

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 4 · NR 4
1977 (323–458)

Postępy Biologii Komórki

Redakcja

PWN – WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 495 + 105 egz. Ark. wyd. 10,5. Ark. druk. 8,5. + wkł. Papier druk. sat. III kl.
80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w lipcu 1977 r. Podpisano do druku w listopadzie
1977 r. Druk ukończono w grudniu 1977 r. Zatr. 1435/77 — G-10. Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

DNA JĄDER NIEKTÓRYCH ORZĘSKÓW

DIETER AMMERMANN

Abteilung für Zellforschung der Universität Tübingen, RFN

WSTĘP

Orzęski charakteryzują się posiadaniem dwóch morfologicznie i fizjologicznie różnych jąder komórkowych. Mikronukleus jest zwykłym diploidalnym jądrem z wyraźnie rozpoznawalnymi chromosomami. Jego podziały nie różnią się istotnie od podziałów u innych *Eukariota*. U niektórych gatunków nie ma widocznie ważnych funkcji podczas cyklu wegetatywnego (np. *Stentor* [51]), ponieważ można go usunąć z komórki bez większej szkody dla niej. U innych gatunków natomiast pełni on istotne funkcje, gdyż po jego usunięciu komórki są mniej lub więcej uszkodzone. U tych gatunków mikronukleus zawiera RNA (niektóre szczepy *Tetrahymena* [42], *Paramecium* [49], [44], *Stylonychia* [4]).

Makronukleus zwykle jest bardzo bogaty w DNA. Tylko u nielicznych gatunków jest on jądrem diploidalnym o mało znanej budowie i sposobie podziału. Zawiera dużo RNA i wiele jądercek, kieruje przemianą materii w komórce. Orzęsek bez makronukleusa jest niezdolny do życia. U niektórych gatunków (np. szczepów amikronuklearnych *Tetrahymena* wyizolowanych ze środowiska naturalnego) makronukleus zdolny jest do nieograniczonej liczby podziałów. Natomiast u innych gatunków musi od czasu do czasu odbyć się proces płciowy, tzw. koniugacja, gdyż inaczej komórki starzeją się i w końcu giną. Podczas koniugacji makronukleusy obu partnerów degenerują. Po zakończeniu mejozy pronukleusy w obu komórkach tworzą synkarion, z którego następnie powstaje mikronukleus i nowy makronukleus, podczas gdy stary zanika. Z tego wynika, że orzęski podobnie jak wiele wyższych *Eukariota* wytworzyły podział funkcji: przekazywanie informacji genetycznej zachodzi poprzez jądra linii płciowej, którą u orzęsków reprezentuje mikronukleus.

Przemianą materii w komórce kieruje makronukleus, który funkcjo-

nuje przez ograniczony czas i odpowiada jądom komórek somatycznych w organizmach wielokomórkowych.

Wydawałoby się, że DNA dwóch tak różnych jąder pochodzących pierwotnie z jednego synkarionu został dokładnie zbadany i porównany. Ale tak właśnie nie jest. Przyczyny są natury metodycznej: dopiero ostatnio u niektórych gatunków udało się oddzielić od siebie oba jądra po ich wyizolowaniu z komórki.

Scharakteryzujemy krótko te gatunki, o których DNA istnieją pewne dane:

a. *Tetrahymena pyriformis*. Problemy z rozdzieleniem jąder nie są jeszcze całkowicie rozwiązane. Frakcja mikronuklearna ciągle zawiera pewien procent (5--15) makronuklearnego DNA [34]. Podczas podziału makronukleusa powstaje często tzw. ciało resztkowe, które łatwo dostaje się do frakcji mikronuklearnej (Portier i Marcaud — informacja ustna). Dalszą trudność stanowi to, że *Tetrahymena pyriformis* jest pojęciem nadrzędnym dla kilku gatunków (syngeny) oraz dla pewnych szczepów rozmnażających się tylko bezpłciowo wskutek braku mikronukleusa, szczepy te są dotąd nie sklasyfikowane.

b. *Paramecium*: „gatunek *aurelia*” także składa się z ponad 12 syngenów i nie można naturalnie rozciągać wyników uzyskanych z badań nad jednym z nich na wszystkie syngeny.

Problem rozdziału jąder (Mi i Ma) w tej grupie jest w zasadzie rozwiązany [22], natomiast badania biochemiczne zwłaszcza nad DNA w mikronukleusie są dopiero w stadium początkowym.

U *Paramecium bursaria*, które również przedstawia grupę gatunków, nie udało się jeszcze rozdzielić jąder.

c. *Oxytricha* i *Stylonychia*: oba należą do zwartego rzędu *Hypotricha* i wykazują zgodność także we właściwościach biochemicznych i cytologicznych. Dla obydwu form opracowano metody pełnego rozdzielenia obydwu jąder [6, 46]. Obiekt opracowywany przez grupę Prescottta uznano ostatnio za gatunek z rodzaju *Oxytricha* [41], podczas gdy we wcześniejszych pracach [12, 46—48] określano go jako *Stylonychia mytilus*. Dlatego nie jest jasne czy tylko część, czy wszystkie wyniki tej grupy publikowane przed rokiem 1974 odnoszą się do *Stylonychia* czy *Oxytricha*.

d. *Stentor coeruleus*: nowsze badania nad DNA zawartym w makronukleusie rozpoczął Pelvat i de Haller w 1975 r., lecz brak jest badań nad mikronuklearnym DNA.

DNA innych gatunków nie było badane. Ten przegląd ma na celu podsumowanie dotychczasowych badań nad DNA zawartym w makro- i mikronukleusie, jak również wskazać na istniejące luki w naszych wiadomościach i zachęcić do dalszych badań.

ZAWARTOŚĆ DNA W JĄDRACH KOMÓRKOWYCH

Dane dotyczące zawartości DNA w makronukleusie i mikronukleusie niektórych gatunków zawarte są w tabeli 1.

TABELA 1. Zawartość DNA w makronukleusach i mikronukleusach różnych orzęsków (metoda mikrospektrofotometryczna)

Rodzaj	Mikronukleus C-wartość = zawartość DNA hapl. genomu w G ₁		Makronukleus w G ₁		Makronuk- leus C-wartość (tzw. stopień poliploidii)	Literatura
	× 10 ⁻¹³ g	× 10 ¹² Dal- tona	× 10 ⁻¹³ g	× 10 ¹² d		
<i>Tetrahymena</i> <i>pyriformis</i> syngen 1	2,2	0,13	100	6	50	[30] [61]
<i>Paramecium</i> <i>aurelia</i> syngen 1, 2, 4, 7, 8	3	0,18	2580	155	860	[30]
syngen 4	3,5	0,21	3010	181	860	[8]
<i>Paramecium</i> <i>bursaria</i>	38	2,25	1500	90	40	[18]
<i>Oxytricha</i> spec.	6,6	0,40	1154	69	175	[41]
<i>Stylonychia</i> <i>mytilus</i> syngen 1	83	5,0	7880	473	95	Lindmayer i Ammer- mann nie publiko- wane
<i>Euplotes</i> <i>mi- nuta</i>	0,7	0,04	859	52	1250	
<i>Stentor</i> <i>coeruleus</i>			27500 — 37500	1650 2250		

Stwierdzono co następuje:

1. Zawartość DNA w makronukleusie dużych orzęsków jest większa niż u małych (u gatunków, które mają makronukleus zbudowany z wielu części sumuje się zawartość wszystkich fragmentów).

2. Zawartość DNA w mikronukleusie nie jest skorelowana z wielkością komórki, np. *Paramecium bursaria* posiada 10 razy więcej DNA w mikronukleusie niż tej samej wielkości *Paramecium aurelia*, które z kolei ma tylko 50% więcej DNA niż malutka *Tetrahymena pyriformis*.

3. Tak różna zawartość DNA w mikronukleusach jest wyrazem tzw. stopnia poliploidyzacji nie związanego ani z wielkością komórki, ani ze stanowiskiem systematycznym gatunku.

Można by przypuścić, że mikronukleusy bogate w DNA są poliploidalne i rzeczywiście u *Paramecium bursaria* znaleziono pewną ilość szczepów charakteryzujących się różną wielkością mikronukleusów; po przeliczeniu chromosomów i pomiarach spektrofotometrycznych uznano te mikronukleusy za poliploidalne [16, 32, 43]. Jednak dla *Stylonychia mytilus* obdarzonej największym mikronukleusem przypuszczenie to wykluczył następujący eksperyment [3]. Wyizolowane z przyrody diploidalne szczepy wytwarzają w mikronukleusie podczas mejozy biwalenty. Jeżeli skrzyżuje się je ze zwierzętami pozbawionymi mikronukleusa, to potomstwo będzie miało mikronukleusy z połową zawartości DNA „haploidy”. Krzyżując je znowu ze szczepami bez mikronukleusa obserwuje się w mejozie tylko uniwalenty, a nie pary chromosomów. Nie znaleziono dotychczas ekskonjugantów z mniejszą zawartością DNA w mikronukleusie niż w haploidalnych klonach rodzicielskich.

Wyniki w tabeli 1 jasno wskazują, iż także u orzęsków obserwuje się duże różnice w wartości C jąder generatywnych, podobnie jak i u wyższych *Eukariota* [50].

CHARAKTERYSTYKA DNA

Charakterystyczną cechą każdego DNA jest skład jego zasad. Orzęski charakteryzują się względnie małą zawartością CG. W żadnym z dotychczas przebadanych gatunków nie znaleziono wyraźnych różnic w zawartości CG między makronukleusem a mikronukleusem: (*Tetrahymena pyriformis* szczep WH-14 [62], *Paramecium aurelia*, syngen 1, 4, 13 [19], *Oxytricha* [12], *Stylonychia mytilus* [6]).

W szczepie WH-14 *Tetrahymena pyriformis* DNA makronukleusa i mikronukleusa wyróżnia się zawartością zasad metylowanej adeniny [33]. Makronuklearny DNA zawiera 0,65—0,87% tych rzadkich zasad, natomiast mikronuklearny DNA wykazuje tylko 10% tej wartości. U *Paramecium aurelia*, Cummings i wsp. [20] nie znaleźli różnic w zawartości metylowanych zasad pomiędzy mikronukleusem i makronukleusem.

Wiele organizmów w swoim DNA zawiera mniejsze frakcje DNA, które mają więcej lub mniej CG niż główna masa DNA. Frakcje te można uwidocznić podczas wirowania w gradiencie CsCl, jako tzw. lekkie lub ciężkie satelity obok głównej masy DNA. Yao i Gorovsky [62] nie znaleźli w makronukleusie i mikronukleusie *Tetrahymena pyriformis* szczep WH-14 żadnego satelitarnego DNA. Co do występowania satelitów u tego orzęska istnieje pewna liczba badań na ten temat, które jednak dotyczą tylko makronukleusa i nie są ze sobą zgodne. Na przykład Sueoka [57] w szczepie GL znalazł jednego satelitę, natomiast Brunk i Honwalt [15] nie znaleźli. W komórkach należących do syngenu 1 Sueoka [57] nie

znalazł żadnych satelitów w przeciwieństwie do Flavella i Jonesa [27], którzy wykazali istnienie jednego satelity. Przyczyny tych rozbieżności są niejasne.

Z doniesień Cummingsa [19] można wywnioskować, że makro- i mikronuklearne DNA u *Paramecium aurelia* syngeny 1, 4 i 13 nie mają satelitarnego DNA. Natomiast Soldo i Godoy [55] znaleźli jednego satelitę w makronukleusie syngenu 8 tego gatunku. Wyniki te są najbardziej jednoznaczne u *Hypotracha*. W mikronuklearnym DNA u *Oxytricha* występują 3—4 satelity, a w makronuklearnym ich nie ma [12]. Mikronuklearne DNA *Stylonychia mytilus* zawiera 4 satelity, natomiast makronuklearne — tylko jednego [6].

Genom wszystkich dotychczas badanych *Eukariota* zawiera oprócz pojedynczych sekwencji DNA (nierepetetywne DNA) także odcinki DNA, które wielokrotnie powtarzają się (repetetywny DNA). Procent repetetywnego DNA w ogólnej masie można ustalić, jeżeli zdenaturowane DNA renaturuje się. Wtedy okazuje się, że szybciej zachodzi renaturacja DNA repetetywnego niż nierepetetywnego. Występowanie repetetywnego DNA w makronukleusie i mikronukleusie przebadano porównawczo tylko u *Hypotracha*. Procentowa zawartość repetetywnego DNA w mikronukleusie u *Stylonychia mytilus* jest większa niż 50% (Steinbruck i wsp. w przygotowaniu) w odróżnieniu do makronukleusa, gdzie go brak [6]. Repetetywność genów r-RNA jest za słaba, żeby można ją wykazać metodami stosowanymi do ustalania kinetyki renaturacji. To samo w zasadzie odnosi się do drugiego przebadanego przedstawiciela *Hypotracha*. Mikronukleus *Oxytricha* zawiera 27% repetetywnego DNA, natomiast makronukleus nie ma go w ogóle [41]. U innych orzęsków istnieją dane odnoszące się tylko do makronuklearnego DNA, lecz bardzo rozbieżne. Procentowa zawartość repetetywnego DNA u *Tetrahymena pyriformis* wynosi 5% syngen 1 [27], 20—25% syngen 1 [1], 10—50% szczep W [60].

Paramecium aurelia: 15% syngeny 1, 2 i 8 [1], 4% syngen 8 [55], 0% syngen 1 (McTavirsh — listowne doniesienie). *Paramecium bursaria*: 13% (prawdopodobnie makro- i mikronukleusy nie rozdzielone [18]). *Stentor coeruleus*: 15% [45].

NIEREPETETYWNY DNA

Spośród frakcji DNA jednego genomu, omawianych w ostatnim rozdziale, najbardziej interesująca jest frakcja sekwencji DNA nierepetetywnych lub niepowtarzalnych, ponieważ najwięcej genów należy do tej frakcji. Tylko nieliczne geny znaleziono we frakcjach średnio repetetywnego DNA (np. geny r-RNA histonowe), podczas gdy wysoce repetetywna część DNA genomu nie zawiera genów, które są transkrybowane i które

by odgrywały istotną rolę w życiu komórki. Ogólna liczba wszystkich zasadowych par w nierepetetywnych sekwencjach DNA została określona przez Wetmura i Davidsona [59] jako kompleks. Kompleksowość nierepetetywnego DNA wyżej zorganizowanych organizmów jest zwykle wyższa niż u prostych [13], co prawdopodobnie jest związane z większą ilością genów. Może być to ustalone poprzez kinetykę renaturacji i oznaczone jako kinetyka kompleksowości. Przy identycznej koncentracji DNA prostego genomu (mniej kompleksów renaturuje szybciej niż DNA bardziej skomplikowanego genomu, ponieważ ułożenie wszystkich sekwencji jest częstsze i dlatego prawdopodobieństwo łączenia się pasujących sekwencji jest wyższe [13]. Przy ustalaniu kinetyki renaturacji istnieją jednak pewne trudności typu metodycznego. Wartości uzyskane dla jednego obiektu różnią się często w zależności od użytej metody (hydroksypatytowa, optyczna, trawienie nukleazą S 1) [14]. Kontrolą do kinetyki denaturacji jest

TABELA 2. Kinetyczna kompleksowość nierepetetywnej frakcji DNA makronukleusa (Ma (dla porównania podano kinetyczną kompleksowość innych organizmów)

Rodzaj	Kinet. kompleks. w Daltonach $\times 10^{10}$	Zawart. DNA/Ma	Literatura
		Kinet. kompleks.	
<i>Tetrahymena</i> szczep T	$\left. \begin{array}{l} 1 \\ 1 \\ 1 \end{array} \right\}$	100 ⁴⁾	[27]
syngen		45	[1]
<i>pyriformis</i>		150	[62] ¹⁾
<i>Paramecium aurelia</i>	$\left. \begin{array}{l} 1, 2, 8 \\ 1 \\ 1 \end{array} \right\}$	540-820	[1]
syngen		1680 ⁵⁾	[55]
		1400 ⁶⁾	[21]
<i>Paramecium bursaria</i>		563	[17] ²⁾
<i>Oxytricha</i> spec.		2200	[41]
<i>Stylonychia mytilus</i>		14000	Steinbrüeck i wsp. (w przygotowaniu)
<i>Stentor coeruleus</i>		ca 27000	³⁾
<i>E. coli</i>			[31]
<i>Dictyostelium</i>			[26]
<i>Drosophila melanogaster</i>	$\left. \begin{array}{l} 4,8 \\ 6,8 \\ 8,5 \end{array} \right\}$		[10]
			[39]
			[40]
<i>Drosophila hydei</i>			[23]

1) Wyliczone na podstawie danych zawartych w pracy Yao i Gorovskiego [62].

2) Skalkulowane w oparciu o dane dla kinetycznej kompleksowości [45] i osobne pomiary zawartości DNA (patrz tab. 1).

3) Makro- i mikronukleusy widocznie były nie rozdzielone. Nie jest jasne, czy w czasie wyliczania CG-czynnik zostały uwzględnione.

4) Autorzy wychodzą w swoich kalkulacjach tylko od $4,3 \cdot 10^{12}$ d DNA/Ma, tj. mniej niż to zostało ustalone przez innych amatorów (patrz tab. 1).

5) Autorzy wychodzą tylko z $66 \cdot 10^{12}$ d DNA/Ma.

6) Autorzy wychodzą tylko z $42 \cdot 10^{12}$ d DNA/Ma.

zwykle DNA o znanej kompleksowości (najczęściej *Escherichia coli*). Porównanie obydwu kinetyk jest możliwe tylko przy identycznym składzie zasad. Jeżeli różnice pomiędzy DNA *E. coli* i próbek nie są duże, to można je skorygować według metody Wetmura i Davidsona [59]. Czasami trudno jest ustalić granicę między średnio repetetywnymi i nierepetetywnymi sekwencjami DNA, ponieważ jest ona płynna. W tabeli 2 umieszczono dotychczas ustalone wartości kinetycznej kompleksowości makronuklearnego DNA. Dane o kinetycznej kompleksowości niepowtarzalnego DNA służą tylko do sprawdzenia stopnia poliploidyzacji obliczonego z pomiarów DNA (tabela 1). Najłatwiej byłoby porównać kinetykę kompleksowości nierepetetywnego DNA w mikronukleusie z makronuklearnym DNA. Niestety, nie jest to możliwe, ponieważ kinetyka kompleksowości nierepetetywnego DNA mikronukleusa nie jest dotychczas dokładnie ustalona. Dla obydwu dotąd przebadanych *Hypotracha* mamy wprowadzić dane o procentowej zawartości repetetywnego DNA w mikronukleusie, ale ze względów metodycznych (granica między słabo repetetywnym i nierepetetywnym DNA jest płynna) nie są one na tyle dokładne, aby ustalić wielkość frakcji nierepetetywnego DNA. Stopień poliploidii można wyliczyć stosując inną metodę. Iloraz zawartości nierepetetywnego DNA makronukleusa do kompleksowości (patrz tabela 2 kol. 2) można porównać ze stopniem poliploidalności (tabela 1, kol. 5). U obydwu dotychczas badanych orzęsków występują uderzające różnice. Wskazują one, iż makronukleus nie zawiera po prostu powielonego genomu mikronukleusa, lecz tylko niepowtarzalny DNA z mikronukleusa lub tylko jego część, lecz w tym ostatnim przypadku silnie zwielokrotnioną. Ocena odpowiednich obliczeń u *Tetrahymena pyriformis* i *Paramecium aurelia* jest trudniejsza, gdyż:

1. procentowa zawartość repetetywnego DNA w makronukleusie nie jest dokładnie znana oraz

2. autorzy podający te obliczenia wychodzą z różnych wartości szczególnie dla zawartości DNA w makronukleusie (patrz tabela 2).

Tak więc Allen i Gibson [1], na podstawie obliczonych wysokich wartości dla „kinetycznej kompleksowości”, doszli do wniosku, iż u *Tetrahymena pyriformis* i *Paramecium aurelia* makronukleus posiada w rzeczywistości kompletne mikronuklearne genomy. Ich liczbę ustalono poprzez określenie stopnia poliploidii. Natomiast wartości podawane przez innych autorów (tabela 2) wystarczają moim zdaniem na wyciągnięcie wniosków przeciwnych, a mianowicie, że podobnie jak u *Hypotracha*, tak u *Tetrahymena* i *Paramecium* stopień poliploidii jest mniejszy niż liczba jednostek określonych poprzez „kinetyczną kompleksowość” makronukleusa. Konsekwentnie więc będę wyróżniał dalej „genom mikronuklearny” (który odpowiada wartości C, a więc zmierzonej spektrofotometrycznie zawar-

tości DNA dla jednego haploidalnego jądra w fazie G_1 — patrz tabela 1, kol. 1) oraz „genom makronuklearny” (którego wielkość jest wyliczona w oparciu o kinetykę kompleksowości nierepetetywnego DNA, jak to podano w tabeli 3, plus kinetyczna kompleksowość ewentualnie istniejącej części repetetywnego DNA).

GENY RYBOSOMALNE

Najelegantszą metodą porównania makronukleusa i mikronukleusa jest stwierdzenie, czy w obydwu jądrach występują pewne określone geny. Jednak ze względów metodycznych można w ten sposób badać tylko niektóre geny, najłatwiej geny DNA rybosomalnego. Przeprowadzono takie badania dla 17 S i 25 S-RNA. Wyniki podano w tabeli 3. Liczba rybo-

TABELA 3. r-RNA geny (dla 17S i 25S) w jądrach różnych orzęsków (część ich (w procentach) do ogólnej ilości DNA i ich liczby)

Rodzaj	Mikronukleusy	Makronukleusy	Literatura
<i>Tetrahymena pyriformis</i> szczep GL	—	log-faza: 0,32% = 170 genów hapl. Ma-genom	[25]
syngen 1	0,03% = 1–10 genów hapl. Mi-genom	stacj. faza: 30–40% mniej 0,3% = 200 genów/Ma-genom ≈ 9000 genów/Ma	[63]
<i>Paramecium aurelia</i> syngen 1	—	0,14% = 30–35 genów/Ma-genom ≈ 66000 genów/Ma	[21]
<i>Stylonychia mytilus</i> syngen 1	0,0043% = 110 genów hapl. Mi-genom	0,26% = 44 genów/Ma-genom = 610000 genów/Ma	Steinbrüeck (w przygotowaniu)

somalnych genów w dobrze rosnącej (log-)hodowli *Tetrahymena* jest wyższa niż w fazie stacjonarnej. Rybosomalne geny w makronukleusie tych orzęsków są wolne, a nie ułożone w chromosomach [29]. Cummings [22] stwierdził taką samą liczbę genów r-RNA u *Paramecium aurelia* w różnych fazach (stacjonarnej i wzrostu). Wyniki podane w tabeli 3 wskazują, iż makronukleusy i mikronukleusy *Tetrahymena pyriformis* i *Stylonychia mytilus* różnią się ilością genów r-RNA. Udział r-DNA w całkowitym DNA u obydwu gatunków jest dziesięciokrotnie wyższy w makronukleusach niż w mikronukleusach. Te różnice w liczbie genów r-RNA wynikają prawdopodobnie ze zróżnicowanej replikacji tych odcinków DNA podczas rozwoju nowego makronukleusa po koniugacji.

CIEŻAR MOLEKULARNY DNA

Cieźar cząsteczkowy DNA jest trudno określić, ponieważ w dużej mierze zależy od metody izolacji. Dlatego też i rozrzuty ciężaru cząsteczkowego DNA orzęsków są dość znaczne w zależności od stosowanej metody izolacji.

Dotychczas znana jest jedna praca, w której opisano różnice w ciężarze molekularnym DNA mikronukleusa i makronukleusa [46]. Ciężar molekularny makronuklearnego DNA u orzęska prawdopodobnie z rodzaju *Oxytricha* wynosi tylko $1,5 \cdot 10^6 d$ (wahania w granicach $1-1,95 \times 10^6 d$), jego długość zmierzona w mikroskopie elektronowym wynosi $0,2-2,2 \mu m$ (średnio $0,8 \mu m$). Natomiast na zdjęciach z mikroskopu elektronowego długość nici DNA w mikronukleusie wynosi ponad $15 \mu m$. Nasze próby określenia ciężaru molekularnego DNA w mikronukleusie i makronukleusie *Stylonychia*, na podstawie metod biochemicznych oraz mikroskopii elektronowej, nie wskazują na tak duże różnice w obydwu jądrach [6]. Jednakże i dla nas uderzający był fakt, iż o wiele jest trudniej otrzymać wysokocząsteczkowe DNA z makronukleusa *Stylonychia* niż z makro- i mikronukleusów innych orzęsków. Ta niezgodność w wynikach badań jest dotychczas nie wyjaśniona. Przypuszcza się, że niektóre *Hypotricha* mogą zawierać szczególnie aktywne DNA-zy.

DYSKUSJA

Na postawione we wstępie pytanie, czy istnieją różnice między DNA generatywnego mikronukleusa i somatycznego makronukleusa, trudno jednoznacznie odpowiedzieć. U obydwu *Hypotricha* — *Stylonychia* i *Oxytricha* — makronukleus różni się od mikronukleusa następującymi właściwościami: nie zawiera repetetywnego DNA, a tylko nierepetetywne, satelitarne DNA jest zredukowane, lub brak go zupełnie, kinetyczna kompleksowość „genów makronuklearnych” jest o wiele mniejsza, liczba genów rybosomalnych jest różna (znana tylko u *Stylonychia*). Powstanie tej różnicy jest u obydwu tych rodzajów przebadane i znane [3, 6, 56]. Podczas rozwoju makronukleusa z diploidalnego mikronukleusa, zbędna część DNA zostaje rozłożona i wyeliminowana, pozostała część — powielona. Z pierwotnie istniejących w mikronukleusie sekwencji tylko mała część (szacunkowo u *Stylonychia* 1,5%, u *Oxytricha* 3%) nierepetetywnego DNA przechodzi do makronukleusa. U innych dotychczas przebadanych orzęsków te stosunki nie są tak jasne. Dla *Tetrahymena pyriformis* znane są dwie różnice: część metylowanych zasad w całości DNA i liczba genów rybosomalnych jest różna w obydwu jądrach. Stopień poliploidyzacji obliczony na podstawie zawartości DNA (tabela 1) nie zgadza się

z wartościami w tabeli 2, kol. 2. Z wyników opublikowanych przez Yao i Gorovski'ego [62] można obliczyć kinetyczną kompleksowość makronukleusa (po korekturze CG): wynosi ona od $4 \cdot 10^{10}$ d. Genom mikronuklearny jest duży — $13 \cdot 10^{10}$ (patrz tabela 1), nie jest to jednak zgodne z innymi wynikami tych autorów, którzy podają, że 80—90% sekwencji makronukleusa i mikronukleusa jest zgodnych (identycznych). Rozwój nowego makronukleusa po koniugacji u tego gatunku charakteryzuje równomierny wzrost DNA, bez obecności fazy rozkładu DNA (Zech — dane nie publikowane).

Zupełnie brak jest danych o DNA mikronukleusa u *Paramecium aurelia*. Kinetyczna kompleksowość makronuklearnego DNA wynosi $2,5—3 \cdot 10^{10}$ d ([21], McTavish — doniesienie listowne) i jest znacznie mniejsza niż wyliczana przez wielu autorów zawartość DNA w genomie haploidalnego mikronukleusa $18—21 \cdot 10^{10}$ d (patrz tabela 1). Te wyliczenia mogłyby być wskazówką, że u *Paramecium aurelia* tylko część mikronuklearnego genomu przechodzi do makronukleusa. Rozwój nowego makronukleusa, podobnie jak i u *Tetrahymena*, przebiega bez widocznej fazy rozkładu DNA [9]. Natomiast Schwartz i Meister [52] znaleźli ubytek DNA u *Paramecium bursaria* w trakcie rozwoju nowego makronukleusa. Zjawisko to stwierdzono również u *Hypotricha*. Można więc przypuszczać, że także u *Paramecium* istnieją różnice między DNA zawartym w makronukleusie i mikronukleusie. Z tabeli 2 wynika, że makronuklearny genom orzęsków jest około 10—20 razy większy niż genom *E. coli* (nie uwzględniono zawyżonych wartości [1]). Ta wielkość odpowiada mniej więcej wielkości genomów mikronuklearnych niektórych orzęsków, np. *Tetrahymena pyriformis* i *Euplotes minuta* (patrz tabela 1). Mikronukleus tych orzęsków zawiera widocznie sekwencje genomu makronuklearnego lub niewiele ponadto. Dlatego też podczas rozwoju nowego makronukleusa potrzebne są niewielkie zmiany, które cytologicznie i spektrofotometrycznie są prawie niezauważalne. Orzęski z mikronukleusem bardzo bogatym w DNA posiadają dodatkowy DNA (oprócz genomu makronuklearnego), który jak stwierdzono u *Hypotricha* składa się w przeważającej części z repetetywnego DNA. Dlatego też u tych orzęsków zachodzą wyraźne przemiany w strukturze DNA podczas rozwoju nowego makronukleusa. Takie fazy reorganizacji DNA połączone z jego rozkładem odkryto na razie tylko u gatunków mających największe mikronukleusy (*Stylonychia mytilus* i *Paramecium bursaria*). Pomimo, niewielkiej liczby dotychczas przebadanych gatunków można przypuszczać, że u wielu orzęsków ma miejsce mniej lub bardziej intensywne przeorganizowanie DNA podczas rozwoju nowego makronukleusa. To przypuszczenie należałoby poprzeć badaniem następnych gatunków orzęsków.

Nasuwa się pytanie, jaką korzyść mają orzęski z mikronukleusami

obfitującymi w DNA, z dodatkowej jego ilości. *Stylonychia* i *Euplotes* nie różnią się zasadniczo ani trybem życia, ani przebiegiem koniugacji, ani procesem starzenia się itp. To samo odnosi się do obydwu rodzajów *Paramecium*. Do czego więc jest potrzebne niektórym rodzajom orzęsków ten dodatkowy DNA zlokalizowany w mikronukleusie? To samo pytanie można by postawić co do wielu roślin wyższych i zwierząt, u których spotykane są duże różnice w zawartości DNA nawet u gatunków blisko spokrewnionych.

Hipotezy odnoszące się do funkcjonowania repetetywnego DNA zebrał Bostock [11] i wyczerpująco je przedyskutował. Można je podzielić na trzy grupy:

1. Hipotezy, które repetetywnemu DNA przypisują funkcje w cyklu wegetatywnym komórki, np. replikacja DNA, transkrypcja, regulacja.
2. Hipotezy, które repetetywnemu DNA przypisują rolę przy rozmnażaniu płciowym, np. łączenie się chromosomów i rekombinacja.
3. Pozostałe hipotezy, według których np. repetetywne DNA byłoby surowcem dla powstania zróżnicowania genetycznego.

Wyniki badań u *Hypotricha* przeczą moim zdaniem hipotezie pierwszej. Dla komórki makronukleus jest ważny podczas całego cyklu komórkowego. Natomiast komórki mogą żyć bez mikronukleusa. Makronukleus nie zawiera repetetywnego DNA w ilościach dających się wykryć. Dwaj przebadani przedstawiciele *Hypotricha* są, jak się wydaje, dotychczas jedynymi znanymi komórkami eukariotycznymi, których jądra nie zawierają repetetywnego DNA. Do pozostałych hipotez trudno się ustosunkować. Dotychczasowe wyniki badań przeprowadzonych na orzęskach nie popierają żadnej ze znanych hipotez.

Podobnie i u zwierząt wyższych. Znaleziono pewne grupy zwierzęce, których jądra generatywne zawierają dodatkowe DNA, podczas gdy go brak w jądrach somatycznych, np. *Ascaris* [58], *Cyclops* [7], *Cynipoida* [38]. Prawdopodobnie we wszystkich tych grupach DNA odgrywałoby rolę podczas spermatogenezy czy oogenezy. To przypuszczenie nie zostało jednak ani potwierdzone, ani zaprzeczone najczęściej ze względów metodycznych. W związku z tym interesujące są badania nad *Drosophila* (podsumowanie [36, 37]). Znajdujący się w jądrach somatycznych chromosom Y nie pełni tam żadnej funkcji w jądrach, w których pozostałe chromosomy są politeniczne, jest bardzo mały wskutek niedoszłej replikacji. Pełni on tylko jedną, ale bardzo ważną funkcję podczas spermatogenezy. W oparciu o te dane można przypuszczać, że także u orzęsków dodatkowe DNA pełni jakąś funkcję podczas rozwoju po koniugacji i w okresie występowania chromosomów politenicznych. Jednakże dotychczasowe prace przeczą temu twierdzeniu. Na początku koniugacji, a krótko przed swoim rozpadem, makronukleus *Stylonychia* syntetyzuje dużą ilość „długo żyją-

cego m-RNA”, które kieruje większością procesu rozwojowego aż do wytworzenia nowego makronukleusa [53, 54]. Podczas rozwoju eks-koniuganta zarówno makronukleus, jak i związek makronukleusa mógłby syntetyzować dalszy niezbędny dla życia RNA. Jednak nie jest jasne, czy rzeczywiście mikronukleus podczas tej fazy syntetyzuje RNA.

Pierwsze badania jąder przed, podczas i po mejozie nie dały żadnych informacji dotyczącej syntezy RNA. Związek makronukleusa u *Stylonychia* syntetyzuje widocznie RNA podczas swojego rozwoju [2], ale tylko znikome ilości (według Ammermanna — dane nie opublikowane). W każdym razie można by się spodziewać silniejszej syntezy RNA, gdyby ponad 90% zredukowanego później DNA było w tym stadium aktywne. Zresztą trzeba podkreślić fakt, że również gatunki z mikronukleusami ubogimi w DNA i prawdopodobnie zawierającymi mało dodatkowego DNA mogą efektywnie koniugować, np. *Euplotes minuta*.

W wielu podręcznikach przedstawia się jeszcze makronukleus jako typowe jądro poliploidalne, które dzieli się amitotycznie. Zaprzeczał temu już Grell w 1950 r. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wyraźnie wskazują, iż przynajmniej u niektórych gatunków makronukleus nie jest poliploidalny, ponieważ nie zawiera wielokrotności mikronuklearnego genomu. Trzeba jednak jeszcze wielu badań, zanim zrozumiemy lepiej budowę i funkcję tego typu jądra.

LITERATURA

- [1] ALLEN S., GIBSON J., Genome Amplification and Gene Expression in the Ciliate Macronucleus. *Biochem. Genet.*, **6**: 193—313, 1972.
- [2] ALONSO P., JARENO A., Incorporation de Uridina- H^3 en el Esbozo Makronuclear de *Stylonychia mytilus*, *Microbiol. Espan.*, **27**: 199—211, 1974.
- [3] AMMERMANN D., Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus* Ehrenberg, *Arch. Protistenkd.*, **108**: 109—152, 1965.
- [4] — The Micronucleus of the Ciliate *Stylonychia mytilus*, its Nucleic Acid Synthesis and its Function, *Exp. Cell Res.*, **61**: 6—12, 1970.
- [5] — Morphology and Development of the Macronuclei of the Ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*, *Chromosoma*, **33**: 209—238, 1971.
- [6] AMMERMANN D., STEINBRUECK G., BERGER L. V., HENNIG, The Development of the Macronucleus in the Ciliated Protozoan *Stylonychia mytilus*, *Chromosoma*, **45**: 401—429, 1974.
- [7] BEERMANN S., A Quantitative Study of chromatin Diminution in Embryonic Mitoses of *Cyclops furcifer*, *Genetics*, **54**: 567—576, 1966.
- [8] BEHME R. J., BERGER J. D., The DNA content of *Paramecium aurelia*, *J. Protozool.*, **17**: 20, 1970.
- [9] BERGER J. D., Nuclear Differentiation and Nucleic Acid Synthesis in Well-fed exconjugants of *Paramecium aurelia*, *Chromosoma*, **42**: 247—268, 1973.

- [10] BONNER J., WU J.R., A Proposal for the Structure of the *Drosophila* Genome, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **70**: 535—537, 1973.
- [11] BOSTOCK C., Repetitious DNA, [in:] Adv. Cell Biology, **2**: 153—223, 1972.
- [12] BOSTOCK C. I., PRESCOTT D. M., Evidence of Gene Diminution during the Formation of the Macronucleus in the Protozoan, *Stylonychia*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **69**: 139—142, 1972.
- [13] BRITTEN R. J., KOHNE D. E., Repeated Sequences in DNA, Science (Wash.), **161**: 529—540, 1968.
- [14] BRITTEN R. J., GRAHAM D. E., NEUFELD B. R., Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation, [in:] Methods in Enzymology, Vol. XXIX, 363—418, 1974.
- [15] BRUNK C. F., HANVALT P. C., Mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*, Exp. Cell Res., **54**: 143—149, 1969.
- [16] CHEN T. T., Polyploids in *Paramecium bursaria*, Proc. Acad. Sci. (USA), **26**: 239—240, 1940.
- [17] CULLIS C. A., The Basis of Cell-to-Cell Transformation in *Paramecium bursaria*, J. Cell Sci., **11**: 611—619, 1972.
- [18] — DNA Amounts in the Nuclei of *Paramecium bursaria*, Chromosoma, **40**: 127—133, 1973.
- [19] CUMMINGS D. J., Isolation and Partial Characterization of Macro- and Micronuclei from *Paramecium aurelia*, J. Cell Biol., **53**: 105—115, 1972.
- [20] CUMMINGS D. J., TAIT A., GODDARD J. M., Methylated Bases in DNA from *Paramecium aurelia*, Biochim. Biophys. Acta, **374**: 1—11, 1974.
- [21] CUMMINGS D. J., Studies on Macronuclear DNA from *Paramecium aurelia*, Chromosoma, **53**: 191—208, 1975.
- [22] CUMMINGS D. J., TAIT A., The Isolation of Nuclei from *Paramecium aurelia*, Methods in Cell Biol., **IX**: 281—309, 1975.
- [23] DICKSON E., BOYD J. B., LAIRD C. D., Sequence Diversity of Polytene Chromosome DNA from *Drosophila hydei*, J. Mol. Biol., **61**: 615—625, 1971.
- [24] ENGBERG J., MOWAT D., PEARLMAN R. E., Preferential Replication of the Ribosomal RNA Genes during a Nutritional Shift-Up in *Tetrahymena pyriformis*, Biochim. Biophys. Acta, **272**: 312—320, 1972.
- [25] ENGBERG J., PEARLMAN R. E., The Amount of Ribosomal RNA Genes in *Tetrahymena pyriformis* in Different Physiological States, Eur. J. Biochem., **26**: 393—400, 1972.
- [26] FIRTEL R. A., BONNER J., Charakterization of the Genome of the Cellular Slime Mold *Dictyostelium discoideum*, J. Mol. Biol., **66**: 339—361, 1972.
- [27] FLAVELL R. A., JONES I. G., Kinetic Complexity of *Tetrahymena pyriformis* Nuclear Deoxyribonucleic Acid., Biochem. J., **116**: 155—157, 1970.
- [28] — DNA from Isolated Pellicles of *Tetrahymena*, J. Cell Sci., **9**: 719—726, 1971.
- [29] GALL J. G., Free Ribosomal RNA Genes in the Macronucleus of *Tetrahymena*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), **71**: 3078—3081, 1974.
- [30] GIBSON J., MARTIN N., DNA Amounts in the Nuclei of *Paramecium aurelia* and *Tetrahymena pyriformis*, Chromosoma, **35**: 374—382, 1971.
- [31] GILLIS M., De LEY J., De CLEEVE M., The Determination of Molecular Weight of Bacterial Genome DNA from Renaturation Rates, Eur. J. Biochem., **12**: 143—153, 1970.
- [32] GOLIKOWA M. N., Cytophotometrical Study of DNA Amounts in Micronucleus of *Paramecium bursaria*, Acta Protozool., **13**: 109—120, 1974.

- [33] GOROVSKY M. A., HATTMAN S., PFLEGER G. L., (⁶N)-Methyl Adenine in the Nuclear DNA of a *Eucaryote*, *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **56**: 697—701, 1973.
- [34] GOROVSKY M. A., YAO M. C., KEEVERT J. B., and PFLEGER G. L., Isolation of Micro- and Macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*, *Methods in Cell Biol.*, **IX**: 311—327, 1975.
- [35] GRELL K. G., Der Kerndualismus der Ciliaten und Suctorien, *Naturwissenschaften*, **37**: 347—356, 1950.
- [36] HENNIG W., MEYER G. F., HENNIG I., LEONCINI O., Chromosome of *Drosophila hydei*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**: 673—683, 1974.
- [37] HESS O., Y-linked Factors Affecting Male Fertility in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*, [in:] R. King (Edit.) „Handbook of Genetics”, **3**: 747—756, Plenum Publ. Co, New York 1975.
- [38] KUNZ W., ECKHARDT R. A., The Chromosomal Distribution of Satellite DNA in the Germ-line and Somatic Tissues of the Gall Midge, *Heteropeza pygmena*, *Chromosoma*, **47**: 1—19, 1974.
- [39] LAIRD C. D., McCARTHY B. J., Molecular Charakterization of the *Drosophila* Genome, *Genetics*, **63**: 865, 1969.
- [40] LAIRD C. D., Chromatid Structure Relationship between DNA Content and Nucleotide Sequence Diversity, *Chromosoma*, **32**: 378—406, 1971.
- [41] LAUTH M. P., SPEAR M. P., HEUMANN J., PRESCOTT D. M., DNA of *Ciliated, Protozoa*: DNA Sequence Diminution during Macronuclear Development of *Oxytricha*, *Cell.*, **7**: 67—74, 1976.
- [42] MURTI K. G., PRESCOTT D. M., Micronuclear Ribonucleic Acid in *Tetrahymena pyriformis*, *J. Cell Biol.*, **47**: 460—467, 1970.
- [43] OSSIPOV D. V., BORCHSENIUS O. N., Peculiarities of the Micronuclear Poliploids in Ciliata (*Protozoa*), *Tsitologia*, **15**: 243—253, 1973.
- [44] PASTERNAK J., Differential Genic Activity in *Paramecium aurelia*, *J. Exp. Zool.*, **165**: 395—418, 1967.
- [45] PELVAT G., de HALLER G., Isolation and Characterisation of Macronuclear DNA from *Stentor coeruleus*, *J. Protozool.*, **22**: 84A, 1975.
- [46] PRESCOTT D. M., BOSTOCK C. J., MURTI K. G. LAUTH M. R., GAMOW E., DNA of Ciliated, *Protozoa*, *Chromosoma*, **34**: 355—366, 1971.
- [47] PRESCOTT D. M., MURTI K. G., BOSTOCK C. J., Genetic Apparatus of *Stylonychia* sp., *Nature*, **242**: 597—600, 1973.
- [48] PRESCOTT D. M., MURTI K. G., Chromosome Structure in Ciliated Protozoans, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**: 609—618, 1974.
- [49] RAO M. V. N., PRESCOTT D. M., Micronuclear RNA Synthesis in *Paramecium caudatum*, *J. Cell Biol.*, **33**: 281—285, 1967.
- [50] ROSBACH M., FORD P. J., BISHOP J. O., Analysis of the C-Value Paradox by Molecular Hybridization, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **71**: 3746—3750, 1974.
- [51] SCHWARTZ V., Versuche über Regeneration und Kerndimorphismus bei *Stentor coeruleus* Ehrbg., *Arch. Protistenkd.*, **85**: 100—139, 1935.
- [52] SCHWARTZ V., MEISTER H., Die Extinktion der feulgengefärbten Makronukleusanlage von *Paramecium bursaria* in der DNA-armen Phase, *Arch. Protistenkd.*, **117**: 60—64, 1975.
- [53] SAPRA G. R., AMMERMANN D., RNA Synthesis and Acquisition of Actinomycin D Insensitivity during Conjugation in *Stylonychia mytilus*, *Exp. Cell Res.*, **78**: 168—174, 1973.

- [54] — An Analysis of the Development Program in Relation to RNA Metabolism in the Ciliate, *Stylonychia mytilus*, Dev. Biol., 36: 105—112, 1974.
- [55] SOLDO A. T., GODOY G. A., The Kinetic Complexity of *Paramecium* Macronuclear Deoxyribonucleic Acid., J. Protozool., 19: 673—678, 1972.
- [56] SPEAR B. B., LAUTH M. R., Polytene Chromosomes in Oxytricha: Biochemical and Morphological Changes during Macronuclear Development in a Ciliated Protozoan, Chromosoma, 54: 1—13, 1976.
- [57] SUEOKA N., Compositional Correlation between Deoxyribonucleic Acid and Protein, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXVI: 35—43, 1961.
- [58] TOBLER H., SMITH K. D., URSPRUNG H., Molecular Aspects of Chromatin Elimination in *Ascaris lumbricoides*, Dev. Biol., 27: 190—203, 1972.
- [59] WETMUR J. G., DAVIDSON N., Kinetics of Renaturation of DNA, J. Biol., 31: 349—370, 1968.
- [60] WILLE J. J., Physiological Control of DNA Nucleotide Sequence Redundancy in the Eukaryote, *Tetrahymena pyriformis*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 46: 677—684, 1972.
- [61] WOODARD J. E., KANESHIRO E., GOROVSKY M. A., Cytochemical studies on the Problem of Macronuclear Subnuclei in *Tetrahymena*, Genetics, 70: 251—260, 1972.
- [62] YAO M. C., GOROVSKY M. A., Comparison of the Sequences of Macro- and Micronuclear DNA of *Tetrahymena pyriformis*, Chromosoma, 48: 1—18, 1974.
- [63] YAO M. C., KIMMEL A. R., GOROVSKY M. A., A Small Number of Cistrons for Ribosomal RNA in the Germinal Nucleus of a Eukaryote, *Tetrahymena pyriformis*., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 71: 3082—3086, 1974.

Otrzymano: 26 stycznia 1977.

Przyjęto: 13 maja 1977.

Adres autora: Auf der Morgenstelle 28, D 7400, Tübingen, RFN.

POSTULOWANE MECHANIZMY POWSTAWANIA WZORÓW PRAŻKOWYCH W CHROMOSOMACH METAFAZOWYCH

Henryk HÜBNER i Andrzej K. KONONOWICZ

Zakład Biologii, Instytut Biologiczno-Morfologiczny, Wojskowa Akademia Medyczna,
Łódź

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet
Łódzki

Streszczenie. W artykule przedstawiono aktualne poglądy na mechanizmy powstawania wzorów prążkowych chromosomów metafazowych. Dotychczasowe badania wykazały, że DNA chromosomów utrwalonych płynem Carnoy posiada natywną strukturę, chociaż w trakcie niektórych metod obróbki wstępnej preparatów ma miejsce jego przejściowa denaturacja. Utrwalanie płynem Carnoy powoduje usunięcie z chromatyny białek, przede wszystkim histonowych, oraz ekstrakcję niewielkiej ilości DNA, które to zmiany są pogłębiane w trakcie przygotowywania preparatów do wybarwiania poszczególnych typów wzorów prążkowych. Na podstawie badań nad lokalizacją poszczególnych typów prążków oraz porównania tych wyników z rozmieszczeniem rodzajów powtarzalnego DNA, wskazuje się na istotną rolę powtarzalnego DNA w powstawaniu wzorów prążków C, Q i G. Istotny postęp w poznaniu mechanizmów powstawania wzorów prążkowych chromosomów metafazowych został również dokonany na drodze analizy czasu replikacji DNA poszczególnych typów prążków. Wykazano, że jaskrawo fluoryzująca heterochromatyna replikowana jest późno, natomiast niefluoryzujące międzyprążki — we wczesnej fazie S. Badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów łączenia się fluorochromów z DNA wykazały zależność tego zjawiska od składu zasad, a także od jego jedno- lub dwuniciowej budowy. Na powstawanie prążków Q wywierają także wpływ białka chromatynowe, a przede wszystkim konformacja dezoksynukleoproteidu. Zmiany konformacji wydają się być głównym czynnikiem indukującym powstawanie wzoru prążkowego G, a także C, R i innych. Wybarwienie prążków C wymaga usunięcia z chromosomów znacznych ilości DNA. Ze składników barwnika Giemsy istotną rolę w powstawaniu prążków odgrywają jedynie związki azurowe. Dotychczasowe wyniki wskazują także na różnice w mechanizmach wybarwiania się centromerowych i niecentromerowych prążków C, które są prawdopodobnie spowodowane różnicą składu zasad. W artykule omówiono ponadto niektóre poznane mechanizmy wybarwiania prążków R, T, N i D.

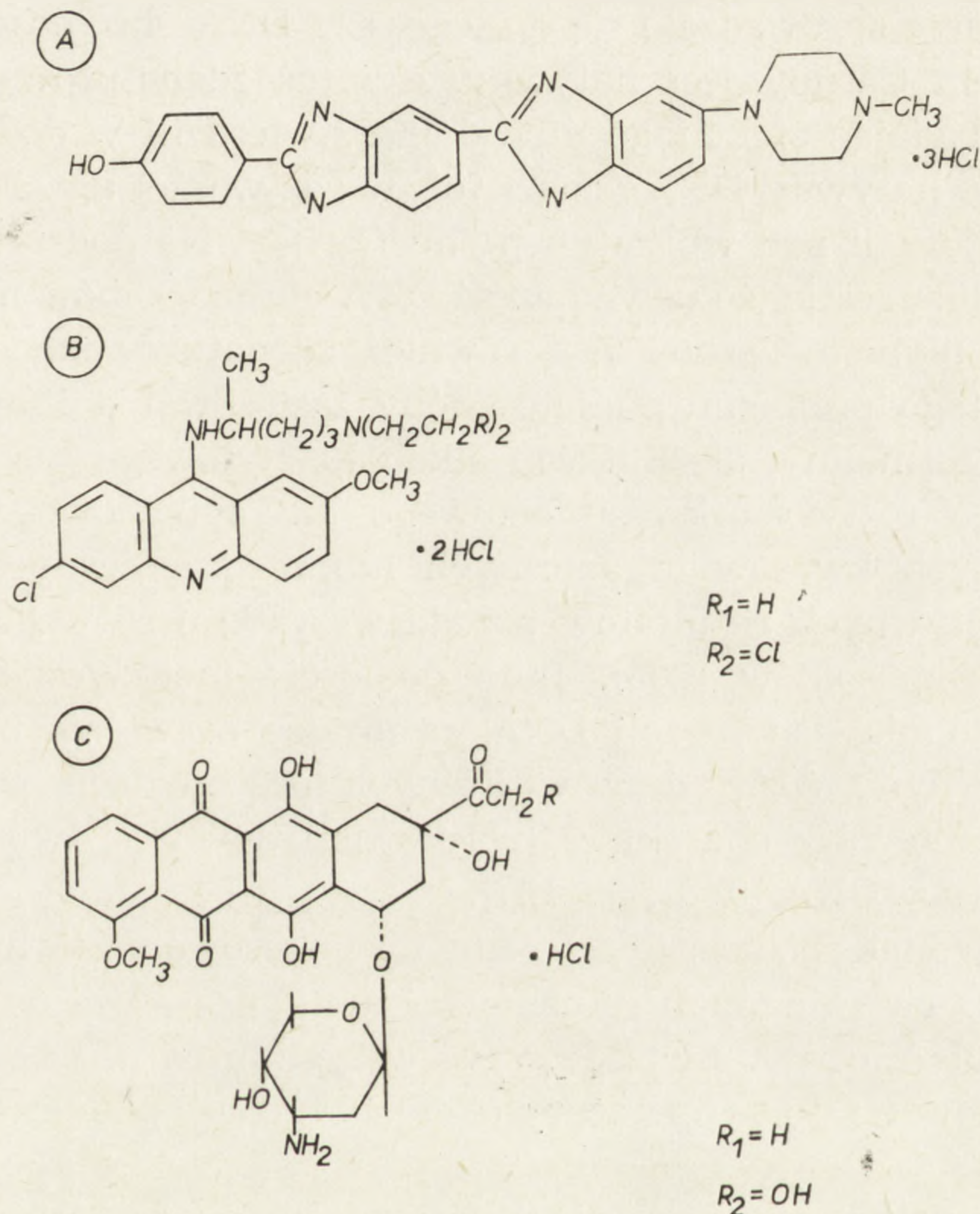
WSTĘP

Dokonany w ostatnich latach postęp w dziedzinie cytogenetyki człowieka, zwierząt i roślin został zapoczątkowany przez Casperssona i wsp. [21—26] wykazaniem zróżnicowanej zdolności wiązania się niektórych pochodnych akrydyny z eu- i heterochromatyną. Efektem tej zróżnicowanej barwliwości jest charakterystyczne poprzeczne zróżnicowanie chromosomów podziałowych. Lokalizacja prążków okazała się stałą i powtarzalną cechą chromosomów. Metoda fluorescencyjna pozwoliła w krótkim czasie na opracowanie nowych kryteriów identyfikacji chromosomów homologicznych [27, 28], a ponadto stała się niezwykle przydatna w rozpoznawaniu aberracji kariotypu [29, 42, 59, 106, 110, 122]. Barwienie płytek metafazowych fluorochromem i ocena uzyskanych w ten sposób prążków Q ujawniła również nowe rodzaje polimorfizmu chromosomowego, dotyczącego zarówno szerokości obszarów wybarwiających się, jak i niefluoryzujących międzyprążków. Poza morfologicznym polimorfizmem niektórych prążków Q już pierwsze badania wykazały, że wybarwiają się one z różną intensywnością i w związku z tym fluoryzują słabo, miernie, silnie lub bardzo silnie. Zech [157] stwierdziła, że spośród chromosomów mitotycznych człowieka szczególnie jaskrawą fluorescencją wykazuje distalna część ramienia długiego heterochromosomu Y. Pearson i wsp. [120] udowodnili z kolei, że jaskrawa fluorescencja tego chromosomu jest widoczna także w komórkach interfazowych, co było pierwszym dowodem na to, że nowa metoda barwienia pozwala również na dokonywanie obserwacji chromatyny w jądrach komórek międzypodziałowych.

Fluorescencyjna metoda analizy prążków Q posiada pewne niedogodności, które spowodowały poszukiwania innych możliwości wybarwienia wzoru prążkowego chromosomów mitotycznych. W 1971 r. Chaudhuri i wsp. [32], Drets i Shaw [43], Schnedl [130] oraz Sumner i wsp. [141] wykazali, że możliwe jest wybarwienie zróżnicowanego wzoru prążkowego chromosomów metafazowych barwnikiem Giemsy lub Leishmana, jednak pod warunkiem, że zastosuje się odpowiednią wstępną obróbkę preparatów. Okazało się wkrótce, że pomiędzy nowym wzorem prążków G, a znanym już wzorem prążków Q istnieją jedynie nieliczne różnice.

Pardue i Gall [115] stwierdzili w 1970 r., że powtarzalny DNA chromosomów mitotycznych myszy wyróżnia się barwliwością po wstępnej obróbce preparatów polegającej na denaturacji i renaturacji DNA in situ. O podobnym wyniku barwienia w odniesieniu do chromosomów człowieka donieśli nieco później Arrighi i Hsu [4]. Zostały w ten sposób stworzone podwaliny wzoru prążków C.

Po wybarwieniu chromosomów mitotycznych fluorochromem akrydynamowym obserwuje się ciemne międzyprążki, które — jak to zostało wykazane przez Casperssona i wsp. [23] — fluoryzują po związaniu bromku etydylu. Inną metodę wybarwiania tych międzyprążków opracowali w 1971 r. Dutrillaux i Lejeune [44]. Ten typ prążków nazwano wzorem R (rewersja prążków G). W tym samym roku na paryskiej cytogenetycznej



Rys. 1. Wzory strukturalne niektórych fluorochromów używanych do wybarwiania wzorów prążkowych chromosomów

A — 33 258 Hoechst; B — pochodne akrydyny — R_1 — atebryna (Q), R_2 — pochodna iperytowa Quinacrine Mustard (QM); C — antybiotyki z grupy antracyklin: R_1 — daunomycyna, R_2 — adriamycyna

konferencji standaryzacyjnej ustalono rozmieszczenie i nazewnictwo poszczególnych rodzajów prążków [116]. Od tego czasu liczba wzorów prążkowych chromosomów podziałowych uległa rozszerzeniu. Szczególnym zainteresowaniem cytogenetyków w ciągu ostatnich lat były jednakże przede wszystkim mechanizmy powstawania poszczególnych rodzajów prążków chromosomów metafazowych, a niniejszy artykuł jest próbą podsumowania tych licznych badań.

1. WYNIKI BADAŃ NAD CHROMATYNĄ CHROMOSOMÓW METAFAZOWYCH UTRWALONYCH PŁYNEM CARNOY

Zastosowanie do niektórych opracowanych sposobów barwienia prążków, szczególnie typu C, nazwy metoda denaturacyjno-renaturacyjna wyraźnie wskazywało na zależność wyników barwienia od stanu DNA. Podstawowe pytanie sprowadzało się do tego, czy DNA chromosomów utrwalonych płynem Carnoy jest natywny, czy też zdenaturowany. Sumner i wsp. [142] badając efekt tego utrwalania stwierdzili w doświadczeniach wstępnych, że natywny DNA (suchy lub w roztworze) ulega w znacznym stopniu denaturacji pod wpływem płynu Carnoy. Na podstawie tego wyniku wysunęli sugestię, że pewna część DNA chromosomów metafazowych utrwalonych płynem Carnoy jest również zdenaturowana. W celu rozstrzygnięcia tego problemu podjęto próby zastosowania innych utrwalaczy, jak 4% formaliny, absolutnego alkoholu etylowego lub metylowego, 50% wodnego roztworu kwasu octowego lub cytrynowego, roztworów wodnych innych kwasów organicznych lub nieorganicznych, co jednak nie dało pozytywnych rezultatów przede wszystkim ze względu na słabą dyspersję chromosomów [103]. Inne podejście metodyczne, mające na celu ocenę stopnia denaturacji DNA na drodze barwienia chromosomów oranżem akrydyny (OA), dały w licznych pracowniach wyniki jednoznaczne: zielono-żółty charakter fluorescencji dowodzi dwuniciowej, natywnej struktury DNA [9, 31, 33, 137].

Należy jednak podkreślić, że niektóre stosowane techniki [60, 61, 118, 152] wybarwiania wzoru prążków G lub C prowadzą do przejściowej denaturacji DNA, co ma miejsce przede wszystkim wówczas, gdy chromosomy są ogrzewane do temperatury około 100°C lub poddawane działaniu zasady.

Problem wpływu utrwalania płynem Carnoy na ekstrakcję białek chromatynowych był i pozostaje nadal przedmiotem licznych badań [7, 16, 17, 33, 99]. Sumner i wsp. [142, 143] stosując szereg testów histochemicznych stwierdzili, że rutynowo stosowane przez 30 min kwaśne utrwalanie powoduje usunięcie z chromosomów metafazowych oraz z jąder komórek interfazowych znacznych ilości białek, w tym szczególnie histonów. Wykazali ponadto, że dwukrotna inkubacja chromosomów w standaryzowanym roztworze chlorku sodu i cytrynianu sodu (SSC) w temperaturze 60°C przez 1 godzinę nie prowadziła do dalszego usuwania białek, co miało jednak miejsce, jeżeli zastosować, jako wstępną obróbkę preparatów, ich trawienie roztworem trypsyny. Na podstawie tych badań Sumner i wsp. [142, 143] doszli do wniosku, że chromosomy metafazowe utrwalone płynem Carnoy są zupełnie lub prawie zupełnie pozbawione histonów; autorzy ci sugerują jednocześnie, że pozostałe w chromatynie białka

kwaśne miałyby być nadal równomiernie rozmieszczone wzdłuż chromatyd.

Comings i wsp. [33] wykazali za pomocą metod biochemicznych i izotopowych, że sekundowe działanie roztworu trypsyny, wystarczające do uzyskania dobrych prążków G, powoduje usunięcie jedynie 0,5% białka, a przedłużenie działania trypsyny do 2 min ekstrahuje 13,2% białka. Omówione badania dowodziły, że utrwalanie płynem Carnoy nie prowadzi do usunięcia wszystkich białek histonowych z chromatyny. Brody [16] stwierdził, że stosowane utrwalanie chromosomów mitotycznych powoduje ekstrakcję z ich chromatyny 60% histonów. Badania przeprowadzone w ostatnim okresie dowodzą, że w trakcie utrwalania chromosomów mieszaniną Carnoy zostają z nich usunięte makrocząsteczki, w tym DNA i białko. Zdaniem Matsui i Sasaki [99], procedury obróbki wstępnej prowadzą do ekstrakcji białek niehistonowych o szczególnie dużych cząsteczkach, a w chromatynie pozostają nadal drobnocząsteczkowe białka niehistonowe. Brown i wsp. [17] przeprowadzili badania nad udziałem poszczególnych frakcji histonów w mechanizmie powstawania prążków G i wykazali, że usunięcie w trakcie utrwalania frakcji F1 i F2 jest niezbędnym warunkiem wstępnym indukcji prążków G. Z tego wynika, że obecność lub nieobecność białek chromatynowych jest jednym z ważnych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie niektórych wzorów prążkowych. Należy podkreślić, że w zrozumieniu współdziałania białek w powstawaniu wzorów prążkowych duże znaczenie miały prace nad interakcją histonów [112, 123] lub syntetycznych polipeptydów [85] z DNA.

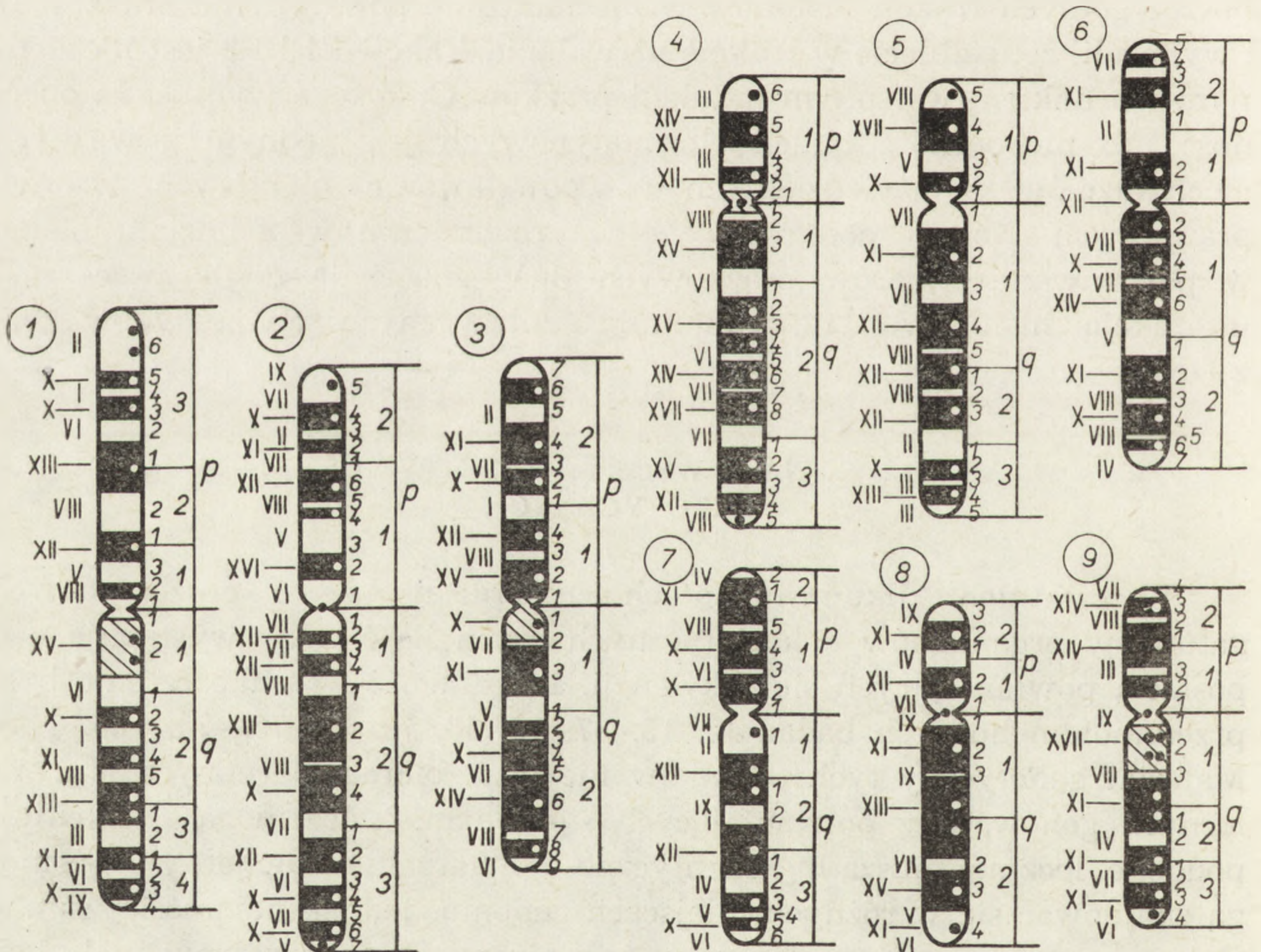
2. POWTARZALNY DNA A WZORY PRAŻKOWE CHROMOSOMÓW MITOTYCZNYCH

W ostatnich kilkunastu latach stwierdzono, że u poszczególnych gatunków organizmów eukariotycznych różna ilość DNA występuje pod postacią powtarzających się sekwencji. Ich długość i rozmieszczenie było przedmiotem licznych badań [5, 15, 37, 56, 58, 70, 71, 75—78, 126, 145]. Materiał genetyczny tych odcinków nie jest zbiorem odrębnych i niezależnych genów, lecz powtarzających się rodzin, które mogą być bardzo podobne, lecz nie muszą być identyczne. Powtarzalne fragmenty DNA mogą znajdować się w różnych miejscach genomu, jednak najczęściej są one zlokalizowane w regionach przewężeń pierwotnych i wtórnych [4, 115, 126].

Udało się otrzymać komplementarny RNA (cRNA) do wszystkich 4 rodzajów powtarzalnego DNA, jaki występuje u człowieka. Dowodzi to, że ten ostatni może *in vitro* odgrywać rolę matrycy [56, 70, 75—78].

Badania nad współzależnościami między rozmieszczeniem w chromosomach powtarzalnego DNA, a wzorami prążkowymi chromosomów człowieka datują się od doświadczeń Arrighi i Hsu [4] oraz Yunisa i wsp. [152], które doprowadziły do wybarwienia wzoru prążków C. Yunis i Yasmineh [153] wskazali na występowanie w regionach centromerowych powtarzalnego DNA, co zostało później potwierdzone przez Jonesa [75]. Szczegółowe badania nad rozmieszczeniem frakcji powtarzalnego DNA człowieka, na tle wzorów prążkowych chromosomów, przeprowadzane są przy użyciu techniki autoradiograficznej z zastosowaniem znakowanego cRNA oraz metod wybarwiania prążków Q (G) lub C. Szczególnie ważne badania przeprowadzili Sanchez i Yunis [125] używając do badań wszystkich frakcji powtarzalnego DNA, analizując lokalizację ziaren związanego cRNA w odniesieniu do wzoru prążków Q.

Frakcja I powtarzalnego DNA występuje w dużym stężeniu w jaskrawo fluoryzujących prążkach Q, przede wszystkim w dystalnej części ra-



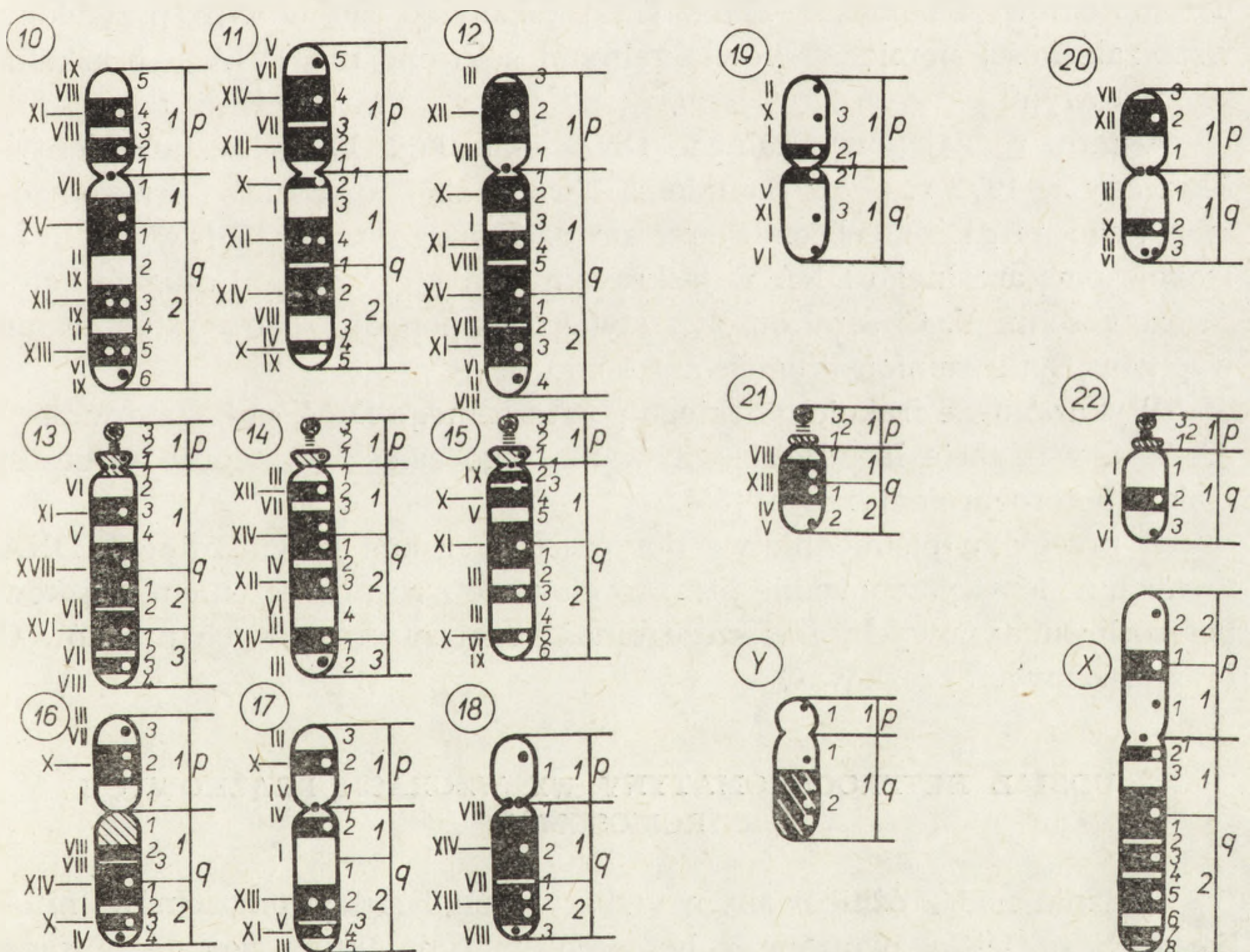
Rys. 2. Idiogram chromosomów człowieka uwzględniający: rozmieszczenie prąż-
mieszczenie prążków zmiennie wybarwiających

Liczbami rzymskimi oznaczono chronologię replikacji poszczególnych prążków według [51].
regionu występowało w więcej niż 50% analizowanych komórek, to na schemacie zaznaczono
na schemacie 2 leżącymi obok

mion długich heterochromosomu Y oraz w okołowcentromerowym prążku autosomów nr 3. Ta frakcja DNA występuje w dwu miejscach chromosomu Y: przede wszystkim w dystalnej połowie ramion długich (przy czym region ten jest rozciągnięty do obszaru telomerów), a znacznie mniejszy region jest położony tuż przy dolnym końcu centromeru. Dużo mniejsze ilości I frakcji powtarzalnego DNA występują w regionach centromerów chromosomów nr 1, 4, 5, 9 i 12, autosomów grup D, F i G oraz chromosomów nr 16 i 17. Czasami piętno po hybrydyzacji występowało nad telomerami, szczególnie autosomów nr 3 i prawdopodobnie nr 14.

Frakcja II powtarzalnego DNA jest głównie skupiona w obrębie przycentromerowego przewężenia wtórnego autosomów nr 1, 9 i 16. Mniejsze ilości tej frakcji DNA stwierdzono we wszystkich autosomach, pewnym stałym miejscem występowania wydaje się być przycentromerowy region chromosomów grup D, E, F i G.

Jeżeli chodzi o III frakcję powtarzalnego DNA człowieka, to jej roz-



ków Q (G) (obszary zaczernione), rozmieszczenie prążków R (obszary białe), rozcię (obszary zakreskowane), według [116]

Lokalizację III frakcji powtarzalnego DNA oznaczono kropkami. Jeżeli wyznakowanie danego 1 kropkę. Występowanie piętna w danym regionie w 100% analizowanych komórek zaznaczono siebie kropkami. Według [125]

mieszczenie wykazuje daleko idącą zbieżność ze wzorem prążków G (rys. 2). Nieliczne wyjątki stanowią silnie napiętnowane regiony niefluoryzujących przewężeń wtórnych autosomów nr 1, 9 i 16 (regiony niecentromerowych prążków C) oraz telomer ramienia krótkiego chromosomu nr 1 (prążki telomerowe). Należy podkreślić, że rozmieszczenie ziaren cRNA uzyskanego na frakcjach II i IV było zbliżone do frakcji III. Sanchez i Yunis [125] sporządzili schemat ilustrujący wyniki ich badań, z którego wynika, że jedynie na obszarze nielicznych prążków Q znajdujących się na autosomach nr 2, 3, 4, 15 i 16 nie znaleziono ziaren autoradiograficznych. Zawartość powtarzalnego DNA w poszczególnych prążkach wykazuje zróżnicowanie i mierzona liczbą ziaren wynosiła średnio od 1 do 4. Obserwowano również lokalizację ziaren nad niefluoryzującymi międzyprążkami, w tym przede wszystkim nad centromerami oraz przewężeniami wtórnymi (prążki C). Regiony centromerowych prążków C były napiętnowane w większości chromosomów. Pewne ilości powtarzalnego DNA wykryto również w regionach telomerów ramion krótkich i długich wielu chromosomów. Sanchez i Yunis [125] dopatrują się w tym przypadku współzależności pomiędzy powtarzalnymi sekwencjami DNA a prążkami telomerowymi.

Ostatni rodzaj powtarzalnego DNA — frakcja IV — został zidentyfikowany w 1972 r. przez Saundersa i wsp. [126] w obszarze przycentromerowego prążka C chromosomu nr 9. Evans i wsp. [56] wykryli tę frakcję powtarzalnego DNA w jaskrawym prążku Q ramion długich heterochromosomu Y. Ci sami autorzy stwierdzili ponadto jego występowanie w przewężeniu ramion długich autosomu nr 1.

Wykazano, że frakcje ludzkiego powtarzalnego DNA są bogate w pary A—T, a w trakcie łagodnego wirowania jego całość występuje w gęstej frakcji heterochromatynowej [55].

Z przeglądu piśmiennictwa dotyczącego frakcji powtarzalnego DNA wynika, że ich występowanie jest skorelowane z rozmieszczeniem prążków heterochromatynowych, a w szczególności niecentromerowych prążków C oraz jaskrawych prążków Q.

3. UDZIAŁ HETEROCHROMATYNY WE WZORACH PRAŻKOWYCH CHROMOSOMÓW

Badania nad zróżnicowanym wybarwianiem się chromosomów mitotycznych są ściśle związane z heterochromatyną, która została opisana przez Heitza [68, 69] jako chromatyna pozostająca w interfazie w stanie kondensacji, czym różni się od euchromatyny ulegającej despiralizacji. Badania nad heterochromatyną były w następnych latach, a szczególnie przez ostatnie dziesięciolecie, systematycznie rozwijane. Do czasu bada-

nia chromosomów metodami fluorescencyjnymi analizowano przede wszystkim interfazowe, heterochromatynowe chromocentra oraz w późniejszym okresie — metodą autoradiograficzną — czas jej replikacji przypadający na późny okres fazy S. Opracowanie metody cytologicznej hybrydyzacji przy zastosowaniu radioaktywnego cRNA pozwoliło na rozwinięcie badań nad konstytutywną heterochromatyną stale obecną w homologicznych parach chromosomów. Wiadomości o konstytutywnej heterochromatynie uległy rozszerzeniu, gdy Arrighi i Hsu [4] opracowali metodę jej wybarwiania roztworem Giemsy, przy czym proces barwienia poprzedzili denaturacją i renaturacją DNA. Rozmieszczenie heterochromatyny konstytutywnej ludzkich chromosomów metafazowych zostało scharakteryzowane w dokumencie konferencji paryskiej [116], należy jednak podkreślić, że niektóre jej obszary pokrywają się z lokalizacją frakcji powtarzalnego DNA. Do konstytutywnej heterochromatyny są zaliczane poza centromerowymi prążkami C niefluoryzujące przewężenia wtórne oraz regiony jaskrawych prążków Q. Charakterystyczną cechą autosomowych przewężeń wtórnych jest to, że ich heterochromatyna daje się wybarwić metodami mniej lub bardziej specyficznymi [8, 60, 61, 116, 119, 132], co jest dalszym dowodem ich chemicznego różnicowania.

Dotychczas nie rozstrzygnięto, czy wszystkie prążki Q (G) zawierają heterochromatynę rozumianą zgodnie z cytowaną definicją Heitza [68, 69]. Pomiedzy eu- i heterochromatyną istnieją różnice w budowie, dające się wykazać badaniem mikroskopowo-elektronowym, a mianowicie, odcinki heterochromatynowe są w porównaniu z odcinkami euchromatynowymi bardziej zwarte i posiadają grubsze fibryle [55, 124]. Powyższe różnice zostały stwierdzone w obrębie chromatyny prążków Q (G) ludzkich chromosomów mitotycznych [20, 36, 64, 124], lecz dotychczas nie wiadomo, czy odnosi się to do wszystkich rodzajów prążków Q oraz, czy istnieją zależności pomiędzy intensywnością fluorescencji a grubością fibryli.

4. POSTULOWANE MECHANIZMY POWSTAWANIA PRAŻKÓW

Charakterystyczną cechą metod uzyskiwania wzorów prążków Q jest ich wybarwienie bez jakiegokolwiek obróbki wstępnej, która jest niezbędnym warunkiem indukcji wszystkich innych rodzajów prążków. Łatwość wiązania się fluorochromów z chromatyną świadczy o dużym powinowactwie tych związków do dezoksynukleoproteidów. Szczególne powinowactwo odnosi się do chromatyny tworzącej jaskrawe prążki Q, bowiem ciała Y oraz ciała pochodzenia autosomowego, fluoryzujące w komórkach interfazowych, są widoczne bardzo wyraźnie również w preparatach utrwalonych innymi niż płyn Carnoy utrwalaczami, jak np. płynem Zenkera, alkoholem metylowym lub etylowym. W przeciwieństwie do tego,

heterochromatyna konstytutywna, zlokalizowana w przewężeniach pierwotnych i wtórnych, nie wybarwia się zupełnie lub prawie zupełnie tymi samymi fluorochromami [24, 25, 27, 28].

Obecnie do wybarwiania prążków Q używane są 2 grupy fluorochromów:

1. Fluorochromy posiadające zdolność do jonowego wiązania się z DNA, a także do interkalacji pomiędzy płaszczyzny jego zasad. Do tej grupy należy oranż akrydyny (OA) mający zdolność łączenia się z zewnętrznymi resztami fosforanowymi oraz do częściowej interkalacji w pojedynczy łańcuch DNA (interkalacja typu I).

2. Związki interkalujące do podwójnego łańcucha DNA (interkalacja typu II) oraz posiadające powinowactwo do pewnych zasad. Należy tu atebryna (Q) i jej pochodna — iperyt akrychinowy (QM) [9, 22, 23, 31, 34, 89, 90, 137].

W pierwszym okresie omawianych badań Caspersson i wsp. [22, 24] sugerowali, że QM wykazuje szczególne powinowactwo do guaniny ze względu na jego właściwości alkilujące. Sądono, że prążki Q ujawniają odcinki DNA bogate w pary G—C. Ta hipoteza nie mogła się utrzymać, ponieważ okazało się, że prążki Q powstają również po wybarwieniu chromosomów metafazowych fluorochromami nie zawierającymi grup alkilujących [142].

Dla wyjaśnienia łączenia się pochodnych akrydyny z DNA ważne są prace przeprowadzone na syntetycznych polimerach jedno- i dwułańcuchowych kwasów nukleinowych. Weisblum i de Haseth [148] wykazali, że pojedyncze łańcuchy poli rC nie wpływają na fluorescencję atebrynową, natomiast jej wygaszanie powodują łańcuchy poli rG oraz poli rG · poli rC. Niewielki wzrost fluorescencji zaobserwowano po związaniu się atebryny z łańcuchem poli dA lub poli dT, natomiast jej intensywny wzrost zaobserwowali po wybarwieniu podwójnych łańcuchów poli dA · poli dT. Wykazano jednocześnie, że wygaszanie fluorescencji przez łańcuchy zawierające pary G—C jest proporcjonalne do ich odsetkowej zawartości. Na intensywność fluorescencji nie wpływa stan natywny lub zdenaturowany DNA.

Badania nad fluorescencją syntetycznych polimerów ATCG oraz DNA wybarwionych QM zostały przeprowadzone przez Selander i de la Chappelle [137]. Udowodnili oni, że mieszanina jednoniciowych łańcuchów poli · (ATCG) wykazuje silniejszą fluorescencję niż mieszanina łańcuchów dwuniciowych. Natomiast wygaszanie fluorescencji przez DNA myszy jest większe w przypadku cząsteczek jednoniciowych niż dwuniciowych.

Rezultaty tych badań sugerują, że intensywność fluorescencji chromosomów (chromatyny) jest w jakimś stopniu uzależniona od budowy DNA.

Za tezę tą przemawia szereg dalszych prac, wśród których na podkreślenie zasługują badania Schrecka i wsp. [131], Comingsa i wsp. [34], Nastasi i wsp. [109] oraz inne [30, 63, 65, 113]. Schreck i wsp. [131] badali fluorescencję chromosomów metafazowych za pomocą przeciwciał znakowanych fluorochromami. Stosując przeciwciała antyguaninowe i antycytydynowe wykazali oni, że obecność par A—T odgrywa rolę w powstawaniu wzoru prążkowego. Z szeregu prac Comingsa i wsp. nad mechanizmami wybarwienia się wzorów prążkowych chromosomów metafazowych szczególnie ważne są badania przeprowadzone na DNA, nukleotydach i histonach grasicy cielęcia, na polinukleotydach, t-RNA i frakcjach DNA myszy [34]. Wyniki tych eksperymentów wskazują, że wygaszanie fluorescencji atebrynowej przez pary G—C lub jej wzbudzenie przez pary A—T jest zjawiskiem odnoszącym się zarówno do izolowanego DNA, jak i do DNA chromosomów metafazowych. Wzbudzenie lub wygaszanie fluorescencji jest ściśle związane z interkalacyjnym wiązaniem się Q do DNA, interkalacja bowiem jest głównym sposobem wiązania wymienionego barwnika do tego kwasu nukleinowego. Kompleks Q—DNA wykazuje większą termostabilność i lepkość. Badania nad zależnościami pomiędzy konformacją DNA a zdolnością interkalacji Q wykazały, że ten typ wiązania może być hamowany na drodze hydratacji DNA przez niektóre związki, jak chlorek sodu oraz etylen glikolowy. Inhibicja interkalacji Q do DNA jest również wynikiem działania niektórych białek, jak np. sperminy, która wiąże się w małym rowku DNA i indukuje zmiany jego konformacji. Podobną wybitną zdolność hamowania interkalacji Q posiada poli-l- lizyna oraz poli-l-arginina również wiążące się w wąskim rowku DNA. Fakty te, zdaniem Comingsa i wsp. [34], wskazują na prawdopodobny mechanizm hamowania przez makrocząsteczki zdolności do interkalacji fluorochromu z DNA.

W konkluzji swojej pracy Comings i wsp. [34] przyłączają się do postulatu wysuniętego przez de la Chapelle i wsp. [41], że skład zasad DNA odgrywa główną rolę w powstawaniu zjawiska fluorescencji chromosomów metafazowych, podkreślając, że odnosi się to szczególnie do jaszkrawych prążków Q, które zawierają krańcowo bogaty w pary A—T powtarzalny DNA. Regiony chromosomów o słabej fluorescencji mają zdaniem Comingsa i wsp. [34], wskazują na prawdopodobny mechanizm powtarzalny DNA bogaty w pary G—C, co nie jest oryginalną tezą tych badaczy, bowiem do podobnych wniosków doszło wielu innych autorów na podstawie badań fluorescencyjnych bądź autoradiograficznych [9, 30, 40, 73, 109, 129, 137].

Ogólne stwierdzenie, że obecność par A—T odgrywa rolę we wzbudzeniu fluorescencji chromosomów metafazowych jest, jak się wydaje, słuszne jedynie w odniesieniu do chromatyny prążków Q, a nie można

tego zjawiska rozciągać na wszystkie segmenty chromosomów, w których znajdują się powyższe zasady. Okazało się, że okolica centromerów chromosomów myszy jest szczególnie bogata w pary A—T, lecz nie fluoryzuje [115, 142]. Podobnie stwierdzono autoradiograficznie, że niefluoryzujące przewężenia wtórne chromosomów człowieka inkorporują również dość znaczne ilości trytowanej tymidyny [73]. Obserwacje te są bezpośrednim dowodem, że sama budowa podwójnej spirali DNA (nagromadzenie par A—T) stanowi tylko jeden z czynników składających się na powstawanie prążków Q. Z innych czynników wpływających na indukcję prążków Q istotne znaczenie zdają się posiadać białka chromatynowe oraz stopień kondensacji i konformacja chromatyny. Postulowana rola białek chromatynowych i związana z nimi konformacja DNA zostanie omówiona.

5. POSTULOWANE MECHANIZMY POWSTAWANIA PRAŻKÓW G

Wiele danych i sugestii dotyczących mechanizmu indukcji prążków Q odnosi się również do prążków G. Jedną z podstawowych różnic sprzecznych prowadzi się do konieczności stosowania odpowiednich procesów obróbki wstępnej, samo bowiem utrwalanie w płynie Carnoy i zabarwienie chromosomów roztworem Giemsy nie wystarcza do uzyskania poprzecznych prążków. Obserwacje poczynione w mikroskopie fazowo-kontrastowym, w mikroskopie elektronowym skaningowym i transmisyjnym dowodzą, że w wyniku obróbki wstępnej następuje w obrębie prążków G kondensacja dezoksynukleoproteidu [33, 101, 103, 104, 124, 149]. W związku z tym uważa się, że jednym z głównych mechanizmów indukcji prążków G są zmiany konformacji kompleksu DNA-białko. Następujący z kolei proces barwienia powoduje jedynie utrwalenie powstałych zmian konformacji dezoksynukleoproteidu w wyniku łączenia się składników barwnika Giemsy z chromatyną. Zmiany w obrębie kompleksu dezoksynukleoproteidu uważa się za odwracalne. Komplex DNA-białko zmienia się podobnie jak zmienia się samo DNA w procesie denaturacji i renaturacji. Chaudhuri i wsp. [32] wykazali, że zdolność wybarwienia prążków G lub C jest uzależniona od temperatury i czasu inkubacji preparatu w buforze Sörensen. Jeżeli działa się na chromosomy roztworem NaOH wg Schnedla [130], to nie wybarwiają się one w prążki G. Zdolność do przyłączania się barwników zostaje przywrócona w wyniku inkubacji w buforze Sörensen. Równowaga różnego stopnia może być osiągnięta w stosunku do poszczególnych regionów chromosomów; zaburzenia równowagi kompleksu DNA-białko mogą być wynikiem działania roztworów chlorku sodu, cytrynianu sodu, mocznika, fenolu, zasadowego pH, detergentów, siarczanu dodecyłu sodu (SDS) itd. [10, 18, 79, 80, 82, 100, 102, 128, 136].

Comings [35] na podstawie przeprowadzonych badań nad udziałem poszczególnych składników barwnika Giemsy w powstawaniu wzoru prąż-

ków G stwierdził, że błękit metylenowy (także każdy z barwników azurowych pojedynczo) daje dobre prążkowanie. Nie posiadająca grup metyloowych tionina nie wybarwia dobrze prążków. Eozyna, która nie wiąże się z DNA, jest składnikiem barwnika Giemsy nie wywierającym wpływu na powstawanie prążków G. W tych samych badaniach wykazano także, że sposób wiązania się błękitu metylenowego z DNA jest uzależniony od stosunku molarnego obu tych substancji. Jeżeli stosunek molarny barwnika do DNA wynosi 0,05, to ma miejsce interkalacja według I typu, natomiast przy wzroście stężenia do 0,2 barwnik wiąże się według typu II.

Ze względu na złożony skład barwnika Giemsy, przebadano również zależności między jego poszczególnymi składnikami w procesie łączenia się z chromatyną. Zdaniem Vogla i wsp. [149], zmiana kompleksu DNA-białko, zachodząca w trakcie obróbki wstępnej chromosomów, ogranicza na obszarze międzyprążków współdziałanie barwników tiazynowych i eozyny w ich przyłączaniu się do chromatyny. Autorzy ci badali wpływ różnych stężeń barwników eozynowych (eozyna B i Y) oraz azuru B na wybarwienie się prążków G, wykazując, że wynik barwienia jest uzależniony od stężenia eozyny. Przy niskim stężeniu eozyny obserwuje się intensywne przyłączanie do chromatyny barwników zasadowych, natomiast przy wysokim stężeniu eozyny proces ten ulega zahamowaniu. Zdaniem Vogla i wsp. [149], eozyna posiada szczególną łatwość reagowania z chromatyną, jednakże w niskich stężeniach współdziała ona z barwnikami tiazynowymi i ułatwia wiązanie się azuru B. W warunkach wysokich stężeń eozyny nasycza ona dezoksynukleoproteid tak gęsto, iż blokuje przyłączanie cząsteczek tiazynowych.

Hsu i wsp. [72] wykazali, że dodanie azuru B do hodowli w fazie G₂ cyklu komórkowego ujawnia typowy wzór prążkowy po wybarwieniu roztworem Giemsy bez poddania preparatów procedurze obróbki wstępnej. Podobne badania przeprowadził również Shafer [138], który wykazał, że dodanie w fazie G₂ aktynomycyny D (AMD) również indukuje powstanie prążków G o doskonałej jakości. Wiadomo, że AMD wiąże się wybiórczo z guaniną [62], a ponadto konkuruje z białkami o miejsca przyczepu do DNA.

Müller [108] wykazał, że azur B posiada duże powinowactwo do par A—T. Vogel i wsp. [149] uważają jednak, że mało prawdopodobne jest, aby różne barwniki używane do wybarwiania prążków G łączyły się z DNA w sposób różnicowy jedynie na podstawie odmiennego składu zasad. Sugerują oni, że istnieje ścisła zależność pomiędzy efektem wybarwiania a jakościowo różnymi białkami niehistonowymi. De la Chapelle i wsp. [41] wysunęli hipotezę, że wzór prążkowy w sposób pierwotny lub wtórny (w wyniku zróżnicowanego powinowactwa białek) odzwierciedla skład zasad DNA, za wyjątkiem prążków C. Tę hipotezę popierają liczne już obecnie prace [33, 72, 102—104, 108, 131, 138, 149]. Uważa się,

że obecność w utrwalonych chromosomach pozostałości białek histonowych i niehistonowych może warunkować przyłączanie barwników, a ponadto wpływać na konformację DNA.

Matsui i Sasaki [99] przeprowadzili badania porównawcze na izolowanych chromosomach chomika chińskiego oraz na ekstrakcie uzyskanym z nich w trakcie obróbki wstępnej preparatów. Stwierdzili, że w trakcie przygotowania chromosomów do barwienia prążkowego są z nich usuwane makrocząsteczki, w tym DNA i białko (szczególnie niehistonowe), o dużych cząsteczkach. Pozostałe w chromosomach białka niehistonowe stanowią małe cząsteczki zawierające dużą liczbę wiązań S—S i, jak się wydaje, są istotnym elementem mechanizmu wybarwiania się prążków G. Badania tych autorów wykazały także, że chromatyna znajdująca się w obrębie prążków G wykazuje w porównaniu z chromatyną, która uległa ekstrakcji, wyższą temperaturę topnienia oraz zdolność do nadbarwliwości. Matsui i Sasaki [99] wykazali ponadto, że usunięcie RNA, a z białek — jedynie histonów, nie prowadzi do powstania prążków G. Zdaniem tych autorów prążki G odpowiadają chromatynie o stosunkowo dużej termostabilności i zawierającej niewielkie cząsteczki białek niehistonowych.

Na znaczenie wiązań dwusiarczkowych w powstawaniu prążków G zwrócił uwagę Sumner [144], którego zdaniem heterochromatyna jest względnie bogata w grupy S—S, a euchromatyna — w S—H.

Brown i wsp. [17] przeprowadzili badania nad udziałem poszczególnych frakcji histonów w mechanizmie powstawania prążków G chromosomów metafazowych chomika chińskiego oraz myszy kaktusowej (*Peromyscus eremicus*). Wykazali oni, że frakcje F1 i F2 mają istotne znaczenie w procesie wybarwiania się prążków G. Frakcja F1 powoduje prawdopodobnie całkowite zablokowanie mechanizmu powstawania prążków G. Usunięcie obu frakcji utrwalaczem Carnoy lub 0,2 N HCl jest konieczne dla indukcji prążkowania typu G. Zdaniem wymienionych autorów frakcje F2b i F3 nie wywierają wpływu na wybarwienie prążków G.

Istniejące współzależności między prążkami G i Q a białkami chromatyny były również badane przez Sivaka i Wolman [140], którzy zajmowali się w szczególności wybarwianiem prążków po utrwalaniu chromosomów metafazowych utrwalaczami formalinowymi. Wyniki ich badań wskazują, że wybarwienie prążków Q lub G jest niezależne od obecności lub nieobecności zasadowych białek histonowych.

6. POSTULOWANE MECHANIZMY POWSTAWANIA PRAŻKÓW C

Wybarwienie centromerowych prążków C wymaga, zdaniem niektórych autorów, usunięcia z chromosomów metafazowych dużych ilości DNA, co osiąga się poprzez działanie DN-azy [1, 2, 33] bądź roztworami

zasad [33, 60, 61, 84, 105, 118]. Należy jednak podkreślić, że prążki C wybarwiają się również po dłuższym trawieniu chromosomów metafazowych enzymami proteolitycznymi [3, 82, 97, 134, 135]. Jeżeli zatem ekstrakcja DNA istotnie leży u podłoża mechanizmu wybarwiania prążków C, to należy przyjąć, że jest on usuwany nie z regionów centromerowej lub przycentromerowej chromatyny, lecz z pozostałych części ramion krótkich i długich. Dezoksynukleoproteid, pozostający po takiej obróbce wstępnej w chromosomach, przyłącza następnie barwnik Giemsy i uwiadcza się pod postacią wzoru prążków C. Usunięcie większości DNA z regionów prążków G i R jest stosunkowo łatwe, jak bowiem wykazały badania Comingsa i wsp. [33], silne działanie ekstrakcyjne mają nawet słabe roztwory zasad. Wydaje się jednak, że mechanizmy powstawania prążków C należy rozważyć po dokonaniu choćby najprostszego ich podziału na prążki C centromerowe i niecentromerowe.

Mechanizm wybarwiania się centromerowych prążków C zdaje się nie polegać wyłącznie na usunięciu z chromatyd odpowiedniej ilości DNA, ten bowiem rodzaj prążków ujawnia się często po okresie krótkiego działania enzymów lub zasad. Comings i wsp. [33], reasumując wyniki swoich badań, dochodzą do wniosku, że również w tym przypadku istotne znaczenie ma interakcja pomiędzy DNA a białkiem. Zdaniem tych autorów zmiany w konformacji dezoksynukleoproteidu zachodzą w obrębie centromerowych prążków C trudniej aniżeli w prążkach G i wymagają dłuższego czasu działania czynników przekształcających chromatynę.

Centromerowych prążków C nie można jednak traktować jako jednorodnej struktury. Jeżeli wybarwić chromosomy metodą opracowaną przez Eiberga [53], to w miejscach, które zdaniem tego autora odpowiadają centromerowi, ujawniają się małe kropki noszące nazwę prążków Cd (centromeric dots). Kropki centromerowe wydają się mieć jednakowe wymiary we wszystkich chromosomach człowieka, są one intensywnie wybarwione, ostro odgraniczone i zajmują tylko część obszaru centromerowych prążków C. W chromosomach prometafazowych widoczne są pojedyncze wąskie prążki, natomiast w metafazie — dwie kropki. Eiberg sugeruje, że dwa oddzielne prążki Cd odpowiadają podzielonemu centromerowi.

U człowieka niecentromerowe prążki C zlokalizowane są przede wszystkim w obszarze przewężeń wtórnych autosomów, u innych zaś gatunków występują one również w telomerach. Cechą charakterystyczną niecentromerowe prążki C człowieka jest obecność w nich poszczególnych rodzajów powtarzalnego DNA. Ten rodzaj prążków wybarwia się technikami, które nie ujawniają centromerowych prążków C, co wskazuje, że u człowieka i szeregu innych gatunków heterochromatyna przewężeń pierwotnych i wtórnych może w sposób istotny różnić się składem dezoksy-

nukleoproteidu. Wskazują na to również odmienne wyniki barwienia się centromerowych i niecentromerowych prążków C człowieka według metody opracowanej przez Schweizera [132, 133]. Jeżeli chromosomy metafazowe inkubowane w środowisku zawierającym bromodezoksyurydynę (BrdU) potraktować po utrwaleniu AMD, to po wybarwieniu preparatów 4-6-dwuamidyno-2-fenyloindolem (DAPI) uzyskuje się intensywne świecenie przewężeń wtórnych autosomów nr 1, 9 i 16 oraz jaskrawych prążków Q, natomiast centromery nie fluoryzują. Podobny efekt uzyskuje się, jeżeli użyć do barwienia fluorochromu Hoechst 33 258 [67, 86, 88].

Zdolność wiązania przez rutynowo utrwalone chromosomy człowieka ^3H -AMD nie odnosi się tylko do niecentromerowych prążków C, bowiem, jak wykazały badania [73], antybiotyk ten jest również wiązany przez DNA centromerów. Istnieją zatem jeszcze pewne inne mechanizmy, które powodują, że występuje zróżnicowana fluorescencja poszczególnych rodzajów prążków C. Jest możliwe, że różnice te polegają na stwierdzonych różnicach zdolności inkorporacji ^3H -Thd [49, 50, 51, 73], której obecność warunkuje inkorporację BrdU.

Niezależnie od tych, niezupełnie jeszcze poznanych mechanizmów wybarwiania się prążków C, można stwierdzić, że DNA w nich zlokalizowany cechuje się dużą podatnością na alkaliczną i termiczną denaturację [33, 60, 61]. Jeżeli jednak działanie czynnika denaturującego ustaje, to DNA prążków C renaturuje niemal natychmiast, natomiast później — DNA pozostałych odcinków chromosomów, a więc DNA jest w stanie natywnym w chwili wybarwiania prążków C roztworem Giemsy. Na natywność DNA wskazuje również fakt, że możliwe jest ujawnianie prążków C metodą fluorescencyjną, która nie wymaga denaturacji.

7. POSTULOWANE MECHANIZMY POWSTAWANIA INNYCH RODZAJÓW PRAŻKÓW

PRAŻKI R

Caspersson i wsp. [23] w trakcie swoich doświadczeń nad prążkami Q wykazali, że niefluoryzujące, ciemne międzyprążki można wybarwić chlorkiem etydylu. Metoda wybarwiania prążków R roztworem Giemsy została opracowana w 1971 r. przez Dutrillaux i Lejeune'a [44]. Wzór prążków R stanowi odwrotność wzoru prążków G, a jeżeli chodzi o porównanie z prążkami Q, to segmenty chromosomów o silnej fluorescencji są najbledszymi prążkami R. Mechanizm wybarwiania się prążków R nie był dotychczas przedmiotem systematycznych badań, toteż można jedynie wskazać na niektóre specyficzne cechy tej metody. Rutynowo stosowany w preparatyce chromosomowej, celem wywołania szoku hipotonicznego, 0,075 M KCl został zastąpiony roztworem składającym się z rozcieńczonej

surowicy, $MgCl_2$ oraz hyaluronidazy. Można sądzić, że elektrolity zawarte w tym płynie oraz enzym wpływają na zmianę kompleksu DNA-białko, prawdopodobnie głównie w obrębie heterochromatyny. Utrwalanie komórek przebiega w 2 etapach, z których pierwszy polega na działaniu mieszaniny składającej się z absolutnego etanolu, kwasu octowego lodowatego i chloroformu w stosunkach objętościowych 6:1:3, a drugi — na działaniu płynu Carnoy o klasycznym składzie (absolutny etanol i kwas octowy lodowaty w stosunku objętościowym 3:1). Pierwszy etap utrwalania trwa 35 min, natomiast drugi — 15 min. Biorąc pod uwagę skład utrwalaczy wydaje się, że procesy usuwania białek chromatyny przebiegają odmiennie niż to opisano w odniesieniu do prawdopodobnych mechanizmów powstawania prążków G i C. Dalsze zmiany kompleksu DNA-białko mogą zachodzić w trakcie inkubacji preparatów w buforze fosforanowym o temperaturze $87^\circ C$, a zostają one utrwalone po wybarwieniu chromosomów roztworem Giemsy. Jest cechą charakterystyczną dla tej metody, że wiązanie się barwnika Giemsy z euchromatyną jest niezbyt intensywne, co powoduje, że chromosomy muszą być analizowane w mikroskopie kontrastowo-fazowym.

Jest interesujące, że różnicowe wybarwienie chromosomów podziałowych o wzorze odpowiadającym prążkom R uzyskał w 1970 r. Shiraishi [127], który ludzkie limfocyty przez ostatnią dobę krótkoterminowej hodowli oziębiał do temperatury $0-3^\circ C$ zgodnie z metodą Darlingtona i La Coura [39]. W tych warunkach odcinki euchromatynowe można wybarwić metodą srebrowo-sześciometyloitetraminową.

PRAŻKI T

Dutrillaux [45] opisał w 1973 r. nową metodę wybarwiania końcowych odcinków chromosomów człowieka — wzór telomerowych prążków T. Prążki T można uzyskać dwoma sposobami, z których pierwszy polega na inkubacji preparatów w buforze fosforanowym o pH 6,7 podgrzanym do temperatury $87^\circ C$. W trakcie tej obróbki wstępnej zachodzi równocześnie proces barwienia chromosomów barwnikiem Giemsy, który jest dodawany do kąpieli. Składniki mieszaniny Giemsy odgrywają prawdopodobnie rolę stabilizatora zmian zachodzących w trakcie obróbki kompleksu dezoksynukleoproteidu, bowiem po oziębieniu szkiełek odbarwia się chromosomy na drodze przeprowadzania preparatów przez szereg alkoholowy. Właściwe ujawnienie prążków T polega na powtórnym barwieniu chromosomów, tym razem w OA, i ich ocenie w mikroskopie fluorescencyjnym.

Drugi sposób wybarwiania wzoru prążków T wymaga obróbki wstępnej w płynie Earle'a lub w buforze fosforanowym o pH 5,1 w tempera-

turze 87°C. Tak przygotowane preparaty mogą być wybarwione roztworem Giemsy lub OA.

Omawiając mechanizmy wybarwiania się prążków T, Dutrillaux i Covic [48] zasadnicze znaczenie przypisują inkubacji termicznej, w tym stężeniu jonowemu, temperaturze i czasowi trwania obróbki wstępnej.

PRAŻKI N

Matsui i Sasaki [98] opublikowali w 1973 r. metodę wybarwiania prążków N, które mają ich zdaniem odpowiadać regionom organizatorów jąderkowych (NOR). Uważają oni, że mechanizmy powstawania prążków N sprowadzają się do usunięcia z preparatów chromosomów obu kwasów nukleinowych oraz histonów, z pozostawieniem białek kwaśnych. Te ostatnie, a raczej ich część specyficzna dla genów rybosomalnych (reprezentująca strukturalny element chromatyny i pełniąca ważną funkcję w ekspresji tych genów) miałyby stanowić podłoże wybarwiania się omawianego wzoru. Na znaczenie białek niehistonowych wskazują, zdaniem powyższych autorów, przeprowadzone testy histochemiczne. Stwierdzili oni bowiem niemożliwość wybarwienia prążków N po uprzednim traktowaniu chromosomów 0,1 N NaOH, 0,5% SDS, 8 M mocznikiem czy fenolem. Na zmianę w wybarwianiu się prążków N nie wywiera wpływu ich traktowanie 0,2 N HCl, 0,2 N H₂SO₄, 0,15 M NaCl, 0,015 M cytrynianem sodu czy mieszaniną chloroformu i eteru w stosunku 3 : 1.

Prążki N stanowią jednak ciągle dyskusyjny problem, tak ze względu na nie wyjaśnione do końca mechanizmy ich wybarwiania, jak również ze względu na brak zgodności co do ich lokalizacji. Nie ustalono dotychczas, czy odpowiadają one nitkom satelitonosnym [111], samym satelitom [52], czy też specjalnemu rodzajowi heterochromatyny zlokalizowanej obok NOR [57].

PRAŻKI D

Badania nad mechanizmami powstawania w chromosomach wzorów prążkowych skłoniły Lin i van de Sande [96] do zastosowania jako fluorochromów antybiotyków antracyklinowych: daunomycyny, adriamycyny i nogalomycyny. Wiążą się one z DNA, podobnie jak Q i QM, na drodze interkalacji typu II [62]. Okazało się, że pierwsze dwa związki indukują powstanie charakterystycznego wzoru prążkowego (prążki D) odpowiadającego prążkom Q. Traktowanie chromosomów nogalomycyną nie powoduje wybarwienia się fluoryzujących, poprzecznych prążków, lecz jednolitą, stosunkowo ciemną fluorescencję na całej długości chromosomu. Autorzy przypuszczają, że przyczyną tego zjawiska jest brak w cząsteczce nogalomycyny grupy aminocukrowej. Brak tej grupy, poprzez zmianę w interakcji DNA-antybiotyk, znajdowałby swe odzwierciedlenie w braku

fluorescencji o różnicowanym charakterze. Jednocześnie Lin i van de Sande [96] sugerują, że wzór prążkowy uzyskany przy zastosowaniu daunomycyny może być efektem wygaszania fluorescencji przez regiony DNA o specyficznej sekwencji zasad.

8. WZORY PRAŻKOWE A CZAS REPLIKACJI DNA

Zróżnicowanie genomu pod względem czasu syntezy DNA stanowiło przedmiot badań [92, 95, 146] podjętych już na około 10 lat przed opracowaniem pierwszych metod prążkowego wybarwienia chromosomów metafazowych. Autorem pierwszych doniesień o asynchronii replikacji DNA w hetero- i euchromatynie był Lima-de-Faria [91, 92, 94], który wykazał, że u konika polnego (*Melanoplus differentialis*) i żyta (*Secale cereale*) heterochromatyna syntetyzuje swój DNA później niż euchromatyna. Od tego czasu asynchronia replikacji DNA była analizowana na wielu obiektach i generalnie potwierdzono, że synteza heterochromatyny przebiega w późnej fazie S.

Złożony wzór replikacji chromosomów człowieka został po raz pierwszy przeanalizowany przez Lima-de-Faria i wsp. [93], którzy stwierdzili, że nie wszystkie chromosomy replikują swój DNA w tym samym czasie oraz że różnice czasowe występują zarówno między odcinkami w obrębie jednego chromosomu, jak i między homologami. Następne badania potwierdziły te obserwacje, a ponadto pozwoliły na dalsze ustalenia, wśród których do najważniejszych należą:

Wykazano, że jeden z chromosomów X kobiety (uogólnienie odnosi się do wszystkich samic ssaków) replikuje później niż jego homolog oraz autosomy. Ta właściwość odnosi się również do nadliczbowych chromosomów X u osobników płci żeńskiej lub męskiej.

Ustalono wzory replikacji dla wszystkich chromosomów człowieka, co umożliwiło identyfikację homologicznych par.

Stwierdzono, że w obrębie każdego chromosomu występuje regionalne zróżnicowanie czasu syntezy DNA, ta właściwość została stwierdzona u wszystkich badanych gatunków.

Wykazano, że późno replikujące segmenty mogą być różnej wielkości w poszczególnych chromosomach.

Nie zdołano ustalić metodą autoradiograficzną sekwencji syntez wewnątrz chromosomu. Nie dowiedziono, by centromery lub telomery determinowały sekwencję replikacji.

Z chwilą poznania prążkowej struktury chromosomów metafazowych przeanalizowano czas replikacji DNA poszczególnych prążków typu Q (G), C i R. Wykazano istnienie korelacji między replikacją heterochromatyny

w późnej fazie S a rozmieszczeniem prążków Q (G) u człowieka [30, 46, 51, 63], zwierząt [139] i roślin [19, 22, 23, 150]. Pogląd o istnieniu pełnej korelacji został podważony przez Bostocka i Christie'a [12, 13] w badaniach przeprowadzonych na różnych gatunkach szczura kangurzego (*Dipodomys ordii*, *Dipodomys merriami*). Wymienieni autorzy wykazali, że u tych gatunków wcześnie replikujące odcinki chromosomów posiadają prążki Q (G) w tym samym stopniu, co późno replikujące. Stwierdzili oni ponadto, że Q-pozytywne regiony chromosomów pokrywają się z regionami wcześnie syntetyzującymi DNA. U *D. merriami* [12] późno replikujące segmenty DNA są identyczne z niecentromerowymi prążkami C, a centromerowe prążki C nie wydają się zawierać DNA późno replikującego. Dalsze badania przeprowadzone na *Dipodomys panamentinus* wykazały, że w tym przypadku również nie występuje prosta zależność między typem prążków a czasem replikacji DNA. Prążki Q i centromerowe prążki C w jednych chromosomach odpowiadają regionom o wczesnej, w innych natomiast o późnej replikacji. Telomerowe prążki C tego gatunku są replikowane w późnej fazie S, co nie jest jednak regułą dla wszystkich niecentromerowych prążków C, część bowiem z nich syntetyzuje DNA we wczesnej fazie S. Prążki C mogą więc w pewnych przypadkach rozpocząć i kończyć replikację przed wieloma innymi regionami chromosomów [12—14, 40, 70, 139]. Podobnie DNA prążków G (Q) może rozpocząć i kończyć replikację przed tymi segmentami, które są G- lub Q-negatywne [11—14, 40, 70, 117]. Należy jednak podkreślić, że wyniki tych badań uzyskano w oparciu o analizę autoradiograficzną, której zdolność rozdzielcza jest zbyt niska dla analizy tak małych struktur, jak prążki chromosomów metafazowych. Moore i Uren [107] wykazali, że identyfikowane metodą autoradiograficzną w metafazie regiony późno replikujące, analizowane w tym samym chromosomie w profazie, ujawniają liczne mniejsze jednostki replikacyjne. Obserwacje te były jedną z przyczyn poszukiwania nowych metod badania regionów chromosomów różniących się czasem syntezy DNA.

Obecnie szeroko stosowaną metodą analizy czasu replikacji DNA w poszczególnych prążkach chromosomów metafazowych jest inkorporacja BrdU (analog tyminy) podawanej do płynu hodowlanego w różnych okresach fazy S. Miejsce wbudowania BrdU można ustalić po wybarwieniu preparatów fluorochromem [47, 50, 67, 86—88] lub roztworem Giemsy [38, 67, 74, 81, 83, 121, 154], niektórzy badacze stosują również metody immunologiczne [66]. Po wybarwieniu chromosomów metafazowych jednym z omówionych sposobów ujawnia się poprzeczne prążkowanie będące odzwierciedleniem wbudowywania BrdU przez poszczególne odcinki. W trakcie analizy należy uwzględnić fakt, że w przechodzeniu przez fazę S poszczególnych komórek istnieje asynchronia (naturalna lub indu-

kowana przez BrdU), która powoduje występowanie pewnych różnic we wzorze tego samego chromosomu z różnych płytek metafazowych. BrdU podawana do hodowli pod koniec fazy S ostatniego cyklu podziałowego komórek (na 4—7 godz. przed utrwalaniem) hamuje po inkorporacji do chromosomów ich kondensację i jednocześnie indukuje ich segmentację [6, 46, 47, 49, 50, 51, 114, 147, 153—156]. Wbudowywanie się BrdU bez względu na czas podawania powoduje poprzeczne zróżnicowanie chromosomów możliwe do ujawnienia po wybarwieniu fluorochromami [47, 86—88] lub roztworem Giemsy [74, 83, 121, 154].

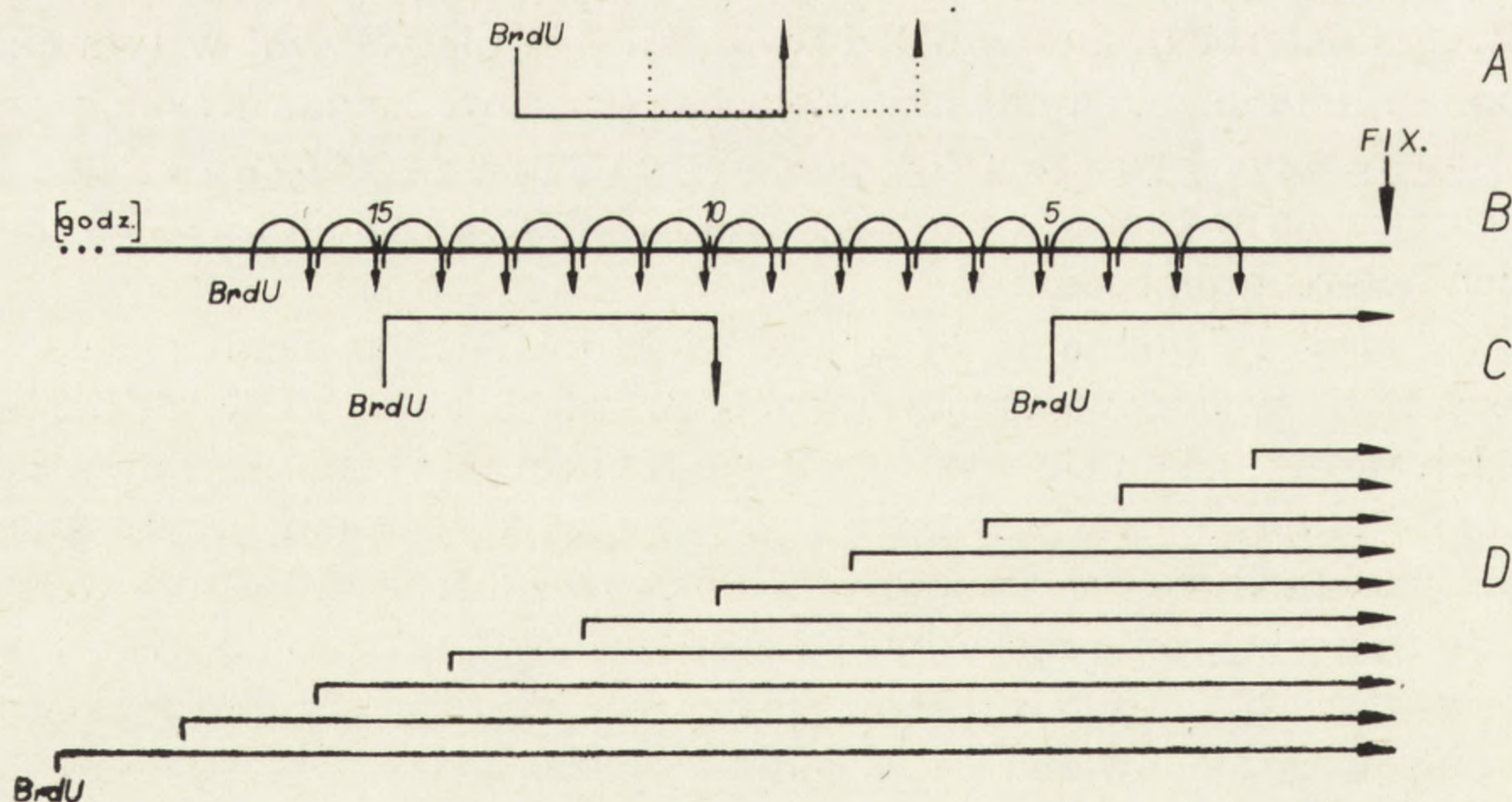
Zakharow i Egolina [154] oraz Tupitsina i wsp. [147] wykorzystali w swoich pracach opisane zjawisko zróżnicowanej kondensacji chromosomów i wykazali u chomika chińskiego, że DNA prążków C jest replikowany późno, a prążków G jedynie nieco wcześniej. Inni autorzy [46, 47, 54, 67, 86, 156] na podstawie zmian wybarwiania się stwierdzili późną replikację DNA w obrębie prążków G, C oraz jaskrawych Q i wczesną prążków R chromosomów człowieka. W dalszych badaniach Zakharov i Egolina [156] wykazali, że większe, wcześniej replikujące regiony autosomów człowieka są w przybliżeniu interstycjalnymi odcinkami ramion długich chromosomów nr 1, 5, 11, 12, 14, 15 i 17, ramion krótkich chromosomów nr 6 i okołocentromerowymi regionami nr 2. Duże segmenty późno syntetyzujące DNA obejmują odcinki przycentromerowe autosomów par 1, 3, 9, 16 i 21 oraz kilka niecentromerowych prążków w chromosomach nr 4, 5, 7, 8, 11 i 13. Potwierdzono ponadto późną replikację nieaktywnego heterochromosomu X i wykazano, że pierwszymi w tym chromosomie replikonami są odcinki okołocentromerowe i kilka wąskich prążków obu ramion. Synteza DNA pozostałych prążków odbywa się później i jest rozłożona w czasie, również później replikuje dystalna część ramion długich heterochromosomu Y.

Zakharov i Egolina [156] analizowali również problem asynchronii syntezy DNA w odpowiadających sobie prążkach autosomowych homologów. Ich wyniki zdają się wskazywać, że asynchronia replikacji ujawniana metodami autoradiograficznymi nie istnieje za wyjątkiem przycentromerowych bloków heterochromatyny homologów nr 1, 9 i 16. Autorzy sugerują, że ta asynchronia może być spowodowana międzyosobniczymi różnicami w zawartości heterochromatyny lub długością stosowanego przez nich pulsowego podawania BrdU (od 1,5 do 2,0 godz.).

Grzeschik i wsp. [67], posługując się techniką inkorporacji BrdU i Thd, a następnie barwienia preparatów fluorochromem 33258 Hoechst lub barwienia złożonego (odczynnik Hoechst — inkubacja w 2 SSC — roztwór Giemsy), ustalili wzór późno replikujących odcinków chromosomów człowieka, identyfikując je jako obszary prążków G. Ich opracowanie wykazuje dużą zgodność z wcześniej ustalonymi wzorami replikacji,

a także ze szczegółowo omawianym wzorem replikacji chromosomów człowieka przedstawionym przez Dutrillaux i wsp. [51]. Na podkreślenie zasługują poczynione przez Grzeschika i wsp. [67] obserwacje dotyczące asynchronii replikacji chromosomów homologicznych, szczególnie heterochromosomów X kobiety i polimorficznych heterochromatynowych prążków niektórych autosomów. Główne różnice pomiędzy heterochromosomami X obecnymi w komórce dotyczą prążków q21, q23 i q27. Homologiczne autosomy nr 2, 3 i 4 przeważnie nie kończą replikacji dokładnie w tym samym czasie, a ponadto występują różnice w intensywności wybarwienia się obszarów heterochromatynowych występujących w chromatydach autosomów nr 1, 16 i jednej pary z grupy F. Rozważając przyczyny wpływające na asynchronię replikacji wymienionych autosomów Grzeschik i wsp. [67] przypuszczają, że przyczyn tego zjawiska należy dopatrywać się w niejednoczesnym rozpoczynaniu i zróżnicowanej szybkości replikacji ich DNA. Intensywność wybarwienia się homologicznych segmentów może po inkorporacji BrdU, zdaniem autorów, odzwierciedlać zróżnicowane rozmieszczenie w DNA par A—T.

Na szczególną uwagę zasługuje praca Dutrillaux i wsp. [51], których wyniki pozwoliły na ustalenie chronologii replikacji poszczególnych prążków chromosomów człowieka. Te badania, jak również omówione doniesienia innych autorów [63, 67, 86, 88, 95, 139, 153, 156], wyjaśniają sze-



Rys. 3. Schemat ilustrujący układ eksperymentalny, którego zastosowanie pozwoliło Dutrillaux i wsp. [51] ustalić chronologię replikacji DNA poszczególnych prążków chromosomów człowieka

A — inkubacja komórek w środowisku zawierającym BrdU warunkujące otrzymanie „prążkowanie pośrednie typu I”; B — seria 1-godzinnych inkubacji komórek w środowisku zawierającym BrdU; C — schemat postępowania pozwalającego uzyskać „prążkowanie pośrednie typu II”; D — seria „ciągłych” inkubacji komórek w środowisku zawierającym BrdU

reg problemów wiążących się z mechanizmami powstawania wzorów prążkowych chromosomów metafazowych.

Dutrillaux [46] oraz Dutrillaux i wsp. [51], stosując pulsowe podawanie BrdU w środkowej fazie S (rys. 3), uzyskali tzw. „prążkowanie pośrednie typu I” (the intermediary type I banding), w których zmodyfikowanych jest tylko kilka prążków R i Q. Ci sami autorzy wyróżnili ponadto „prążkowanie pośrednie typu II” (the intermediary type II banding), które można uzyskać podając pulsowo BrdU między 15 i 10 godz. oraz ponownie na ostatnie 5 godz. przed zakończeniem hodowli. Wzór prążkowy typu II jest przeciwny do wzoru typu I. Oprócz wymienionych sposobów podawania BrdU autorzy tych prac stosowali szereg 1-godzinnych inkubacji w czasie od 17 do 3 godz. przed utrwalaniem oraz szereg inkubacji „ciągłych”. Preparaty były barwione OA, który po przyłączeniu się do DNA natywnego daje fluorescencję zieloną, natomiast w połączeniu z DNA zdenaturowanym lub z RNA fluoryzuje czerwono. Chromosomy, nie zawierające BrdU, wykazują generalnie jednolitą zieloną fluorescencję, natomiast po jego inkorporacji, odcinki chromosomów zmodyfikowane wbudowaniem tego związku do DNA fluoryzują pomarańczowo. Szczegółowa analiza uzyskanych w ten sposób wzorów prążkowych pozwoliła Dutrillaux i wsp. [51] na ustalenie chronologii replikacji DNA autosomów człowieka. Uszeregowali oni prążki w XVIII grup o zbliżonych czasach replikacji, przy czym I odpowiada segmentom syntetyzującym DNA najwcześniej, a XVIII — najpóźniej (rys. 2).

Wyniki uzyskane przez Dutrillaux i wsp. [51] w sposób jednoznaczny wskazują na późną replikację DNA regionów prążków Q (G) oraz jego wczesną replikację w obrębie prążków R.

UWAGI KOŃCOWE

Niektóre podstawowe zjawiska, zachodzące podczas wybarwiania prążków chromosomów metafazowych, można uważać za wyjaśnione, chociaż jeszcze nie wszyscy autorzy akceptują wnioski wypływające z licznych eksperymentów.

1. Jeżeli preparaty chromosomowe są utrwalane płynem Carnoy, to chromatyna chromosomów metafazowych składa się z DNA i białek nie-histonowych.

2. Białka niehistonowe są zaangażowane w powstawanie niektórych rodzajów prążków, w tym przede wszystkim G.

3. Skład zasad nukleotydów wzdłuż chromosomów nie jest stały. Zmienne rozmieszczenie powtarzalnych sekwencji bogatych w pary A—T lub w pary G—C odzwierciedla się we wzorze prążkowym.

4. Niektóre wzory prążkowe wydają się odzwierciedlać regionalne różnice stopnia kondensacji chromatyny chromosomów metafazowych.

5. Spośród dotychczas opracowanych wzorów prążkowych większość powstaje na podłożu dwuniciowej, natywnej struktury DNA.

6. W obrębie prążków Q (G) jest zlokalizowany późno, natomiast w obrębie prążków R wcześnie replikujący DNA.

7. Czas replikacji DNA, występującego w obrębie niektórych prążków C, nie zamyka się w określonym wycinku fazy S.

8. Wśród centromerowych i niecentromerowych prążków C obserwuje się duże zróżnicowanie pod względem ich wybarwienia się poszczególnymi technikami.

Pomimo nadal odczuwalnych niejasności w mechanizmach powstawania wzorów prążkowych, opracowanie różnych technik ich ujawniania oraz wyniki analiz porównawczych z innymi metodami badań chromosomów i chromatyny, dostarczyły one szeregu informacji o złożoności struktury chromosomów *Eukaryota*.

Autorzy dziękują Profesor dr hab. Marii J. Olszewskiej za krytyczną ocenę rękopisu niniejszego artykułu.

LITERATURA

- [1] ALFI O. S., DONNEL G. N., DERENCSENYI A., C-banding of human chromosomes produced by D. N. Ase, *Lancet*, **2**: 505, 1973.
- [2] ALFI O. S., MENON R., A rapid C-band staining technique for chromosomes, *J. Lab. Clin. Med.*, **82**: 692—694, 1973.
- [3] ANSEDE A., Human chromosome banding, *Lancet*, **1**: 1184, 1972.
- [4] ARRIGHI F. E., HSU T. C., Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81—86, 1971.
- [5] ARRIGHI F. E., SAUNDERS P. P., SAUNDERS G. F., HSU T. C., Distribution of repetitive DNA in human chromosomes, *Experientia*, **27**: 964—965, 1971.
- [6] BARANOVSKAYA L. I., ZAKHAROV A. F., DUTRILLAUX B., CARPENTIER S., PRIEUR M., LEJEUNE J., Différentiation des chromosomes X par les méthodes de despiralisation au 5-bromodéoxyuridine et de denaturation thermique ménagée, *Ann. Genet.*, **15**: 271—274, 1972.
- [7] BARNETT R. J., MacKINNON E. A., ROMEO-SIERRA C., The lability of acid-alcohol fixed human chromosomes, *Cytobios*, **11**: 115—122, 1974.
- [8] BOBROW M., MADEN K., PEARSON P. L., Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No 9, *Nature New Biology*, **238**: 122—124, 1972.
- [9] BOBROW M., Acridine orange and the investigation of chromosome banding, *Cold Spring Harbor Symposium on Quantative Biology*, **28**: 435—440, 1973.
- [10] BOSMAN F. T., SCHABERG A., A new G-banding modification for metaphase chromosomes, *Nature New Biology*, **241**: 216—217, 1973.
- [11] BOSTOCK C. J., PRESCOTT D. M., HATCH F. T., Timing of replication

- of the satellite and main band DNAs in cell of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*), *Exp. Cell Res.*, **74**: 487—495, 1972.
- [12] BOSTOCK C. J., CHRISTIE S., Chromosome banding and DNA replication studies on a cell line of *Dipodomys merriami*, *Chromosoma (Berl.)*, **48**: 73—87, 1974.
- [13] — Quinacrine fluorescence staining of chromosomes and its relationship to DNA base composition, *Exp. Cell Res.*, **86**: 157—161, 1974.
- [14] — Chromosomes of a cell line of *Dipodomys panamintinus* (Kangaroo rat) a banding and autoradiographic study, *Chromosoma (Berl.)*, **51**: 25—34, 1975.
- [15] BRITTEN R. J., KOHNE D. E., Repeated sequences in DNA, *Science*, **161**: 529—531, 1968.
- [16] BRODY T., Histones in cytological preparations, *Exp. Cell Res.*, **85**: 255—261, 1974.
- [17] BROWN R. L., PATHAK S., HSU T. C., The possible role of histones in the mechanism of chromosomal G banding, *Science*, **189**: 1090—1091, 1975.
- [18] BUCKLAND R. A., EVANS H. J., SUMNER A. T., Identifying mouse chromosomes with the ASG technique, *Exp. Cell Res.*, **69**: 231—236, 1971.
- [19] BURGER E. C., SCHEUERMANN W., Giemsa-Banden und heterochromatische Regionen bei Metaphasenchromosomen von *Vicia faba*, *Cytobiologie*, **9**: 23—35, 1974.
- [20] BURKHOLDER G. D., The ultrastructure of G- and C-banded chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **90**: 269—278, 1975.
- [21] CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L., Chemical differentiation along metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **49**: 219—222, 1968.
- [22] CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J., FOLEY G. E., WAGH U., SIMONSSON E., Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **58**: 128—140, 1969.
- [23] — DNA-binding fluorochromes for the study of the organisation of the metaphase nucleus, *Exp. Cell Res.*, **58**: 141—152, 1969.
- [24] CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **60**: 315—319, 1970.
- [25] CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., LINDSTEN J., HULTEN M., Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei, *Exp. Cell Res.*, **61**: 472—474, 1970.
- [26] CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents, *Exp. Cell Res.*, **62**: 490—492, 1970.
- [27] CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., MODEST E. J., Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents, *Chromosoma (Berl.)*, **30**: 215—227, 1970.
- [28] CASPERSSON T., LOMAKKA G., ZECH L., The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability, *Hereditas*, **67**: 89—102, 1971.
- [29] CASPERSSON T., de la CHAPELLE A., LINDSTEN J., SCHRÖDER J., ZECH L., Absence of brightly fluorescent Y material in XX men, *Ann. Genet.*, **14**: 173—176, 1971.
- [30] CALDERON D., SCHNEDL W., A comparison between quinacrine fluore-

- science banding and H^3 -thymidine incorporation patterns in human chromosomes, *Humangenetik*, **18**: 63—70, 1973.
- [31] CASTOLDI G. L., GRUSOVIN G. D., SCAPOLI G. L., SPANEDDA R., Differential acridine orange staining of human chromosomes, *Acta Genet. Med. Gemellol.*, **21**: 319—326, 1972.
- [32] CHAUDHURI J. P., VOGEL W., VOICULESCU I., WOLF U., A simplified method of demonstrating Giemsa-band pattern in human chromosomes, *Humangenetik*, **14**: 83—84, 1971.
- [33] COMINGS D. E., AVELINO E., OKADA T. A., WYANDT H. E., The mechanism of C- and G-banding of chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **77**: 469—493, 1973.
- [34] COMINGS D. E., KOVACS B. W., AVELINO E., HARRIS D. C., Mechanism of chromosome banding. V. Quinacrine banding, *Chromosoma (Berl.)*, **50**: 111—145, 1975.
- [35] COMINGS D. E., Mechanism of chromosome banding. IV. Optical properties of the Giemsa dyes, *Chromosoma (Berl.)*, **50**: 89—110, 1975.
- [36] COMINGS D. E., OKADA T. A., Mechanism of chromosome banding. VI. Whole mount electron microscopy of banded metaphase chromosomes and a comparison with pachytene chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **93**: 267—274, 1975.
- [37] CORNEO G., GINELLI E., POLLI E., Repeated sequences in human DNA, *J. Molec. Biol.*, **48**: 319—327, 1970.
- [38] CROSSEN P. E., PATHAK S., ARRIGHI F. E., A high resolution study of the DNA replication patterns of *Chinese hamster* chromosomes using sister chromatid differential staining technique, *Chromosoma (Berl.)*, **52**: 339—347, 1975.
- [39] DARLINGTON C. D., La COUR L. F., Differential reactivity of the chromosomes, *Ann. Bot. N. S.*, **2**: 615—625, 1938.
- [40] DEAVEN L. L., PETERSEN D. F., The chromosomes of CHO, on aneuploid *Chinese hamster* cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses, *Chromosoma (Berl.)*, **41**: 129—144, 1973.
- [41] de la CHAPELLE A., SCHRÖDER J., SELANDER R. K., STENSTRAND K., Differences in DNA composition along mammalian metaphase chromosomes, *Chromosoma (Berl.)*, **42**: 365—382, 1973.
- [42] de la CHAPELLE A., SCHRÖDER J., STENSTRAND K., FELLMAN J., HERVA R., SAARNI M., ANTTOLAINEN I., TALLILA I., TERVILA L., HUSÅ L., TALLQVIST G., ROBSON E. B., COOK P. L., SANGER R., Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10, *Amer. J. Hum. Genet.*, **26**: 746—766, 1974.
- [43] DRETS M. E., SHAW M. W., Specific banding patterns of human chromosomes (heterochromatin) Giemsa stain (chromosome bands), *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **68**: 2073—2077, 1971.
- [44] DUTRILLAUX B., LEJEUNE J., Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humaine, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **272**: 2638—2640, 1971.
- [45] DUTRILLAUX B., Nouveau système de marquage chromosomique: Les bandes T, *Chromosoma*, **41**: 395—402, 1973.
- [46] — Traitements discontinus par le BrdU et coloration par l'acridine orange: obtention de marquages R, Q et intermédiaires, *Chromosoma (Berl.)*, **62**: 261—273, 1975.
- [47] DUTRILLAUX B., LAURENT C., COUTURIER J., LEJEUNE J., Coloration

- par l'acridine orange de chromosomes préalablement traités par le 5-bromo-déoxyuridine (BrdU), C. R. Acad. Sci. (Paris), **276**: 3179—3181, 1973.
- [48] DUTRILLAUX B., COVIC M., Étude de facteurs influençant la dénaturation thermique ménagée des chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **85**: 143—153, 1974.
- [49] DUTRILLAUX B., FOSSE A. M., Sur le mécanisme de la segmentation chromosomique induite par le BUDR, *Ann. Génét.*, **17**: 207—211, 1974.
- [50] DUTRILLAUX B., Obtention simultanée de plusieurs marquages chromosomiques sur les mêmes préparations, après traitement par le BrdU, *Human-genetik*, **30**: 297—306, 1975.
- [51] DUTRILLAUX B., COUTURIER J., RICHER C. L., VIEGAS-PEQUIGNOT E., Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment, *Chromosoma (Berl.)*, **58**: 51—61, 1976.
- [52] EIBERG H., Satellite staining of human chromosomes, *Lancet*, **2**: 836—837, 1974.
- [53] — New selective Giemsa technique for human chromosomes, Cd staining, *Nature*, **248**: 55, 1974.
- [54] EPPLEN J. T., SIEBERS J. W., VOGEL W., DNA replication patterns of the human chromosomes from fibroblast and amniotic fluid cells revealed by a Giemsa staining technique, *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**: 177—185, 1975.
- [55] EVANS H. J., Molecular architecture of human chromosomes, *Brit. Med. Bull.*, **29**: 196—202, 1973.
- [56] EVANS H. J., GOSDEN J. R., MITCHELL A. R., BUCKLAND R. A., Location of human satellite DNAs on the Y chromosome, *Nature*, **251**: 346—347, 1974.
- [57] FAUST J., VOGEL W., Are N-bands selective staining of specific heterochromatin? *Nature*, **249**: 252—253, 1974.
- [58] FLAMM W. G., Highly repetitive sequences of DNA in chromosomes, *Int. Rev. Cytol.*, **32**: 1—51, 1972.
- [59] FLEISCHMANN T., HAKANSSON G. H., LEVAN A., MÖLLER T., Multiple chromosome aberrations in a lymphosarcomatous tumor, *Hereditas*, **70**: 243—258, 1972.
- [60] GAGNE R., TANGUAY R., LABERGE C., Differentiation staining patterns of heterochromatin in man, *Nature, New Biology*, **232**: 29—30, 1971.
- [61] GAGNE R., LABERGE C., Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man, *Exp. Cell Res.*, **73**: 239—242, 1972.
- [62] GALE E. F., CUNDLIFFE E., REYNOLDS P. E., RICHMOND M. H., WARRING M. J., *The molecular basis of antibiotics action*, J. Wiley and Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 1972.
- [63] GANNER E., EVANS H. J., The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosomes complement, *Chromosoma (Berl.)*, **35**: 326—341, 1971.
- [64] GOLOMB H. M., BAHR G. F., Correlation of the fluorescent banding pattern and ultrastructure of a human chromosome, *Exp. Cell Res.*, **84**: 121—126, 1974.
- [65] GOTTFELD J. M., BONNER J., RADDA G. K., WALKER I. O., Biophysical studies on the mechanism of quinacrine staining of chromosomes, *Biochemistry*, **13**: 2937—2945, 1974.
- [66] GRATZNER H., INGRAM D., LIEF R. C., CASTRO A., The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for immunofluorescent determination of DNA

- replication in single cells and chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **95**: 88—94, 1975.
- [67] GRZESCHIK K. H., KIM MY A., JOHANNSMANN R., Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining, *Humangenetik*, **29**: 41—59, 1975.
- [68] HEITZ E., Das Heterochromatin der Moose, *Jb. wiss. Bot.*, **69**: 768—813, 1928.
- [69] — Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlicher Nukleolen, *Planta (Berl.)*, **12**: 775—844, 1931.
- [70] HSU T. C., ARRIGHI F. E., Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes, *Chromosoma (Berl.)*, **34**: 243—253, 1971.
- [71] HSU T. C., ARRIGHI F. E., SAUNDERS G. F., Compositional heterogeneity of human heterochromatin, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **69**: 1464—1466, 1972.
- [72] HSU T. C., PATHAK S., SHAFER D. A., Induction of chromosome cross-banding by treating cells with chemical agents before fixation, *Exp. Cell Res.*, **79**: 484—487, 1973.
- [73] HÜBNER H., KONONOWICZ A. K., Badania autoradiograficzne nad zróżnicowaniem chromatyny w jądrach interfazowych i chromosomach mitotycznych. II. Badania inkorporacji ³H-tymidyny i wiązania ³H-aktynomycyny D przez wybrane segmenty chromosomów mitotycznych człowieka w funkcji ich zróżnicowanej zdolności do wiązania fluorochromów akrydynowych, w druku.
- [74] IKUSHIMA T., WOLFF S., Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **87**: 15—19, 1974.
- [75] JONES K. W., Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells, *Nature (Lond.)*, **225**: 912—915, 1970.
- [76] JONES K. W., CORNEO G., Location of satellite and homogeneous DNA sequences on human chromosomes, *Nature (Lond.) New Biology*, **233**: 268—271, 1971.
- [77] JONES K. W., PROSSER J., CORNEO G., GINELLI G., The chromosomal location of human satellite DNA III, *Chromosoma (Berl.)*, **42**: 445—451, 1973.
- [78] JONES K. W., PURDOM I. F., PROSSER J., CORNEO G., The chromosomal localisation of human satellite DNA I, *Chromosoma (Berl.)*, **49**: 161—171, 1974.
- [79] KATO H., MORIWAKI K., Factors involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes, *Chromosoma (Berl.)*, **38**: 105—120, 1972.
- [80] KATO H., YOSIDA T. H., Banding patterns of Chinese hamster chromosomes revealed by new techniques, *Chromosoma (Berl.)*, **36**: 271—280, 1972.
- [81] KIM M. A., Chromatid exchange and heterochromatin alteration of human chromosomes with BrdU-labelling demonstrated by benzimidazole fluorochrome and Giemsa stain, *Humangenetik*, **25**: 179—188, 1974.
- [82] KLINGER H. P., Rapid processing of primary embryonic tissues for chromosome banding pattern analysis, *Cytogenetics*, **11**: 424—435, 1972.
- [83] KORENBERG J., FREEDLENDER E., Giemsa technique for detection of sister chromatid exchanges, *Chromosoma (Berl.)*, **48**: 355—360, 1974.
- [84] KURNIT D. M., DNA helical content during the C-banding procedure, *Cytogenet. Cell Genet.*, **13**: 313—329, 1974.
- [85] LANG M., FELSENFELD G., The preferential interaction of polylysine and

- polyarginine with specific base sequences in DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 56: 1325—1332, 1966.
- [86] LATT S. A., Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 70: 3395—3399, 1973.
- [87] — Microfluorometric analysis of deoxyribonucleic acid replication kinetics and sister chromatid exchanges in human chromosomes, J. Histochem. Cytochem., 22: 478—491, 1974.
- [88] LATT S. A., STETTEN G., JUERGENS L. A., WILLARD H. F., SCHER C. D., Recent developments in the detection of DNA synthesis by 33 258 Hoechst fluorescence, J. Histochem. Cytochem., 23: 493—505, 1975.
- [89] LERMAN L. S., Structural considerations in the interaction of DNA acridines, J. Mol. Biol., 3: 18—30, 1961.
- [90] — The structure of the DNA-acridine complex, Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 49: 94—102, 1963.
- [91] LIMA-DE-FARIA A., Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*, J. Biophys. Biochem. Cytol., 6: 457—466, 1959.
- [92] — Incorporation of tritiated thymidine into meiotic chromosomes, Science (N.Y.), 130: 503—506, 1959.
- [93] LIMA-DE-FARIA A., REITALU J., BERGMAN S., The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man, Hereditas, 47: 695—703, 1961.
- [94] LIMA-DE-FARIA A., JAWORSKA H., Late DNA synthesis in heterochromatin, Nature (Lond.), 217: 138—142, 1968.
- [95] LIMA-DE-FARIA A., Handbook of molecular cytology, ed. Lima-de-Faria A., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 217—325, 1969.
- [96] LIN C. C., van de SANDE J. H., Differential fluorescent staining of human chromosomes with daunomycin and adriamycin — the D-bands, Science, 190: 61—63, 1975.
- [97] LUNDSTEEN C., KRISTOFFERSEN L., OTTOSEN F., Studies on the mechanism of chromosome banding with trypsin, Humangenetik, 24: 67—69, 1974.
- [98] MATSUI S., SASAKI M., Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes, Nature, 246: 148—150, 1973.
- [99] — The mechanism of Giemsa-banding of mammalian chromosomes, with special attention to the role of non-histone proteins, Japan. J. Genet., 50: 189—204, 1975.
- [100] MEISNER L. F., CHUPREVICH T. W., JOHNSON C. B., INHORN S. L., CARTER J. J., Banding of human chromosomes with caesium chloride, Lancet, 1: 100, 1973.
- [101] MEISNER L. F., CHUPREVICH T. W., INHORN S. L., Giemsa banding specificity, Nature New Biology, 245: 145—147, 1973.
- [102] — Chromosome banding in G2 with tetracycline, Lancet, 1: 1509, 1973.
- [103] MEISNER L. F., CHUPREVICH T. W., INHORN S. L., JOHNSON C. B., Dye-nucleoprotein interactions in Giemsa banding, J. Cell Biol., 61: 248—253, 1974.
- [104] McKAY R. D. G., The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes, Chromosoma (Berl.), 44: 1—14, 1973.
- [105] McKENZIE W. H., LUBS H. A., An analysis of the technical variables in the production of C bands, Chromosoma (Berl.), 41: 175—182, 1973.

- [106] MIKKELSEN M., Identification of G group anomalies in Down's syndrome by quinacrine dihydrochloride fluorescence staining, *Humangenetik*, **12**: 67—73, 1971.
- [107] MOORE R., UREN J., The pattern of DNA synthesis in short-term leukocyte cultures of *Protemnodon bicolor*, *Exp. Cell Res.*, **38**: 141—147, 1965.
- [108] MÜLLER W., Spezifikation bei Wechselwirkung basischer Farbstoffe mit Nucleinsäuren, Colloquium at Freiburg (Br.), 8. 11. 1972. Cytat za W. Voglem i wsp. [149].
- [109] NASTASI M., YIP R. W., SELIGY V. L., SZABO A. G., WILIAMS R. E., Exciton-like splitting in acridine dye-nucleic acid complexes, *Nature*, **249**: 248—250, 1974.
- [110] NIEBUHR E., Dicentric and monocentric Robertsonian translocations in man, *Humangenetik*, **16**: 217—226, 1972.
- [111] NIIKAWA N., KAJII T., Satellite-stalk staining of human chromosomes, *Lancet*, **1**: 1383—1384, 1975.
- [112] OLINS D., Interaction of lysine-rich histones and DNA, *J. Mol. Biol.*, **43**: 439—447, 1969.
- [113] PACHMANN U., RIGLER R., Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence, *Exp. Cell Res.*, **74**: 602—608, 1972.
- [114] PALMER C. G., PALMER C. G., 5-bromodeoxyuridine induced constrictions in human chromosomes, *Canad. J. Genet. Cytol.*, **12**: 816—820, 1970.
- [115] PARDUE M. L., GALL J. G., Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, **168**: 1356—1358, 1970.
- [116] Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, VIII: 7, 1972. The National Foundation, New York.
- [117] PATHAK S., HSU T. C., UTAKOJI T., Relationships between patterns of chromosome banding and DNA synthetic sequences: a study on the chromosomes of the Seba's fruit bat, *Carrolia perspicillata*, *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**: 157—164, 1973.
- [118] PATIL S. P., MERRICK S., LUBS H. A., Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain, *Science*, **173**: 821—822, 1971.
- [119] PAWLOWITZKI I. H., The correspondence between quinacrine banding patterns and sites of secondary constrictions in human chromosomes, *Humangenetik*, **15**: 236—241, 1972.
- [120] PEARSON P. L., BOBROW M., VOSA C. G., Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei, *Nature*, **226**: 78—81, 1970.
- [121] PERRY P., WOLFF S., New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**: 156—158, 1974.
- [122] REITALU J., A familial Y-22 translocation in man, *Hereditas*, **74**: 155—160, 1973.
- [123] RUBIN R. L., MOUDRIANAKIS E. N., Cooperative binding of histones to DNA, *J. Mol. Biol.*, **67**: 361—366, 1972.
- [124] RUZICKA F., SCHWARZACHER H. G., The ultrastructure of human mitotic chromosomes and interfase nuclei treated by Giemsa banding techniques, *Chromosoma (Berl.)*, **46**: 443—454, 1974.
- [125] SANCHEZ O., YUNIS J. J., The relationship between repetitive DNA and chromosomal bands in man, *Chromosoma (Berl.)*, **48**: 191—202, 1974.
- [126] SAUNDERS G. H., HSU T. C., GETZ M. J., SIEMS E. L., ARRIGHI F. E., Locations of human satellite DNA in human chromosome, *Nature New Biology*, **236**: 244—246, 1972.

- [127] SCHIRAISHI Y., The differential reactivity of human peripheral leucocyte chromosomes induced by low temperature, *Jap. J. Genet.*, **45**: 429—442, 1970.
- [128] SCHIRAISHI Y., YOSIDA T. H., Banding pattern analysis of human chromosomes by use urea treatment technique, *Chromosoma (Berl.)*, **37**: 75—83, 1972.
- [129] SCHMIADY H., WEGNER B. D., SPERLING K., Relative DNA content of human euchromatin and heterochromatin after G, C and Giemsa 11 banding, *Humangenetik*, **29**: 85—89, 1975.
- [130] SCHNEDL W., Analysis of the human karyotype using a reassociation technique, *Chromosoma (Berl.)*, **34**: 448—454, 1971.
- [131] SCHRECK R. B., WARBURTON D., MILLER O. J., BEISER S. M., ERLANGER B. F., Chromosome structure as revealed by a combined chemical and immunochemical procedure, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **70**: 804—807, 1973.
- [132] SCHWEIZER D., Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI, *Chromosoma*, **58**: 307—324, 1976.
- [133] — DAPI fluorescence of plant chromosomes prestained with actinomycin D, *Exp. Cell Res.*, **102**: 408—413, 1976.
- [134] SEABRIGHT M., The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man, *Chromosoma (Berl.)*, **36**: 204—210, 1972.
- [135] SEHESTED J., Giemsa „banding” in metaphase chromosomes after pretreatment with inactivated trypsin, *Humangenetik*, **19**: 321—324, 1973.
- [136] — A simple method for R banding of human chromosomes, showing a pH-dependent connection between R and G bands, *Humangenetik*, **21**: 55—63, 1974.
- [137] SELANDER R. K., de la CHAPELLE A., The fluorescence of quinacrine mustard with nucleic acids, *Nature New Biology*, **245**: 240—243, 1973.
- [138] SHAFER D. A., Banding human chromosomes in culture with actinomycin D, *Lancet*, **1**: 824—828, 1973.
- [139] SHARMA T., DHALIWAL M. K., Relationship between patterns of late S DNA synthesis and C- and G-banding Muntjak chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **87**: 394—397, 1974.
- [140] SIVAK A., WOLMAN S. R., Chromosomal proteins in fixed metaphase cells, *Histochemistry*, **42**: 345—349, 1974.
- [141] SUMNER A. T., EVANS H. J., BUCKLAND R. A., New technique for distinguishing between human chromosomes, *Nature New Biology*, **232**: 31—32, 1971.
- [142] — Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. I. The effects of fixation in methanol-acetic acid, *Exp. Cell Res.*, **81**: 214—222, 1973.
- [143] SUMNER A. T., EVANS H. J., Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal components, *Exp. Cell Res.*, **81**: 223—236, 1973.
- [144] SUMNER A. T., Involvement of protein disulphides and sulphhydryls in chromosome banding, *Exp. Cell Res.*, **83**: 438—442, 1973.
- [145] SZALA S., CHORAŻY M., Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów, PWN, Warszawa 1972.
- [146] TAYLOR J. H., Asynchronous duplication in cultured cells of *Chinese hamster*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**: 455—463, 1960.
- [147] TUPITSINA L. P., ZAKHAROV A. F., TSVETKOVA T. G., Dependence of

- differential staining of heterochromatin on the time of its reduplication and the degree of condensation, *Tsitologia*, **17**: 261—265, 1975.
- [148] WEISBLUM B., de HASETH P. L., Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **69**: 629—632, 1972.
- [149] VOGEL W., FAUST J., SCHMID M., SIEBERS J. W., On the relevance of non-histone proteins to the production of Giemsa banding patterns on chromosomes, *Humangenetik*, **21**: 227—236, 1974.
- [150] VOSA C. G., Heterochromatin recognition with fluorochromes, *Chromosoma (Berl.)*, **30**: 366—372, 1970.
- [151] YUNIS J. J., YASMINEH W. G., Heterochromatin, satellite DNA, and cell function, *Science*, **174**: 1200—1209, 1971.
- [152] YUNIS J. J., ROLDAN L., YASMINEH W. G., LEE J. G., Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes, *Nature (Lond.)*, **231**: 532—533, 1971.
- [153] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Asynchrony of DNA replication and mitotic spiralization along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes, *Chromosoma*, **23**: 365—385, 1968.
- [154] — Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes, *Chromosoma*, **38**: 341—365, 1972.
- [155] ZAKHAROV A. F., BARANOVSKAYA L. I., IBRAIMOV A. I., BENJUSCH V. A., DEMINTSEVA V. S., OBLAPENKO N. G., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5-bromodeoxyuridine and 5-bromodeoxycytidine revealed differentiation in human chromosomes, *Chromosoma*, **44**: 340—359, 1974.
- [156] ZAKHAROV A. F., EGOLINA N. A., Correlation between patterns of DNA replication and chromosome banding, *Biol. Zbl.*, **95**: 327—334, 1976.
- [157] ZECH L., Investigation of metaphase chromosomes with DNA binding fluorochrome, *Exp. Cell Res.*, **58**: 463—464, 1969.

Otrzymano: 23 maja 1977.

Przyjęto: 27 maja 1977.

*Adres autorów: Pl. 9 Maja 1, 90-647 Łódź,
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.*

STRUKTURA CHROMOSOMÓW METAFAZOWYCH

Jadwiga MICHALSKA

Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice

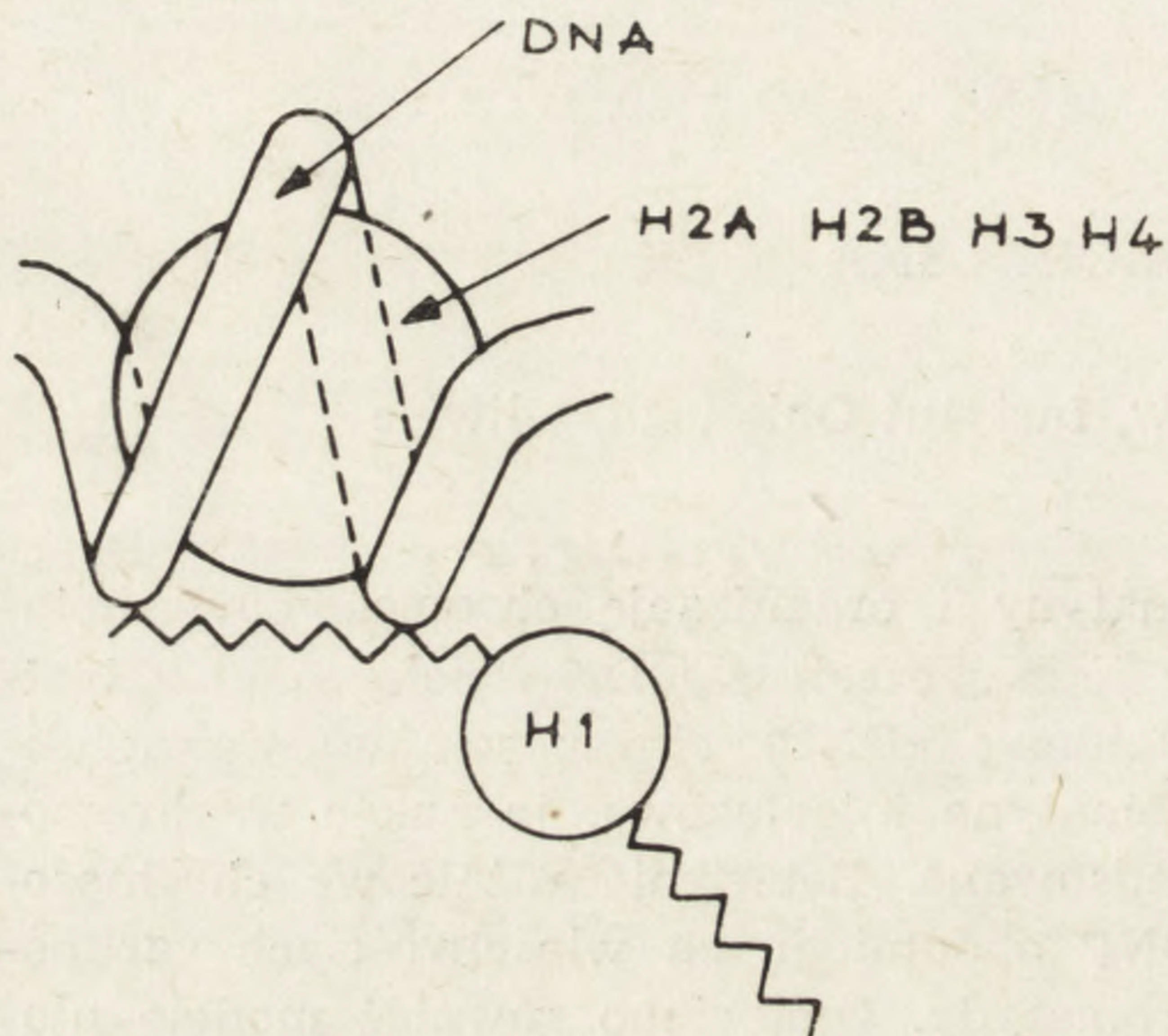
Streszczenie. Omówiono strukturę chromatyny i organizację chromosomów metafazowych. Chromatyna zbudowana jest z jednej cząsteczki DNA połączonej z białkami. Włókienko dezoksyrybonukleoproteidowe (DNP) chromosomów ma strukturę podjednostkową taką samą jak chromatyna interfazowa, jednakże w chromosomach włókienko to jest silniej skondensowane. Barwienie różnicowe chromosomów wykazało, że odcinki włókienka DNP o odmiennych właściwościach zgrupowane są w określonych segmentach chromatydy. Omówiono również modele ułożenia włókienka DNP w chromatydzie.

ORGANIZACJA CHROMATYNY W JĄDRZE INTERFAZOWYM

Jądrowy DNA komórek *Eukaryota* występuje zawsze w połączeniu z histonami i białkami niehistonowymi. Te trzy składniki tworzą włókienko dezoksyrybonukleoproteidowe — podstawową jednostkę strukturalną zarówno jądra interfazowego, jak i chromosomów metafazowych. Połączenie DNA z białkami ma wpływ na wiele właściwości DNA, m. in. modeluje zmiany konformacyjne, które wpływają na aktywność matrycową DNA. Badania mające na celu wyjaśnienie budowy włókienka dezoksyrybonukleoproteidowego wykazały, że chromatyna jąder interfazowych składa się z paciorkowatych, globularnych struktur połączonych na podobieństwo sznura koralu cienkimi włókienkami. Globularne struktury zwane cząstkami ν [92, 93] lub nukleosomami [94] mają średnicę około 100 Å, a łączące je włókienka około 15 Å. Odległości między nukleosomami wynoszą mniej niż 20 Å [45]. W skład nukleosomu wchodzi histony H2A, H2B, H3 i H4 oraz odcinek DNA zawierający około 200 par zasad. Histony H3 i H4 występują w nukleosomach w postaci tetrameru (H3 H4)₂ [68, 69]. Zaproponowano model budowy nukleosomu, w którym cztery histony tworzą rdzeń, na który nawinięty jest dwupasmowy DNA. W modelu tym histon H1 może łączyć nukleosomy w tym samym włókienku chroma-

tyny lub też podjednostki sąsiednich włókienek (rys. 1). Nukleosomy występują w chromatynie nieaktywnej. W chromatynie ulegającej transkrypcji nie stwierdzono obecności nukleosomów [47].

Z badań genetyki klasycznej wiadomo, że określone sekwencje DNA tworzące geny strukturalne są przekazywane z pokolenia na pokolenie



Rys. 1. Model struktury podjednostki chromatyny

Rdzeń białkowy jest złożony z czterech histonów. Grupy zasadowe histonów są połączone z odcinkiem DNA o długości około 200 par zasad, owiniętym dookoła rdzenia białkowego. Cały kompleks tworzy globularną strukturę zwaną nukleosomem. Histon H1 może spinać podjednostki tego samego włókienka chromatynowego lub podjednostki sąsiednich włókienek. Według [4]

w tych samych chromosomach. Sugeruje to, że układ włókienek chromatynowych, jaki obserwuje się w jądrze interfazowym, jest tylko pozornie nieuporządkowany. Określone sekwencje DNA powinny zajmować określone położenie, aby w procesie kondensacji mogły być upakowane w odpowiednie chromosomy. Spostrzeżenia Du Praw [34] wykazują, że włókienka chromatynowe w komórkach pszczoły są przyczepione do pierścieni otaczających pory jądrowe. Comings [18, 24] opierając się na tym spostrzeżeniu oraz na danych cytologicznych, takich jak ułożenie chromosomów w płytkach metafazowych, opracował model uporządkowania włókienek chromatynowych w jądrze interfazowym, (rys. 2). Według tego modelu uporządkowanie to jest utrzymywane przez przymocowanie włókien chromatynowych do pierścieni otoczki jądrowej w komórkach ptaków z mikroskopu elektronowego potwierdzono przymocowanie włókienek chromatynowych do pierścieni otoczki jądrowej w komórkach ptaków i ssaków [24, 54]. W preparatach chromosomów metafazowych stwierdzono obecność fragmentów błony jądrowej, przyczepionych do chromosomów. Miejsca przyczepu były rozmieszczone przypadkowo wzdłuż ramion chromatyd. Fragmenty te były morfologicznie identyczne z preparatami wyizolowanych i oczyszczonych błon jądrowych [25]. Vogel i Schroeder [120] analizując aberracje chromosomowe dochodzą do wniosku, że w jądrze interfazowym włókienka chromatynowe wchodzące w skład homologicznych chromosomów są ułożone obok siebie (sparowa-

nie somatyczne). Sparowanie somatyczne nie zachodzi wzdłuż całej długości chromosomów, lecz ogranicza się tylko do pewnych jego części.

Comings [19] sugerował, że miejsca przyczepu mogą być jednocześnie miejscami inicjacji replikacji DNA. Jednakże dane z badań autoradiograficznych po pulsowym znakowaniu [^3H] tymidyną synchronizowanych



Rys. 2. Organizacja chromatyny w jądrze interfazowym. Włókienka chromatynowe utrzymywane są w określonej konfiguracji przez przymocowanie do pierścieni por jądrowych (a). Obrazy po zniszczeniu błony jądrowej, spowodowanym rozpraszaniem preparatów na powierzchni wody (b i c). Według [24]

i niesynchronizowanych komórek zwierząt są sprzeczne i problem ten nie jest dotąd jednoznacznie rozwiązany [20, 60]. Na materiale roślinnym, stosując metody biochemiczne, wykazano, że nowo replikowany DNA jest związany z błoną jądrową [18, 62]. Wyniki prac wykonanych techniką autoradiografii nie są tak jednoznaczne. Stwierdzono, że DNA replikuje blisko otoczki jądrowej tylko w późnej fazie S [111]. Natomiast z badań Kuroiwy [71] wynika, że miejsca replikacji DNA są rozmieszczone w okolicach chromatyny rozproszonej, występujących na terenie całego jądra. Taką lokalizację miejsc replikacji obserwowano zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie S.

STRUKTURA WŁÓKIENKA DEZOKSYRYBONUKLEIDOWEGO
W CHROMOSOMACH METAFAZOWYCH

Obecnie przyjmuje się, że jedną chromatydę tworzy tylko jedna cząsteczka DNA (uninemiczny model struktury chromosomu). Za taką koncepcją przemawiają dane genetyczne dotyczące mutacji i rekombinacji. Również spostrzeżenia biochemiczne popierają taki model struktury chromosomu. Stwierdzono bowiem, że z wyjątkiem sekwencji powtarzających się, reszta DNA jest obecna w genomie haploidalnym w postaci pojedynczych kopii [72]. Ponadto Kavenoff i Zimm [67] na podstawie badań ciężaru cząsteczkowego DNA komórek *Drosophila* dochodzą do wniosku, że jedną chromatydę tworzy tylko jedna cząsteczka DNA bez względu na to czy chromosom jest metacentryczny, czy też submetacentryczny.

Niektórzy autorzy wysuwają koncepcję, że w cząsteczkach DNA występują „wstawki” substancji innych niż DNA. Postulowano, że łączniki te mogą mieć naturę białkową [2, 33] lub są zmodyfikowanymi nukleotydami, lub też RNA połączonym z białkiem [57]. Jednakże obecność wstawek wykluczają doświadczenia, w których chromosomy szczoteczkowe płazów [10, 48] i metafazowe chromosomy ludzkie [1] trawiono proteazami, RNazą i DNazą. Tylko trawienie DNazą powoduje fragmentację włókienek chromosomalnych, co wskazuje, że za ciągłość struktury chromosomu odpowiedzialny jest tylko DNA.

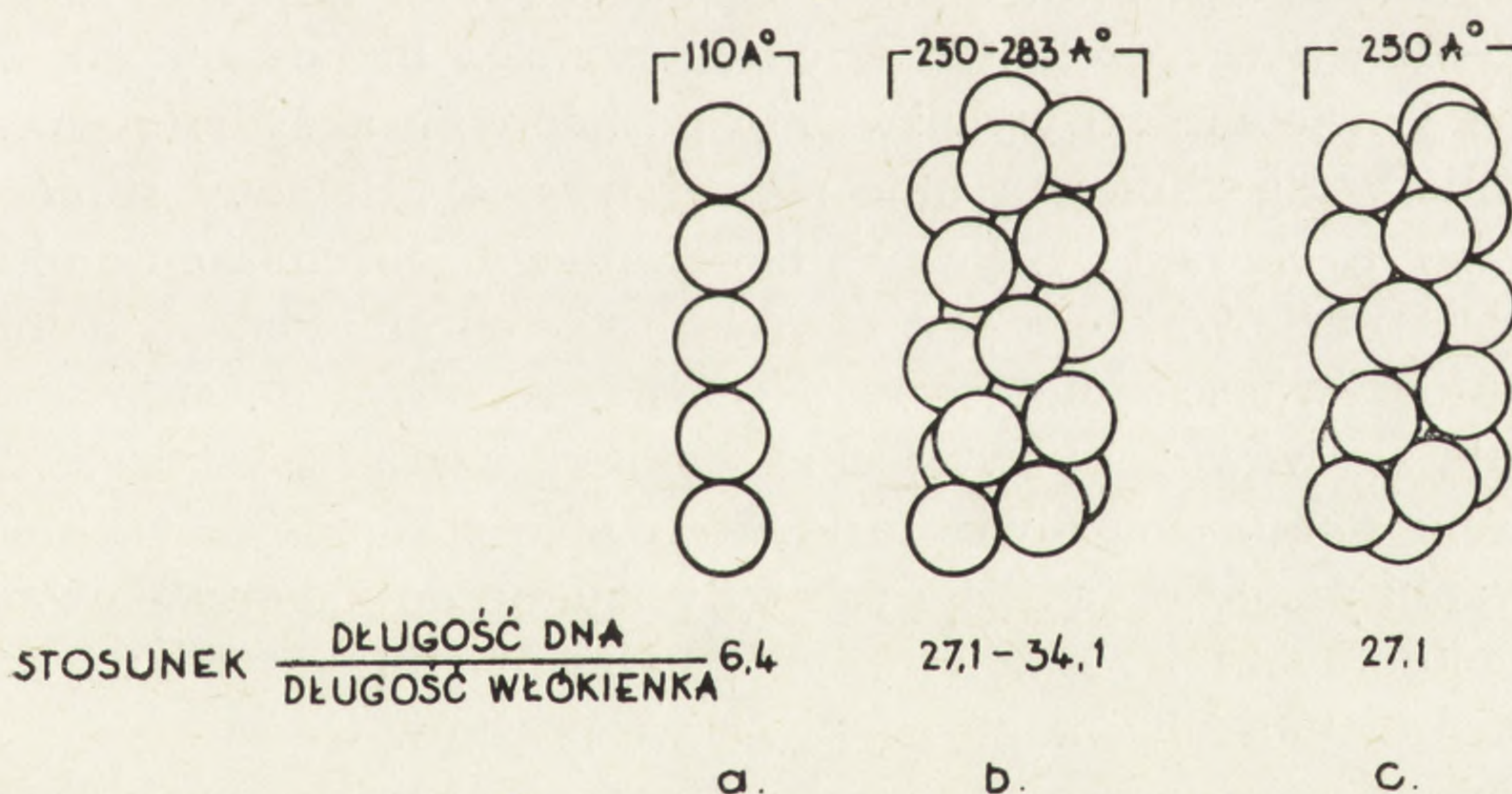
Struktura podstawowego włókienka dezoksyrybonukleoproteidowego jest identyczna zarówno w jądrze interfazowym, jak i w chromosomach metafazowych. W preparatach chromosomów ssaków rozpraszanych detergentem i mocznikiem spostrzega się nukleosomy o średnicy około 100 Å [99]. Nucleosomy te są takie same, jak nukleosomy obserwowane przez Olinsów [92, 93] w chromatynie interfazowej.

W chromosomach badanych w mikroskopie elektronowym znajduje się nie tylko włókienka o średnicy ~ 100 Å, ale również włókienka o średnicy 230—300 Å. Różnice te zależą od metody przygotowania preparatów. W preparatach nieskrawanych spostrzega się włókienka 100 Å, jeżeli w czasie preparatyki stosuje się formalinę [124] lub wersenian sodu [109]. Natomiast w nieobecności związków chelatujących w preparatach chromosomów występują na ogół włókienka o średnicy 230—300 Å [1, 35, 36, 50, 74], chociaż Du Praw znajdował także włókienka o średnicy ~ 50 Å, a nawet o grubości 500 Å. Powstaje pytanie, które z tych włókienek jest formą natywną występującą w chromosomach? Wolfe [124, 127] uważa, że natywną formą jest włókienko 100 Å, a włókienka 250 Å powstają przez kontaminację białkami komórkowymi. Podobnie Solari [109, 110] sądzi, że włókienka 250 Å są artefaktami powstającymi w wyniku agregacji włókienek o mniejszej średnicy. Agregację tę powo-

dują jony dwuwartościowe, etanol i białka. Inną interpretację podaje Ris [100—102]. W chromatynie nieaktywnej występują włókienka 250 Å, ale do zachowania ich struktury potrzebne są jony metali dwuwartościowych. Włókienka 250 Å mogą składać się z dwu włókienek 100 Å lub też powstawać przez sfałdowanie lub spiralizację włókienka 100 Å.

Podobne stanowisko zajmuje Du Praw [36, 37]. Według jego modelu struktury chromosomu, cząsteczka DNA połączona z białkiem ulega spiralizacji w tzw. włókienko typu A (ϕ 60—110 Å). We włókienku typu A stosunek długości DNA do długości włókienka wynosi około 6 : 1. Włókienko to ulega dalszej superspiralizacji, zmniejszając swą długość od 5 do 10 razy, w której wyniku powstaje włókienko typu B o średnicy \approx 250 Å.

Białka związane z DNA można podzielić na trzy klasy [38]: 1. białka wspólne dla obydwu typów włókienek, niektóre z tych białek mogą indukować pierwszorzędową spiralizację typową dla włókienek A; 2. białka specyficzne dla włókienek typu B, niektóre z nich stabilizują drugorzędową spiralizację włókienek A prowadzącą do powstania włókienek typu B; 3. białka enzymatyczne, takie jak np. polimeraza RNA, które mogą funkcjonować we włókienku A, ale nie są czynne we włókienku B, gdzie DNA jest bardzo silnie upakowany.



Rys. 3. Ułożenie nukleosomów w struktury wyższego rzędu: a — liniowe; b i c — struktury powstające przez spiralizację nukleosomów ułożonych liniowo

b — ułożenie, w którym każdy nukleosom jest w kontakcie z 4 sąsiednimi i na każdy obrót helisy przypadają 4 nukleosomy, c — bardzo ściśle upakowana struktura, w której każdy nukleosom przylega do 6 nukleosomów sąsiednich. Według [11]

W tym czasie, gdy Du Praw opracował swój model, nie znana była jeszcze podjednostkowa struktura chromatyny. Carlson i Olins [11] opierając się na danych uzyskanych techniką rozpraszania promieni X przedstawiają hipotetyczne modele ułożenia nukleosomów w struktury wyż-

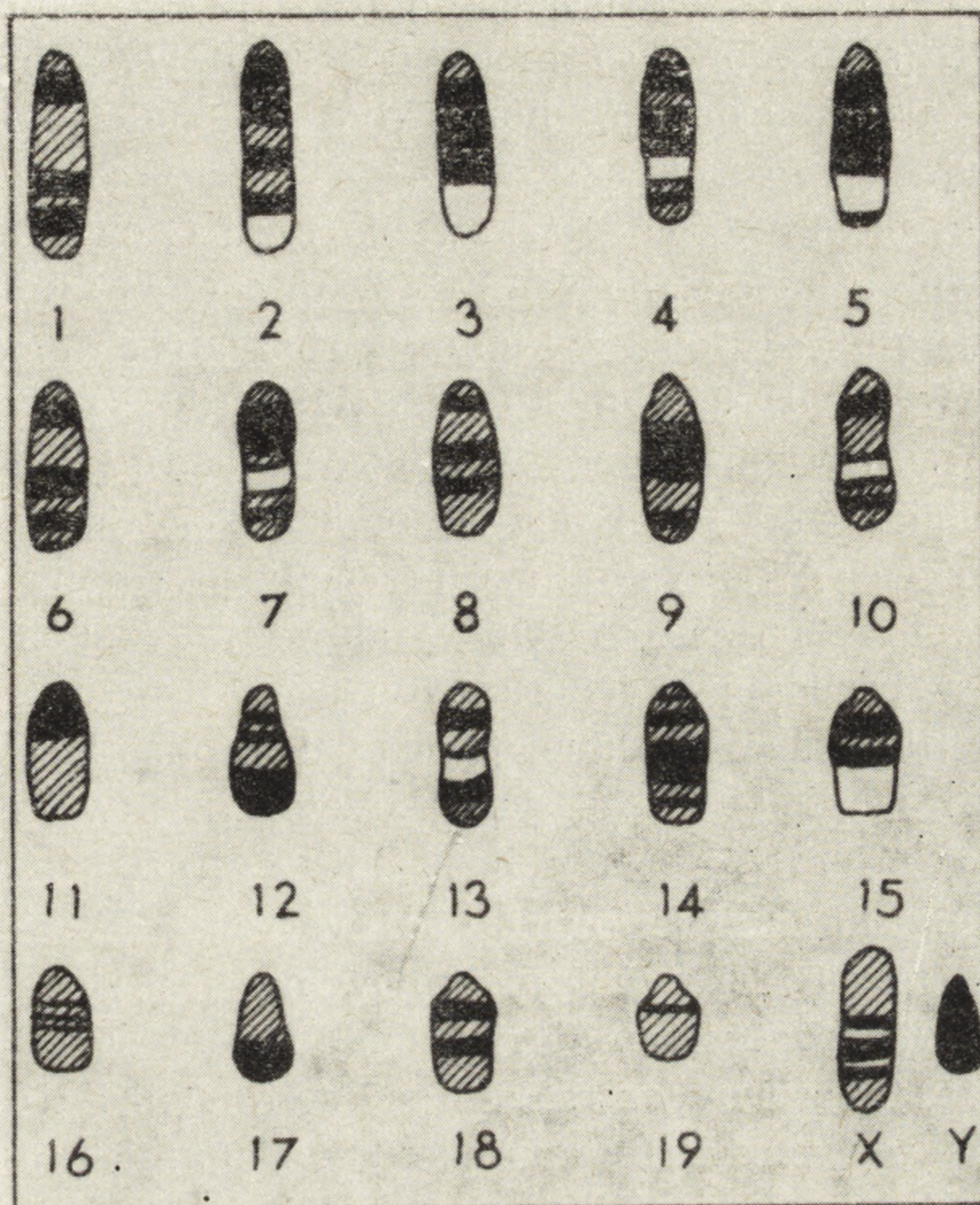
szego rzędu (rys. 3). Krzywe rozpraszania promieni X wyliczone dla tych modeli są zgodne z danymi doświadczalnymi. Liniowe ułożenie nukleosomów (rys. 3a) przypomina włókienko typu A w modelu Du Praw. Natomiast struktury powstające przez spiralizację nukleosomów ułożonych liniowo mają właściwości podobne jak włókienko typu B. Tak więc można przyjąć, że chromosom metafazowy charakteryzuje się strukturą podjednostkową taką samą jak chromatyna interfazowa, ale w chromosomie dezoksyrybonukleoproteid ulega silnej kondensacji. Dla zachowania zwartej struktury wyższego rzędu potrzebne są określone warunki środowiska, np. odpowiednie stężenie jonów metali dwuwartościowych. Badania Fincha i Kluga [46] popierają taki model struktury włókienka dezoksyrybonukleidowego. Wykazali oni bowiem, że w preparatach chromatyny interfazowej, w obecności jonów magnezu, nukleosomy ulegają spiralizacji.

BARWIENIE RÓŻNICOWE CHROMOSOMÓW¹

Wprowadzenie metod barwienia różnicowego [13] pozwoliło stwierdzić, że włókno chromosomowe nie tworzy w chromatydzie nieregularnej sieci, lecz pewne odcinki tego włókna, które mają odmienne właściwości od pozostałych, zgrupowane są w bloki poprzeczne. Prace nad barwieniem różnicowym chromosomów zostały zapoczątkowane w pracowni Casperssona [12—15]. Stwierdzono, że w chromosomach metafazowych, zarówno roślin jak i zwierząt, po wybarwieniu pochodnymi akrydyny pewne segmenty fluoryzują silniej, a inne słabiej (rys. 4). Regiony silnie fluoryzujące tworzą charakterystyczny dla każdego chromosomu układ poprzecznych prążków, który jest identyczny w chromosomach homologicznych. Intensywność fluorescencji można mierzyć densytometrycznie. Otrzymuje się wówczas powtarzalne wykresy charakterystyczne dla każdego chromosomu. Umożliwia to identyfikację chromosomów, które przy zastosowaniu metod dotąd znanych były trudne do zidentyfikowania, jak np. chromosomy 21 i 22 w kariotypie ludzkim [16]. Prążki uzyskane po wybarwieniu fluorochromami noszą nazwę prążków Q.

Prace te zapoczątkowały bardzo burzliwy rozwój metod barwienia różnicowego. Stwierdzono, że prążki uzyskuje się nie tylko po wybarwieniu chromosomów fluorochromami, ale również po wybarwieniu barwnikiem Giemsy. W tym przypadku preparaty chromosomów poddaje się przed barwieniem odpowiedniej obróbce. W zależności od metody traktowania preparatów zabarwiają się ciemno różne regiony chromosomów,

¹ Szczegółowe naświetlenie tego zagadnienia z uwzględnieniem najnowszej literatury przedstawione jest w artykule H. Hübnera i A. K. Kononowicza zamieszczonym w tym samym numerze.



Ryc. 4. Schemat przedstawiający wzór prążkowania Q w kariotypie mysim ■ — regiony silnie fluorescencyjne, // — regiony o słabej fluorescencji, □ — regiony niefluorescencyjne. Według [87]

czyli uzyskuje się różny typ prążkowania. W prążkowaniu typu C ciemno wybarwiona jest heterochromatyna okołocentromerowa, a także niektóre regiony niecentromerowe. Indukowanie tego typu barwienia polega m. in. na denaturacji DNA w utrwalonych preparatach chromosomów i następnej inkubacji w roztworach soli, np. w 0,3 M NaCl + 0,03 M cytrynian sodu [3, 63]. Modyfikacją prążkowania C jest prążkowanie typu Cd [42], w którym ciemno wybarwiają się dwa regiony w centromerze (jeden w każdej chromatydzie).

W prążkowaniu typu G ciemno wybarwiają się pasma w ramionach chromosomów. Wzór prążkowania w kariotypie ludzkim jest identyczny jak prążkowania Q z wyjątkiem heterochromatyny okołocentromerowej w chromosomach 1 i 16, która w prążkowaniu G wybarwia się ciemno, oraz chromosomu Y. Metody indukowania prążków G są bardzo różnorodne. Można je uzyskać po trawieniu utrwalonych preparatów chromosomów enzymami proteolitycznymi [40, 122]. Pojawiają się również po

inkubacji preparatów w roztworach soli [84, 115, 119] lub po traktowaniu 0,25% SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu) [77]. Prążki tego typu można również uzyskać hodując komórki w obecności aktynomycyny D lub azuru B [59].

Prążki R są odwrotnością prążkowania typu G, tzn. rejony chromosomów wybarwione na ciemno w prążkowaniu G pozostają jasne i odwrotnie. Prążki te uzyskuje się inkubując preparaty chromosomów w buforze fosforanowym pH 6,5 lub 5,1 w temperaturze 68—87°C [39, 41].

W prążkowaniu typu N, po usunięciu z preparatów chromosomów DNA, RNA i histonów, wybarwiają się organizatory jąderkowe. W chromosomach ludzkich wybarwiają się tą metodą regiony organizatorów jąderkowych wszystkich chromosomów akrocentrycznych, a w jądrach interfazowych wybarwiają się jąderka [79].

W różnych tkankach ludzkich, takich jak szpik kostny, skóra, jądra i owodnia, wzór prążków Q jest jednakowy [17]. Stwierdzono również, że w toku rozwoju embrionalnego myszy wzór prążkowania nie zmienia się [9, 90].

Mechanizm prążkowania chromosomów nie jest dotąd w pełni wyjaśniony. Jones [63] sugerował, że tworzenie się prążków typu C spowodowane jest obecnością powtarzających się sekwencji DNA, które w czasie inkubacji w roztworach soli renaturują. Barwnik wiąże się z DNA dwupasmowym i te regiony chromosomów, w których występuje DNA zrenaturowany, barwią się silniej. Z hipotezą tą sprzeczne są następujące spostrzeżenia: a) nie wykazano korelacji między ilością satelitarnego DNA a obszarem ciemno zabarwionej heterochromatyny okołocentrometrowej [23], b) z prac nad izolowanym DNA wynika, że barwnik Giemsy wiąże się wprawdzie z DNA, ale wiązanie to nie zależy od tego czy DNA jest natywny, czy zdenaturowany, zależy natomiast od stężenia DNA [116]. Nie wiadomo też, czy w preparatach chromosomów po denaturacji i renaturacji występuje DNA jednopasmowy, czy dwupasmowy. Wyniki uzyskane po barwieniu preparatów oranżem akrydyny wskazują, że w chromosomach następuje bardzo szybka renaturacja DNA [28]. Analizy DNA izolowanego z jąder i chromosomów poddanych denaturacji i renaturacji wykazywały natomiast, że około 70% DNA w preparatach denaturowanych jest jednopasmowy, a ilość ta nie zmienia się po renaturacji preparatów [70]. Stwierdzono również, że w metodach indukowania prążków C, w których stosuje się denaturację alkaliczną, duża część DNA zostaje wyekstrahowana, a pozostały DNA zlokalizowany jest głównie w heterochromatynie okołocentrometrowej [28, 97].

W chwili obecnej zgromadzono szereg danych sugerujących, że DNA zlokalizowany w regionach prążków Q i G ma cechy odmienne od DNA zlokalizowanego w pozostałych regionach chromosomów.

Metodą autoradiografii wykazano, że w chromosomach ludzkich DNA w prążkach Q i G jest replikowany w późnej fazie S [30, 51, 56, 75, 126]. W komórkach *Muntiacus muntjak* kolejność syntezy DNA jest następująca: jasne prążki — prążki C — prążki G [105]. U *Carolia perspicillata* kolejność syntezy jest nieznacznie zmieniona: po wyznakowaniu jasnych prążków najpierw znakują się prążki G, a następnie C [98]. W komórkach myszy po inkorporacji 5-bromodezoksyurydyny w różnych okresach replikacji DNA i wybarwieniu preparatów fluorochromem 32 258 Hoechst stwierdzono, że w późnej fazie S replikuje heterochromatyna okołocentromerowa i niektóre prążki Q [78].

Szereg spostrzeżeń sugeruje, że DNA w regionach prążków Q jest bogaty w pary A-T. Z badań *in vitro* wynika, że fluorescencja pochodnych akrydyny zwiększa się w obecności dwupasmowych polinukleotydów, takich jak poli(dA)·poli(dT) i poli(rA)·poli(rU). Natomiast gaszenie fluorescencji spostrzegano w obecności poli(dG) lub poli(rG) oraz w obecności DNA z wysoką zawartością G-C [108, 123]. Potrzebne są przynajmniej 4 sąsiednie pary AT, aby wzmocnić fluorescencję [95]. Regiony zawierające bogaty w pary A-T satelitarny DNA w chromosomach olbrzymich *Samoaia leonensis* silnie fluoryzują po wybarwieniu pochodną akrydyny [43]. Ponadto przeciwciała antyadenozynowe reagują z regionami chromosomów, które odpowiadają prążkom Q i G [31], a przeciwciała antycytozynowe z regionami odpowiadającymi prążkom R [107].

Znane są jednak regiony chromosomów, które mają wysoki procent AT, a pomimo tego fluoryzują słabo, np. heterochromatyna okołocentromerowa myszy, zawierająca bogaty w AT satelitarny DNA [96], fluoryzuje słabo [103]. Podobnie słabo fluoryzuje heterochromatyna okołocentromerowa chromosomów ludzkich 1 i 16, gdzie metodą hybrydyzacji *in situ* zlokalizowano II satelitarny DNA o gęstości niższej od gęstości głównego pasma DNA [64]. Należy jednak zaznaczyć, że regiony centromerów chromosomów 1 i 16, pomimo słabej fluorescencji, są G dodatnie.

Wydaje się, że w mechanizmie barwienia różnicowego dużą rolę odgrywają białka. Sugerowano, że białkami tymi mogą być histony, które są silniej związane w regionach ciemnych prążków G [82, 83, 85]. Sugestie te nie były jednakże poparte żadnymi dowodami. Natomiast więcej danych przemawia za tym, że obecność histonów uniemożliwia uzyskanie wzorów prążkowych. Preparaty inkubowane w 0,2 M HCl barwią się jednolicie ciemno jak preparaty kontrolne [28, 86]. Ponadto w preparatach chromosomów, w których elektroforetycznie nie stwierdzono obecności histonów po 4 godzinnej inkubacji w HCl, można indukować prążkowanie typu G i C [22]. Przeprowadzono natomiast szereg doświadczeń, które udawadniają, że białka niehistonowe są odpowiedzialne za barwienie różnicowe chromosomów. Analiza komponentów usuwanych z chro-

mosomów i porównanie z komponentami pozostającymi w chromosomach po indukowaniu prążkowania G wykazała, że w prążkowanych chromosomach pozostają niskocząsteczkowe białka niehistonowe z dużą liczbą wiązań S-S. Usuwane są natomiast wysokocząsteczkowe białka niehistonowe [80]. Do podobnych wniosków dochodzi Sumner [114]. Uważa on, że prążkowanie chromosomów jest konsekwencją zmieniających się stężeń białek, zawierających grupy siarkowodorowe i dwusiarczkowe, wzdłuż ramion chromosomów. Regiony ciemnych prążków wydają się być bogate w mostki dwusiarczkowe, a prążki blade — w białka zawierające grupy siarkowodorowe. Należy podkreślić, że w chromosomach metafazowych występuje więcej białek z wiązaniami S-S niż w jądrach interfazowych, co może odgrywać rolę w kondensacji chromosomów [104].

Nowych wskazówek dla wyjaśnienia mechanizmu prążkowania dostarczyły obrazy uzyskane w mikroskopie elektronowym. Po indukowaniu prążków w nieutrwalonych preparatach chromosomów myszy [28] i w utrwalonych preparatach chromosomów chomika chińskiego [7] wykazano, że regiony o silnie skondensowanej chromatynie odpowiadają prążkom G. Podobne obrazy spostrzegano w preparatach chromosomów chomika chińskiego, w których prążki indukowano aktynomycyną D. Prążki te odpowiadają chromomerom chromosomów w stadium pachytenu [27].

Ponieważ barwnik Giemsy i pochodne akrydyny wiążą się z DNA [21, 29, 116], wydaje się więc, że prążkowanie chromosomów wynika z mniejszego wiązania się barwnika w tych regionach, gdzie DNA jest wystarczająco rozproszony. W regionach ciemnych prążków, DNA skompleksowany z białkami niehistonowymi zawierającymi wiązania S-S pozostaje silniej skondensowany.

BUDOWA REGIONU CENTROMERU

Region centromeru wykazuje dwie cechy: 1. stanowi miejsce przyczepu włókienek wrzeciona kariokinetycznego z chromatydami, 2. w miejscu tym obydwie siostrzane chromatydy są połączone aż do stadium metafazy. Te dwie cechy związane są z dwoma niezależnymi strukturami morfologicznymi. Włókienka wrzecionka przymocowują się do dyskowatych struktur, zwanych kinetochorami. Chromosom metafazowy ma dwa centromery i umieszczone są one symetrycznie po zewnętrznej stronie każdej chromatydy [5]. Skład chemiczny kinetochorów nie jest znany.

Natomiast połączenie między chromatydami utrzymywane jest przez włókienka chromosomowe. W chromosomie metafazowym włókienka

krzyżują się w dwóch miejscach otaczając przestrzeń elektronowo pustą [1] (rys. 5).

Metodą hybrydyzacji in situ zlokalizowano przy centrometrach chromosomów myszy satelitarny DNA [63, 96]. Tę samą technikę zastosowano do badania chromosomów ludzkich. Wykazano, że komplementarny RNA (cRNA) transkrybowany na matrycy każdej z trzech frakcji satelitarnego DNA hybrydyzuje głównie w rejonach centromerów. Satelitarny DNA I oprócz regionów centromerów zlokalizowany jest również w dystalnej części chromosomu Y [64—66].

Powtarzającym się sekwencjom DNA przypisuje się udział w utrzymaniu struktury i parowaniu chromosomów [121]. Kontrolują one wzory sfałdowania chromosomów, a umiejscowienie ich w centromerze implikuje udział w kondensacji chromosomów. Według Suttona [117], krótkie powtarzające się sekwencje powodują lokalne różnice w konformacji podwójnej helisy i w efekcie w konformacji dezoksyrybonukleoproteidu. Powtarzające się sekwencje byłyby ośrodkami „krystalizacji” zapoczątkującymi kondensację chromosomów.

Heterochromatyna okołocentromerowa chromosomów chomiczych i mysich jest bardziej oporna na trawienie enzymami proteolitycznymi niż ramiona chromatyd [28, 86]. W centromerach chromosomów mysich zlokalizowano białka, które nie ekstrahują się 0,2 M HCl [81]. Przypuszcza się, że są to specyficzne białka niehistonowe, nie występujące w ramionach chromatyd. Nie można jednak wykluczyć możliwości, że białka te nie ulegają wymyciu z powodu silnej kondensacji włókienek w rejonie centromeru. Taka silna kondensacja może utrudniać penetrację HCl i enzymów proteolitycznych.

UŁOŻENIE WŁÓKIENKA DNP W CHROMATYDZIE

W preparatach skrawanych obraz włókienka chromosomowego można śledzić tylko na krótkim odcinku przekroju, zależnym od grubości skrawka. Wprowadzenie przez Galla [49] techniki oglądania w mikroskopie elektronowym preparatów nieskrawanych umożliwiło śledzenie struktury chromosomu jako całości. Włókienko chromosomowe w obrębie chromatyd jest jednak tak ciasno upakowane, że w preparatach widoczna jest tylko pozornie bezładna „sieć” włókienek. Po delikatnym trawieniu chromosomów proteazami, powodującym rozproszenie struktury, obserwuje się podłużny układ odcinków włókienka [1]. Odcinki te nie są jednak ułożone ściśle równolegle jak w chromosomach politenicznych i ilość odcinków włókienka w poszczególnych segmentach całej chromatyd nie jest jednakowa. Metodą pomiaru suchej masy dowolnego odcinka chromosomu na podstawie elektronogramów stwierdzono, że ilość

Natomiast w modelu zaproponowanym przez Du Praw [35], włókienko chromosomowe może być sfałdowane poprzecznie lub podłużnie. Po sfałdowaniu włókienko ulega superspiralizacji tworząc chromatydę (rys. 7). W przypadku takiego modelu struktury chromatydzie należy założyć, że odcinki włókienka wchodzące w prążki Q lub G byłyby krótkie, lecz liczne (liczba ich byłaby wielokrotnością prążków występujących w danej chromatydzie). Po superspiralizacji układałyby się w chromatydzie równolegle.

Model, który zakłada, że w chromatydzie występuje nie tylko sfałdowanie, ale również superspiralizacja, znajduje potwierdzenie w obrazach z mikroskopu świetlnego, gdzie po traktowaniu chromosomów KCN spostrzega się ich spiralną strukturę [91].

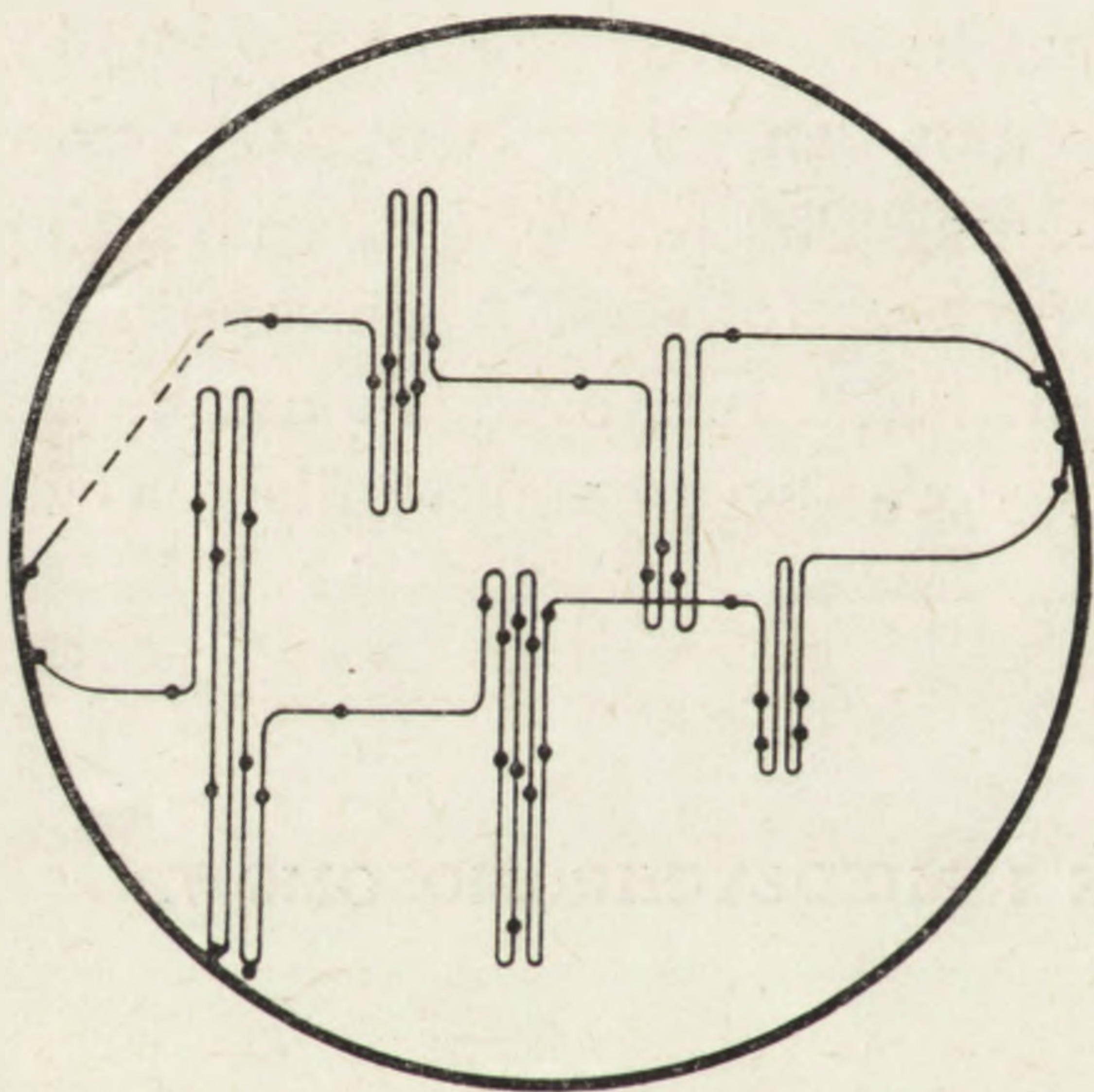
Zupełnie inny model struktury chromosomu zaproponowali Stubblefield i Wray [112, 113, 125]. Według tych autorów, chromosomy izolowane w glikolu heksylenowym i oglądane w mikroskopie elektronowym wykazują obecność wewnętrznego rdzenia. Rdzeń ten składa się z dwu „wstążek” o grubości 50 Å i szerokości 4 000 Å, które utworzone są z wielu równoległych nici dezoksyrybonukleoproteidowych. Do rdzenia przyłączone są spętłone włókienka DNP o średnicy 250 Å. Pętle te nazwano epichromatyną. W epichromatynie zawarta jest 75% DNA chromosomu i DNA ten można wyekstrahować 2,0 M NaCl lub 5 M mocznikiem. W innych pracowniach nie spostrzegano obrazów przemawiających za taką strukturą chromosomu.

WŁÓKIENKA MIĘDZYCHROMATYDOWE I MIĘDZYCHROMOSOMOWE

W mikroskopie elektronowym spostrzegano włókienka łączące dwie chromatydzie (włókienka międzychromatydowe), jak również włókienka łączące chromosomy (włókienka międzychromosomowe) [34, 44, 52, 73]. Występowanie takich włókienek nie jest spowodowane stosowaniem kolchicyny, albowiem wykazano ich obecność w preparatach nie traktowanych kolchicyną [53]. Włókienka międzychromosomowe obserwuje się również w mikroskopie świetlnym, i to zarówno w preparatach utrwalonych i trawionych pronazą [55], jak i w neutrowalonych preparatach komórek mitotycznych i mejotycznych [6, 11]. Obrazy z mikroskopu świetlnego jak i elektronowego sugerują, że połączenia te występują bardzo często między końcami chromosomów [6, 61]. Włókienka międzychromatydowe i międzychromosomowe są identycznie zbudowane jak włókienka tworzące chromatydę. Ich średnica i masa na jednostkę długości są takie same jak włókienek chromatydowych [73], a DNaza trawi identycznie włókienka

międzychromatydowe i międzychromosomowe jak włókienka chromatydowe [53, 54]. Obecność DNA we włókienkach międzychromosomowych w komórkach ludzkich stwierdzono stosując technikę autoradiografii [89]. DNA włókienek międzychromosomowych może być matrycą dla transkrypcji RNA [106]. [^3H] urydyna wbudowuje się w około 30% włókienek międzychromosomowych. Jak można sądzić na podstawie czasu znakowania, RNA znajdujący we włókienkach międzychromosomowych jest informacyjnym RNA. Moore i Abuelo [88] uważają, że włókienka międzychromatydowe zawierają powtarzające się sekwencje DNA, ale nie przedstawiają przekonujących dowodów popierających tę hipotezę.

Występowanie włókienek międzychromosomowych było jedną z przesłanek, na podstawie której Du Praw [37] wysunął hipotezę, że cały haploidalny garnitur chromosomów stanowi jedna kolista cząsteczka DNA (rys. 8). Włókienka międzychromosomowe, słabiej zespiralizowane niż włó-



Rys. 8. Schemat ilustrujący hipotezę przewidującą, że cały haploidalny garnitur chromosomów stanowi jedną cząsteczkę DNA. Kropkami oznaczono miejsca inicjacji syntezy DNA. Według [44]

kienka chromatydy, wraz z włókienkami chromatynowymi przyczepionymi do pierścieni por otoczki jądrowej, utrzymywałyby chromosomy w określonej konfiguracji w stadium interfazy. We włókienkach międzychromosomowych zgrupowane byłyby powtarzające się sekwencje DNA. Sekwencje te nie występują u bakterii mających tylko jeden chromosom. Z hipotezą tą zgodne są doświadczenia Hoskinsa [58]. Hoskins stosując technikę mikromanipulacji wykazał, że w komórkach ludzkich cały garnitur chromosomów połączony jest włókienkami wrażliwymi na DNazę. Również Diacumakos i wsp. [32] na podstawie podobnych doświadczeń dochodzą do wniosku, że między parami chromosomów istnieją połączenia innego typu niż połączenia między chromosomami i włóknami wrzeciona kariokinetycznego.

Oznaczenia ciężaru cząsteczkowego DNA sugerują, że jądro *Saccharomyces cerevisiae* może zawierać dwie liniowe lub też tylko jedną kołistą cząsteczkę DNA [76].

Z hipotezą Du Praw polemizują Comings i Okada [26]. Twierdzą oni, że włókienka międzychromosomowe są artefaktami i nie spostrzega się ich w dobrze rozproszonych preparatach. W słabo rozproszonych preparatach spostrzega się natomiast nie tylko włókienka międzychromosomowe, ale również włókienka, które łączą chromosomy z występującymi w preparacie jądrami interfazowymi [8].

Obecnie przyjmuje się powszechnie, że chromosom zbudowany jest z jednej cząsteczki DNA skompleksowanej z białkami. Kontrowersje dotyczą natomiast średnicy podstawowego włókienka chromosomowego oraz jego upakowania w obrębie chromatydy. Najbardziej ciekawą i dyskusyjną jak dotąd jest hipoteza, że cały haploidalny garnitur chromosomów stanowi jedna cząsteczka DNA.

LITERATURA

- [1] ABUELO J. G., MOORE D. E., The human chromosome electron microscopic observations on chromatin fiber organization, *J. Cell Biol.*, **41**: 73—90, 1969.
- [2] ANDOCH T., IDE T., Disulfide bridges in proteins linking DNA in cultured mouse fibroblasts, strain LP3, *Exp. Cell Res.*, **74**: 525—531, 1972.
- [3] ARRIGHI F. E., HSU T. C., Localization of heterochromatin in human chromosomes, *Cytogenetics*, **10**: 81—86, 1971.
- [4] BALDWIN J. P., BOSELEY P. G., BRADBURY E. M., IBEL K., The subunit structure of the eukaryotic chromosome, *Nature*, **253**: 245—249, 1975.
- [5] BRINKLEY B. R., STUBBLEFIELD E., Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis and meiosis, *Adv. Cell Biol.*, **1**: 119—185, 1970.
- [6] BURDICK A. B., Somatic cell chromosome interconnections in trypan preparations of *Chinese hamster* testicular cells, *Exp. Cell Res.*, **99**: 425—428, 1976.
- [7] BURKHOLDER G. D., Electron microscopic visualization of chromosomes banded with trypsin, *Nature*, **247**: 292—294, 1974.
- [8] — The ultrastructure of G- and C-banded chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **90**: 269—278, 1975.
- [9] BURKHOLDER G. D., COMINGS D. E., Do the Giemsa-banding patterns change during embryonic development, *Exp. Cell Res.*, **75**: 268—271, 1972.
- [10] CALLAN H. G., MacGREGOR H. C., Action of deoxyribonuclease on lampbrush chromosomes, *Nature*, **281**: 1479—1480, 1958.
- [11] CARLSON R. D., OLINS D. E., Chromatin model calculations: Arrays of spherical ν bodies, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 89—100, 1976.
- [12] CASPERSSON T., FARBER S., FOLEY G. E., KUDYNOWSKI J., MODEST E. J., SIMONSSON E., WAGH U., ZECH L., Chemical differentiation along metaphase chromosome, *Exp. Cell Res.*, **49**: 219—222, 1968.

- [13] CASPERSSON T., ZECH L., MODEST E. J., FOLEY G. E., WAGH U., SIMONSSON E., Chemical differentiation with fluoresced alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosome, *Exp. Cell Res.*, **58**: 128—140, 1969.
- [14] — DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus, *Exp. Cell Res.*, **58**: 141—152, 1969.
- [15] CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C., Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **60**: 315—319, 1970.
- [16] — Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents, *Exp. Cell Res.*, **62**: 490—492, 1970.
- [17] CASPERSSON T., de la CHAPELLE A., SCHRÖDER J., ZECH L., Quinacrine of metaphase chromosomes. Identical patterns in different tissues, *Exp. Cell Res.*, **72**: 56—59, 1972.
- [18] CLAY W. F., KATTERMAN F. R. H., BARTELS P. G., Chromatin and DNA synthesis associated with nuclear membrane in germinating cotton, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 3134—3138, 1975.
- [19] COMINGS D. E., The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus, *Ann. J. Human Genet.*, **20**: 440—460, 1968.
- [20] — The structure and function of chromatin, *Adv. Human Genet.*, **3**: 237—431, 1972.
- [21] — Mechanisms of chromosome banding, IV Optical properties of the Giemsa dyes, *Chromosoma*, **50**: 89—110, 1975.
- [22] COMINGS D. E., AVELINO E., Mechanisms of chromosome banding II Evidenced that histones are not involved, *Exp. Cell Res.*, **86**: 202—206, 1974.
- [23] COMINGS D. E., MATOCCIA E., DNA of mammalian and avian heterochromatin, *Exp. Cell Res.*, **71**: 113—131, 1972.
- [24] COMINGS D. E., OKADA T. A., Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane, *Exp. Cell Res.*, **62**: 293—302, 1970.
- [25] — Association of nuclear membrane fragments with metaphase and anaphase chromosomes as observed by whole-mount electron microscopy, *Exp. Cell Res.*, **63**: 62—68, 1970.
- [26] — Some aspects of chromosome structure in eukaryotes, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**: 145—153, 1973.
- [27] — Mechanisms of chromosome banding VI whole-mount electron microscopy of banded metaphase chromosomes and a comparison with pachytene chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **93**: 267—274, 1975.
- [28] COMINGS D. E., AVELINO E., OKADA T. A., WYANDT H. E., The mechanism of C- and G-banding of chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **77**: 469—493, 1973.
- [29] COMINGS D. E., KOVACS B. W., AVELINO E., HARRIS D. C., Mechanisms of chromosome banding. V Quinacrine banding, *Chromosoma*, **50**: 111—145, 1975.
- [30] CZAKER R., Banding patterns and late replication in HeLa cells, *Human-genetik*, **19**: 135—144, 1973.
- [31] DEV V. G., WARBURTON D., MILLER O. J., MILLER D. A., ERLANGER B. F., BEISER S. M., Consistent pattern of binding of anti-adenosine antibodies to human metaphase chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **74**: 288—293, 1972.
- [32] DIACUMAKOS E. G., HOLLAND S., PECORA P., Chromosome displacement in and extraction from human cells in different mitotic stages, *Nature*, **232**: 33—36, 1971.

- [33] DOUNCE A. L., Nuclear gels and chromosome structure, *Amer. Scient.*, **59**: 74—83, 1971.
- [34] Du PRAW E. J., The organization of nuclei and chromosomes in honeybee embryonic cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**: 161—168, 1965.
- [35] — Macromolecular organization of nuclei and chromosomes. A folded-fibre model based on whole-mount electron microscopy, *Nature*, **206**: 338—343, 1965.
- [36] — *Cell and Molecular Biology*, Academic Press New York, London, 1968.
- [37] — *DNA and chromosomes*. Holt, Reinhart Winston, 1970.
- [38] Du PRAW E. J., BAHR G. F., The arrangement of DNA in human chromosomes, as investigated by quantitative electron microscopy, *Acta Cytol.*, **13**: 188—205, 1969.
- [39] DUTRILLAUX B., Nouveau système de marque chromosomique, *Chromosoma*, **41**: 395—402, 1973.
- [40] DUTRILLAUX B., De GROUCHY J., FINAZ C., LEJEUNE J., Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier), *C. R. Acad. Sc. Paris, Série D.*, **273**: 587—588, 1971.
- [41] DUTRILLAUX B., LEJEUNE J., Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272**: 2638—2640, 1971.
- [42] EIBERG H., New selective Giemsa technique for human chromosomes, *C_a staining*, *Nature*, **248**: 55, 1974.
- [43] ELLISON J. R., BARR H. J., Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions: late replication and high AT content in *Samoaia leonensis*, *Chromosoma*, **36**: 375—390, 1972.
- [44] EMMERICH G., SCHARRER S., STENGEL-RUTKOWSKI S., ZANG K. D., Elektronenmikroskopische untersuchung interchromosomaler fädiger strukturen an menschlichen lymphocyten in der metaphase, *Humangenetik*, **19**: 227—234, 1973.
- [45] FINCH J. T., NOLL M., KORNBERG R. D., Electron microscopy of defined lengths of chromatin, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **72**: 3320—3322, 1975.
- [46] FINCH J. T., KLUG A., Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **73**: 1897—1901, 1976.
- [47] FRANKE W. W., SCHEER U., TRENDELENBURG M. F., SPRING H., ZENTGRAF H., Absence of nucleosomes in transcriptionally active chromatin, *Cytobiologie*, **13**: 401—434, 1976.
- [48] GALL J. G., Kinetics of deoxyribonuclease action on chromosomes, *Nature*, **198**: 37—38, 1963.
- [49] — Chromosome fibers from an interphase nucleus, *Science*, **139**: 120—121, 1963.
- [50] — Chromosome fibers studies by spreading technique, *Chromosoma*, **20**: 221—233, 1966.
- [51] GANNER E., EVANS H. J., The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in human chromosome complement, *Chromosoma*, **35**: 326—341, 1971.
- [53] GOLOMB H. M., BAHR G. F., Scanning electron microscopic observations of surface structure of isolated human chromosomes, *Science*, **171**: 1024—1026, 1971.
- [53] — Interchromosomal fibers: authentic or artefactual? *Lancet II*, **260**, 1973.

- [54] — Human chromatin from interphase to metaphase. A scanning electron microscopis study, *Exp. Cell Res.*, **84**: 79—87, 1974.
- [55] deGROUCHE J., CHAVIN-COLIN F., Correspondance entre les filaments interchromosomiques et les topographies de bandes révélées le SDS et la pronase, *Ann. Génét.*, **16**: 215—218, 1973.
- [56] GRZESCHIK K. H., KIM M. A., JOHANNSMAN R., Late replicating bands of human chromosomes demonstrated by fluorochrome and Giemsa staining, *Humangenetik*, **29**: 41—52, 1975.
- [57] HERSHEY H. V., WERNER D., Evidence for non-deoxynucleotide linkers in Ehrlich ascites tumour cell DNA, *Nature*, **262**: 148—150, 1976.
- [58] HOSKINS G. C., Sensitivity of micrurgically removed chromosomal spindle fibres to enzyme disruption, *Nature*, **217**: 748—750, 1968.
- [59] HSU T. C., PATHAK S., SHAFER D. A., Induction of chromosome cross-banding by treating cells with chemical agents before fixation, *Exp. Cell Res.*, **79**: 484—487, 1973.
- [60] HUBERMAN J. A., Structure of chromosome fibers and chromosomes, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**: 365—378, 1973.
- [61] JAFFRAY J. Y., GENEIX A., Interchromosomal fibers: human ultrastructural study by a recent technique, *Humangenetik*, **25**: 119—126, 1974.
- [62] JERZMANOWSKI A., TOCZKO K., Association of DNA replication with the nuclear membrane-like complex in pea cells, *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol.*, **21**: 405—408, 1973.
- [63] JONES K. W., Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells, *Nature*, **225**: 912—915, 1970.
- [64] JONES K. W., CORNEO G., Location of satellite and homogeneous DNA sequences on human chromosomes, *Nature New Biol.*, **233**: 268—271, 1971.
- [65] JONES K. W., PROSSER J., CORNEO G., GINELLI E., The chromosomal location of human satellite DNA III, *Chromosoma*, **42**: 445—451, 1973.
- [66] JONES K. W., PURDOM I. F., PROSSER J., CORNEO G., The chromosomal localization of human satellite DNA I, *Chromosoma*, **49**: 161—171, 1974.
- [67] KAVENOFF R., ZIMM B. H., Chromosome-sized DNA from *Drosophila*, *Chromosoma*, **41**: 1—27, 1973.
- [68] KORNBERG R. D.: Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA, *Science*, **184**: 868—871, 1974.
- [69] KORNBERG R. D., THOMAS J. O., Chromatin structure-oligomers of the histones, *Science*, **184**: 865—868, 1974.
- [70] KURNIT D. M., DNA helical content during C-banding procedure, *Cytogenet. Cell Genet.*, **13**: 313—329, 1974.
- [71] KUROIWA T., Fine structure of interphase nuclei. III Replication site analysis of DNA during the S period of *Crepis capillaris*, *Exp. Cell Res.*, **83**: 387—398, 1974.
- [72] LAIRD C. D., Chromatid structure: relationship between DNA content and nucleotide sequence diversity, *Chromosoma*, **32**: 378—408, 1971.
- [73] LAMPERT F., BAHR G. F., Du PRAW E. J., Ultrastructure of a Burkitt's lymphoma marker chromosome as investigated by quantitative electron microscopy, *Cancer*, **24**: 367—376, 1969.
- [74] LAMPERT F., LAMPERT P., Ultrastructure of the human chromosome fiber, *Humangenetik*, **11**: 9—17, 1970.
- [75] LATT S. A., Fluorescence analysis of late DNA replication in human metaphase chromosomes, *Somatic Cell Genet.*, **1**: 293—321, 1975.

- [76] LAUER G. D., KLOTZ L. C., Determination of the molecular weight of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear DNA, *J. Mol. Biol.*, **95**: 309—326, 1975.
- [77] LEE C. L. Y., WELCH J. P., LEE S. H. S., Banding of human chromosomes by protein denaturation, *Nature New Biol.* **241**: 142—143, 1973.
- [78] MADAN K., ALLEN J. W., GERALD P. S., LATT S. A., Fluorescence analysis of late DNA replication in mouse metaphase chromosomes using BUdR and 33258 Hoechst, *Exp. Cell Res.*, **99**: 438—444, 1976.
- [79] MATSUI S., SASAKI M., Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes, *Nature*, **246**: 148—150, 1973.
- [80] — The mechanisms of Giemsa banding of mammalian chromosomes with special attention to the role of non-histone proteins, *Japan J. Genetics*, **50**: 189—204, 1975.
- [81] MATSUKUMA S., UTAKOJI T., Non-histone protein associated with centromeric heterochromatin in the mouse chromosome, *Exp. Cell Res.*, **105**: 217—222, 1977.
- [82] MEISNER L. F., CHUPREVICH T. W., INHORN S. L., Nucleotide specificity of Giemsa banding, *Lancet II*, 94—95, 1973.
- [83] — Giemsa banding specificity, *Nature New Biol.*, **245**: 145—147, 1973.
- [84] MEISNER L. E., CHUPREVICH T. W., JOHNSON C. B., INHORN S. L., CARTER J. J., Banding of human chromosomes with a caesium chloride, *Lancet I*, 100—101, 1973.
- [85] MEISNER L. F., CHUPREVICH T. W., INHORN S. L., JOHNSON C. B., Dye-nucleoprotein interactions in Giemsa banding, *J. Cel. Biol.*, **61**: 248—252, 1974.
- [86] MICHALSKA J., The loss of DNA and protein in chromosome banding, *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol.*, **22**: 837—846, 1974.
- [87] MILLER O. J., MILLER D. A., KOURI R. E., ALLDERDICE P. W., DEV V. G., GREWAL M. S., HUTTON J. J., Identification of the mouse karyotype by quinacrine fluorescence and tentative assignment of seven linkage groups, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 1530—1533, 1971.
- [88] MOORE D. E., ABUELO A. G., Human repetitious DNA, satellite DNA and chromosome interarm fibers, *Nature*, **234**: 467—468, 1971.
- [89] MYHRA S., BRØGGER A., Interchromosomal DNA-containing fibers in human cells, *Humangenetik*, **29**: 183—189, 1975.
- [90] NESBITT M. N., DONAHUE R. P., Chromosome banding patterns in pre-implantation mouse embryos, *Science*, **177**: 805—806, 1972.
- [91] OHNUKI Y., Demonstration of the spiral structure of human chromosomes, *Nature*, **203**: 916—917, 1966.
- [92] OLINS A. L., OLINS D. E., Spheroid chromatin units (ν bodies), *J. Cell Biol.*, **59**: 252a, 1973.
- [93] — Spheroid chromatin units (ν bodies), *Science*, **183**: 330—332, 1974.
- [94] OUDET P., GROSS-BELLARD M., CHAMBON P., Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit, *Cell*, **4**: 281—300, 1975.
- [95] PACHMAN U., RIGLER R., Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence. A basis for the explanation of acridine bands in chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **72**: 602—608, 1972.
- [96] PARDUE M. L., GALL J. G., Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, **168**: 1356—1358, 1970.

- [97] PATHAK S., ARRIGHI F. E., Loss of DNA following C-banding procedures, *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**: 414—422, 1973.
- [98] PATHAK S., HSU T. C., UTAKOJI T., Relationship between patterns of chromosome banding and DNA synthetic sequences, a study on the chromosomes of the Seba's fruit bat, *Carolia perspicillata*, *Cytogenet. Cell Genet.*, **12**: 157—164, 1973.
- [99] RATTNER J. B., BRANCH A., HAMKALO B. A., Electron microscopy of whole mount metaphase chromosomes, *Chromosoma*, **52**: 329—338, 1975.
- [100] RIS H., Effect of fixation on the dimension of nucleohistone fibers, *J. Cell Biol.*, **39**: 158a, 1968.
- [101] — Molecular organization of chromosomes, [w] *Handbook of Molecular Cytology*, red. Lima-de Faria A. North Holland Publishing Co. Amsterdam, London 1969, 221—250.
- [102] RIS H., KUBAI D. F., Chromosome structure, *Ann. Rev. Gen.*, **4**: 263—294, 1970.
- [103] ROWLEY J. D., BODNER W. F., Relationship of centromeric heterochromatin to fluorescent banding pattern of metaphase chromosomes in the mouse, *Nature*, **231**: 503—506, 1971.
- [104] SADGOPAL A., BONNER J., Proteins of interphase and metaphase chromosomes compared, *Biochim. Biophys. Acta*, **207**: 227—239, 1970.
- [105] SARMA T., DHALIWAL M. H., Relationship between patterns of late DNA synthesis and C- and G-banding in muntjac chromosomes, *Exp. Cell Res.*, **87**: 394—397, 1974.
- [106] SCHNEIDER L. K., RNA synthesis in chromosome connectives, *J. Cell Biol.*, **56**: 608—611, 1973.
- [107] SCHRECK R. R., WARTBURTON D., MILLER O. J., BEISER S. M., ERLANGER B. F., Chromosome structure as revealed by a combined chemical and immunochemical procedure, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 804—807, 1973.
- [108] SELANDER R. K., de la CHAPELLE A., The fluorescence of quinacrine mustard with nucleic acids, *Nature New Biol.*, **245**: 240—244, 1973.
- [109] SOLARI A. J., The ultrastructure of chromatin fibers. I. The effect of spreading conditions, *Exp. Cell Res.*, **53**: 553—566, 1968.
- [110] — Experimental changes in the width of the chromatin fibers from chicken erythrocytes, *Exp. Cell Res.*, **67**: 161—170, 1971.
- [111] SPARVOLI E., GALLI M. G., MOSCA A., PARIS G., Localization of DNA replication sites near the nuclear membrane in plant cells, *Exp. Cell Res.*, **97**: 74—82, 1976.
- [112] STUBBLEFIELD E., Structure of mammalian chromosomes, *Int. Rev. Cytol.*, **35**: 1—60, 1973.
- [113] STUBBLEFIELD E., WRAY W., Architecture of the chinese hamster metaphase chromosome, *Chromosoma*, **32**: 262—294, 1971.
- [114] SUMNER A. T., Involvement of protein disulphides and sulphhydryls in chromosome banding, *Exp. Cell Res.*, **83**: 438—442, 1974.
- [115] SUMNER A. T., EVANS H. J., BUCKLAND R., New technique for distinguishing between human chromosomes, *Nature New Biol.*, **232**: 31—32, 1971.
- [116] SUMNER A. T., EVANS H. J., Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal components, *Exp. Cell Res.*, **81**: 223—236, 1973.
- [117] SUTTON W. D., Chromatin packing, repeated DNA sequences and gene control, *Nature New Biol.*, **237**: 70—71, 1972.

- [118] TAKAYAMA S., Interchromosomal connectives in squash preparations of L cells, *Exp. Cell Res.*, **91**: 408—412, 1975.
- [119] UTAKOJI T., Differential staining patterns of human chromosomes treated with potassium permanganate, *Nature*, **239**: 168—169, 1972.
- [120] VOGEL F., SCHROEDER T. M., The internal order of the interphase nucleus, *Humangenetik*, **25**: 265—297, 1974.
- [121] WALKER P. M. B., „Repetitive” DNA in higher organisms, [w] *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, red. J. A. V. Butler, D. Noble, Pergamon Press — Oxford, New York, **23**: 145—190, 1971.
- [122] WANG H. C., FEDOROFF S., Banding in human chromosomes treated with trypsin, *Nature New Biol.*, **235**: 52—53, 1972.
- [123] WEISBLAUM B., de HASETH P. L., Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 629—632, 1972.
- [124] WOLFE S. L., The effect of prefixation on the the diameter of chromosome fibres isolated by the langmuir through critical point method., *J. Cell Biol.*, **37**: 610—620, 1968.
- [125] WRAY W., STUBBLEFIELD E., A new method for the rapid isolation of chromosomes, mitotic apparatus or nuclei from mammalian fibroblasts at near neutral pH, *Exp. Cell Res.*, **59**: 469—478, 1970.
- [126] ZAKHAROV A. F., BARANOVSKAJA L. I., IBRAIMOV A. I., BENJUSCH V. A., DEMINSTEVA V. S., OBLAPENKO N. G., Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes II 5-bromodeoxyuridine and 5-bromo-deoxy-citidine revealed differentiation in human chromosomes, *Chromosoma*, **44**: 343—359, 1974.
- [127] ZIRKIN B. R., WOLFE S. L., The chemical composition of nuclei and chromosomes isolated by the Langmuir through technique, *Chromosoma*, **32**: 162—170, 1970.

Otrzymano: 12 maja 1977.

Przyjęto: 6 czerwca 1977.

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

W dniach 9—10 lutego 1978 r. Brytyjskie Towarzystwo Patologów organizuje w Londynie w Royal College of Physicians (11 St. Andrew's Place, Regent's Park, London NW 1)

Symposium na temat chorób tkanki łącznej.

Głównymi tematami są:

1. Komórki tkanki łącznej,
2. Substancja podstawowa,
3. Patomechanizmy,
4. Choroby uwarunkowane genetycznie,
5. Zapalenia i włóknienie,
6. Choroby metaboliczne.

Wysokość wpisowego wynosi 14 funtów, a koszt posiłków — 10 funtów. Zgłoszenia udziału należy kierować pod adresem:

Assistant Secretary (Meeting)
The Royal College of Pathologists
2 Carlton House Terrace
London SW 1 Y 5 AF

HOMEOSTAZA NASKÓRKA

Joanna KOPEĆ

Zakład Fizjopatologii Instytutu Hematologii w Warszawie

Streszczenie. Homeostaza w naskórku rogowaciejącym ssaków wyraża się w stałym uzupełnianiu komórek ulegających złuszczeniu i opiera się na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego. Substancją kluczową w tym zamkniętym systemie są prawdopodobnie przekaźniki chemiczne — chalony. Proliferacja komórek naskórka jest zależna nie tylko od chalonów, ale podlega także wpływowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), cyklicznym nukleotydom i czynnikiem fizycznym. Komórki naskórka tworzą nie tylko układ warstwowy, ale są jednocześnie zorganizowane w systemy kolumnowe o określonym położeniu i losach poszczególnych komórek, odpowiednio wrażliwych na działanie chalonów.

WSTĘP

Homeostaza, czyli stan równowagi naskórka, charakteryzuje się ustalonym tempem podziałów komórkowych oraz różnicowania przy niskim poziomie glikogenu. Naskórek jest tkanką, w której komórki układają się w uporządkowane systemy tworzące jednostki strukturalne o własnym mechanizmie regulacyjnym.

W naskórku ssaków występują trzy zasadnicze typy komórek: keratynocyty, melanocyty i komórki Langerhansa. Keratynocyty ulegają w procesie różnicowania rogowaceniu i stopniowo przemieszczają się ku powierzchni, melanocyty decydują o pigmentacji. Komórkom Langerhansa przypisuje się wielorakie funkcje: ostatnio uważa się je za elementy układu obronnego naskórka [36, 37] bądź za czynnik regulujący podziały komórkowe [2]. Od keratynocytów różnią się m.in. jasną cytoplazmą i nieregularnym kształtem jądra komórkowego [43].

Keratynocyty stanowią 95% komórek naskórka i one decydują o strukturze naskórka, która charakteryzuje się układem warstwowym. Niektórzy badacze uważają, że naskórek ssaków można traktować tak, jak gdyby był zbudowany z jednego rodzaju komórek — keratynocytów — w różnych stadiach różnicowania [33].

Proporcje grubości poszczególnych warstw naskórka są w stanie fizjologicznym zachowane w sposób stały, lecz normalne tempo podziałów mitotycznych i procesów różnicowania zostaje zmienione wskutek zmian patologicznych bądź podczas regeneracji. Na tempo proliferacji ma wpływ wiele czynników o charakterze chemicznym i fizycznym.

PROLIFERACJA KOMÓREK NASKÓRKA

Podziały komórkowe zachodzą w normalnym naskórku jedynie w komórkach podstawnych. Aktywność mitotyczna tych komórek jest zwykle wyrażana w postaci wskaźnika mitotycznego, obliczanego w promille, czyli liczbą mitoz na 1000 komórek podstawnych.

Wartość tego wskaźnika, np. u myszy nagiej (mutanta) wynosi około 12‰ [3], u szczura białego dorosłego — około 15‰ [21]. Aktywność mitotyczna zależna jest m.in. od pory dnia, występuje bowiem znane zjawisko rytmu dobowego, w którym nasilenie maksymalne podziałów komórkowych występuje dwukrotnie, podobnie jak i minimalne obniżenie. U myszy maksimum mitoz przypada o godzinie 8 i 20, natomiast minimum — o 6 i 14 [17].

Aktywność mitotyczna bywa także wyrażana jako tempo mitoz, czyli ilość podziałów komórkowych w określonej jednostce czasu [18], często zamiast obliczania wskaźnika mitotycznego stosuje się określenie liczby komórek syntetyzujących DNA za pomocą znakowanych prekursorów DNA, najczęściej tymidyny. Dla niektórych gatunków obliczono wskaźnik według znakowania tymidyną u szczura wynosi on około 5% po 1 godzinie od podania prekursora natomiast u dorosłego człowieka wynosi przeciętnie 2,5%, u myszy nagiej (mutanta) — 6,75% [9, 26, 32]. Wartości tego wskaźnika są zwykle wyższe aniżeli wskaźnika mitotycznego, m.in. ze względu na dłuższy okres trwania syntezy DNA niż mitozy w komórce.

Czas potrzebny komórce do przemieszczenia się z warstwy podstawnej do zrogowaciałej określa się mianem „czasu przejścia” komórki (transit time) [30]. U myszy wynosi on 11 dni, co przy obecności np. 9 warstw komórek w naskórku czyni dzienne tempo przejścia 1,1 warstwy. Czas przejścia komórki zależy nie tylko od liczby warstw w naskórku, ale i od tempa proliferacji komórek podstawnych. Czas trwania cyklu życiowego komórki naskórka wynosi u szczura około 400 godzin [27]. Tempo proliferacji komórek w warstwie podstawnej jest równoważone utratą tych komórek, które migrują na zewnątrz i ulegają rogowaceniu. Doświadczenia nad komórkami naskórka myszy pokazały, że *in vitro* komórki rosną synchronicznie: można wyróżnić wyraźne punkty maksymalnego nasilenia syntezy DNA oraz podziałów mitotycznych [14]. Auto-

rzy tłumaczą ten fakt m.in. zmianą koncentracji substancji regulujących wzrost. W ostatnich latach rolę regulacyjną proliferacji komórek również w naskórku przypisuje się nukleotydowi cyklicznym, jak c-AMP, c-GMP, czynnikowi wzrostowemu naskórka (EGF) (epidermal growth factor) oraz chalomom.

Według różnych autorów [19] stan równowagi tkankowej w naskórku jest kontrolowany przez mechanizm negatywnego sprzężenia zwrotnego w ten sposób, że ubytek komórek złuszcających się z powierzchni naskórka powoduje zwiększenie proliferacji komórek w warstwie podstawnej. Wobec tego powinny istnieć substancje, które spełnią rolę przekaźnika informacji o stanie komórek. Taka substancja sygnalizacyjna, tkankowo specyficzna, może być inhibitorem proliferacji komórkowej. W ten sposób tkanka jest systemem regulującym stan równowagi pomiędzy utratą a namnażaniem komórek [25]. Ostatnio uważa się, że substancjami sygnalizacyjnymi w naskórku są chalony naskórkowe.

CHALONY NASKÓRKOWE

Chalony zostały określone i opisane przez Bullougha [6]. Bullough oznaczył kolejne warstwy naskórka jako komórki generatywne, niedojrzałe, dojrzałe i starzejące się, co odpowiada komórkom podstawnym kolczystym, ziarnistym i rogowaciejącym. Według tego badacza chalony działają głównie na warstwę komórek podstawnych, hamując ich zdolność do podziałów [7]. Baden [4] uważał, że chalony hamują proliferację komórek w sposób odwracalny, są specyficzne dla tkanek, a nie dla gatunków. Badania nad naturą i działaniem chalonów rozwinęły się w ostatnich latach.

Chalony są to tkankowo specyficzne inhibitory proliferacji komórkowej. W naskórku wyróżnia się dwa rodzaje czynników o charakterze chalonu: chalon G_1 — zatrzymujący rozpoczęcie przez komórkę syntezy DNA, oraz chalon G_2 — hamujący wejście komórki w mitozę [25]. Oba chalony mają naturę glikoprotein o ciężarze około 25 000. W przeciwieństwie do chalonu G_2 — chalon G_1 jest oporny na ciepło i enzymy proteolityczne i jest produkowany prawdopodobnie w komórkach rogowaciejących, chalon G_2 natomiast występuje w komórkach podstawnych [5].

Oczyszczony chalon G_1 w dawce 0,05—0,01 μg podany dootrzewnowo dojrzałej myszy jest w stanie obniżyć syntezę DNA w naskórku o około 50%. Mechanizm działania chalonu G_1 nie zostaje naruszony, gdy naskórek zostanie poddany działaniu stymulatora nie powodującego większego urazu, np. masaż, chemiczna depilacja [25]. Natomiast przy zranieniu, podaniu mitogenów lub środków rakotwórczych następuje przejściowa utrata wrażliwości naskórka na chalon G_1 i wówczas rozwija się hiper-

plazja (zwiększenie liczby komórek), która przypomina tkankę zarodkową [42]. Natomiast jednocześnie wiadomo, że jeśli działają chalony i powodują obniżenie liczby komórek syntetyzujących DNA, to spadek ten następuje szybciej w naskórku regenerującym (po 6 godzinach) aniżeli w normalnym (12 godzin) [42]. Tkanka zarodkowa jest wrażliwa tylko na chalony G_2 ; chalon G_1 występuje tylko w naskórku zrogowiałym [29].

Aktywność chalonu G_2 jest związana z określonym poziomem c-AMP w naskórku, chociaż chalon ten nie działa prawdopodobnie na powierzchnię komórki. Związek chalonu G_2 z cyklazą adenilową może wskazywać, że chalon ten jest zaangażowany w proces różnicowania komórek, a zatrzymywanie komórek w fazie G_2 (ściślej — w środkowej części tej fazy) jest zjawiskiem wtórnym [13].

Zdaniem współczesnych badaczy [25], chalony w prosty sposób wyjaśniają stan równowagi tkankowej w naskórku, są międzykomórkowymi przekąźnikami informacji w sprzężeniu zwrotnym pomiędzy dojrzałymi komórkami naskórka a proliferatywną populacją komórek tej tkanki. Nie znany bliżej jest jednak dotąd sposób przenoszenia się tych substancji pomiędzy komórkami różnych warstw naskórka ssaków.

INNE CZYNNIKI REGULUJĄCE STAN RÓWNOWAGI

Dużą rolę w regulacji homeostazy odgrywają prostaglandyny oraz cykliczne nukleotydy, a także tzw. czynnik wzrostowy naskórka EGF (epidermal growth factor). Substancje te są wytwarzane przez naskórek, choć nie są specyficzne tylko dla tej tkanki.

CYKLICZNE NUKLEOTYDY

Z badań nad komórkami *in vitro* wynika, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy poziomem c-AMP i c-GMP w komórce. Podczas fazy logarytmicznego wzrostu hodowli zachodzi podwyższenie poziomu c-GMP przy niskim poziomie c-AMP. Natomiast w stanie stacjonarnym, poziom c-AMP w komórkach hodowli jest najwyższy przy jednoczesnym minimalnym poziomie c-GMP. Zatem można przypuszczać, że punkt regulacji proliferacji komórkowej znajduje się w wartości krytycznej stosunku ilości c-AMP do c-GMP [41].

Poziom nukleotydów cyklicznych jest regulowany przez aktywność enzymów, które są konieczne dla ich syntezy i rozkładu. W naskórku świni domowej stwierdzono występowanie kilku rodzajów enzymów specyficznych dla c-AMP i c-GMP, zarówno we frakcji rozpuszczalnej, jak i strukturalnej komórki. Enzymy typu fosfodwuesteraz (rozkładające nukleotydy) frakcji strukturalnej charakteryzuje wysokie powinowactwo

i specyficzność względem substratu, frakcji ropuszczalnej zaś — nieduże powinowactwo do cyklicznych nukleotydów [1]. W komórkach naskórka stwierdzono również cyklazę adenilową i cyklazę guanylową potrzebną do syntezy tych związków [41].

W naskórku stan homeostazy jest utrzymywany przy niskim poziomie c-AMP i podwyższonym poziomie c-GMP. Praca Delescluse [12] wykazała, że w naskórku świnki morskiej *in vitro* jest zachowana wrażliwość na zmiany poziomu c-AMP w fazie G_2 lub G_1 komórki; podniesienie poziomu c-AMP hamuje proliferację. Działanie to nie jest efektywne w fazie S cyklu komórkowego.

Zatrzymanie podziału mitotycznego odbywa się prawdopodobnie poprzez aktywację cyklazy adenilowej lub inhibicję fosfodwuesterazy.

PROSTAGLANDYNY

Fulgham [15] opisał zjawisko przyspieszenia proliferacji i keratynizacji naskórka *in vitro* pod wpływem działania prostaglandyn E i B. Prawdopodobnie również niektóre prostaglandyny, np. PGE_1 , mają hamujące działanie na powstawanie c-AMP, być może poprzez cyklazę adenilową.

Z innych badań wynika, że np. prostaglandyna PE_2 hamuje proliferację i przyspiesza dojrzewanie komórek naskórka, natomiast prostaglandyna PF_2 daje wynik przeciwny. Prostaglandyny i cykliczne nukleotydy są syntetyzowane w naskórku, ale nie są tkankowo specyficzne. Są to więc przekąźniki drugorzędowe [25].

CZYNNIK WZROSTOWY NASKÓRKA

W naskórku ssaków wykryto także tzw. „czynnik wzrostowy naskórka” (epidermal growth factor — EGF). Jest to łańcuch polipeptydowy, w którym stwierdzono częste występowanie lizyny, alaniny i fenyloalaniny, sekwencja aminokwasów jest już znana. Czynnik ten wyizolowany został przez Cohena po raz pierwszy ze ślinianki podszczękowej myszy, stymuluje wzrost komórek naskórka *in vivo* i *in vitro* [10, 11]. Czas życia hodowli komórek naskórka wzrasta z 50 do 150 pokoleń przez dodanie EGF do środowiska [33].

Badania Carpentera [8] wykazały, że EGF nie jest specyficzny gatunkowo, gdyż komórki pochodzące od człowieka, myszy, szczura i kury mają receptory, które reagują na EGF pochodzący od myszy. W komórce, na którą działał EGF, obserwowano po 48 godzinach wzrost ilości RNA, aktywniejszą syntezę białka, wzmożenie układania się rybosomów w większe zespoły — polisomy. W komórce kontrolnej stwierdzono np. 30% rybosomów w postaci polisomów, a po działania EGF — 60%.

EGF ślinianek myszy działa również na komórki glejowe człowieka *in vitro*, których zagęszczenie w hodowli jest odpowiedzią na działanie tego wzrostowego czynnika [40].

Ciężar cząsteczkowy EGF wynosi 6045 [33] po obliczeniu ze składu aminokwasowego, natomiast w aktywnych homogenatach występują cząstki o ciężarze około 74 000. EGF tworzy zatem kompleks ze związkiem wielkocząsteczkowym, jak się okazało, białkiem. Tym białkiem wiążącym jest esteraza argininowa, która może stanowić etap pośredni w procesie uwalniania EGF z prekursorowego białka przez enzym esterazę argininową. Podobny proces zachodzi przy aktywowaniu bradykininy i insuliny.

Ta kompleksowa cząsteczka może być rozłożona na dwie drobiny białka o ciężarze około 30 000 oraz EGF o masie cząsteczkowej około 6045. EGF występuje w surowicy krwi; u myszy jego poziom wynosi 1 ng/ml [11].

Jarret [20] uważa, że działanie opisanych substancji regulujących proliferację i różnicowanie komórek naskórka podlega dalszej kontroli pewnych nadrzędnych czynników. Autor ten przypuszcza, że zasadniczym mechanizmem zmian w nabłonku jest bądź czynnik genetyczny, bądź humoralny, działający od strony skóry właściwej. Nie wyklucza również wpływu substancji toksycznych pochodzących z destrukcji komórek rogowaciejących.

Czynnik genetyczny może decydować w momencie podziału komórki w warstwie podstawnej i „znakować” komórkę przeznaczoną do procesu różnicowania i rogowacenia. Czynnik „skórny” to według Jarreta wpływ komórek Langerhansa, o których sądzi on, iż nie są to komórki naskórka; wpływ zaś substancji toksycznych, powstałych podczas cytolizy, prowadzi do obumarcia komórek warstwy zrogowaciejącej.

Poza czynnikami wewnętrznymi o charakterze chemicznym, na tempo proliferacji w naskórku mogą wpływać czynniki zewnętrzne, np. temperatura. Podniesienie temperatury pokojowej do 30°C powoduje prawie czterokrotny wzrost liczby mitoz komórek naskórka ucha myszy. Wysoka temperatura ma największy wpływ w fazie G₂ cyklu komórkowego, przyspieszając inicjację podziału mitotycznego, natomiast nie działa prawdopodobnie na fazę S [16].

Wszystkie opisane czynniki prowadzą do utrzymania stanu dynamicznej homeostazy w naskórku, którą charakteryzuje m.in. ustalona dla gatunku i miejsca występowania ilość warstw komórek żywych i obumarłych, a także czas życia poszczególnych komórek i wędrówki każdej z nich od momentu powstania wskutek podziału mitotycznego w warstwie podstawnej aż do chwili całkowitego zrogowacenia i następnie złuszczenia z powierzchni naskórka.

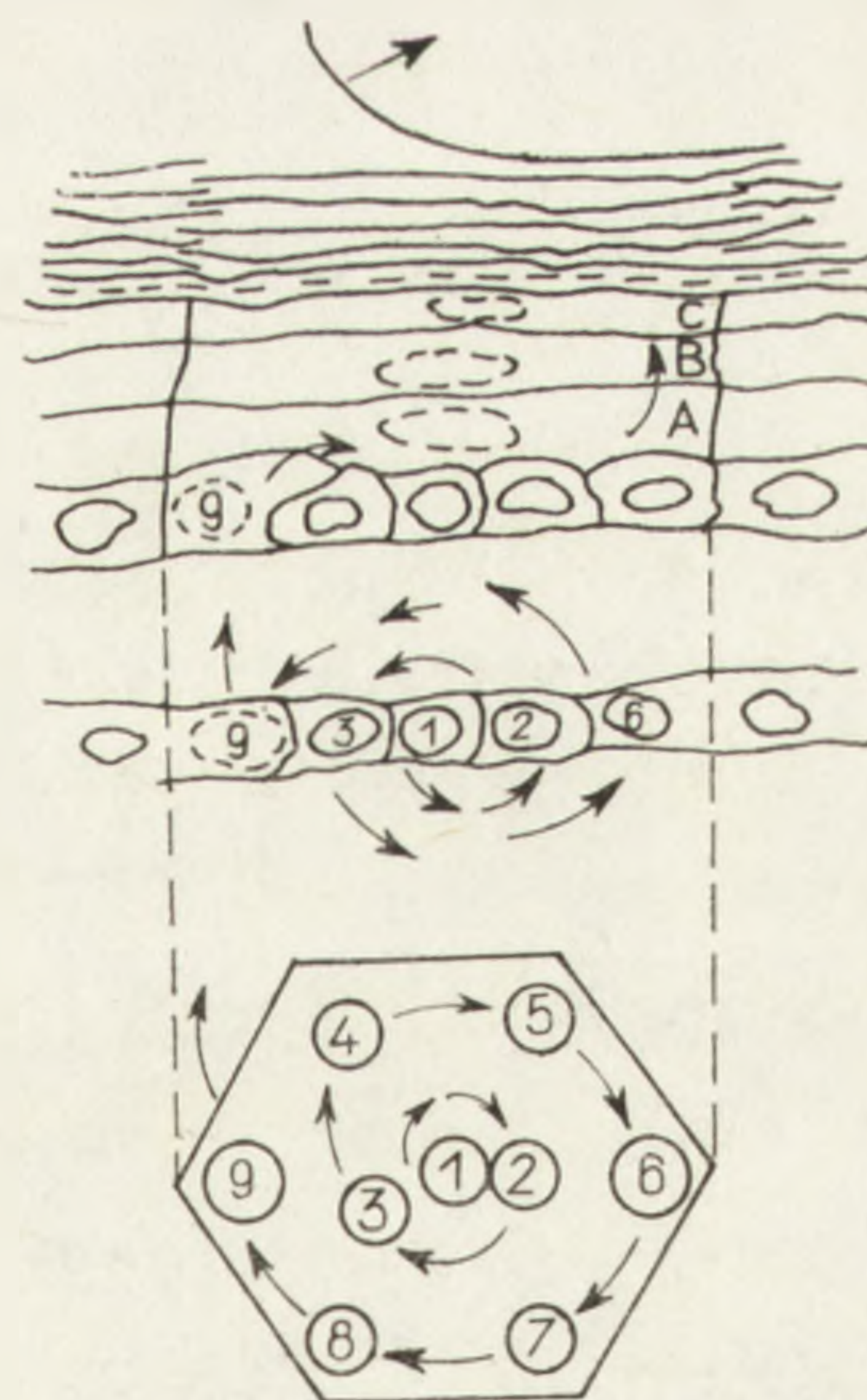
I tak, np. u myszy przeciętnie występują 4 warstwy komórek żywych (z jądrami komórkowymi) i 5 warstw komórek zrogowaciałych, u człowieka zaś odpowiednio 5 i 10 warstw [31].

RÓWNOWAGA STRUKTURALNA NASKÓRKA

Jak wiadomo w naskórku ssaków wyróżnia się 4 zasadnicze warstwy: podstawną, kolczystą, ziarnistą i zrogowaciałą. Według Jarreta [20] komórki są ułożone w ten sposób, że na 5 komórek podstawnych przypada po 2 komórki kolczyste w dwu wyższych warstwach i nad nimi 1 komórka ziarnista. Taki układ powstaje dzięki temu, że podczas różnicowania i migracji komórek w kierunku powierzchni zmieniają się w nich proporcje objętościowe jądra i cytoplazmy [35].

Allen i Potten [1, 31] na podstawie badań nad naskórkiem myszy wprowadzili koncepcję jednostki wynikającej z aktywności proliferacyjnej naskórka — epidermal proliferative unit (EPU). Jednostka taka tworzy dynamiczny system, w którym można określić los każdej komórki od chwili jej powstania w mitozie aż do momentu zakończenia rogowacenia.

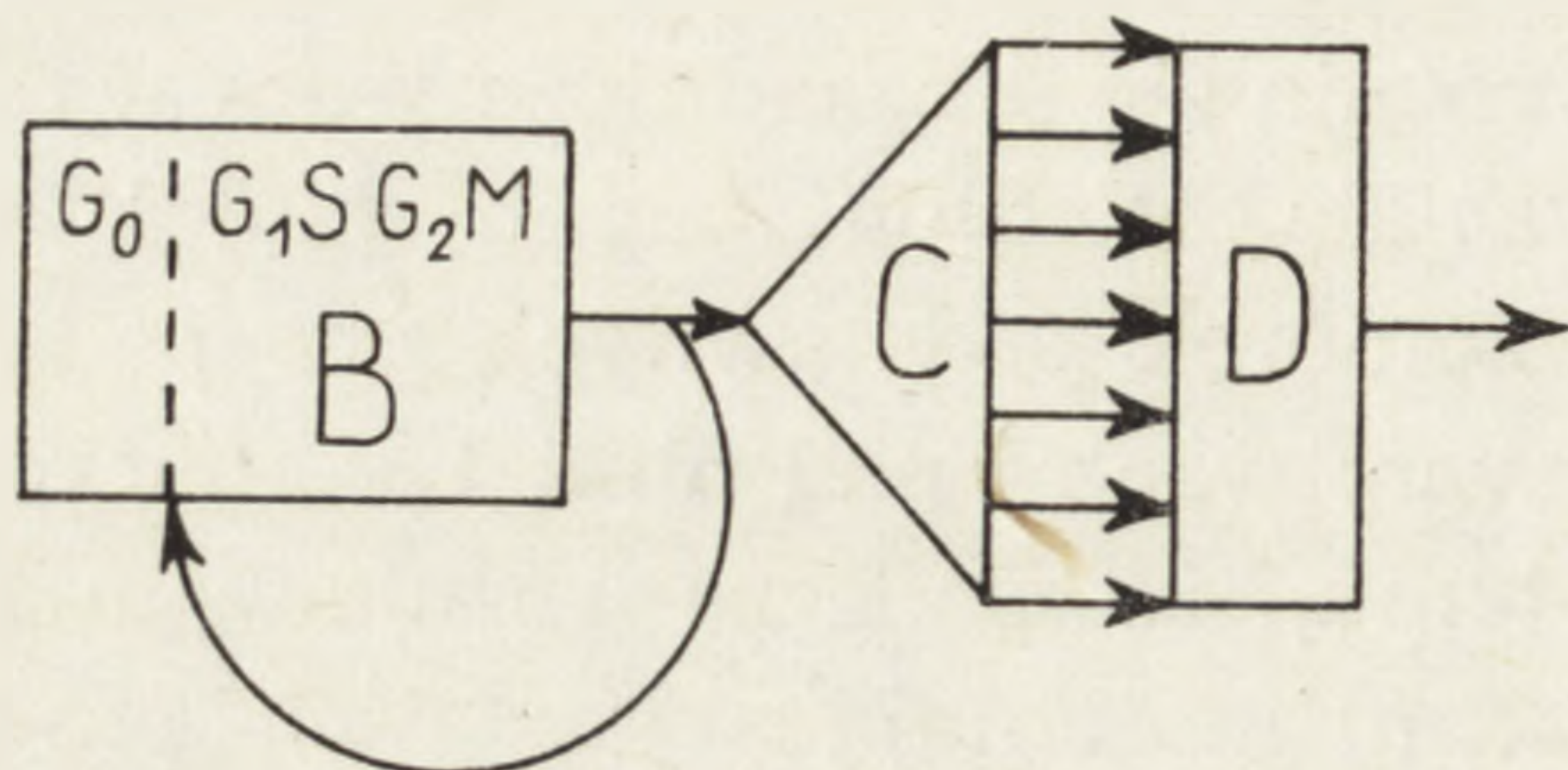
EPU składa się z 10—11 komórek podstawnych, 1 komórki Langerhansa i 2—3 dojrzewających komórek w okresie postmitotycznym. Oprócz tego na „krańcach” EPU mogą występować melanocyty [2]. Jedna z komórek podstawnych położona centralnie jest komórką klonalną, dającą początek wszystkim innym komórkom w jednostce. Do warstwy ponadpodstawnej migruje zwykle komórka z części peryferyjnej EPU (rys. 1).



Rys. 1. Model jednostki proliferacyjnej naskórka ssaka (według Pottena [31]). Każda jednostka zawiera komórkę klonalną (1), która dzieli się. Najbardziej peryferyczna z komórek potomnych (9) migruje do warstwy ponadpodstawnej i różnicuje się.

W ten sposób w systemie klonalnym komórka podstawna dzieląc się daje 1 klonalną i 1 nieklonalną komórkę. Ta ostatnia jest zdolna jeszcze do kilku podziałów i następnie ulega różnicowaniu (rys. 2). Na jeden

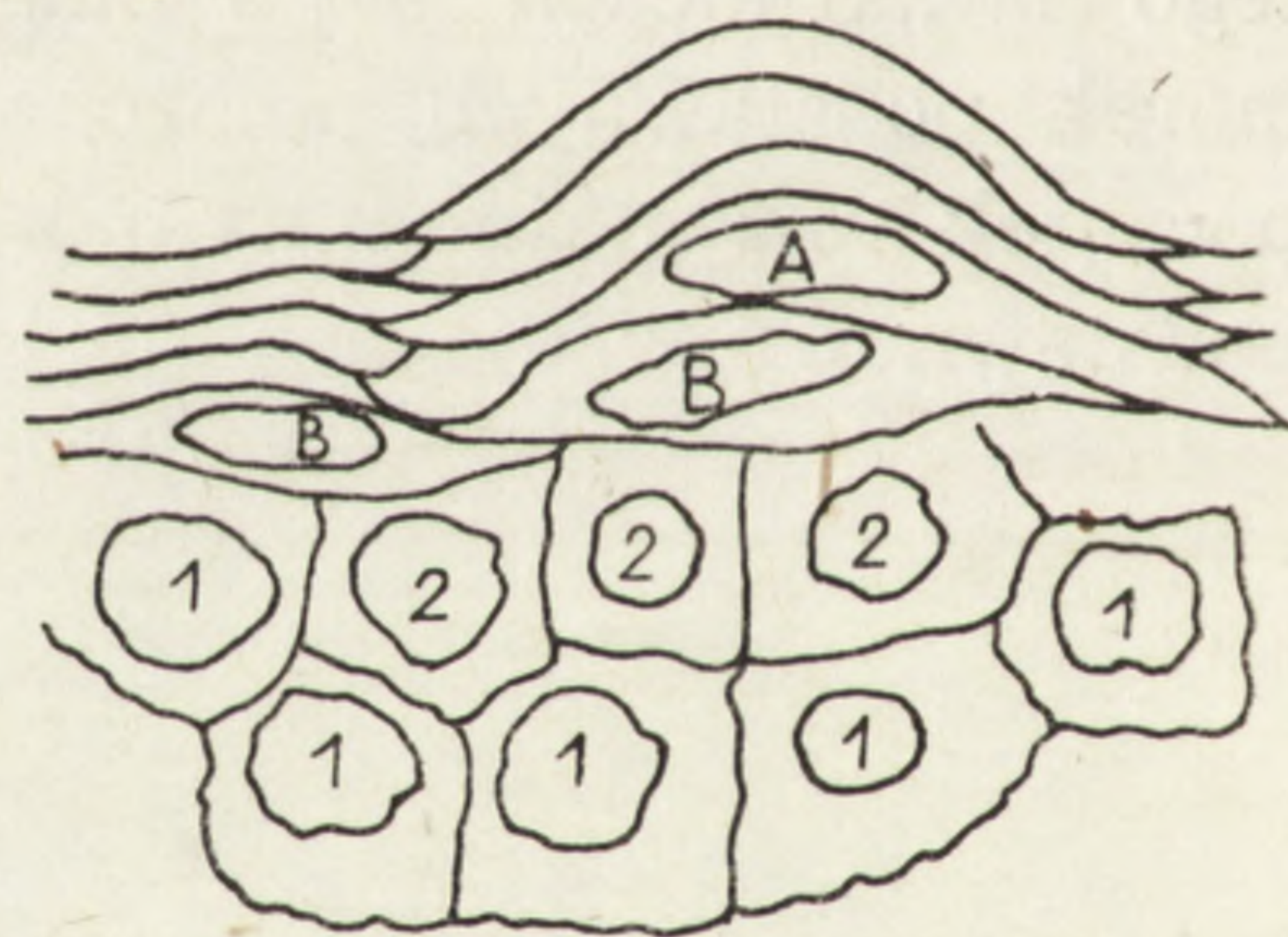
milimetr naskórka u myszy przypada około 1,2 jednostki proliferacyjnej, podobnie jak u człowieka — 1,1 jednostki [31]. Autorzy przedstawionej struktury naskórka poszukują czynników regulacji proliferacji naskórka w komórkach Langerhansa, które być może wytwarzają inhibitor podziałów mitotycznych. Z kolei synteza tego inhibitora może zależeć od stopnia zagęszczenia komórek podstawnych w jednostce proliferacyjnej.



Rys. 2. Schemat proliferacji komórek w naskórku (według Pottena, [31]). Klonalna komórka B dzieli się na 1 klonalną i 1 nieklonalną, która po kilkakrotnych podziałach (C) ulega różnicowaniu (D)

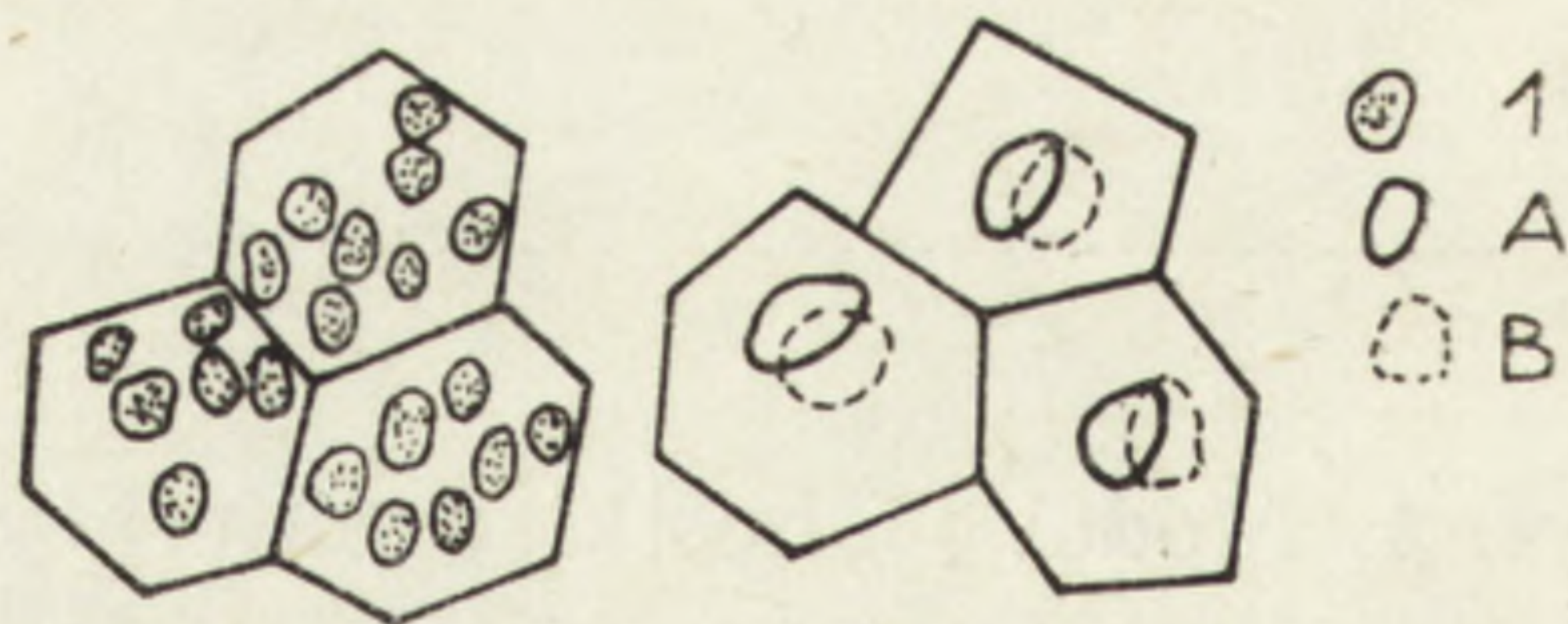
Istnieje również hipoteza, że naskórek posiada niejednorodną populację komórek klonalnych i tylko komórki klonalne dojrzałe są zdolne do reakcji na chalon G_1 , inne komórki zaś reagują jedynie na chalon G_2 [25].

Według Mentona [28], regularność budowie naskórka nadaje głównie kolumnowa struktura warstwy zrogowaciałej. Jądra komórek podstawnych układają się względem kolumn bezładnie, natomiast jądra komórek górnej części warstwy kolczystej i ziarnistej leżą w centrum każdej kolumny komórek zrogowaciałych (rys. 3).



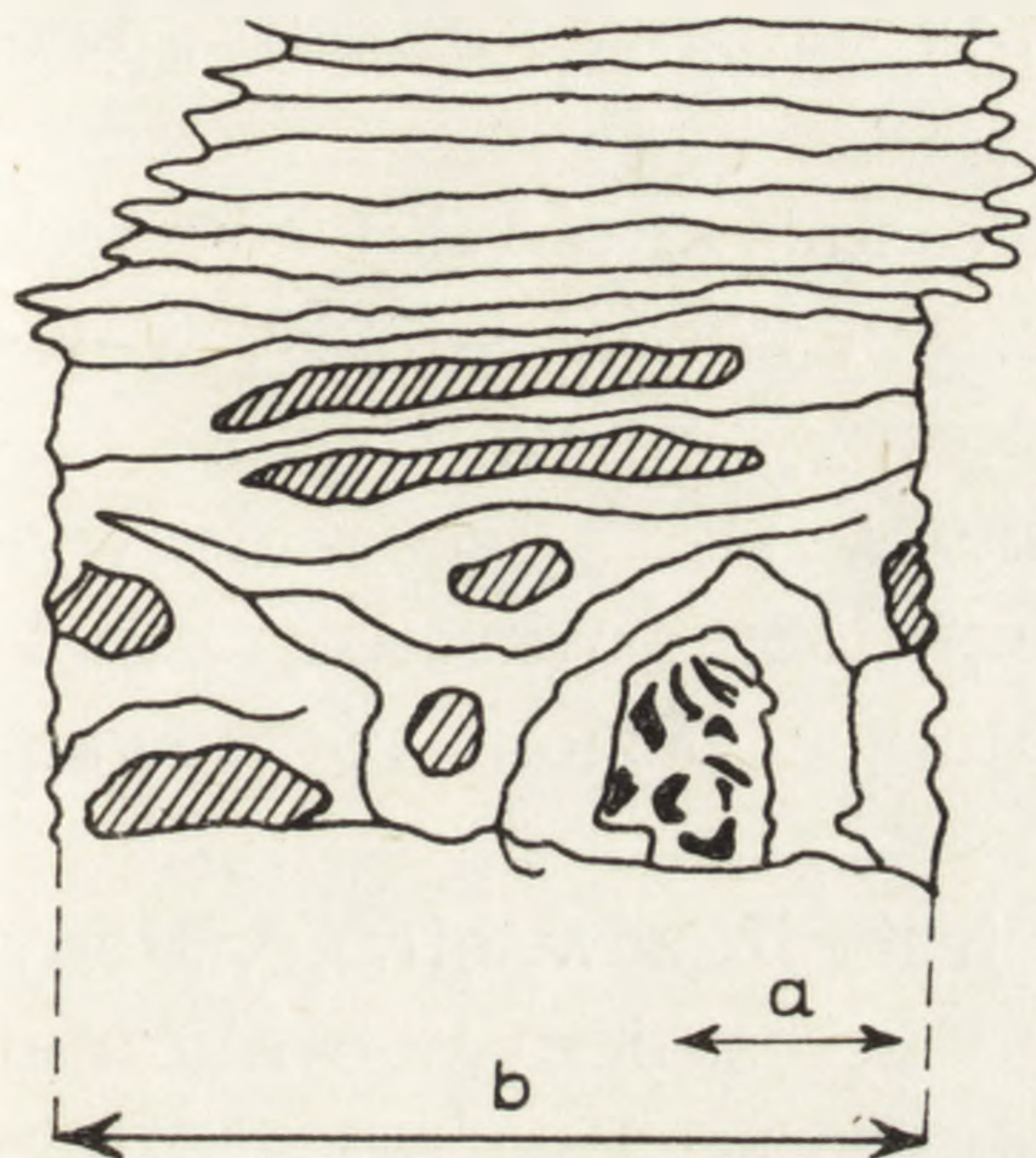
Rys. 3. Schemat układu jąder komórek różnych warstw naskórka na tle zarysu komórek warstwy zrogowaciałej (według Mentona [28])

1 — komórki podstawne, A i B — komórki rogowaciejące



Mackenzie [23—24] zajmował się z kolei zagadnieniem lokalizacji podziałów komórek podstawnych w stosunku do kolumny. Z badań tych wynika, że mitoza zachodzi zwykle w strefie brzeżnej kolumny, około $4,4 \mu\text{m}$ od jej brzegu, przy szerokości całej kolumny (mysz, chochlik) około $30 \mu\text{m}$ (rys. 4).

Oddzielne zagadnienie stanowi położenie komórek Langerhansa a regulacja układu kolumnowego naskórka. O ile u myszy są one rozmieszczone w sposób określony względem kolumn, to u innych ssaków, np. u świnki morskiej czy małp, położenie to nie jest stałe. Prawdopodobnie zatem regularność taka u myszy jest nietypowa i nie ma zasadniczego znaczenia dla układu kolumnowego [23, 24].



Rys. 4. Schemat położenia komórki podstawnej w metafazie w stosunku do „kolumny” komórek warstwy zrogowaciałej (według Mackenziego [22])

a — około $4,5 \mu\text{m}$, b — około $30 \mu\text{m}$ (szerokość kolumny)

Jednostkowa struktura naskórka, czy też inaczej budowa kolumnowa, dowodzi istnienia równowagi między tempem powstawania komórek (czyli aktywnością mitotyczną) a ich dojrzewaniem i różnicowaniem; tempo podziałów mitotycznych w naskórku wyrażone na jednostkę proliferacyjną wynosi u myszy 1,3, a u człowieka — 2,6 komórki dziennie [31].

ZAKOŃCZENIE

Jak już wspomniano na początku, stan równowagi naskórka utrzymuje się przy bardzo niskim poziomie glikogenu w komórkach. W naskórku glikogen jest węglowodanem występującym jedynie podczas okresu wzrostu i różnicowania komórek naskórka.

Podczas rozwoju zarodkowego u myszy stwierdzono w 17 dniu w warstwie podstawnej i kolczystej liczne ziarna glikogenu. Około 20 dnia ilość glikogenu zaczyna spadać, choć występuje przez cały czas rozwoju naskórka. Obecność glikogenu jest charakterystyczną cechą rozwijającego się naskórka ssaków. Ubytek glikogenu zaznacza się najpierw w komórkach podstawnych, następnie w ziarnistych, a w komórkach kolczystych glikogen pozostaje najdłużej [39].

Z niektórych badań ostatnich lat wynika, że inicjację gromadzenia glikogenu w komórkach naskórka determinuje odpowiednio niski poziom c-AMP; związek ten byłby zatem regulatorem procesu syntezy glikogenu. Ponieważ glikogen odkłada się jedynie podczas rozmnażania oraz wzro-

stu komórek, jednocześnie c-AMP znajduje się w centrum regulacji równowagi między proliferacją a różnicowaniem komórek naskórka [41].

System utrzymujący homeostazę metaboliczną i strukturalną ulega naruszeniu przy pobudzeniu naskórka do regeneracji reparatywnej. Wówczas dominującym procesem jest migracja i proliferacja, co pociąga za sobą zmiany struktury warstw i ultrastruktury komórek naskórka. Zagadnienia związane z tymi przemianami stanowią odrębny problem i wymagają osobnego opracowania.

W stanie równowagi naskórek jest tkanką o stałym ubytku komórek wskutek złuszczenia warstwy zrogowaciałej, zatem konieczne jest wówczas działanie mechanizmu umożliwiającego precyzyjne powstawanie nowych komórek. W systemie tym wiele momentów jest jeszcze nie wyjaśnionych; licznie prowadzone badania prawdopodobnie wkrótce uzupełnią obecny obraz poglądów na procesy regulujące poziom równowagi dynamicznej naskórka.

Zdaniem Rothberga i wsp. [34] możliwe jest, iż zewnętrzne błony komórkowe odgrywają rolę w kontroli wzrostu i uczestniczą w cyklicznej łączności między błoną komórkową a jądrem komórki. Być może dzieje się to przez zmianę systemu cyklicznej adenilowej błon. Jak te zmiany zachodzą i jak wpływają na zjawiska w komórkach podstawnych w różnych stadiach cyklu komórkowego — jest na razie trudne do wyjaśnienia.

Na podstawie dotychczasowych badań można jednak wnioskować o istnieniu czynnościowych związków między substancjami regulacyjnymi homeostazy naskórka, np. między cyklicznymi nukleotydami a chalonaми, które z kolei działają wybiórczo na komórki naskórka ssaków.

LITERATURA

- [1] ADACHI K., LEVINE V., HALPRIN K., IIZUKI H., YOSHIKAWA K., Multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in pig epidermis, *Bioch. Bioph. Acta (Enzymol)*, **429**: 498—507, 1976.
- [2] ALLĒN T. D., POTTEN C. S., Fine-structural indentification and organization of the epidermal proliferative unit, *Journ. Cell Sci.*, **15**: 291—320, 1974.
- [3] ARGYRIS Th. S., Kinetics of epidermal production during epidermal regeneration following abrasion in mice, *Am. Journ. Pathol.*, **83**: 329—340, 1976.
- [4] BADEN H. P., SVIOKLA S., The effect of chalone in epidermal DNA synthesis, *Exp. Cell Res.*, **50**: 644—645, 1968.
- [5] BERTSCH S., CSONTOS K., SCHWEIZER J., MARKS R., Effect of mechanical stimulation on cell proliferation in mouse epidermis and on growth regulation by endogenous factors (chalons), *Cell Tissue Kinet.*, **9**: 445—457, 1976.
- [6] BULLOUGH W. S., The control of mitotic activity in adult mammalian tissue, *Biol. Rev.*, **37**: 307—342, 1962.

- [7] — Mitotic and functional homeostasis, *Cancer Res.*, **25**: 1683—1727, 1965.
- [8] CARPENTER G., LEMBACH K. J., MORRISON M. M., COHEN S., Characterization of the binding of ^{125}I -labeled epidermal growth factor to human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **250**: 4297—4304, 1975.
- [9] CHOPRA D. P., FORBES P. D., Analysis of cell kinetics during ultraviolet light-induced epidermal carcinogenesis in hairless mice, *Cancer Res.*, **34**: 454—457, 1974.
- [10] COHEN S., Epidermal growth factor, *J. Invest. Derm.*, **59**: 13—16, 1972.
- [11] COHEN S., TAYLOR J. M., Epidermal Growth Factor: Chemical and Biological Characterization, [w] Epidermal Wound Healing, red. Maibach H. I., Rovee D. T., Year Book Med. Publ. Chicago 203—218, 1972.
- [12] DELESCLUSE C., COLBURN N. H., DUELL E. A., VOORHEES J. J., Cyclic AMP-elevating agents inhibit proliferation of keratinizing guinea pig epidermal cells, *Differentiation*, **2**: 343—350, 1974.
- [13] ELGJO K., Epidermal chalone and cyclic AMP: in vivo study, *Journ. Invest. Derm.*, **64**: 14—18, 1975.
- [14] ELGJO K., HENNINGS H., MICHAEL D., YUSPA S., Natural synchrony of newborn mouse epidermal cells in vitro. *J. Invest. Dermat.*, **66**: 292—296, 1976.
- [15] FULGHUM D.D., The skin and prostaglandins, *Arch. Dermatol.*, **102**: 225—229, 1970.
- [16] GELFANT S., Temperature-induced cell proliferation in mouse ear epidermis in vivo, *Exptl. Cell Res.*, **90**: 458—461, 1975.
- [17] HEGAZY M., FOWLER J., Cell population kinetics of plucked and unplucked mouse skin. I. Unirradiated skin, *Cell Tissue Kinet.*, **6**: 17—33, 1973.
- [18] HENNINGS H., ELGJO K., Epidermal regeneration after cellophane tape stripping of hairless mouse skin, *Cell Tissue Kinet.*, **3**: 243—252, 1970.
- [19] IVERSEN O. H., BJERKNES R., Kinetics of epidermal reaction to carcinogens, *Acta Pathol., Microb. Scand.*, supp. 165, 1963.
- [20] JARRET A., *The Physiology and Pathophysiology of the Skin*, vol. 1, Academic Press, London, New York, San Francisco 1973.
- [21] KOPEĆ J., Dane nie opublikowane.
- [22] MACKENZIE I. C., The ordered structure of mammalian epidermis, [in] *Epidermal Wound Healing*, ed. H. I. Maibach, D. T. Rovee, Chicago, Year Book, 5—25, 1972.
- [23] — Ordered structure of the epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **65**: 45—51, 1975.
- [24] MACKENZIE I. C., ZIMMERMAN K. L., WHEELLOCK D. A., Patterns of mitosis in hamster epidermis, *Am. J. Anat.*, **144**: 461—466, 1975.
- [25] MARKS F., Epidermal growth control mechanisms, hyperplasia and tumor promotion in skin, *Cancer Res.*, **36**: 2636—2643, 1976.
- [26] MATHUR M., DEO M. G., Kinetics of proliferation and differentiation in the hair follicle and epidermis in neonatally undernourished rat, *Am. J. Pathol.*, **82**: 9—24, 1976.
- [27] MC GUIRE J., ARNESEN S., Control of keratinocyte division in vitro, *J. Invest. Derm.*, **59**: 84—90, 1972.
- [28] MENTON D. N., A minimum-surface mechanism to account for the organization of cells into columns in the mammalian epidermis, *Am. J. Anat.*, **145**: 1—22, 1976.
- [29] NOME O., Tissue specificity of the epidermal chalones, *Virchows Arch. B., Zell Pathol.*, **19**: 1—25, 1975.

- [30] POTTEN C. S., Epidermal transit time, *Br. Journ. Dermat.* 93: 649—658, 1975.
- [31] — Epidermal cell production rates, *J. Invest. Dermatol.*, 65: 488—500, 1975.
- [32] PULLMANN H., LENNARTZ K. J., STEIGLEDER G. K., Die Proliferationskinetik normaler Epidermis vor und nach äusserlicher Anwendung einer 1% igen Vitamin A-Säure-Lösung, *Arch. Derm. Res.*, 253: 71—76, 1975.
- [33] RHEINWALD J. G., GREEN H., Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature*, 265: 421—424, 1977.
- [34] ROTHBERG S., NANCARROW G. E., MEYDRECH E. F., IWANIK M. J., Extracellular stimulation of epidermal DNA synthesis, *Cell Tissue Kinet.*, 9: 439—444, 1976.
- [35] ROWDEN G., Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse III. Determination of the volumes of nuclei and cytoplasm of cells in murine epidermis, *J. Invest. Derm.*, 64: 1—3, 1975.
- [36] SHELLES W. B., JUHLIN L., Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigens, *Nature*, 261: 46—47, 1976.
- [37] SILBERBERG I., BAER R., ROSENTHAL S., The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pig, *J. Invest. Dermatol.*, 66: 210—217, 1976.
- [38] WAWRZYNIAK M., *Polskie Mianownictwo Histologiczne*, PZWL, Warszawa 1974.
- [39] WEISS L. W., ZELIKSON A. S., Embryology of the epidermis: ultrastructural aspects, *Acta Dermatovener.* 55: 431—442, 1975.
- [40] WESTERMARK B., Density dependent proliferation of human glia cells stimulated by EGF, *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 69: 304—310, 1976.
- [41] VOORHEES J. J., DUELL E. A., STAWISKI M., HARREL R., Cyclic nucleotide metabolism in normal and proliferating epidermis, *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, 4: 117—161, 1974.
- [42] YAMAGUCHI T., HIROBE T., KINJO Y., MONAKA K., The effect of chalone on the cell cycle in the epidermis during wound healing, *Exp. Cell Res.*, 89: 247—254, 1974.
- [43] ZELIKSON A. S., The Langerhans cell, *J. Invest. Dermatol.*, 44: 201—212, 1965.

Otrzymano: 5 maja 1977.

Przyjęto: 7 czerwca 1977.

Adres autorki: ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa.

KINETYKA I MECHANIZMY ZMIAN W POPULACJI KOMÓRKOWEJ NOWOTWORÓW O ZATRZYMANYM WZROŚCIE LUB ZANIKAJĄCYCH W NASTĘPSTWIE ODCZYNÓW IMMUNOLOGICZNYCH ORGANIZMU

Przemysław JANIK

Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie,
Warszawa

Streszczenie. Tematem artykułu są badania mechanizmów zaniku względnie zatrzymania wzrostu nowotworów, jak również powstawania przerzutów w warunkach zmienionej odpowiedzi immunologicznej.

Stwierdzono, że podczas regresji nowotworów czas cykli mitotycznych, jak również podokresy cyklu nie zmieniają się w porównaniu z tymi samymi nowotworami rosnącymi progresywnie. Istotne zmiany wystąpiły we współczynniku utraty komórkowej, który wzrósł do 100%. Oznacza to, że w czasie ostrego odrzucania przeszczepu nowotworowego przeważają odczyny o charakterze cytotoksycznym. Podczas zatrzymania wzrostu guza przeważają odczyny o charakterze cytostatycznym.

Wyłączanie komórek z funkcji proliferacyjnej podczas immunologicznej regresji nowotworów nie ma charakteru losowego; wypadaniu podlegają głównie komórki w okresie G_2 . Zachodzący w tym okresie blok jest częściowo odwracalny. Komórki zablokowane w okresie G_2 charakteryzują się podwyższoną wrażliwością na uszkodzające działanie przeciwciał.

Kilka doświadczeń poświęcono przeszczepialnemu nowotworowi płuc, który wstrzykiwany w zawieszynie dożylniej powoduje rozwój pojedynczych guzków nowotworowych w płucach. Doświadczenia o tej zasadzie mogą być rozważane jako model do badania przerzutów. Zawiesiny takie wstrzykiwano dożylnie myszom normalnym, myszom z obniżoną odpornością przez napromienianie całego ciała oraz myszom obciążonym rosnącym nowotworem podskórnym.

Stwierdzono, że zachodzi prosta zależność między liczbą wstrzykniętych komórek a liczbą guzków. Bezwzględne liczby guzków w płucach zmieniały się w zależności od stanu uodpornienia biorcy, zależały również od fazy wzrostu podskórnego guza.

WSTĘP

Immunogenność nowotworów — uwarunkowana istnieniem na powierzchni ich komórek różnego rodzaju determinat antygenowych (np. uzależnionych od obecności wirusów, od zróżnicowania narządowego oraz antygenów transplantacyjnych) — jest warunkiem wzbudzania odpowie-

dzi immunologicznej typu humoralnego, zależnego, a więc zależnej od obecności limfocytów B, lub komórkowego, zależnego od obecności limfocytów T. Przyjmuje się, że mechanizmy te działają przeciwstawnie [32, 50, 80], przy czym mechanizmy humoralne mogą ułatwiać wzrost komórek nowotworowych [1, 4, 32] osłaniając ich powierzchnię przed cytotoksycznym działaniem limfocytów T. Jest to efekt blokujący, a przeciwciała — blokujące [32].

Limfocytom grasiczozależnym przypisuje się wielorakie funkcje (killer, supressor, helper, zabójcza, osłabiająca, wspomagająca), przy czym — ze zrozumiałych względów — w problematyce onkologicznej największe zaciekawienie budzi zdolność zabijania komórek nowotworowych przez swoiście uczulone limfocyty T. Różne efekty działania odczynów immunologicznych na komórki nowotworowe są wypadkową działania czynników humoralnych i komórkowych. Z tych względów trudno jest przewidzieć ilościowy, jak i jakościowy efekt jakiegokolwiek ingerencji doświadczalnej w stan układu immunologicznego, co stanowi słabą stronę dotychczasowych prób immunoterapii. Trudność tę powiększa fakt, że rodzaj zmobilizowanych mechanizmów immunologicznych, jak również efekt ich odpowiedzi na nowotwór zależy w decydującym stopniu od różnic antygenowych między nowotworem a gospodarzem, jeżeli różnice te są wielkie, jak np. w przeszczepach ksenogennych lub allogennych, to odpowiedź immunologiczna jest rychła i niezwykle skuteczna, tzn. w 100% prowadzi do całkowitego zniszczenia wszczepionego nowotworu. Przy słabych różnicach w antygenowości nowotworu i gospodarza, jakie istnieją w przypadku nowotworów samoistnych, jak również w przeszczepach syngenicznych, nowotwór wzrasta progresywnie, tak jakby układ immunologiczny w ogóle nie reagował albo też jakby przeciwstawne mechanizmy znosiły się wzajemnie. Na tę ostatnią możliwość wskazują doświadczenia, w których sztucznie zachwianie równowagi immunologicznej powoduje przyspieszenie albo zahamowanie wzrostu nowotworu.

Niektóre ze sposobów ingerencji w mechanizmy immunologiczne wzbudziły szczególne zainteresowanie i stały się niejako metodą, modelem czy układem doświadczalnym użytecznym w immunoterapii eksperymentalnej zarówno nowotworów zwierzęcych, jak i w klinice. Metody te można podzielić na dwie wielkie grupy:

1. Metody w których obniża się efekt działania limfocytów T; wyliczyć tu można immunosupresję przy użyciu różnych leków chemicznych, stosowanie surowicy antylimfocytarnej, postnatalne wycinanie grasicy, napromienianie letalne z restytucją ograniczoną wyłącznie do limfocytów B.

2. Techniki, które pobudzają limfocyty T do mobilizacji przez zwiększenie ich liczby i aktywności względnie przez ich swoiste uczulenie.

Przyjmuje się, że nieswoiste uaktywnienie limfocytów T można osiągnąć przez wstrzykiwanie adiuwantów względnie BCG, *Corynebacterium parvum* i innych antygenów wzbudzających odpowiedź typu późnego.

Stosowane metody — prowadzące do osłabienia, jak i wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej organizmu — miały rozmaity wpływ na różne przeszczepialne nowotwory, co zależało od stopnia zgodności tkanekowej (antygenowej) poszczególnych nowotworów z organizmami ich nosicieli.

Rozmaite efekty doświadczalnej ingerencji w stan odpornościowy gospodarza będą w obecnej pracy rozważane z punktu widzenia biologii nowotworów, a w szczególności ich wzrostu, a nie z punktu widzenia istniejących koncepcji immunologicznych.

Podstawowym zagadnieniem jest pytanie, jakim zmianom podlega czas trwania cyklu mitotycznego i jego faz w komórkach nowotworu ulegającego regresji pod wpływem odpowiedzi immunologicznej organizmu. Zmniejszanie się wymiarów nowotworu podczas takiej regresji może być rozważane jako proces depopulacji komórkowej, analogicznie do tego, co obserwowano w następstwie stosowania różnych metod leczniczych w klinice onkologicznej. Mechanizmy depopulacji po napromieniowaniu [48, 61, 82], chemioterapii [62] czy hormonoterapii [30, 44] są znane i wiadomo, że są one związane z głębokimi zmianami zarówno w zakresie trwania cyklu mitotycznego, jak i jego faz. Wiadomo również, że podczas tego procesu wchodzi w grę różne mechanizmy zależne od rodzaju leku, biochemizmu jego działania względnie istnienia dla niego swoistych receptorów [30]. Największą wrażliwość na leki chemiczne i na promieniowanie wykazują na ogół komórki proliferujące. Powstaje więc pytanie, czy podobnie dzieje się w nowotworach ulegających regresji w następstwie działania odpowiedzi immunologicznej. Informacje na ten temat są w piśmiennictwie bardzo skąpe i dotyczą z reguły komórek nowotworowych hodowanych poza ustrojem. Wnioski z takich doświadczeń nie mogą mieć zastosowania wprost do nowotworów ulegających regresji w organizmie.

Drugim problemem jest rozstrzygnięcie, czy zanik nowotworu w wyniku odpowiedzi immunologicznej jest następstwem działania mechanizmów cytotoksycznych czy cytostatycznych. W pierwszym przypadku należy przewidywać zabijanie komórek przez limfocyty T w każdym okresie życia komórki. W przypadku efektu cytostatycznego można przewidywać powstrzymanie względnie blok w aktywności proliferacyjnej.

Niekiedy komórki nowotworowe przeżywają długie okresy czasu mimo przejawów mocnej odpowiedzi organizmu [25, 27]. Przeciwciała blokujące lub kompleksy antygen—przeciwciało osłaniają komórki nowotworowe przed działaniem limfocytów [43, 70, 75], a efektem tego jest

wymykanie się komórek antygenowo obcych spod kontroli mechanizmów spełniających funkcję nadzoru immunologicznego [14, 78]. Dzięki temu liczba rozwiniętych i rozpoznawanych nowotworów u człowieka jest znacznie mniejsza niż liczba transformacji nowotworowych przewidywanych przez teorię mutacyjną.

Oprócz opisanych mechanizmów wymykania się komórek spod kontroli układu immunologicznego znane są fakty, które wskazują, że w nowotworze zachodzą procesy przystosowania się (adaptacji) do warunków stworzonych przez odpowiedź immunologiczną gospodarza [45, 73, 84]. W warunkach takich zachodzi selekcja, a więc wybiórcze nagromadzenie komórek o słabszej antygenowości błon komórkowych względnie o większej zdolności do naprawy uszkodzeń spowodowanych przez odczyny immunologiczne. Tego rodzaju mechanizmy mogłyby wyjaśnić niektóre zjawiska progresji oraz podjęcia wzrostu po dłuższym okresie jego zatrzymania.

W obrębie populacji komórek nowotworowych ekspresja antygenów powierzchniowych, jak również ich podatność na uszkodzenia przez efekторы układu immunologicznego są zmienne. Tego rodzaju zmienność jest przedmiotem żywej dyskusji w piśmiennictwie od czasu podstawowych badań Cikesa [16, 17] i zasługuje na bardziej szczegółowe omówienie.

Cikes [16, 17] stwierdził, że w populacji komórek białaczki limficznej indukowanej u myszy wirusem Moloney (YCAB) rosnącej w hodowli *in vitro* nasilenie ekspresji antygenowej pozostaje w odwrotnej zależności od tempa wzrostu i objętości komórek. Antygeny zgodności tkankowej oraz swoiste antygeny zależne od wirusa białaczkowego Moloney są najsilniej wyrażone we wczesnej interfazie, przypuszczalnie w G_1 . Gdy faza G_1 ulega wydłużeniu, w miarę zwalniania się tempa proliferacji komórek, następuje zwiększenie się ekspresji obu antygenowych właściwości, co wykazano metodą immunofluorescencji oraz testem cytotoksycznym. Na takim samym — co w pracach Cikesa — materiale komórkowym (YCAB), jednakże przy użyciu dodatkowych metod (np. uwalniania ^{51}Cr), Lerner i wsp. [51] wykazali, że efekt cytotoksyczny jest wprawdzie ograniczony do fazy G_1 , jednakże we wszystkich okresach cyklu mitotycznego antygeny powierzchniowe komórek zależne od wirusa Moloney są dostępne dla swoistych przeciwciał i dopełniacza. Na środek okresu G_1 przypada również maksymalna ekspresja antygenów powierzchniowych (SATA) w ludzkich komórkach neuroblastoma w hodowli *in vitro* [13]. Antygeny te wiążą przeciwciała obecne w surowicach osób chorych na neuroblastoma, natomiast takie reakcje nie występowały z surowicami pochodzącymi od zdrowych osób.

Według Lenevej i Svet-Mołodawskiego [50] fibroblasty L z ustalonej linii *in vitro* ulegają cytotoksycznemu działaniu uczulonych limfocytów

wyłącznie na początku fazy G_1 . Badacze ci uważają, że w komórce w początkowym okresie fazy G_1 , tzw. G_{1a} , istnieje szczególny stan fizjologicznej podatności na działanie czynników morfogenetycznych, jak również cytotoksycznych.

Największa ekspresja antygenów komórek nowotworowych i ich podatność na uszkodzające działanie mechanizmów obronnych nie zawsze jednak przypada na okres G_1 . Tak na przykład Schwenk i Schwenk [68] — na materiale ludzkich komórek białaczkowych hodowanych *in vitro* — wykazali, że ekspresja antygeny charakterystycznego dla limfocytów T jest najslabiej wyrażona w okresie G_1 , wzrasta natomiast w późniejszych okresach cyklu mitotycznego. Z badań nad komórkami nerki szczura zakażonymi wirusami Raushera lub Kirsteina wynika, że antygeny powierzchniowe zależne od wirusa są najmocniej wyrażone w końcu okresu S oraz w okresie G_2 [56].

Pelegriano i wsp. [58], badając ekspresję antygenów HL-A na powierzchni komórek wyprowadzonych z ludzkich limfocytów, znajdują, że komórki z okresu G_1 są mało podatne na immunocytolizę. Z drugiej strony gęstość powierzchniowych antygenów, jak i ich ilość nie zmienia się w cyklu mitotycznym. Na podstawie tych obserwacji autorzy dochodzą do wniosku, że stosunkowo mała podatność komórek z okresu G_1 jest wynikiem dużej zdolności do naprawy uszkodzeń wywołanych przez przeciwciała w obecności dopełniacza. W doświadczeniach Shipley'a [69] najwyższą oporność wykazywały komórki znajdujące się w środkowym okresie syntezy DNA. Materiał w tych doświadczeniach stanowiły komórki z ustalonej linii pochodzącej od chomika złocistego, a metoda polegała na zahamowaniu wzrostu kolonii *in vitro*. Również Hanke i Rajewski [31] znaleźli, że komórki z okresu syntezy DNA (w przeciwieństwie do komórek z okresu G_1 i G_1) są mało podatne na immunocytolizę wywołaną przez uczulone limfocyty.

Thomas [77] na materiale komórek mastocytoma (P816Y) oraz mysich limfocytów stymulowanych PHA badał ekspresję dwóch różnych antygenów grupowych H oraz B metodą pośredniej immunofluorescencji; stwierdził on, że w różnych okresach po założeniu hodowli względnie po zwolnieniu bloku tymidynowego oba antygeny ujawniają się naprzemiennie.

Z tego krótkiego przeglądu wynika, że podatność komórek hodowanych *in vitro* na uszkodzające działanie mechanizmów immunologicznych nie pozostaje w prostej zależności od pozycji zajmowanej przez komórkę w cyklu mitotycznym, a odgrywa tu rolę szereg innych czynników, jak rodzaj komórek, rodzaj antygeny powierzchniowego oraz stan zaawansowania wzrostu komórek.

Badania *in vitro* mają szereg zalet, przede wszystkim ułatwiają syn-

chronizację populacji komórkowej, a tym samym uzyskanie względnie czystych frakcji. Wyniki tych badań jednak nie dostarczają bezpośrednich informacji o warunkach i mechanizmach podatności komórek nowotworowych rosnących w organizmach, gdzie odpowiedź immunologiczna na proces nowotworowy jest bardzo złożona.

Pierwszym doniesieniem o zmiennej wrażliwości komórek nowotworowych na odczyny immunologiczne w warunkach *in vivo* jest praca De Cossy i Gelfanta [20] nad komórkami raka Ehrlicha. Komórki te zatrzymane w okresie G_2 cyklu mitotycznego przez odczyny immunologiczne mogą wchodzić na nowo w okres mitozy, jeżeli odporność gospodarza obniży się wstrzykiwaniem surowicy antylimfocytarnej.

Również w naszych wcześniejszych pracach [38, 46] stwierdzaliśmy, że w raku Ehrlicha wkrótce po przeszczepieniu na nowych biorców wzrasta znacznie odsetek komórek w fazie mitozy, co obecnie tłumaczymy uwalnianiem się komórek z bloku w okresie G_2 .

Odmienną interpretację badań nad rakiem Ehrlicha, jak również nad nowotworem wysiękowym JB-I, w zaawansowanych okresach ich wzrostu przedstawili Bichel i Dombernowski [7, 8]. Według tych badaczy zatrzymanie komórek w okresach G_1 i G_2 jest wynikiem działania chalonów. Chalonami nazywa się w piśmiennictwie swoiste inhibitory okresów G_1 i G_2 cyklu mitotycznego komórki, które zostały wykryte w tkankach normalnych [12, 28, 57]. Ich rola w regulacji wzrostu nowotworów jest dyskusyjna. Z badań Iversena i wsp. [37] wynika, że w chłoniaku Burkitta istnieje dysproporcja między ilością komórek wchodzących w okres syntezy DNA a ilością komórek wchodzących w okres mitozy, co wskazuje na blok w okresie G_2 cyklu mitotycznego; może on być wywołany albo przez chalony, albo przez odczyny immunologiczne.

Wrażliwość komórek nowotworowych na czynniki immunologiczne została przebadana dość wszechstronnie w doświadczeniach *in vitro*, natomiast zmienność taka w organizmie żywym przedstawia szereg zagadnień wymagających wyjaśnienia. Próbę ich rozwiązania podjęto przez wprowadzenie szeregu nowych metod. Głównym problemem była istota i mechanizm bloku G_2 , co badano na materiale kilku przeszczepialnych nowotworów przy użyciu tak rozmaitych metod, jak ciągła iniekcja znakowanej tymidyny, technika podwójnego znakowania, wirowanie na fikolu oraz testy cytotoksyczne.

Wielu badaczy od dawna wskazywało, że stan odpornościowy ustroju ma znaczenie dla powstawania przerzutów [2, 60, 83]. Mogliśmy podjąć badania nad oddzielnymi wpływami mechanizmów humoralnych oraz komórkowych na powstawanie przerzutów. Podjęliśmy również badania nad modyfikacją stanu immunologicznego organizmu przez rosnący nowo-

twór i wpływem takiej modyfikacji na przerzuty. Zjawiska powstawania przerzutów badaliśmy w sposób ilościowy, posługując się metodą Hilla i Busha [34]; polega ona na dożylnym wstrzykiwaniu znanej liczby komórek w zawieszynie i zliczaniu guzków nowotworowych w płucach w 2—4 tygodni później. Korzystając z metod immunologicznych oraz ilościowego badania przerzutów można też było podjąć dyskusję nad pojęciem „klonogenności” rozpatrywanej z jednej strony jako cechy nowotworu, z drugiej zaś jako wyraz wpływu środowiska na przejaw tej cechy.

Zainteresowania zróżnicowaną podatnością komórek nowotworowych na odczyny immunologiczne wynikają z przesłanek teoretycznych, jak i praktycznych. Dla teorii znajomość skutków działania mechanizmów obronnych na terenie komórek w warunkach *in vivo* przybliży zrozumienie ich ewentualnego znaczenia w kontroli wzrostu nowotworów.

Praktyczny natomiast aspekt zagadnienia wynika z coraz powszechniej podejmowanych prób immunologicznego leczenia chorób nowotworowych. Poprzez analogie do leczenia energią promienistą, hormonami czy też związkami chemicznymi nasuwa się pytanie, jak odczyny immunologiczne oddziałują na populację komórek nowotworowych oraz jakie składowe tej populacji mogą być najbardziej podatne na siły obronne ustroju obciążonego nowotworem.

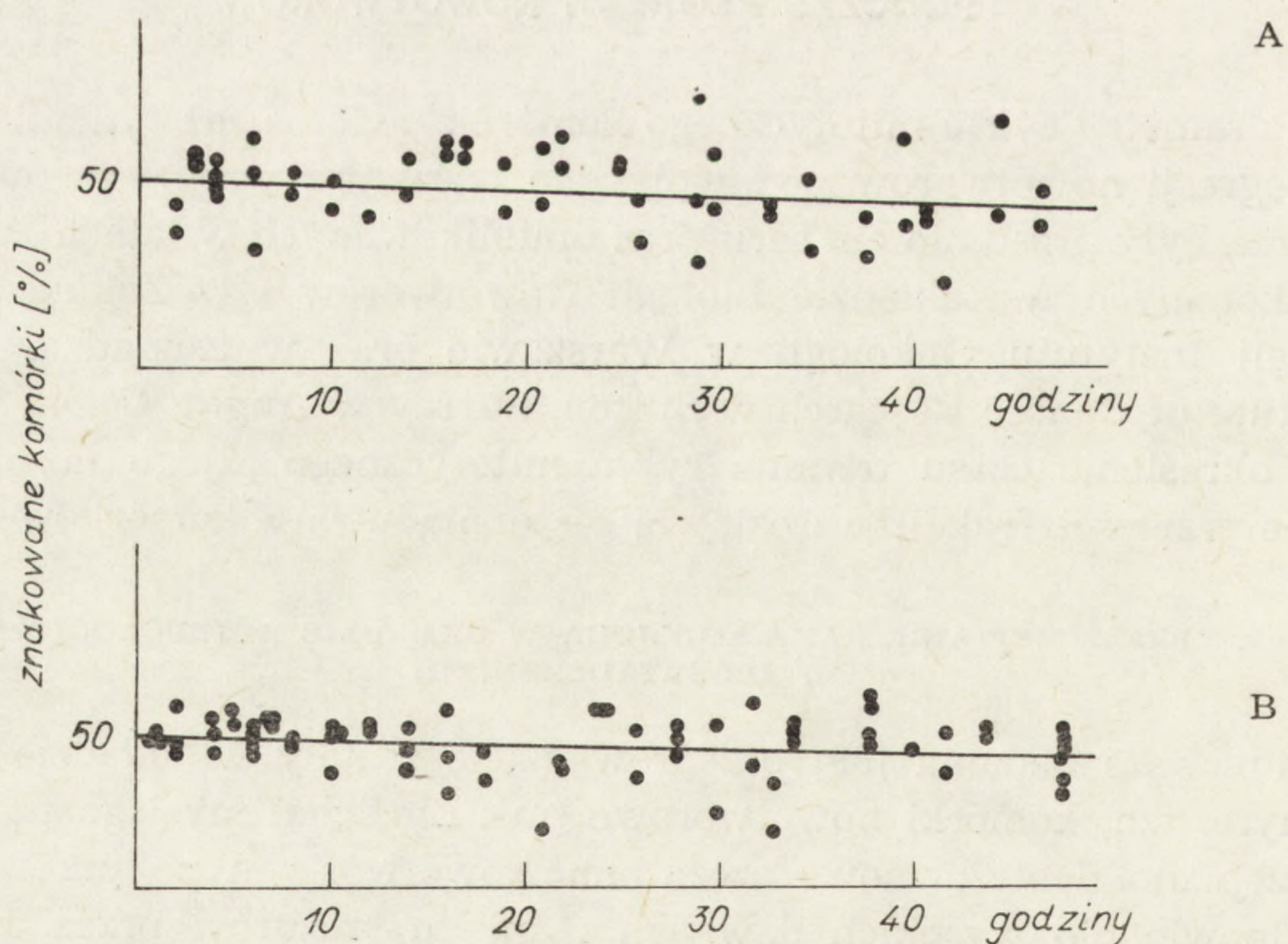
PARAMETRY CYKLU MITOTYCZNEGO KOMÓREK PODCZAS REGRESJI NOWOTWORÓW

Parametry cyklu mitotycznego komórek podczas zatrzymania względnie regresji nowotworów pod wpływem odczynów odpornościowych gospodarza były przedmiotem serii prac opublikowanych w latach 1971—1976 i wykonanych w Zakładzie Biologii Nowotworów i w Zakładzie Radiobiologii Instytutu Onkologii w Warszawie oraz w Zakładzie Biofizyki Institute of Cancer Research w Sutton, Surrey w Anglii. Celem tych prac było określenie czasu trwania cyklu mitotycznego i jego faz oraz obliczenie wartości frakcji wzrostowej i stopnia utraty komórkowej.

1. PRZESZCZEPIANIE RAKA EHRLICHA W UKŁADZIE HETEROLOGICZNYM (DOŚWIADCZENIE 1)

Pierwsze badania [39] przeprowadzone zostały w układzie heterologicznym, tzn. komórki nowotworowe (rak Ehrlicha) mysiego pochodzenia wszczepiano dootrzewnowo szczurom. Nowotwór ten po przeszczepieniu w odpowiednio wysokich dawkach rośnie u szczurów przez 5 dni wytwarzając obfity wysięk. Po takim okresie wzrostu następuje okres regresji; mianowicie liczba komórek nowotworowych w wysięku zmniejsza

się na skutek odczynów immunologicznych [46]. Czas cykli mitotycznych określano metodą fali znakowanych mitoz [35, 63], wielokrotnie stosowanej do badań nad rakiem Ehrlicha [48, 49]. Wykazano, że podczas regresji raka Ehrlicha, która zachodzi w okresie 120-170 godz. po wszczepieniu, nie zmienia się czas cyklu mitotycznego komórek ani jego faz w porównaniu z rakiem Ehrlicha, rosnącym u myszy i badanym w takim samym czasie. Spostrzeżeniem godnym uwagi był fakt, zaobserwowany podczas regresji raka Ehrlicha u szczurów, że ramię wstępujące pierwszej fali znakowanych mitoz było nachylone mniej stromo niż w analogicznych wykresach uzyskanych z materiału takich samych komórek rosnących u myszy. Z różnic tych wyprowadziłem wniosek, że maksymalny okres G_2 ulega wydłużeniu [39]. Zestawienie tego faktu z wynikami pomiarów odsetka komórek w okresie mitozy sugerowało, że immunologiczne mechanizmy efektorowe działają głównie na komórki w fazie G_2 . W okresie regresji nowotworu wielkość frakcji wzrostowej populacji komórkowej obliczona metodą Pucka i Steffena [61] oraz metodą Steela [74] ulegała nieznacznemu obniżeniu, zwiększał się natomiast współczynnik utraty komórkowej, obliczony metodą Steela [71, 74]. Stwierdzono ponadto, że podczas regresji nowotworu odsetek interfazalnych komórek piętnowanych trytowaną tymidyną nie ulegał wyraźnej zmianie w porównaniu z okresem wzrostu raka Ehrlicha (rys. 1). Przedstawione wyniki badań doprowadziły do wniosku, że w następstwie dzia-



Rys. 1. Procenty wyznakowanych komórek raka Ehrlicha podczas (A) wzrostu u myszy oraz (B) regresji u szczurów

łania mechanizmów odpornościowych u szczurów zachodzi w przeszczepionym nowotworze utrata zarówno komórek proliferujących, jak i spoczynkowych.

2. PRZESZCZEPIANIE BIAŁACZKI 5178Y (DOŚWIADCZENIE 2)

Powstało zagadnienie czy w innych przeszczepialnych nowotworach zwierzęcych rosnących i ulegających regresji u gospodarzy syngenicznych występują podobne zmiany w populacji komórek, jakie opisywaliśmy w heterologicznych przeszczepach raka Ehrlicha.

Szczególnie cennym materiałem okazała się białaczka 5178Y przeszczepiana u myszy DBA/2. W białaczce tej obecność swoistych antygenów transplantacyjnych wynika z faktu, że po preimmunizacji nie dochodzi do wzrostu podskórnego przeszczepu nowotworu, a immunizacja wykonana podczas wzrostu podskórnego przeszczepu tej białaczki powoduje jej regresję [47]. Do doświadczeń nad białaczką 5178Y użyto linii komórkowej wyprowadzonej przez Courney [21]. Komórki tej linii charakteryzują się wysoką antygenowością, tak że jednorazowa preimmunizacja zabitymi komórkami nowotworowymi zapobiega wzrostowi komórek wszczepionych podskórnie w dawce 10^6 . Zdarzały się też często regresje samoistne tej białaczki. We własnych eksperymentach [47] regresję nowotworu wywoływano dwukrotnym dootrzewnym wstrzykiwaniem komórek zabitych napromieniowaniem (dawką 5000 R promieniowania X) wykonanym w 6 i 11 dniu po wszczepieniu podskórnym trzech milionów żywych komórek. U zwierząt w ten sposób immunizowanych guz lity rósł podskórnie do 14 dnia, a następnie ulegał regresji. Badania cyklów mitotycznych przeprowadzano 15 dnia po implantacji, a więc w okresie regresji. W tym okresie czas cyklów mitotycznych, jak i jego faz wykazywał wartości takie same jak w okresie postępującego wzrostu nowotworu u nie immunizowanych gospodarzy. U tych ostatnich nowotwór rósł w tempie, które wyrażało się czasem podwojenia wynoszącym około 18 godz. Jedyne różnice zaznaczyły się w wielkości współczynnika utraty komórkowej. Współczynnik ten [71, 72] określa proporcję między tempem utraty komórek (przez zamieranie lub emigrację z guza), a tempem produkcji nowych komórek. Może on być wyrażony w procentach albo jako frakcja całości. W omawianych eksperymentach współczynnik utraty komórkowej wzrósł do 100% przy równoczesnym nieznacznym spadku frakcji wzrostowej, która mówi o tym, jaka część populacji znajduje się w cyklu mitotycznym [53].

Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że podczas regresji tej białaczki, podobnie jak w raku Ehrlicha, nie zachodzą zmiany w czasie cyklu mitotycznego komórek oraz że immunologiczne mechanizmy efektorowe niszczą zarówno komórki proliferujące, jak i spoczynkowe.

3. PRZESZCZEPIANIE BIAŁACZKI LBN/B-3 (DOŚWIADCZENIE 3)

Następnym układem doświadczalnym była przeszczepialna białaczka, rosnąca w postaci wysiękowej i ulegająca samorzutnej regresji u syngenicznego gospodarza. Białaczka ta jest podlinią komórkową oznaczoną symbolem LBN/b-3, która została wyodrębniona w trakcie pasażowania białaczki wywołanej u myszy BN/b surowicą antylimfocytarną [76]. W obecnych doświadczeniach komórki białaczkowe w liczbie 4×10^6 wstrzykiwano dootrzewnowo myszom, które odrzuciły poprzedni przeszczep tego samego nowotworu, a więc biorcom aktywnie immunizowanym. Po takiej implantacji nowotwór nie wzrastał, lecz od początku ulegał powolnemu zanikowi. W okresie regresji badano cykle mitotyczne oraz ich fazy i porównywano je z cyklami mitotycznymi komórek białaczkowych badanych w analogicznym czasie po wszczepieniu nie immunizowanym biorcom. Stwierdzono [41], że między tymi doświadczeniami nie zachodzą wyraźne różnice pod względem parametrów cykli mitotycznych komórek oraz że regresja białaczki wiąże się z utratą komórkową, czego wyrazem jest podwyższenie współczynnika utraty komórkowej do 100%.

4. GRUCZOLAKORAK SUTKA U SZCZURÓW Z POBUDZONĄ ODPORNOŚCIĄ (DOŚWIADCZENIE 4)

Interesujący układ doświadczalny stanowi gruczolakorak sutka indukowany dwumetylobenzantracenenem (DMBA) (dr G. C. Steel) u szczurów ze szczepu August, a następnie przeszczepiany podskórnie syngenicznym biorcom. (Z materiału tego mogłem korzystać podczas pobytu w 1970 r. w Zakładzie Biofizyki Instytutu do Badań nad Rakiem, Sutton, Surrey, Anglia.)

Badania wspólne [47] wykonano na guzach z 5 i 6 pasażu nowotworu. Wstępne eksperymenty wykazały, że podanie adjuwantu Freund'a na pierwszy lub drugi dzień po wszczepieniu nowotworu zatrzymuje jego wzrost. Podanie adjuwantu Freund'a na 6, 12 i 16 dzień po wszczepieniu nowotworu powodowało czasowe zatrzymanie wzrostu guza na okres około 6 dni, po czym następował ponowny szybki wzrost nowotworu.

W okresie zatrzymania wzrostu guzów badano czas trwania cyklu mitotycznego komórek i jego faz. Otrzymane wyniki porównywano z wynikami równoległych badań wykonanych u zwierząt kontrolnych, gdzie nowotwór rósł niepowstrzymanie. Okazało się, że czas cyklu mitotycznego komórek nowotworowych w okresie zatrzymania wzrostu był taki sam jak u kontrolnych zwierząt, natomiast w czasach poszczególnych podokresów cyklu wystąpiły znaczne różnice; przejawiały się one wydłużeniem okresu syntezy DNA kosztem okresu G_1 . W omawianym tu gruczolakoraku współczynnik utraty komórkowej podczas zatrzymania wzrostu wzrastał prawie do 100%, jednakże — wobec wysokich wartości

tego współczynnika (72%) w guzach kontrolnych — przyrost ten nie wydaje się odgrywać istotnej roli w zatrzymaniu wzrostu guza; tłumaczy się ono raczej znamienym zmniejszeniem się frakcji wzrostowej. Warto tu zwrócić uwagę, że we wszystkich poprzednio opisanych nowotworach zmiana współczynnika utraty komórkowej była wystarczająco wysoka do wytłumaczenia zatrzymania wzrostu lub regresji guza.

Zgodnie z założeniami przedstawionymi na wstępie pracy, w dyskusji nad kinetyką i mechanizmami regresji nowotworów ograniczymy się do procesów zachodzących w komórkach nowotworowych, pozostawiając na uboczu wszelkie swoiste i nieswoiste odczyny immunologiczne organizmu.

Wykonane badania nad różnego rodzaju nowotworami w okresie ich zanikania bądź zatrzymania wzrostu zarówno w układach syngenicznych, jak i w układzie heterologicznym wskazują, że nasilenie odczynu immunologicznego nie wpływa na czas trwania cyklu mitotycznego. Również podokresy cyklu nie ulegają wyraźnej zmianie. Wyjątek stanowił tu gruczolakorak sutka szczurów August, który wykazywał wydłużenie okresu syntezy kosztem okresu G_1 . Obserwacje nad rakiem Ehrlicha po przeszczepieniu szczurom [38], dokonane w okresie poprzedzającym regresję, jak również badania nad przebiegiem regresji białaczki LBN/b-3 po wszczepieniu immunizowanym biorcom nie ujawniły zmian w długości cyklu mitotycznego. Wyniki te dodatkowo potwierdzają, że czas cyklu mitotycznego nie zmienia się pod wpływem naporu odpowiedzi immunologicznej, a zjawisko nie jest wynikiem selekcji, a więc uprzedniej eliminacji komórek z wydłużonym cyklem. Do podobnych wniosków dochodzą też Cohen i Steel [19] na podstawie badań nad guzem Stickera u psów. Autorzy ci znajdują, że w pewnych rejonach tego guza tempo proliferacji spada bez skrócenia czasu cyklu mitotycznego. Przypuszczają oni, że w rejonach tych komórki nowotworowe są szczególnie podatne na wpływy immunologiczne.

Fakt, że nowotwór ulega regresji mimo nie zmienionych parametrów cyklu mitotycznego może tłumaczyć się albo zmniejszeniem produkcji komórek nowotworowych (efekt cytostatyczny), albo wzrostem odsetka komórek ginących (efekt cytotoksyczny). Ginięcie komórek nowotworowych, a nie ich obniżona produkcja, stanowi podstawowy czynnik prowadzący do regresji nowotworów, natomiast w przypadku zatrzymania wzrostu obniżenie produkcji komórek nowotworowych dominuje nad ich zabijaniem.

Z przedstawionych danych — dotyczących badań cykli mitotycznych komórek nowotworowych — wynika, że część komórek podczas regresji nowotworu nie ulega uszkodzeniu przez mechanizmy immunologiczne i przechodzi przez cykl mitotyczny w zwykły sposób.

Scharakteryzowanie zmian w populacji komórek guza nowotworowego, zanikającego w następstwie odczynów immunologicznych, wyjaśnia cały szereg cech (parametrów) komórek nowotworowych oraz mechanizmów ich zanikania.

Wyniki badań przedstawione w obecnej pracy wskazują, że podczas regresji charakter zmian w kinetyce populacji jest inny niż po stosowaniu takich metod leczenia jak hormonoterapia, chemioterapia czy radioterapia. Tak na przykład stwierdziliśmy [44] u myszy GR w hormonalnie uwarunkowanych nowotworach, że podczas regresji wywołanej brakiem hormonu występują wybitne zmiany w cyklu mitotycznym komórek; wyrażają się one wydłużeniem całego cyklu, jak i okresu G_1 . Jeżeli chodzi o leki chemiczne, stosowane w onkologii, to z reguły działają one na komórki proliferujące, interferując — zależnie od swego charakteru chemicznego — z różnymi okresami cyklu mitotycznego [55, 62]. Szczególnie wrażliwy na promieniowanie jonizujące — zarówno w warunkach *in vitro* [61], jak i *in vivo* [48] — jest okres G_2 cyklu mitotycznego.

TABELA 1. Parametry wzrostu badanych nowotworów

Nowotwory	T_D	T_c	T_{G_1}	T_S	T_{G_2}	G.F.	Utrata komórkowa [%]	L.I.
Rak Ehrlicha								
wzrost	50	34	5,6	24,3	5,3	0,76	60	45
regresja	—	35	7,7	20,9	6,9	0,58	100	38
L 5178Y								
wzrost	18	10	2,7	6,5	1,1	0,9	40	48
regresja	—	11	2,5	6,8	2,0	0,68	100	38
LBN/b-3								
wzrost	18	11,9	0,5	9,6	1,7	0,88	30	63
regresja	—	10,8	0,6	8,7	0,8	0,5	100	57
Adenocarcinoma								
wzrost	90	21	9,4	8,9	2,4	0,87	72	28
regresja	—	23	6,4	14,9	2,7	0,67	100	31

T_D — czas podwojenia populacji, T_c — czas cyklu mitotycznego, T_{G_1} , T_S , T_{G_2} — czasy faz cyklu mitotycznego, G. F. — frakcja wzrostowa, L. I. — procent znakowanych komórek.

W regresji immunologicznej guzów przeszczepialnych giną w nowotworze komórki zarówno proliferujące, jak i wyłączone z cyklu mitotycznego. W doświadczeniach naszych odsetki komórek znakowanych nie ulegały istotnym zmianom, a czas cykli mitotycznych miał wartości niemal identyczne jak w nowotworach rosnących progresywnie. Istotną

zmianą była zwyżka współczynnika utraty komórkowej, osiągająca niemal 100%, co oznacza, że ginęły niemal wszystkie nowo powstałe komórki. W znacznie mniejszym stopniu malała w nowotworze frakcja wzrostowa; oznacza to, że mimo regresji nowotworu nadal namnażały się jego komórki. Stwierdziliśmy ponadto, że nie występują istotne zmiany w czasie trwania poszczególnych faz cyklu mitotycznego w komórkach przeżywających regresję guza. Wynika stąd, że wypadanie komórek z frakcji proliferującej odbywa się na zasadzie wszystko albo nic, bez tolerowania form przejściowych pod względem trwania cyklu mitotycznego.

Warto tu wspomnieć, że brak zmian w parametrach cyklu mitotycznego komórek i we wskaźnikach frakcji wzrostowej nowotworów przeszczepialnych stwierdzono również w stanach immunosupresji wywołanej u nosicieli guzów, np. napromieniowaniem całego ciała promieniami X [47] bądź wstrzykiwaniem surowicy antylimfocytarnej [64].

W doświadczeniach, gdzie zachodziło szybkie (ostre) odrzucenie przeszczepu (np. w układach ksenogennych) zmniejszanie się frakcji wzrostowej podczas regresji było niewielkie w porównaniu z wielkością tej frakcji podczas wzrostu postępującego. W przypadkach więc ostrego odrzucania przeszczepu przeważają efekty cytotoksyczne nad cytostatycznymi. Z drugiej strony, w doświadczeniach, gdzie występowały małe różnice pod względem antygenowości między nowotworem a gospodarzem, odpowiedź immunologiczna przybierała dla obserwatora postać procesu łagodnego (przeważały efekty cytostatyczne). Może wtedy nie dochodzić do odrzucenia przeszczepu nowotworu, lecz do spowolnienia tempa jego wzrostu albo do jego zatrzymania. Niekiedy jedyny dowód, że takie spowolnienie wzrostu jest wynikiem odczynów immunologicznych polega na wykazaniu, że immunosupresja przyspiesza wzrost guza [47, 65]. Przyjmujemy więc, że we wzroście stacjonarnym nowotworu przeważają efekty cytostatyczne nad swoistymi efektami cytotoksycznymi.

Można domyślać się, że między tak skrajnymi przykładami efektów immunologicznych, jakie z jednej strony stanowi ostre odrzucenie przeszczepu nowotworowego, a wzrost stacjonarny z drugiej strony, istnieje szereg form pośrednich, przy czym w historii życia poszczególnego nowotworu można wyodrębnić okresy zwolnienia i przyspieszenia wzrostu, w zależności od modulacji układu odpornościowego ustroju przez czynniki bądź pobudzające, bądź immunosupresyjne.

Wydaje się, że różne nowotwory zanikające w następstwie odpowiedzi immunologicznej mogą być modelem dla badań nad kinetyką podostrego i ostrego odrzucania przeszczepów tkankowych i narządowych. Sądzę też, że dyskusja i wnioski z obecnej pracy mogą wzbudzać zainteresowanie w klinice onkologicznej jako model mechanizmów, dzięki którym wzrost nowotworów ulega okresowo przyspieszeniu lub zwolnieniu w zależności

od stanu ogólnego ustroju. W każdej nie dość radykalnej metodzie leczenia nowotworów złośliwych pozostają przy życiu komórki, które w jednej z faz swego cyklu mitotycznego mogą ulec zablokowaniu przez swoiste i nieswoiste mechanizmy immunologiczne.

BLOK W OKRESIE G_2 CYKLU MITOTYCZNEGO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

W poprzednim rozdziale wykazano, że regresja nowotworów jest przede wszystkim wynikiem zwiększonej utraty komórkowej i podlegają jej zarówno komórki proliferujące, jak i spoczynkowe. Powstało zatem pytanie, czy komórki wypadają z cyklu reprodukcyjnego w sposób losowy, czy też są one w jakiejś fazie cyklu szczególnie wrażliwe na działania sił odpornościowych gospodarza. Fazą taką może być okres G_2 , na co wskazują niektóre prace z piśmiennictwa [20, 59] oraz własne badania nad rakiem Ehrlicha [39].

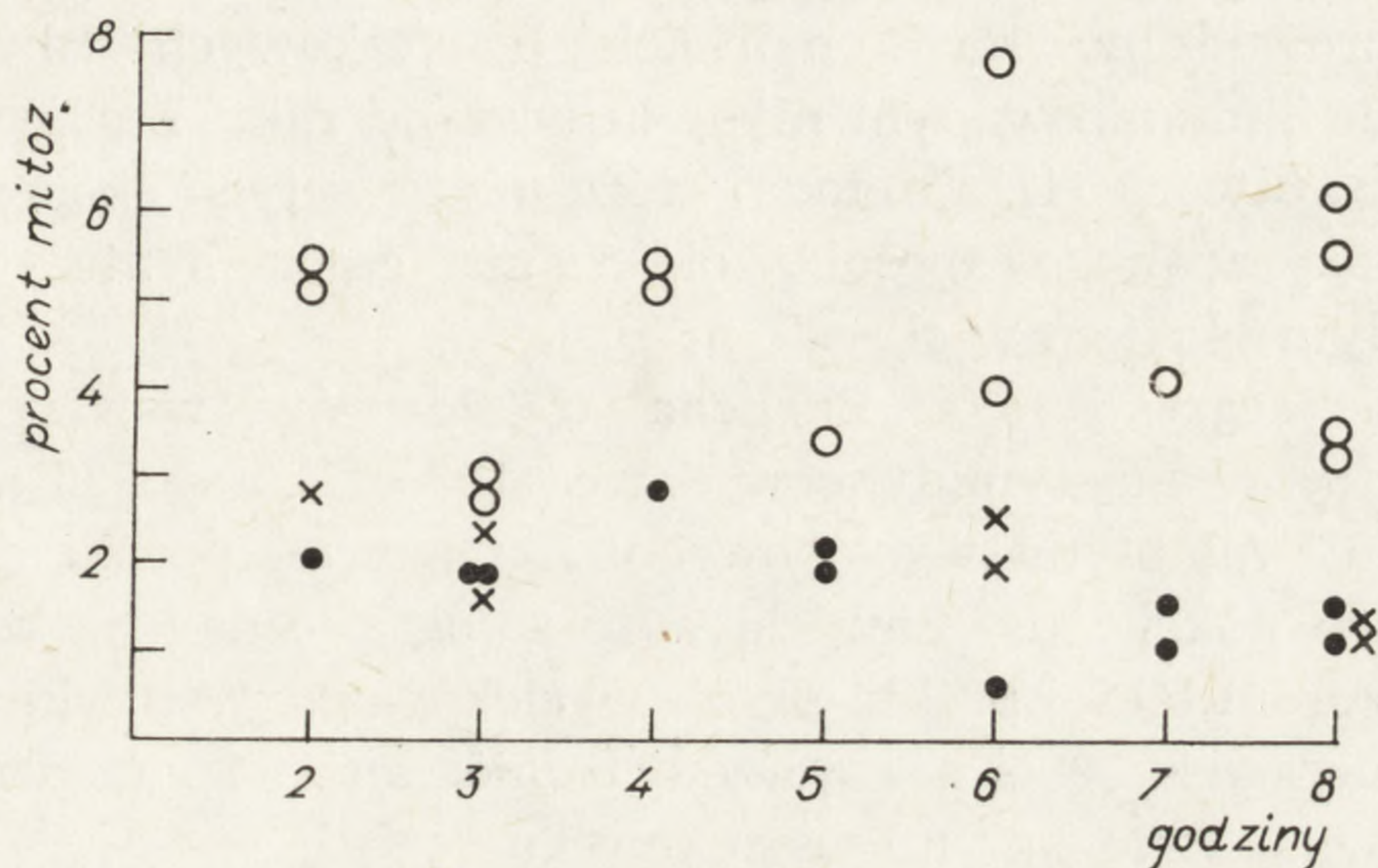
1. BLOK W G_2 I JEGO ODWRACALNOŚĆ (DOŚWIADCZENIE 5)

Celem doświadczenia było sprawdzenie, czy podczas regresji raka Ehrlicha u szczurów komórki mogą być zatrzymane w okresie G_2 cyklu mitotycznego i czy blok ten jest odwracalny.

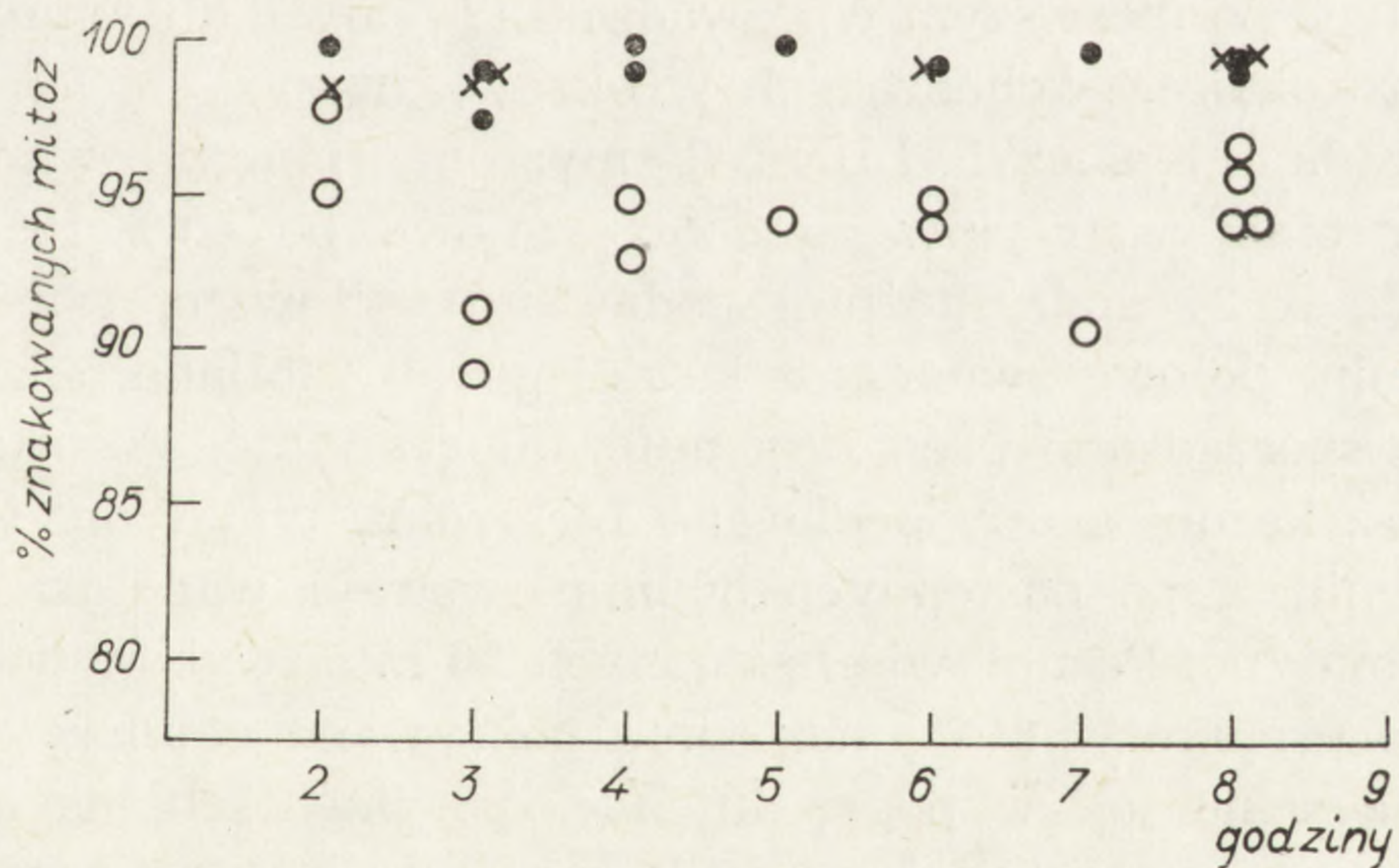
Materiał doświadczalny stanowiły komórki wspomnianego — mysiego — nowotworu przeszczepione szczurom i badane w okresie jego odrzucania [40]. Metoda polegała na wielokrotnym podawaniu znakowanej tymidyny. W sumie wykonano 5 wstrzyknień w odstępach 4-godzinnych. W wyniku tego postępowania 94% komórek interfazalnych oraz prawie 100% komórek mitotycznych nosiło piętno izotopowe. Po ostatnim wstrzyknięciu szczury podzielono na dwie grupy. Grupa pierwsza służyła jako kontrola. Szczurom z drugiej grupy pobrano drogą aspiracji od 1/2 do 3/4 objętości płynu wysiękowego, z którego komórki odwirowane i zawieszane w soli fizjologicznej wstrzykiwano dootrzewnowo trzeciej grupie szczurów. Każdy szczur z tej grupy otrzymał w przybliżeniu 200 milionów komórek piętnowanych trytowaną tymidyną. Następnie, co jedną lub dwie godziny, zabijano po dwa szczury z każdej grupy. W celu zatrzymania mitoz podawano kolcemid (0,01 mg na szczura) na godzinę przed sekcją. Podczas sekcji pobierano płyn wysiękowy, z którego sporządzano preparaty autoradiograficzne, na których zliczano procenty znakowanych mitoz oraz procent komórek podziałowych.

Rezultaty ze zliczeń odsetka komórek metafazalnych wskazują, że u zwierząt z nietkniętym płynem wysiękowym, jak i tych, którym zmniejszono objętość płynu wysiękowego przez aspirację, procent mitoz utrzymuje się na stałym poziomie, podczas gdy po przeszczepieniu wyraźnie

wzrasta (rys. 2). Po wszczępieniu piętnowanych komórek nowotworowych nowemu biorcy procent znakowanych mitoz wyraźnie spada, podczas gdy u dawców materiału komórkowego oraz u szczurów z nietkniętym płynem wysiękowym utrzymuje się na wysokości ponad 98% (rys. 3). Wyniki te



Rys. 2. Zmiany w indeksach mitotycznych komórek raka Ehrlicha; ● — u szczurów kontrolnych, × — u szczurów z częściowo usuniętym płynem wysiękowym, ○ — po przeszczepieniu nowym biorcom



Rys. 3. Zmiany odsetka znakowanych mitoz komórek raka Ehrlicha po wielokrotnym podaniu znakowanej tymidyny; ● — u szczurów kontrolnych, × — u szczurów z częściowo usuniętym płynem wysiękowym, ○ — po przeszczepieniu nowym biorcom

wskazują, że istnieje pewna frakcja komórek zatrzymanych w okresie posyntetycznym; zatrzymanie to trwa przez czas dłuższy niż czas podawania izotopu. Blok taki jest odwracalny po przeszczepieniu nowotworu nowemu gospodarzowi. Usunięcie natomiast znacznej ilości płynu wysiękowego nie wywołuje tego efektu.

2. WYŁĄCZANIE SIĘ KOMÓREK W FAZIE G₂ Z PROLIFERACYJNEJ FRAKCJI NOWOTWORU (DOŚWIADCZENIE 6)

Celem tego doświadczenia było sprawdzenie czy utrata komórkowa podczas regresji nowotworu przebiega w sposób losowy, czy też istnieje selektywne ich wyłączenie z jakiejś fazy cyklu mitotycznego. Eksperymenty przeprowadzono na komórkach białaczkowych LBN/b-3 [76] wszczepionych immunizowanym myszom oraz na raku Ehrlicha w okresie regresji nowotworu [41]. Metoda, którą użyto w tych eksperymentach, jest kombinacją znanego sposobu określania czasu syntezy DNA [9] z krótkotrwałym blokiem w okresie mitozy.

W okresie regresji raka Ehrlicha u szczurów wstrzykiwano do otrzewnowo trytowaną tymidynę w dawce 100 μ Ci, a po 30 min aspirowano około 0,3 ml płynu wysiękowego. Z pobranej próbki sporządzano rozmazy, które pokrywano emulsją autoradiograficzną. Natychmiast po pobraniu szczurom takiej próbki płynu wysiękowego, wstrzykiwano tymidynę. Po następnych 30 min zwierzęta uśmiercano i sporządzano preparaty autoradiograficzne z płynu wysiękowego.

Na preparatach zliczano procent znakowanych komórek. W preparatach pobranych po drugiej iniekcji zliczano również odsetek komórek zatrzymanych w metafazie. Z różnicy między odsetkiem znakowanych komórek w preparatach wykonanych po drugiej iniekcji a odsetkiem komórek znakowanych po pierwszym wprowadzeniu trytowanej tymidyny określono procent komórek wchodzących w okres syntezy.

W przypadku białaczki LBN/b-3 myszom immunizowanym oraz z grupy kontrolnej wstrzykiwano do otrzewnowo po 40×10^6 komórek białaczkowych, a 24 godz. później podawano trytowaną tymidynę. Po upływie 30 min. połowę zwierząt z każdej grupy zabijano, a z komórek wysiękowych sporządzano preparaty autoradiograficzne. Pozostałej połowie zwierząt z każdej grupy podawano trytowaną tymidynę, w 30 min. później kolcemid, a po następnych 30 min. wstrzykiwano po raz drugi trytowaną tymidynę. Po upływie następnych 30 min. wykonywano sekcje i sporządzano preparaty, które następnie pokrywano emulsją autoradiograficzną. Tak samo jak w poprzednich eksperymentach, na autoradiogramach zliczano odsetek znakowanych komórek oraz procent metafaz. Procent komórek wchodzących w okres syntezy DNA określano z różnicy między średnią wartością odsetka znakowanych komórek otrzymanych po drugiej iniekcji znakowanego prekursora a odsetkiem znalezionym po pierwszej iniekcji trytowanej tymidyny. Procent komórek wchodzących w mitozę jest określony procentem komórek zatrzymanych w metafazie. W ten sposób określano na drodze eksperymentalnej procent komórek wchodzących w okres syntezy DNA, jak i mitozy.

Wypada tu wyjaśnić, że w czasie wzrostu nowotworu nie wszystkie

komórki po podziale mitotycznym docierają do następnej mitozy. Wypadanie ich z cyklu mitotycznego może być losowe bądź też selektywne w którejś z faz cyklu mitotycznego. Chcąc porównać wyniki eksperymentalne otrzymane w dwóch skrajnych sytuacjach, tzn. podczas wzrostu oraz podczas regresji nowotworu, należy wstępnie poznać teoretycznie obliczone wartości tych parametrów. W obecnej pracy przeprowadzono obliczenia dla teoretycznego założenia, że utrata komórkowa zachodzi na terenie cyklu mitotycznego w sposób losowy. Warunkom tym odpowiada komputerowy model SAB 2 wprowadzony przez Steela [72, 74]. Dla otrzymania teoretycznych wartości odsetków komórek wchodzących losowo w okres syntezy DNA i mitozy niezbędna jest znajomość następujących parametrów: czas cykli mitotycznych oraz jego faz, frakcja wzrostowa, współczynnik utraty komórkowej oraz czas podwojenia populacji. Na podstawie tych parametrów dr J. Blinowski z Katedry Fizyki Teoretycznej UW opracował program, stanowiący podstawę do wykonania obliczeń.

Eksperymenty przeprowadzono na komórkach raka Ehrlicha oraz komórkach białaczkowych w okresie ich regresji. Wyniki porównywano z otrzymanymi podczas progresywnego wzrostu tych samych nowotworów w analogicznych okresach czasu po wszczepieniu komórek (tabela 2).

TABELA 2. Odsetki komórek wchodzących w okres syntezy DNA i mitozę podczas progresywnego wzrostu oraz podczas regresji nowotworów. W tabeli podano dane otrzymane na podstawie obliczeń teoretycznych oraz eksperymentalnych

Rodzaj nowotworu	Nosiciel nowotworu (liczba zwierząt)	Procent komórek wchodzących w okres syntezy DNA				Procent komórek wchodzących w mitozę			
		progresja		regresja		progresja		regresja	
		teoret.	eksp.	teoret.	eksp.	teoret.	eksp.	teoret.	eksp.
Rak Ehrlicha	mysz (8)	7,0	10,1 ±2,0			4,4	5,0 ±0,9		
	szczur (8)			6,2	10, ±1,3			3,6	2,0 ± 0,6
LBN/b-3	mysz (20)	8,9	9,0			4,2	4,0		
	mysz immuniz. (20)			9,3	10,0			3,9	1,5

Stwierdzono, że procent komórek wchodzących w okres syntezy DNA w nowotworach ulegających regresji był bardzo zbliżony do procentów takich w nowotworach rosnących progresywnie oraz zbliżony do wartości

przewidywanych na drodze teoretycznych obliczeń. Inaczej przedstawia się sprawa wchodzenia komórek w podziały mitotyczne. Znalezione na drodze eksperymentalnej procenty komórek w metafazie są znacznie niższe w nowotworach ulegających regresji niż rosnących progresywnie; są one również niższe od przewidywanych teoretycznie.

Przedstawione doświadczenie obaliło hipotezę o losowym wypadaniu komórek z cyklu mitotycznego podczas immunologicznej regresji nowotworu. Zwiększa to prawdopodobieństwo hipotezy drugiej, że wypadanie takie dotyczy głównie komórek w fazie G_2 .

Podsumowując: w okresie zanikania raka Ehrlicha u szczurów zachodzi w komórkach blok w fazie G_2 oraz wyłączanie z cyklu mitotycznego; procesy te nie mają cech losowych.

3. WRAŻLIWOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA IMMUNOCYTOLIZĘ (DOŚWIADCZENIE 7)

Celem doświadczeń było sprawdzenie czy wrażliwość komórek białaczkowych wobec uszkadzającego działania przeciwciał zmienia się w zależności od okresu wzrostu nowotworu oraz od okresów cyklu mitotycznego. Istota doświadczeń polegała na rozdziale komórek białaczkowych na skokowym gradiencie fikolu z następującą ekspozycją rozdzielonych komórek na przeciwciała cytotoksyczne w obecności dopełniacza.

Materiał doświadczalny stanowiła białaczka wywołana w Instytucie Fibigera przez dra U. Key'a u myszy DBA_2 przez dożylny wstrzyknięcie zawiesiny metylocholantrenu. Nowotwór ten początkowo przeszczepiany był przez dożylny wstrzyknięcie zawiesiny komórek śledzionowych, a następnie przez dootrzewnowe wstrzyknięcie płynu wysiękowego. W warunkach hodowlanych poza ustrojem komórki te rosną w postaci zawiesiny w płynie Eagla wzbogaconym surowicą cielecą oraz glutaminą. Dzięki uprzejmości dra U. Key'a białaczka ta została nam udostępniona i przeniesiona do naszego Zakładu w roku 1974.

W badaniach własnych stwierdzono, że w teście cytotoksycznym według Schlesingera [67] na powierzchni komórek białaczkowych nie występuje antygen theta. Ponadto okazało się w badaniach wykonanych metodą immunofluorescencji przy użyciu króliczej surowicy przeciw mysim gamma globulinom, że komórki tej białaczki nie mają na swej powierzchni gammaglobulin.

Nowotwór ten po dootrzewnowym wszczepieniu myszom DBA_2 rośnie w postaci wysięku, jednakże część komórek wysiewa się do obwodowych węzłów chłonnych oraz do śledziony, prowadząc do splenomegalii. Średni czas przeżycia myszy po wszczepieniu komórek w dawce 10^6 wynosił 8 dni. Przeprowadzone badania cyklu mitotycznego wykonane na piąty dzień po dootrzewnowej implantacji nowotworu wykazały,

że czas cyklu mitotycznego wynosił 13,5 godz., natomiast brak było okresu G_1 , czas okresu syntezy wynosił 12 godz., czas okresu G_2 — 1,5 godz. W populacji komórek białaczkowych oprócz komórek dzielących się występowało około 30% komórek spoczynkowych — G_0 .

W doświadczeniach nad rozdziałem komórek w gradiencie fikolu wysięk białaczkowy pobierano na 3, 4 oraz na 5 dzień po dootrzewnowym wszczepieniu nowotworu. Pobrane komórki przepłukiwano 0,037 M roztworem EDTA, a następnie płukano w chlorku amonu (0,93%) w celu usunięcia krwinek czerwonych. Po ostatnim wirowaniu osad komórkowy zawieszano w 5-procentowym roztworze fikolu w płynie Parkera.

Skokowy gradient fikolu uzyskiwano przez nawarstwianie w probówce wirówkowej kolejnych rozcieńczeń fikolu w płynie Parkera. Idąc od dołu probówki poszczególne warstwy roztworów fikolu o objętości 2 ml każda miały następujące stężenia: 27, 25, 22, 19 i 15%.

Komórki białaczkowe zawieszane w 5-procentowym roztworze fikolu nakładano na gradient. Następnie probówki z nawarstwionymi komórkami wirowano z szybkością 1500 obr./min na wirówce MSE przez 30 min w temperaturze pokojowej. W wyniku tego postępowania zawiesina komórek białaczkowych rozdzielała się na 4 frakcje: pierwsza frakcja leżała na pograniczu rozcieńczeń 5/15, druga — 15/19, trzecia — 19/22, czwarta — 19/25. Komórki z poszczególnych warstw delikatnie zbierano pipetą i oczyszczano z fikolu przez wielokrotne wirowanie w płynie Parkera. Następnie poszczególne próbki przenoszono do płynu Parkera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej oraz vinblastyny. Po 2-godzinnej inkubacji w naczyniach hodowlanych w temperaturze 37°C sporządzano preparaty. Przeglądając 1000 komórek, zliczano komórki metafazalne. Stwierdzono, że najwyższe procenty mitoz występują w hodowlach z warstwy trzeciej i czwartej, a najniższe z warstwy pierwszej.

Rozmieszczenie komórek będących w fazie syntezy DNA badano metodą autoradiografii w następujący sposób. W piątym dniu po wszczepieniu myszom DBA_2 białaczki wstrzykiwano trytowaną tymidynę w dawce 25 μ Ci na mysz, a w godzinę później pobierano płyn wysiękowy. Komórki białaczkowe rozdzielało na gradiencie fikolu (jak w opisanych już doświadczeniach). Z poszczególnych warstw sporządzano preparaty autoradiograficzne. Zliczanie komórek wykazało, że w warstwie pierwszej zaledwie 12% komórek ma piętno izotopowe, w warstwie drugiej i trzeciej — 85%, a w warstwie czwartej — 62%.

Testy cytotoksyczne według metody Schlesingera [67] z użyciem błękitu trypanu wykonywano w następujący sposób. Próbki komórek z kolejnych warstw gradientu zawieszano w płynie Parkera, tak aby w 1 ml było 10^6 komórek, z czego pobierano do testu 50 μ l. Surowicę odpornościową otrzymano przez 3-krotną immunizację dootrzewnową szczurów ko-

mórkami białaczkowymi. Surowice te przed użyciem absorbowano normalnymi limfocytami myszy DBA₂, a do testu używano jej w rozcieńczeniu 1/64. Jako dopełniacza używano liofilizowaną surowicę świnki morskiej. Przed przystąpieniem do testu sprawdzano żywotność badanych komórek; nie wykonywano testu, gdy procent martwych komórek przekraczał 10.

Testy cytotoksyczne wykonane na komórkach z poszczególnych warstw wykazały, że 3 i 4 dnia po przeszczepieniu, a więc w okresie logarytmicznego wzrostu białaczki, frakcje rozdzielone na gradiencie fikolu nie różnią się pod względem odsetka komórek martwych. Inny był wynik podobnych badań wykonanych na komórkach pobranych na 5 dzień po przeszczepieniu białaczki, a więc w stacjonarnej fazie jej wzrostu. Wtedy w warstwie trzeciej i czwartej stwierdzano najwyższe odsetki komórek martwych.

Przedstawione wyniki można interpretować następująco: Komórki z płynu wysiękowego rozdzielają się na skokowym gradiencie fikolu według wielkości poszczególnych elementów [31]. Można więc przewidywać, że do warstwy najniższej — o największym stężeniu fikolu — przechodzą komórki największe, a więc po dokonanej syntezie DNA. W najwyższej warstwie powinny zatrzymać się komórki najmniejsze, jakimi są elementy tuż po podziale mitotycznym.

Zgodnie z tymi przewidywaniami (tabela 2) w warstwie pierwszej znaleziono niewielki odsetek komórek wyznakowanych i figur mitotycznych, można więc przypuszczać, że są to komórki spoczynkowe z fazy G₀ oraz niewielki odsetek z późnych okresów cyklu mitotycznego. Można przypuszczać, że w tej frakcji rozdziału zatrzymała się również pewna liczba limfocytów normalnych jaka towarzyszy białaczce. W warstwie drugiej i trzeciej stwierdzono najwyższy odsetek komórek w fazie S oraz wzrastającą liczbę komórek metafazalnych. W warstwie czwartej komórki wyznakowane należy uznać za komórki w końcowej fazie syntezy DNA, nie wyznakowane zaś za komórki z okresu G₂, na co jednak brak bezpośrednich dowodów. Zmienność taka natomiast nie zależy od pozycji w cyklu mitotycznym komórki proliferującej.

Okazało się, że w okresie progresywnego wzrostu białaczki odsetek komórek ulegających cytotoksycznemu działaniu surowicy w obecności dopełniacza jest podobny we wszystkich frakcjach. W fazie stacjonarnej wzrostu we wszystkich frakcjach zwiększa się odsetek komórek martwych w porównaniu z okresami progresywnego wzrostu. Zaznacza się ponadto zwyżka tego odsetka we frakcjach trzeciej i czwartej, co uwidacznia ostatnia kolumna w tabeli 2. Ponieważ w tym okresie wzrostu znaczna liczba komórek ulega zablokowaniu w okresie G₂, można przyjąć, że są to właśnie te elementy, których uszkodzenie odpowiada za podwyższenie wyników w tekście cytotoksycznym z frakcji trzeciej i czwartej. Można

więc sądzić, że komórki zablokowane w fazie G_2 odznaczają się szczególną wrażliwością na cytotoksyczne działanie przeciwciał.

W przeglądzie piśmiennictwa na stronicach 408 i 409 cytowaliśmy szereg eksperymentów dotyczących zróżnicowanej wrażliwości komórek z różnych okresów cyklu mitotycznego na uszkodzające działanie przeciwciał bądź też uczulonych limfocytów. Doświadczenia te wykonane były na komórkach hodowanych i synchronizowanych *in vitro*. Trudności wynikające z badań nad wzrostem nowotworów w organizmie, a w szczególności synchronizacji wzrostu, zostały pokonane w obecnej pracy przez rozdział populacji komórek nowotworowych na gradiencie fikolu. Dzięki temu kolejne frakcje o coraz to większym ciężarze właściwym komórek były wzbogacane o składniki z poszczególnych faz cyklu mitotycznego.

Wyniki otrzymane z doświadczeń na materiale pobranym na 3 i 4 dzień po implantacji nowotworu wskazują, że w żadnej z faz cyklu mitotycznego nie ujawnia się selektywna wrażliwość komórek. Dopiero komórki pobrane na 5 dzień wykazują podwyższoną podatność na immunocytolizę we wszystkich frakcjach, a szczególnie we frakcji 3 i 4.

Rozdział w gradiencie fikolu prowadzi do wzbogacenia frakcji komórek w elementy z poszczególnych okresów cyklu mitotycznego, co jednak nie jest jednoznaczne z synchronizacją. Mimo to w eksperymentach tych rysuje się duża powtarzalność wyników w poszczególnych grupach. Można więc sądzić, że we wszystkich badanych terminach po przeszczepieniu rozdział populacji komórkowej w gradiencie fikolu jest podobny. Tym samym zwiększona podatność na immunocytolizę komórek nowotworowych w późniejszym terminie po przeszczepieniu wydaje się być związana z jakąś nową cechą pojawiającą się w populacji komórkowej w zaawansowanej fazie wzrostu badanej białaczki.

Zmienna podatność na cytotoksyczne działanie przeciwciał w zależności od okresu wzrostu nowotworu zależy najprawdopodobniej od różnego nasilenia ekspresji antygenów na powierzchni.

Doświadczenia nasze pozwalają na włączenie się do istniejącej w piśmiennictwie dyskusji nad pytaniem, czy zatrzymanie komórek w okresie G_2 cyklu mitotycznego jest wynikiem działania swoistych inhibitorów zwanych chalonami, czy też jest wyrazem działania sił odpornościowych gospodarza. Warto tu przypomnieć, że zatrzymywanie komórek w okresie G_2 stwierdzano w tkankach normalnych [28, 57], a inhibitory tego okresu zostały zaliczone przez Boulogha i Laurence [12] do chalonów. Jeżeli chodzi o komórki nowotworowe, to można tu przytoczyć badania Bichela i Dombernowskiego [7, 8] nad rakiem Ehrlicha oraz nowotworem JB-1 w zaawansowanych okresach ich wzrostu. Według tych badaczy zatrzymanie komórek w okresie G_2 jest wynikiem działania specyficznych inhibitorów okresu G_2 — mianowicie chalonów.

TABELA 3. Zestawienie wyników charakteryzujących komórki białczkowe rozdzielone na cztery frakcje w gradiencie fikolu. W każdej frakcji obliczono odsetek metafaz po krótkotrwałej inkubacji in vitro, odsetek komórek piętnowanych po iniekcji $^3\text{HtdR}$ oraz odsetek komórek zabarwionych błękitem trypanu w teście cytotoxycznym. Podano średnie z 12 prób. Komórki badano w okresie wzrostu postępującego, tj. w 3 i 4 dniu po dootrzewnowym wszczepieniu białczki myszom DBA/2 oraz w fazie stacjonarnej wzrostu, tj. w 5 dniu po wszczepieniu. W ostatniej kolumnie podano procentowe różnice zachodzące między fazą stacjonarną a fazą postępującą wzrostu pod względem odsetka komórek martwych w teście cytotoxycznym

stężenie fikolu %	Gradient fikolu		Metafazy %			Znakowanych komórek % 5 dzień	Przybliżony rozdział według długości cyklu mitotycznego	Martwych komórek % czas po wszczepieniu białczki (dni)			Różnice w % między kolumnami (10) a średnią (8)+(9) (11)
	warstwa (nr)	(2)	czas po wszczepieniu białczki (dni)					(8)	(9)	(10)	
			3	4	5						
(1)			(3)	(4)	(5)	(6)	(7)				
5	§/ I		4,6±1,1	2,6±0,7	2,9±0,2	54		42±11	35±9	39±11	0
15	II		1,2±0,3	0,4±0,1	0,1±0,1	12	G ₀	32±10	24±7	40±9	45
19	III		3,5±0,3	1,3±0,1	1,5±0,1	85	S	39±7	37±9	56±18	47
22	IV		9,2±1,1	5,2±0,6	6,7±0,7	85	S (późne)	46±11	40±4	67±21	55
25			10±1,3	5,0±0,5	6,5±0,4	62	i G ₂ +M	39±13	37±7	61±19	62

§/ -- przed rozdzieleniem w fikolu.

Z drugiej strony opisano doświadczenia, które przemawiają za udziałem mechanizmów immunologicznych w zatrzymywaniu komórek w okresie G_2 cyklu mitotycznego. De Cosse i Gelfant [20] wykazali, że komórki raka Ehrlicha mogły ponownie wchodzić w okres mitozy po stłumieniu naporu odczynów immunologicznych przez wstrzyknięcie surowicy antylimfocytarnej. W badaniach nad mięsakami szczurzymi wywołanymi metylocholanantrenem Post i Hoffman [59] znajdowali komórki zatrzymane w okresie G_2 cyklu; blok ten tłumaczyli działaniem sił odpornościowych.

Własne doświadczenia zdają się przemawiać raczej za rolą mechanizmów immunologicznych niż chalonów w blokadzie fazy G_2 . W badaniach nad białaczką mechanizm immunologiczny tego bloku zależy niewątpliwie od wcześniejszego uodpornienia biorcy nie zaś od chalonów, gdyż ich obecność — jak to wynika z piśmiennictwa — można wykazać było wyłącznie w zaawansowanym okresie wzrostu. W doświadczeniach nad rakiem Ehrlicha odrzucanym przez obcogatunkowego gospodarza udało się wykazać, że komórki w okresie G_2 są wyłączane z proliferacyjnej frakcji nowotworu. W analogicznym czasie po wszczepieniu nowotworu myszom — a więc gatunkowo zgodnym gospodarzom — nie obserwowano tego zjawiska. Przemawia to również za hipotezą o immunologicznych mechanizmach wyłączania komórek w okresie G_2 . Zjawiska blokowania komórek w okresie G_2 nie obserwowano u zwierząt, którym częściowo usunięto płyn wysiękowy, co świadczy, że blok w okresie G_2 (częściowo odwracalny) nie zależy od stopnia stłoczenia komórek w jamie otrzewnej (inhibicja kontaktowa), a więc od dużej liczby komórek, zależy natomiast od natężenia odczynów immunologicznych. W przedstawionych doświadczeniach wykazano, że komórki raka Ehrlicha mogły być zatrzymane w okresie G_2 na czas wynoszący co najmniej 20 godz. i że blok ten jest odwracalny.

Ponadto — w dalszym etapie badań — stosując technikę podwójnego znakowania, skojarzoną z krótkotrwałym blokiem w okresie mitozy, mogliśmy wykazać, że wypadaniu komórek z cyklu mitotycznego podlegają głównie komórki z okresu G_2 i że proces ten nie ma charakteru losowego. Warto dodać, że inaczej wygląda kinetyka wypadania komórek z cyklu reprodukcyjnego podczas postępującego wzrostu nowotworu. Wypadanie to odbywa się w każdej fazie cyklu mitotycznego i jest zgodne z teoretycznym modelem utraty komórkowej — losowej — opisanym przez Steela [72, 74].

Dotychczasowa dyskusja — prowadząca do stwierdzenia, że podczas regresji nie zmienia się ani długość cyklu mitotycznego, ani jego faz — nie wyjaśnia bynajmniej mechanizmów, jakie prowadzą do depopulacji komórek nowotworowych, a więc zmniejszania się masy guza. Hipotezy na temat zaniku nowotworów w następstwie odpowiedzi immunologicz-

nej są w piśmiennictwie najczęściej oparte na spekulacjach nad zmianami w ekspresji antygenów powierzchniowych w hodowli *in vitro*. Cikes [16, 17] w swoich rozważaniach nad podatnością komórek na immunocytolizę doszedł do wniosku, że może to być związane z ilością komponent antygenowych na powierzchni komórki. Lerner i wsp. [51] uważają, że stan zmienionej podatności może być wynikiem przegrupowania komponent antygenowych na powierzchni komórki. Swet-Mołdawski i wsp. [50] przypuszczają, że zwiększona podatność komórek w pewnym momencie okresu G_1 (G_{1a}) jest wynikiem zmienionej wrażliwości na induktory morfogenetyczne. Pellegrino i wsp. [58] uważają, że nie ma korelacji między ilością komponent antygenowych na powierzchni komórki a jej podatnością na immunocytolizę. Brak wrażliwości w okresie G_1 tłumaczą oni możliwością naprawy uszkodzeń litycznych, która jest utrudniona w innych okresach cyklu mitotycznego.

Z nielicznych publikacji dotyczących nowotworów rosnących w organizmie wynika, że w populacji komórkowej podlegającej silnemu naporowi immunologicznemu znaczna część komórek ulega zablokowaniu w okresie G_2 swego cyklu mitotycznego [20, 39, 59]. Spostrzeżenia te potwierdzają wyniki otrzymane w obecnej pracy. Istnienie frakcji komórek nowotworowych zatrzymanych w pewnych okresach cyklu mitotycznego, a zwłaszcza podczas immunologicznej regresji guza, może rzucać pewne światło na mechanizmy prowadzące do zmniejszania się jego rozmiarów. Również można przypuszczać, że istnienie takich bloków w warunkach normalnych jest częściowo spowodowane przez odczyny immunologiczne organizmu nosiciela nowotworu.

W mechanizmach eliminacji komórek z populacji komórkowej guza podczas regresji immunologicznej możemy wyróżnić dwa efekty przejawiające się na poziomie komórek docelowych: (a) cytotoksyczny oraz (b) cytostatyczny.

Pierwszy z nich — zgodnie z poglądami współczesnej immunologii — ma charakter swoisty i jest wynikiem działania zabójczych limfocytów (killer cells) na odpowiednią komórkę docelową.

Efekt cytostatyczny odczynu immunologicznego znany z niektórych testów i doświadczeń *in vitro* [81] nie został dotychczas — jak się wydaje — zdefiniowany w piśmiennictwie w odniesieniu do nowotworów rosnących w organizmie. Próbę zdefiniowania immunologicznego efektu cytostatycznego rozpocznę tutaj od interpretacji własnych badań nad blokiem w fazie G_2 komórek raka Ehrlicha w czasie jego regresji u heterologicznego gospodarza oraz białaczki LBN/b-3 u immunizowanych biorców.

W bloku fazy G_2 można wyróżnić dwa podokresy:

1. fazę odwracalną — w której komórki uwolnione spod działania efektorów odpowiedzi immunologicznej mogą wejść w nowy cykl prolifera-

racyjny. Takie zwolnienie bloku może nastąpić albo przez przeszczepienie zanikającego nowotworu nowemu nieuodpornionemu biorcy, albo przez immunosupresję nosiciela, którego reakcja doprowadziła do bloku G_2 [20];

2. fazę nieodwracalną — w której komórki po zabiegach zwalniających blok, nie przejawiają zdolności do proliferacji.

Nieodwracalna faza bloku G_2 odpowiada pojęciowo efektowi cytostaticznemu. „Efekt cytostaticzny” nie oznacza jeszcze śmierci komórki, mówi natomiast o tym, że

1. komórka jest niezdolna do podziałów i wyłączona z cyklu mitotycznego;

2. jej działalność życiowa jest nastawiona na syntezę różnych białek, np. antygenów powierzchniowych, rogowacenia w przypadkach raków pochwy (obserwacje Duxa — nie publikowane) kolagenu itp.;

3. odznacza się szczególną wrażliwością na przeciwciała w obecności komplementu w teście cytotoxycznym z błękitem trypanu. Mogliśmy to wykazać w doświadczeniu 7 dotyczącym rozdziału komórek białaczkowych w gradiencie stężeń fikolu;

4. podlega procesowi zwyrodnienia z nagromadzeniem się wodniczek lisosomalnych (autoliza, karioliza). Taka wyrodniewająca komórka może łatwo ulegać zniszczeniu na drodze nieswoistych mechanizmów (działanie makrofagów, granulocytów);

5. komórka ma mniejsze zdolności reparacyjne.

Podsumowując — komórki niezdolne do odmładzania przez podziały mitotyczne mają mniejszą żywotność, ulegają zwyrodnieniu, starzeją się, po czym następuje śmierć przez mechanizmy swoiste lub nieswoiste, np. z udziałem makrofagów.

Efekt cytostaticzny — stosunkowo łatwy do opisanego na poziomie komórkowym i sprawdzalny przy użyciu testów *in vitro* — jest trudny do oceny na poziomie populacji komórkowej *in vivo*. W obecnej pracy przyjęliśmy, że efekt cytostaticzny odpowiedzi immunologicznej przejawia się w nowotworze obniżeniem się frakcji komórek proliferujących, czyli frakcji wzrostowej.

Konfrontacja przedstawionych rozważań z aktualną wiedzą o immunologicznych mechanizmach odrzucania względnie tolerancji niezgodnych przeszczepów, jak również wnioski z niektórych własnych doświadczeń (np. doświadczenie 8) wskazują, że swoisty efekt cytotoxyczny jest wyrazem działania swoiście uczulonych limfocytów T, natomiast w efekcie cytostaticznym biorą udział mechanizmy humoralne. Zamierające komórki po okresie cytostazy są najprawdopodobniej niszczone przez makrofagi oraz granulocyty.

Nie dysponujemy doświadczeniami, które by w bezpośredni sposób informowały, jaki jest immunologiczny mechanizm bloku G_2 i cytostazy.

Ponieważ blok zachodzi jako efekt odpowiedzi immunologicznej bez uśmiercania komórki, możemy wyłączyć funkcję zabójczą limfocytów T; najprawdopodobniej dochodzi do opłaszczania komórek przez swoiste przeciwciała, które wiążą się z powierzchniowymi determinantami antygenowymi. Opłaszczanie takie daje dwa efekty. Pierwszy z nich polega na osłonięciu determinant antygenowych na powierzchni komórki przed uczulonymi limfocytami [18, 32]. Drugą konsekwencję przedstawiamy jako teoretyczny postulat, że z powierzchni komórki opłaszczonej przez swoiste przeciwciała została przekazana w jakiś sposób informacja (sygnał) do wnętrza komórki, której odczytanie powoduje zatrzymanie cykli podziałowych.

Efekt cytostatyczny odpowiedzi immunologicznej nie zawsze polega na bloku w fazie G_2 ; podobne bloki obserwowaliśmy w fazie G_1 w gruczolakoraku sutka (porównaj doświadczenie 4).

Myślę również, że opisany przez nas efekt cytostatyczny może być analogią do działania niektórych leków onkostatycznych oraz substancji blokujących proliferację komórkową, które nie zabijają komórki wprost, lecz zatrzymują je w funkcjach podziałowych, np. blok w metafazie (kolchicina), blok w fazie S (nadmiar tymidyny, hydroksymocznik). Również leki stosowane w hormonoterapii działają na nowotwór przez efekt cytostatyczny, nie zaś cytotoksycznie [44, 30].

Efekt cytostatyczny odpowiedzi immunologicznej może stanowić model dla mechanizmów regulacji tkanek prawidłowych, jeżeli uwzględnimy podobieństwo między opisanymi przeze mnie blokami a fizjologicznym wyłączaniem komórek z cyklu mitotycznego i przejściem ich w tzw. fazę G_0 . Rozważania nad efektem cytostatycznym można by uogólniać na inne jeszcze tereny fizjologii wzrostu i różnicowania, choć łatwiej byłoby tu o spekulacje niż o dowody doświadczalne.

ZAGNIEŹDZANIE SIĘ I WZROST KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W PŁUCACH W ZALEŻNOŚCI OD STANU IMMUNOLOGICZNEGO USTROJU

W poprzednio opisanym doświadczeniach materiałem były nowotwory wszczepiane podskórnie albo dootrzewnowo. Przyjęcie się i wzrost takich przeszczepów wymagają wprowadzenia do organizmu dostatecznie wielkiej liczby komórek; przy dawce zbyt małej nie dochodzi do wzrostu guza albo wzrost jest nieregularny i rozpoczyna się u niektórych tylko osobników. Szczególnie interesujący materiał badawczy stanowią nowotwory, które po dożylnym wprowadzeniu rozproszonej zawiesiny komórkowej mogą zagnieźdzać się w płucach i rosnąć w postaci mnogich guzków. Istnieją dowody, że każdy z tych guzków jest rozrośniętym klonem, wywodzącym się z jednej komórki; stąd liczba guzków pozwala

określić odsetek komórek z zawiesiny wprowadzonej dożylnie zatrzymujących się w naczyniach włosowatych płuc ze zdolnością do zagnieżdżania się i wzrostu. Komórki takie zostały nazwane przez Lamertona [49] klonogennymi.

Opisana metoda wszczepiania nowotworu wydała się szczególnie cenna w badaniach zmierzających do poznania mechanizmów immunologicznych ustroju, które sprzyjają zagnieżdżaniu się i wzrostowi krwiopochodnych komórek nowotworowych w płucach względnie utrudniają ten proces. Z badań takich wylaniają się również wnioski, które naświetlają problemy przerzutów nowotworowych.

Do doświadczeń użyto przeszczepialnego nowotworu płuc myszy BALB/c (sarcoma — mięsak, L-1). Guz ten znaleziono podczas sekcji myszy BALB/c, a następnie przeszczepiano podskórnie myszom tego samego szczepu. W obecnej pracy używano materiału nowotworowego z 6—10 podskórnego pasażu guza.

Sporządzanie zawiesiny komórkowej. Zawiesiny otrzymywano przez dokładne pocięcie uprzednio wyluskanego guza. Następnie rozdrobnione fragmenty po oczyszczeniu z tkanek martwiczych poddawano działaniu 0,04% trypsyny i 0,04% kolagenazy w płynie Parkera, do którego dodawano nieznaczne ilości DNA-azy. Trawienie enzymatyczne odbywało się w temperaturze pokojowej i na mieszadle magnetycznym przez jedną godzinę. Produkt trawienia przepuszczano przez gazę, na której zatrzymywały się większe fragmenty. Przesączoną zawiesinę przemywano kilkakrotnie płynem Parkera i wreszcie sporządzano podstawową zawiesinę, której 0,2 ml zawierało 5×10^5 żywych komórek.

Wstrzyknięcia podskórne. Po implantacji podskórnej $0,5 \times 10^6$ komórek przeżycie zwierząt waha się w granicach 60—70 dni. Podczas sekcji przeprowadzonej w okresie 60—70 dni po implantacji nowotworu znajduje się pojedyncze przerzuty w płucach. Tylko sporadycznie spotyka się przerzuty w wątrobie, sercu oraz w opłucnej. Często dochodzi do splenomegalii. Do zapoczątkowania wzrostu podskórnego wystarczy 3500 komórek. Przy obniżeniu dawki wstrzykniętych komórek do 1700 nie obserwuje się wzrostu.

Wstrzyknięcia dożylna. Zawiesiny komórkowe wprowadzano do żyły ogonowej myszy podczas lekkiej narkozy eterowej. W czasie autopsji — wykonywanej w okresie 2—4 tygodni po wprowadzeniu dożylnym — badano liczbę guzków nowotworowych na terenie płuc metodą Hilla i Busha [34]. Metoda ta polega na wypełnieniu płuc przez tchawicę mieszaniną utrwalacza z tuszem chińskim. Po takim utrwaleniu na tle czarnej powierzchni płuc uwidaczniają się białe pojedyncze i łatwe do zliczenia guzki nowotworowe.

1. WPŁYW NAPROMIENIOWANIA MYSZY NA LICZBĘ GUZKÓW NOWOTWOROWYCH
W PŁUCACH PO DOŻYLNYM WSTRZYKNIĘCIU KOMÓREK MIĘSAKOWYCH
(DOŚWIADCZENIE 8)

W piśmiennictwie znane są doświadczenia, z których wynika, że po dożylnym wstrzyknięciu komórek nowotworowych zwierzętom napromienianym na całe ciało promieniami X liczba guzków nowotworowych jest wyższa niż u zwierząt kontrolnych. Niektórzy autorzy tłumaczyli taki wynik obniżeniem odporności przez promieniowanie [54, 83]. Thompson [79] natomiast uważa, że uszkodzenie popromienne naczyń włosowatych ułatwia zagnieżdżanie się komórek nowotworowych.

Aby wyjaśnić rolę układu immunologicznego w omawianym zjawisku, wykonano doświadczenia, których zasadą było wstrzykiwanie dożylne komórek nowotworowych biorcom z różnymi defektami w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej. W szczególności chodziło tu o wybiórcze wyłączenie limfocytów T, którym przypisuje się główną rolę w nadzorze immunologicznym [14].

Utworzono następujące grupy myszy:

1. myszy normalne — nietknięte — stanowiące materiał kontrolny;
2. myszy napromieniane dawką letalną promieniowania X (900 R) na całe ciało, a następnie rekonstruowane komórkami szpiku kostnego, wstrzykniętymi dożylnie w dawce 20×10^6 komórek. Myszy te stanowiły grupę bez komórek T;
3. myszy napromieniane letalnie i rekonstruowane mieszaniną komórek ze szpiku kostnego (20×10^6) i komórek grasicy (50×10^6). Była to grupa myszy napromienianych z pełną rekonstrukcją;
4. oddzielne grupy stanowiły myszy, którym usunięto grasicę w ciągu 24 godz. po urodzeniu;
5. myszy nietknięte, będące w tym samym wieku, co myszy po tymektomii — stanowiły one grupę kontrolną.

Myszom z grupy 2 i 3 w dwa tygodnie po napromieniowaniu i rekonstrukcji, jak również myszom kontrolnym wstrzykiwano dożylnie zawiesinę komórek mięsakowych. W taki sam sposób wstrzykiwano komórki mięsakowe myszom z grupy 4 i 5 w wieku 2 miesięcy, stosując dwojaki rodzaj dawki.

Z tabeli 4 wynika, że liczba guzków w płucach zwiększyła się w sposób istotny w porównaniu z grupą kontrolną (grupa I) jedynie w grupie myszy, które były napromieniane letalnie i rekonstruowane komórkami ze szpiku (grupa 2). U myszy napromienianych letalnie z następującą pełną rekonstrukcją komórkami szpiku i grasicy (grupa 3) liczba guzków w płucach nie różniła się znamienne od grupy kontrolnej. Stwierdzono również, że u myszy po tymektomii liczba guzków w płucach była niemal taka sama jak u myszy kontrolnych, zarówno po dawce standardowej (grupa 4a i 5a), jak i podwojonej (grupa 4b i 5b).

TABELA 4. Wpływ wyłączenia limfocytów T na liczbę guzków w płucach myszy BALB/c po dożylnym wstrzyknięciu komórek mięsakowych (układ zgodności antygenowej)

nr	Grupa doświadczalna		Liczba zwierząt	Liczba guzków w płucach $\bar{x} \pm SD$
	rodzaj zabiegu	dawka komórek nowotworowych		
1	Nietknięte (kontrola)	10^5	7	$7,3 \pm 0,5$
2	Napromienianie X + rekonstrukcja komórkami szpiku	10^5	7	$14,3 \pm 2,2$
3	Napromienianie X + rekonstrukcja komórkami szpiku i grasicy	10^5	6	$6,4 \pm 1,1$
4a	Tymektomia	10^5	7	$6,5 \pm 2,2$
5a	Nietknięte (kontrola)	10^5	7	$8,7 \pm 1,6$
4b	Tymektomia	2×10^5	8	$16,4 \pm 3,2$
5b	Nietknięte (kontrola)	2×10^5	10	$17,2 \pm 4,0$

W celu sprawdzenia skuteczności stosowanych sposobów rekonstrukcji u myszy napromienianych letalnie, a w szczególności roli komórek pochodzenia grasiczego, wykonano dodatkową serię doświadczeń, w których założono silne różnice w antygenach zgodności tkankowej między komórkami mięsaka a ustrojem gospodarza. W doświadczeniach tych komórki mięsakowe pochodzące z myszy BALB/c (H-2^d) wstrzyknięto myszom BN/b (H-2^{bp}) napromienianym letalnie i rekonstruowanym w sposób podobny jak w grupach 2 i 3 z tabeli 4.

Z tabeli 5 wynika, że guzki nowotworowe wystąpiły wyłącznie u myszy rekonstruowanych komórkami szpiku, przy czym liczba ich była

TABELA 5. Wpływ wyłączenia limfocytów T na liczbę guzków w płucach w układzie niezgodności antygenowej. Komórki mięsakowe (H-2^d) wstrzykiwano dożylnie myszom BN/b (H-2^{bp})

nr	Grupa doświadczalna		Liczba zwierząt	Liczba guzków w płucach $\bar{x} \pm SD$
	rodzaj zabiegu	dawka komórek nowotworowych		
1	Napromienianie X + rekonstrukcja komórkami szpiku	10^5	6	$12,5 \pm 2,2$
2	Napromienianie X + rekonstrukcja komórkami szpiku i grasicy	10^5	6	0

zbliżona do liczby guzków otrzymanych u myszy BALB/c. U zwierząt rekonstruowanych komórkami szpiku kostnego i grasicy nie znaleziono guzków nowotworowych. Świadczy to o szczególnej roli limfocytów T w ich powstawaniu.

Wyniki doświadczeń zestawione w tabelach 4 i 5 dowodzą, że liczba guzków mięsakowych, jaka powstaje w płucach po dożylnym wstrzyknięciu zawiesiny komórek mięsakowych, zależy od trzech czynników:

1. od różnic w antygenach zgodności tkankowej między nowotworem a gospodarzem,
2. od rodzaju stopnia uszkodzenia układu immunologicznego,
3. od liczby wstrzykniętych komórek.

Identyczność wyników między grupą 1 i 3 (tabela 4) przemawia przeciw hipotezie Thompsona [79], według której przyczyną zwiększania się liczby guzków u zwierząt napromieniowanych jest uszkodzenie anatomiczne płuc.

2. WPŁYW OBCIĄŻENIA NOWOTWOREM USTROJU GOSPODARZA NA LICZBĘ GUZKÓW W PŁUCACH PO DOŻYLNYM WPROWADZENIU KOMÓREK MIĘSAKOWYCH (DOŚWIADCZENIE 9)

Tworzenie się i wzrost guzków w płucach — zapoczątkowanych przez osiedlenie się krążących we krwi komórek mięsaka — stwarzają możliwości ilościowej obserwacji zjawiska i jego doświadczalnej modulacji. Wyłoniło się więc pytanie, jaką rolę ma zaawansowany proces nowotworowy w zagnieżdżaniu się w płucach komórek przerzutowych.

Doświadczenie polegało na wprowadzeniu dożylnym zawiesiny komórek mięsakovych myszom z podskórnymi przeszczepami tego samego mięsaka, rosnącymi progresywnie przez różne okresy czasu. W 9, 16 i 28 dniu po wszczepieniu nowotworu wstrzykiwano dożylnie myszom z wszystkich grup tę samą zawiesinę komórek nowotworowych.

Wyniki doświadczeń zostały przedstawione w tabeli 6. Najwyższe liczby guzków nowotworowych znajdowano u myszy noszących najbar-

TABELA 6. Wpływ obciążenia nowotworem na liczbę guzków nowotworowych w płucach po dożylnym wstrzyknięciu $0,5 \times 10^6$ komórek mięsakovych. Wstrzyknięcia dożylna wykonano jednocześnie myszom w różnych okresach po podskórnym wszczepieniu nowotworu

Kontrola bez obciążenia		Wielkość guza podskórnego					
		Dni po wszczepieniu					
		0,05 g	0,47 g	2,9 g			
		9	16	28			
$\bar{x} \pm SD$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm SD$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm SD$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm SD$	<i>n</i>
$41 \pm 1,89$	8	$47 \pm 14,7$	9	$28 \pm 1,7$	10	$57 \pm 4,1$	9

n — liczba myszy.

ziej zaawansowane nowotwory (po 28 dniach wzrostu), a najniższe w średnio zaawansowanych nowotworach (16-dniowe). U myszy z nowotworami o najkrótszym okresie wzrostu liczba guzków nowotworowych była podobna jak u zwierząt kontrolnych.

Wyniki otrzymane z tych eksperymentów wskazują, że proces nowotworowy jest czynnikiem ułatwiającym zagnieżdżanie się i wzrost w płucach krwiopochodnych komórek nowotworowych.

Sądzę, że opisany charakter zmian w liczbie przerzutów w płucach nie jest zależny bezpośrednio od wielkości podskórnego nowotworu i że powinien być raczej interpretowany jako efekt pośredni; czynnikiem bezpośrednio tu działającym jakościowo czy ilościowo jest odpowiedź immunologiczna gospodarza zmieniona przez proces nowotworowy. We wczesnym okresie wzrostu guza podskórnego układ obronny gospodarza nie jest na tyle pobudzony, aby jego efektorowe mechanizmy mogły zniszczyć wprowadzone dożylnie komórki nowotworowe. W miarę wzrostu następuje pobudzenie układu obronnego, które wprawdzie nie wystarcza do zniszczenia guza rosnącego podskórnym, może natomiast niszczyć dożylnie wszczepione komórki czy też wstrzymywać ich wzrost. W zaawansowanym okresie wzrostu guza podskórnego zwiększanie się liczby guzków w płucach rozwiniętych po wprowadzeniu dożylnym komórek nowotworowych można tłumaczyć, zgodnie z hipotezami z piśmiennictwa, jako wynik swoistej immunosupresji wywołanej przez proces nowotworowy [36, 52, 60, 80].

3. ZALEŻNOŚĆ LICZBY GUZKÓW NOWOTWOROWYCH W PŁUCACH MYSZY BALB/c OD DAWKI WSTRZYKNIĘTYCH KOMÓREK MIĘSAKOWYCH (DOŚWIADCZENIE 10)

W dotychczas opisanych doświadczeniach (doświadczenie 8 i 9) ujawniła się zależność między liczbą guzków w płucach a liczbą komórek nowotworowych wstrzykniętych dożylnie myszom.

W celu bliższego zbadania takiej zależności wstrzykiwano dożylnie myszom BALB/c zawiesiny komórek nowotworowych w różnych stężeniach, a w cztery tygodnie później wykonywano autopsję. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: (1) myszy normalne, (2) napromieniane na całe ciało promieniami X w dawce 300 R, (3) myszy z podskórnymi przeszczepami tego samego nowotworu dokonanymi na jeden miesiąc przed wstrzyknięciem dożylnym. Kontrolę dla grupy 3 stanowiły zwierzęta z jednomiesięcznym guzem podskórnym, którym nie wykonano wstrzyknięcia dożylnego; u tych myszy liczba guzków nowotworowych w płucach, badana po upływie następnego miesiąca, była miarą samoistnych przerzutów pochodzących z guzów rosnących podskórnym.

Wyniki doświadczeń zestawiono w tabeli 7. Najwyższe liczby guzków znaleziono u myszy napromienianych, a najniższe u normalnych. Zwierzęta obciążone nowotworem wykazywały wartości pośrednie. Na liczbę guzków u tych myszy nie miały wpływu przerzuty spontaniczne, ponieważ liczba ich u myszy w grupie z podskórnymi guzami bez dożylnego wstrzyknięcia była bardzo mała. We wszystkich grupach myszy zarówno

TABELA 7. Liczba guzków nowotworowych w płucach myszy napromieniowanych promieniami X w dawce 300 R, względnie obciążonych nowotworem wszczepionym podskórnie w zależności od dawki wstrzykniętych dożylnie komórek mięsakowych

Ilość komórek mięsakowych wstrzykniętych dożylnie ($\times 10^6$)	Rodzaj obciążenia myszy											
	kontrola				napromieniowanie*				w 1 miesiąc po wszcze- pieniu**			
	\bar{x}	SD (+ -)	n	zakres zmiany	\bar{x}	SD (+ -)	n	zakres zmiany	\bar{x}	SD (+ -)	n	zakres zmiany
0,125	2,8	2,1	6	1-6	16	5,9	6	8-23	12	5,0	5	8-20
0,25	7,2	4,2	5	3-12	34	16	6	19-59	18	45	5	11-23
0,5	17,6	3,8	6	14-24	50	10,6	6	34-60	34	10,9	6	23-48
Współczynnik korelacji	0,99				0,97				0,96			

* Wstrzyknięcia dożylnie komórek nowotworowych wykonywano 24 godz. po napromienieniu.

** U myszy kontrolnych z podskórnie rosnącym guzem, którym nie wstrzyknięto dożylnie komórek nowotworowych liczba guzków w płucach badanych w tym samym czasie co w grupie doświadczalnej wynosiła średnio 0,7 na mysz w grupie 20 zwierząt.

kontrolnych, jak i w rozmaity sposób obciążonych ujawniła się prosta zależność między liczbą komórek wstrzykniętych dożylnie a liczbą guzków znalezionych w płucach [42]. Zależność ta miała charakter prostoliniowy o wysokim współczynniku korelacji zbliżonym we wszystkich grupach doświadczalnych.

Wyniki te dowodzą, że zagnieżdżanie się i wzrost komórek przerzutowych jest ułatwione przez naświetlanie całego ciała, jak i miejscowy proces nowotworowy oraz że liczba guzków przerzutowych zależy od liczby krążących (nowo wprowadzonych) komórek w krwioobiegu.

Ostatni etap pracy, jak i dyskusji dotyczy mechanizmów zagnieżdżania się w płucach komórek nowotworowych przenoszonych z krwią. Procesy te mogliśmy obserwować w doświadczeniach, gdzie wzrost guzka nowotworowego zapoczątkowany był przez pojedynczą komórkę nowotworową, co może stanowić model ogniska przerzutowego. Przedstawione zostały dowody, że w zagnieżdżaniu się i wzroście w płucach takich komórek przenoszonych z krwią odgrywa istotną rolę układ immunologiczny, a szczególnie limfocyty pochodzenia grasieczego.

Doświadczalna eliminacja tych komórek z organizmu przez napromienianie zwierząt letalną dawką promieni X z następową rekonstytucją wyłącznie komórkami szpiku sprzyja zagnieżdżaniu i wzrostowi komórek nowotworowych zarówno allogenicznym, jak i syngenicznym.

Przedstawionym wnioskom zdają się zaprzeczać doświadczenia, polegające na dożylnym wstrzykiwaniu komórek nowotworowych myszom, którym usunięto grasieć w ciągu 24 godz. po urodzeniu. Liczba guzków

w płucach u takich myszy nie różniła się od liczby guzków u myszy kontrolnych z zachowaną grasicą zarówno w dawkach standardowych, jak i po wprowadzeniu podwojonej ilości komórek nowotworowych. Rozbieżności między wynikami tych i poprzednich doświadczeń mogą zależeć od szeregu nie określonych bliżej różnic między skutecznością pierwszego i drugiego sposobu eliminowania limfocytów T. W pracy [23] wykazaliśmy na przykład, że u szczurów pozbawionych grasicy tuż po urodzeniu przedłużał się okres wzrostu raka Ehrlicha wszczepionego dootrzewnowo, a jego regresja i samowyleczenie były opóźnione. Postulowaliśmy wówczas, że w nieobecności grasicy, dzięki wykształconym nowym mechanizmom zastępczym, może rozwinąć się skuteczna odpowiedź immunologiczna przeciw przeszczepowi nowotworu (obcogatunkowego).

Dla wyjaśnienia omawianych rozbieżności pragnę również przedstawić hipotezę, że przeszkodę w zagnieżdżaniu się komórek nowotworowych przenoszonych z krwią mogą stanowić szczególne — bliżej nie zdefiniowane — komórki efektorowe. Takie hipotetyczne komórki (nie będące ani limfocytami T, ani B [33] są wrażliwe na promieniowanie, a dla swej funkcji wymagają obecności (kooperacji) limfocytów T. Zgodnie z tym rola limfocytów T w utrudnianiu zagnieżdżania się i wzroście komórek nowotworowych w płucach sprowadzałaby się raczej do funkcji wspomagającej (helper) niż zabójczej (killer).

Stwierdzając wpływ różnych mechanizmów immunologicznych na liczbę krwiopochodnych guzków w płucach nie dysponowaliśmy układami doświadczalnymi, które by pozwalały rozstrzygnąć czy utrudnienie w zagnieżdżaniu i wzroście komórek przerzutowych jest efektem cytotoksycznym, czy cytostatycznym. Prawdopodobnie oba mechanizmy mogą wchodzić w grę w zależności od tego czy komórka przerzutowa zatrzymuje się w płucach, w czasie gdy organizm osiągnął jakiś stan immunizacji, czy też osiedla się rychło, a więc w okresie, gdy nie doszło jeszcze do swojego uczulenia. Za takim przypuszczeniem przemawiają niektóre informacje zaczerpnięte z piśmiennictwa. Tak więc podanie surowicy antylimfocytarnej zwiększa liczbę guzków nowotworowych w płucach [11, 29]. Immunosupresja uzyskana u zwierząt napromieniowanych na całe ciało ułatwia przyjmowanie się przeszczepów nowotworowych, jak również szybszy ich wzrost [65]. Ponadto promieniowanie jonizujące może prowadzić do uszkodzenia antomicznego płuc, a tym samym ułatwić zagnieżdżanie się i wzrost wprowadzonych dożylnie komórek nowotworowych [10, 79]. Z drugiej strony wzmacnianie odporności przez nieswoiste pobudzenie układu obronnego zmniejsza liczbę przerzutów zarówno w przebiegu wzrostu nowotworów, jak i po podaniu dożylnym komórek nowotworowych [2, 3, 6].

Modelem doświadczalnym — bardziej zbliżonym do naturalnych warunków rozwoju przerzutów w samoistnych nowotworach — są eksperymenty (doświadczenie 9) polegające na dożylnym wstrzykiwaniu zawiesiny komórkowej myszom, u których rozwija się ten sam nowotwór wszczepiony wcześniej pod skórę. Wyniki doświadczalne doprowadziły nas do wniosku, że nieproste zależności między liczbą guzków przerzutowych w płucach a okresem wzrostu i rozmiarami guza podskórnego tłumaczą się pośrednim udziałem mechanizmów immunologicznych. Komórki guza miejscowego (podskórnego) mogą dzięki swym antygenom powierzchniowym z jednej strony immunizować organizm, w innej znów fazie absorbować na swej powierzchni swoiste przeciwciała i w ten sposób obniżać ich miano w krwi krążącej. Obniżka taka może udostępniać limfocytom pojedyncze komórki zagnieżdżające się na terenie płuc. Tak więc w różnych okresach po wszczepieniu tkanki nowotworowej istnieje „gra” przeciwstawnych mechanizmów immunologicznych. W okresie zaawansowanego wzrostu guza — być może — składowa humoralna osiąga przewagę nad składową komórkową i poprzez swoje osłaniające działanie umożliwia większej liczbie komórek zagnieżdzenie się i wzrost w płucach. Czynnikiem osłaniającymi komórki nowotworowe mogą być przeciwciała krążące, kompleks przeciwciało-antygen lub nadmiar antygeny.

Sądzę, że — analogicznie jak w tym doświadczeniu — również w naturalnym rozwoju samoistnych nowotworów złośliwych wielkość zmiany pierwotnej stanowi ważny czynnik w powstawaniu ognisk nowotworowych, oddziałując za pośrednictwem mechanizmów obronnych. W ten sposób wielkość nowotworu może wpływać na liczbę przerzutów nie tylko przez ilości uwolnionych komórek, czy też poprzez zmiany w aktywności fibrynolitycznej.

W dyskusji nad powstawaniem przerzutów szczególną uwagę pragnę zwrócić na nasze spostrzeżenia, że istnieje liniowa zależność między liczbą krążących w krwiobiegu komórek nowotworowych a ilością przerzutów w płucach. Wysoki współczynnik takiej korelacji ujawnił się we wszystkich doświadczeniach, w których zmieniano stan odporności. Wynika stąd, że liczba krążących komórek we krwi stanowi niezależny od innych mechanizmów współczynnik (parametr) wpływający na powstawanie przerzutów. Niektórzy klinicyści przypisywali temu czynnikowi znaczenie w powstawaniu przerzutów w nowotworach złośliwych u ludzi i w związku z tym wielkie zainteresowanie wzbudzała technika wykrywania i określania ilościowego komórek nowotworowych w krwi krążącej [15, 66]. Brak korelacji między liczbą takich komórek w krwi obwodowej a ogniskami przerzutowymi, jak stwierdzali niektórzy badacze na materiale klinicznym, można by tłumaczyć dwojako: albo liczby komórek krążących były mniejsze niż wartość progowa, albo wystąpiła interferencja mecha-

nizmów immunologicznych, które — jak wykazaliśmy — mogą wybitnie zmieniać szanse powstania przerzutu.

Z doświadczeń nad dożylnym wstrzykiwaniem komórek nowotworowych wyłania się problem klonogenności, czyli tzw. frakcji komórek klonogennych w populacji komórek nowotworowych. W pierwotnym rozumieniu autorów wielkość frakcji takich komórek miała być cechą inhereentną danego guza nowotworowego. Test pozwalający wykazać tę cechę polega na wstrzykiwaniu dożylnym zawiesiny komórek odpowiedniemu biorcy i zliczaniu guzków przerzutowych w płucach.

W świetle naszych badań (doświadczenia 8—10) test na klonogenność nowotworów powinien uwzględniać warunki zarówno miejscowego wzrostu guza nowotworowego, jak i stanu immunologicznego zarówno dawcy, jak i biorcy. Takie wymagania dla testu wynikają z faktu, że w obrębie populacji nowotworu stopień żywotności nowotworu jest zmienny (efekty cytostatyczne) oraz że stan odpornościowy biorcy wpływa na liczbę guzków w płucach.

Wykazanie prostoliniowej zależności między liczbą wstrzykniętych komórek a liczbą guzków w płucach z równoczesną zmiennością bezwzględnych liczb guzków w płucach — zależne od stanu immunologicznego biorcy — nasuwa myśl, że metodą wstrzykiwań dożylnych komórek nowotworowych można oceniać albo żywotność guza, albo stan odpornościowy biorcy, w zależności od ustalenia wstępnych warunków modelu doświadczalnego.

Na podstawie przedstawionych w artykule informacji można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Regresja nowotworu pod wpływem odpowiedzi immunologicznej gospodarza przebiega bez zmian w długości cyklu mitotycznego i jego faz.

2. Zanik nowotworu względnie zatrzymanie jego wzrostu może mieć cechy efektu cytotoksycznego względnie cytostatycznego.

3. Pod wpływem presji immunologicznej zachodzi odwracalny blok w fazie G_2 cyklu komórek.

4. Wyłączanie komórek z cyklu mitotycznego odbywa się w okresie G_2 , nie zaś w sposób losowy.

5. Komórki zatrzymane w okresie G_2 cyklu są najbardziej podatne na cytotoksyczne działanie przeciwciał.

6. W warunkach immunosupresji wywołanej promieniowaniem jonizującym zagnieżdżanie się komórek nowotworowych w płucach jest ułatwione.

7. Proces nowotworowy zmieniając charakter odczynów immunologicznych jest czynnikiem warunkującym (ułatwiającym lub utrudniającym) powstawanie odległych zmian przerzutowych.

8. Między liczbą przerzutów w płucach a liczbą krążących w krwioobiegu komórek nowotworowych istnieje liniowa zależność.

Panu prof. K. Duxowi serdecznie dziękuję za żywą i krytyczną dyskusję.

LITERATURA

- [1] BALDWIN R. W., EMBLETON M. J., ROBINS R. A.; Cellular and humoral immunity to rat hepatoma specific antigens correlated with tumour status, *Int. J. Cancer*, **11**: 1—10, 1973.
- [2] BALDWIN R. W., PIM M. V., BCG immunotherapy of pulmonary growth from intravenously transferred rat tumours cells, *Br J. Cancer*, **27**: 48—54, 1973.
- [3] — BCG suppression of pulmonary metastases from primary rat hepatoma, *Br J. Cancer*, **30**: 473, 476, 1974.
- [4] BALDWIN R. W., PRICE M. R., ROBINS R. A., Blocking of lymphocyte-mediated cytotoxicity for rat hepatoma cells by tumour specific antigen-antibody complexes, *Nature*, **238**: 185—86, 1972.
- [5] BANSAL S. C., SJÖGREN H., Correlation between changes in antitumor immune parameters and tumor growth in vivo in rats, *Fed. Proceed.*, **32**: 165—172, 1973.
- [6] — Regression of polyoma tumor metastasis by combined unblocking and BCG treatment — correlation with induced alteration in tumor immunity, *Int. J. Cancer*, **12**: 179—193, 1973.
- [7] BICHEL P., Specific growth regulation in three ascitic tumours, *Europ. J. Cancer*, **8**: 167—173, 1972.
- [8] BICHEL P., DOMBERNOWSKI P., On the resting stages of the JB-1 ascites tumour, *Cell Tissue Kinet*, **6**: 359—357, 1973.
- [9] BOOTSMA D., Changes induced in the first post-irradiation cycle of human cells studied by double labelling, *Exp. Cell Res.*, **38**: 429—431, 1965.
- [10] BRENK van den H. A. S., BURCH W. M., ORTON C., SHARPINGTON C., Stimulation of clonogenic growth of tumour cells and metastases in the lungs by local x-radiation, *Br J. Cancer*, **27**: 291—306, 1973.
- [11] BRENK van den H. A. S., SHARPINGTON C., ORTON C., Macrocolony assays in the rat of allogeneic Y-P388 and W-256 tumour cells injected intravenously: dependency of colony forming efficiency on age of the host and immunity, *Br. J. Cancer*, **27**: 134—152, 1973.
- [12] BULLOUGH W. S., LAURENCE E. R., Mitotic control by internal secretion: the role of the chalone-adrenaline complex, *Exp. Cell Res.*, **33**: 176—194, 1964.
- [13] BURK K. H., DREWINKO B., LICHTIGER B., TRUJILLO J. M., Cell cycle dependency of human sarcoma associated tumor antigen expression, *Cancer Res.*, **36**: 1278—83, 1976.
- [14] BURNETT M. F., Immunological surveillance, Pergamon Press, Oxford 1970.
- [15] CARTER R. L., Metastasis, [w] *Biology of Cancer*, red. E. J. Ambrose, F. J. C. Rose, Ellis Harwood, Ltd, 1975.
- [16] CIKES M., Relationship between growth rate, cell volume, cell cycle kinetics and antigenic properties of cultured murine lymphoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**: 979—988, 1970.

- [17] CIKES M., FRIBERG S., jr., Expression of H-2 and Moloney leukemia virus determined cell surface antigens in synchronized cultures of a mouse cell line, *proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **68**: 586—569, 1971.
- [18] COHEN A. M., Host immunity to growing sarcomas; tumor specific serum inhibition of tumor specific-cellular immunity, *Cancer*, **31**: 81—92, 1973.
- [19] COHEN D., STEEL G. G., Thymidine labelling studies in a transmissible venereal tumour of the dog, *Br. J. Cancer*, **25**: 413—418, 1972.
- [20] COSSE De J. J., GELFANT S., Noncycling tumor cells: mitogenic response to antilymphocytic serum, *Science*, **698**: 162—165, 1968.
- [21] COURTNEY V. D., Radioresistant mutants of L5178Y cells, *Rad. Res.*, **38**: 186—203, 1969.
- [22] CURRIE G. A., BASHAM C., Serum mediated inhibition of the immunological reaction of the patient to his own tumour: A possible role for circulating antigen, *Br. J. Cancer*, **26**: 427—438, 1972.
- [23] DĄBROWSKA B., JANIK P., DUX K., Kinetyka wzrostu i zanikania mysiego raka Ehrlicha wszczepionego dootrzewnowo szczurom pozbawionym grasicy, *Nowotwory*, **18**: 1—5, 1968.
- [24] DUX K., CHORAŻY M., Wstęp do biologii nowotworów, 1973 str. 14 PZWL.
- [25] DUX K., CZARNOMSKA A., BREGUŁA U., Wpływ naporu immunologicznego nosiciela nowotworu na odsetek komórek poliploidalnych w raku Ehrlicha, *Nowotwory*, **23**: 7—13, 1973.
- [26] DUX K., RYŻEWSKA A., CZARNOMSKA A., Mechanism of antigen transformation of transplantable rat tumour, *Nature*, **190**: 458—459, 1961.
- [27] DUX K., SLOPEK S., BREGUŁA U., FOGEL M., Sur les modification de la structure antigenique de l'epithelioma Guerin an cours des heterogreffes sur les souris, *Bulletin du Cancer*, **44**: 72—87, 1957.
- [28] GELFANT S., A new theory on the mechanism of cell division in cell growth and cell division, N. Y. Academic Press, 229—243, 1963.
- [29] GERSHON F. K., CARTER R. L., Facilitation of metastatic growth by antilymphocyte serum, *Nature*, **226**: 368—370, 1970.
- [30] GORSKI J., TOFT D., SHYAMAKA G., SMITH D., NOTIDES A., Hormone receptore, [w] *Recent Progress in Hormone Res. Academic Press N. Y.*, **24**: 45—80, 1968.
- [31] HANKE K., RAJEWSKI M. F., Cell cycle phase-specific cellular immune cytolysis and colony inhibition in neoplastic rat cells separated by velocity sedimentation, 8th ESGCP Meeting, Montreux, Abstracts, 31—32, 1976.
- [32] HELLSTRÖM J., HELLSTRÖM U. E., Studies on cellular immunity and its serum mediated inhibition in Moloney — virus induced mouse sarcomas, *Int. J. Cancer*, **4**: 587—593, 1969.
- [33] HERBERMAN R. P., NUNN, M. E., HOLDEN H. T., LAVRIN D. H., Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic tumours. II. Characterization of effector cells, *Int. J. Cancer*, **16**: 230—239, 1975.
- [34] HILL R. P., BUSH R. S., A lung colony assay to determine the radiosensitivity of the cells of a solid tumor, *Int. J. Rad. Biology*, **15**: 435—444, 1969.
- [35] HOWARD A., PELC S. R., Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage, *Heredity*, **6**: 261—273, 1953.
- [36] HRSAK I., MARROTTI T., Mechanism of the immunosuppressive effect of Ehrlich ascitic Tumour, *Europ. J. Cancer*, **11**: 181—185, 1975.

- [37] IVERSEN O. H., IVERSEN U., ZIEGLER J. L., BLUMUNG A. Z., Cell kinetics in Burkitt lymphoma, *Europ. J. Cancer*, **10**: 155—163, 1974.
- [38] JANIK P.: Studies on the cell cycle of Ehrlich carcinoma cells transplanted into allogeneic and xenogeneic hosts, *Arch. Immunol. et. Ther. Exper.*, **17**: 590—595, 1969.
- [39] — Cell proliferation during course of immunological rejection of Ehrlich ascites tumour cells, *Cell Tissue Kinet.*, **4**: 69—74, 1971.
- [40] — On the G₂ arrest of Ehrlich ascites tumour cells during the tumour regression in rats, *Neoplasma*, **21**: 415—419, 1974.
- [41] — Are the tumor cells of the G₂ period of the cell cycle sensitive to the immune pressure, *Neoplasma*, **23**: 31—36, 1976.
- [42] — Lung colony assay in normal, irradiated and tumour bearing mice, *Neoplasma*, **23**: 495—497, 1976.
- [43] — Niektóre aspekty immunologii nowotworów, *Postępy Biologii Komórki*, **3**: 113—126, 1976.
- [44] JANIK P., BRIAND P., HARTMAN N. R., The effect of estrone-progesteron treatment on cell proliferation kinetics of hormone dependent GR mouse mammary tumors, *Cancer Res.*, **35**: 3698—3704, 1975.
- [45] JANIK P., DĄBROWSKA B., DUX K., Adaptacyjne zmiany wysiękowego raka Ehrlicha w wyniku długotrwałego pasażowania na szczurach, *Nowotwory*, **16**: 311—316, 1966.
- [46] JANIK P., DĄBROWSKI M., DUX K., Dynamics of growth and regression of Ehrlich ascites carcinoma transplanted intraperitoneally in rats, *Arch. Immunol. et. Ther. Exp.*, **14**: 717—723, 1966.
- [47] JANIK P., STEEL G. G., Cell proliferation during immunological perturbation in three transplanted tumours, *Br. J. Cancer*, **26**: 108—114, 1972.
- [48] KIM J. H., EVANS T. C., Effect of x-irradiation on the mitotic cycle of Ehrlich ascites tumor cells, *Rad. Res.*, **21**: 129—135, 1964.
- [49] LAMERTON L. F., Tumour cell kinetics, *Brit. Med. Bull.*, **29**: 23—40, 1973.
- [50] LENEVA N. V., SVET-MOŁDAWSKI G. J., Susceptibility of tumor cells in different phases of the mitotic cycle to the effect of immune lymphocytes, *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**: 699—704, 1974.
- [51] LERNER R. A., OLDSTRONE M. B., COOPER N. R., Cell cycle-dependent immune lysis of Moloney virus-transformed lymphocytes: presence of viral antigen, accessibility to antibody and complement activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **68**: 2584—2588, 1971.
- [52] MCGRATH J. T., Immunosuppression in Burkitt lymphoma, *Int. J. Cancer*, **13**: 839—849, 1974.
- [53] MENDELSON M. L., The growth fraction: a new concept applied to tumors, *Science*, **132**: 1426—1428, 1960.
- [54] MILAS L., KOGELNIK H. D., BASIC J., MASON K., HUNTER N., WITHERS H., Combination of *C. parvum* and specific immunisation against artificial metastases in mice, *Int. J. Cancer*, **16**: 738—743, 1975.
- [55] PALME G., LISS E., Effect of alkylating agents on the life cycle of Ehrlich tumour cells, *Europ. J. Cancer*, **245—248**, 1965.
- [56] PANEM S., SCHAUF V., Cell cycle dependent appearance of murine leukemia-sarcoma virus antigen, *J. Virology*, **13**: 1196—1199, 1974.
- [57] PEDERSON T., GELFANT S., G₂ — Population cells in mouse kidney and duodenum and their behaviour during the cell division cycle, *Exp. Cell Res.*, **59**: 32—36, 1970.

- [58] PELLEGRINO M. A., FERRANCE S., COOPER N. R., DIERICH M. P., REISFELD R. A., Variation in susceptibility of a human lymphoid cell line to immune lysis: lack of the correlation with antigen density and complement binding, *J. Exptl. Med.*, **140**: 578—590, 1974.
- [59] POST J., SKLAREW R. J., HOFFMAN J., Cell proliferation Patterns in an autogenous rat sarcoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**: 403—414, 1973.
- [60] PROCTOR J., RUDENSTAM C. M., ALEXANDER P., Increased incidence of lung metastases following treatment of rats bearing hepatoma with irradiated tumour cells and the beneficial effect of *Corynebacterium parvum* in this system, *Biomedicine*, **19**: 248—252, 1973.
- [61] PUCK T. T., STEFFEN J., Life cycle analysis, *Biophys.*, **3**: 379—396, 1963.
- [62] Van PUTTEN L. M., LELIEVELD P., The effects of cytostatic drugs and radiotherapy on the cell cycle 136—145, [w] Scientific Foundation of Oncology, red. T. Symington, R. L. Carter. William Heineman Medical Books London 1976.
- [63] QUASTLER H., SHERMAN F. G., Cell proliferation kinetics in the intestinal epithelium of the mouse, *Exptl. Cell Res.*, **17**: 420—429, 1959.
- [64] RAJEWSKI M. F., GRUNEISEIN A., Cell proliferation in transplanted rat tumor: Influence of the host immune system, *Europ. J. Immunol.*, **2**: 245—258, 1972.
- [65] ROSENAU W., MOON H. D., Suppression of the immune response to antigenic tumors in isogenic mice by whole-body irradiation, *Cancer Res.*, **27**: 1973—1981, 1967.
- [66] RUDOWSKI W., Obecny stan badań nad zagadnieniem przerzutów nowotworowych, *Nowotwory*, **14**: I, 12, 1964.
- [67] SCHLESINGER M., Immune lysis of thymus and spleen cells of embryonic and neonatal mice, *J. Immunology*, **94**: 358—364, 1965.
- [68] SCHWENK H. U., SCHWENK U., Cell cycle dependency of a T cell marker on lymphoblasts, *Blood*, **31**: 499—506, 1975.
- [69] SHIPLEY W. U., Immune cytolysis in relation to the growth cycle of chinese hamster cells, *Cancer Res.*, **31**: 925—929, 1971.
- [70] SKURZAK H., Rola czynników humoralnych w blokowaniu cytotoksyczności limfocytów in vitro, *Postępy Biologii Komórki*, **2**: 287—297, 1975.
- [71] STEEL G. G.: Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours, *Europ. J. Cancer*, **3**: 381—387, 1967.
- [72] — Cell loss from experimental tumours, *Cell Tissue Kinet.*, **1**: 193, 1968.
- [73] STEEL G. G., ADAMS K., HODGETT J., JANIK P., Cell population kinetics of a spontaneous rat tumour during serial transplantation, *Br. J. Cancer*, **4**: 802—811, 1971.
- [74] STEEL G. G., HANES S., The technique of labelled mitoses: analysis by automatic curve-fitting, *Cell Tissue Kinet.*, **4**: 93—105, 1971.
- [75] STEFFEN J., Czynniki immunologiczne w powstawaniu i rozwoju chorób nowotworowych, *Nowotwory*, **25**: 123—132, 1975.
- [76] SKUDLAREK J., RADZIKOWSKI C., CZARNOMSKA A., DUX K., BARTOSZEWICZ W., Leukaemias in BN/a and BN/b mice subjected to sustained treatment with ALG, *Int. J. Cancer*, **18**: 829—834, 1976.
- [77] THOMAS B. D., Cyclic expression of blood group determinants in murine cells and their relationship to growth control, *Nature*, **233**: 317—321, 1971.
- [78] THOMAS L., [w] Cellular and humoral aspects of the hypersensitivity status, red. H. S. Lawrence, Basel, N. Y., 1959.

- [79] THOMPSON S. C., Tumour colony growth in the irradiated mouse lung, *Br. J. Cancer*, **30**: 337—341, 1974.
- [80] THOMPSON D. M. P., Soluble tumour specific antigen and its relationship to tumour growth, *Int. J. Cancer*, **15**: 1016—1029, 1975.
- [81] TSUTSUI J., EVERETT N. B., Specific versus nonspecific targeted cell destruction by T lymphocytes sensitized in vitro, *Cellular Immunol.*, **10**: 359—370, 1974.
- [82] TUBIANA M., The kinetics of tumour cell proliferation and radiotherapy, *Br. J. Radiol.*, **44**: 325—337, 1971.
- [83] WITHERS H. R., MILAS L., Influence of preirradiation of lung on development of artificial pulmonary metastases of fibrosarcoma in mice, *Cancer Res.*, **33**: 1931—1936, 1973.
- [84] WOODRUFF M. F. A., SYMES M. O., Evidence of loss of tumour specific antigen on repeatedly transplanting tumour in the strain of origin, *Br. J. Cancer*, **16**: 482—486, 1962.

Otrzymano: 14 czerwca 1977.

Przyjęto: 28 czerwca 1977.

Adres autora: ul. Wawelska 15, 00-973 Warszawa.

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWAŃ MIKROSKOPII AKUSTYCZNEJ W BADANIACH BIOLOGICZNYCH *

Michał OPAS

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
Warszawa

Streszczenie. W artykule tym przedstawiłem pokrótce rozwój mikroskopii akustycznej. Na przykładzie wyników uzyskanych przy użyciu dwóch pracujących obecnie mikroskopów akustycznych omówiłem niektóre z możliwości zastosowania techniki mikroskopii akustycznej do badań biologicznych.

WPROWADZENIE

Rozwój nauk biologicznych, a zwłaszcza histologii i cytologii, związany jest z postępowaniem technicznym w dziedzinie mikroskopii. I tak mikroskopia fazowo-kontrastowa stworzyła nowe perspektywy dla badań obiektów przezroczystych; opracowanie metod mikroskopii interferencyjnej dało możliwość głębszego poznania własności mikroobъекtów (patrz przegląd [32]). Następnym przełomem było opracowanie technik mikroskopii holograficznej, dającej możliwość pełniejszego zapisu obrazu mikroskopowego, i co za tym idzie — uzyskania pełniejszej informacji o badanym obiekcie (patrz przegląd [31]). Równolegle z rozwojem nowoczesnej mikroskopii optycznej dokonywał się postęp w technikach mikroskopii elektronicznej, otwierając drogę do badań ultrastrukturalnych.

Mikroskopia akustyczna stanowi nowe podejście do problemu uzyskiwania informacji o mikroobъекtach. Technika ta — w odróżnieniu od mi-

* Dziękuję zespołowi Sonoscan Inc. (Bensenville, Illinois) za stworzenie mi możliwości pracy na SONOMICROSCOPE 100, jak również drowi Lawrence W. Kesslerowi za podzielenie się ze mną informacjami o planowanych udoskonaleniach mikroskopu. Możliwość zapoznania się z teoretycznymi i praktycznymi aspektami mikroskopii akustycznej zawdzięczam inicjatywie i pomocy dra Roberta Rinaldiego (NIH, Bethesda) za co mu serdecznie dziękuję.

kroskopii optycznej — daje wgląd w mechaniczne własności struktur. Mikroskopia akustyczna jest, podobnie jak i optyczna, techniką otrzymywania powiększonych obrazów o dużej zdolności rozdzielczej, z tym, że źródłem informacji jest tu deformacja wiązki (fali) akustycznej, a nie elektromagnetycznej.

Metody akustycznego uwidoczniania obiektów są już od dłuższego czasu stosowane w diagnostyce medycznej [12], jednak zastosowanie wysokich częstotliwości wymaganych dla otrzymania obrazów o dużej zdolności rozdzielczej jest nowością w tej dziedzinie. W diagnostyce medycznej zastosowanie ultradźwięków o niewielkich częstotliwościach (rzędu kilku MHz) opiera się na ich zdolności przenikania ciał nieprzeźroczystych i uwidoczniania makrostruktury (tkanek o różnej gęstości i elastyczności oraz granic między tkankami miękkimi) bez szkodliwych efektów związanych z użyciem promieniowania jonizującego. W mikroskopii akustycznej celem jest otrzymanie obrazów struktur o rozmiarach kilkunastu, kilku lub nawet ułamków mikrometrów. Dla osiągnięcia tego celu niezbędna jest ekspozycja obiektu wiązką ultradźwięków o częstotliwości rzędu setek megaherców, a nawet gigaherców, ponieważ długość fali użytego dźwięku musi być tego samego rzędu wielkości co obiekt. Stwarza to szereg problemów niespotykanych przy stosowaniu wizualizacji akustycznej w medycynie.

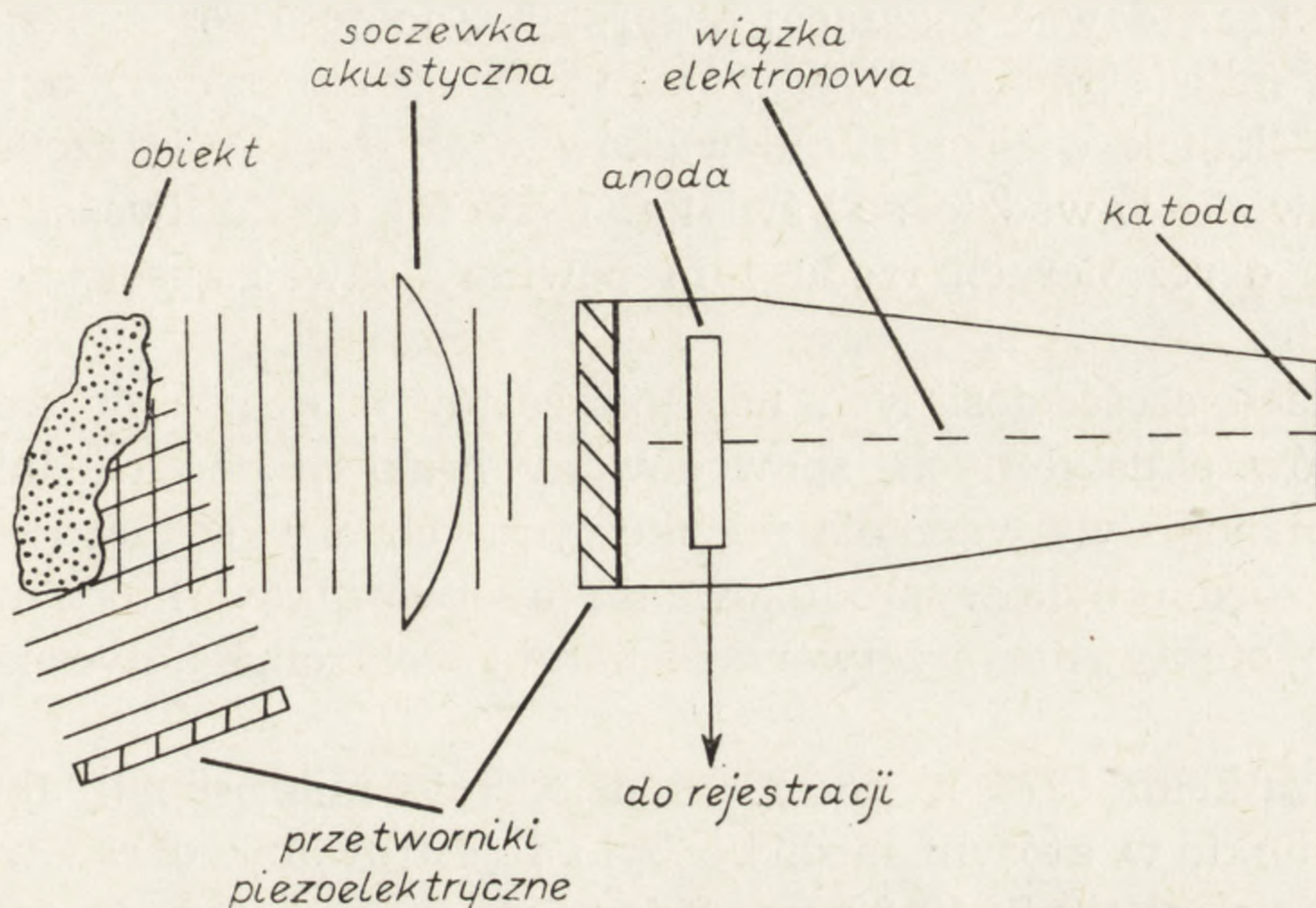
Dotychczasowe zastosowania mikroskopii akustycznej pozwoliły na wykazanie, że można za pomocą tej techniki badać żywe tkanki i komórki oraz uwidoczniać strukturę obiektów nieprzeźroczystych. W wielu przypadkach obrazy akustyczne okazały się bardziej kontrastowe niż obrazy optyczne tych samych obiektów.

Trudno jest przewidzieć jak wielkim przełomem będzie szerokie zastosowanie mikroskopii akustycznej do badań biologicznych (zależy to także od stopnia spopularyzowania tej techniki wśród biologów); opierając się na obecnym stanie wiedzy można jedynie powiedzieć, że mikroskop akustyczny otworzy bardzo szerokie możliwości badania gęstości, lepkości, elastyczności — jednym słowem mechanicznych własności mikrostruktur.

DROGI POSZUKIWAŃ

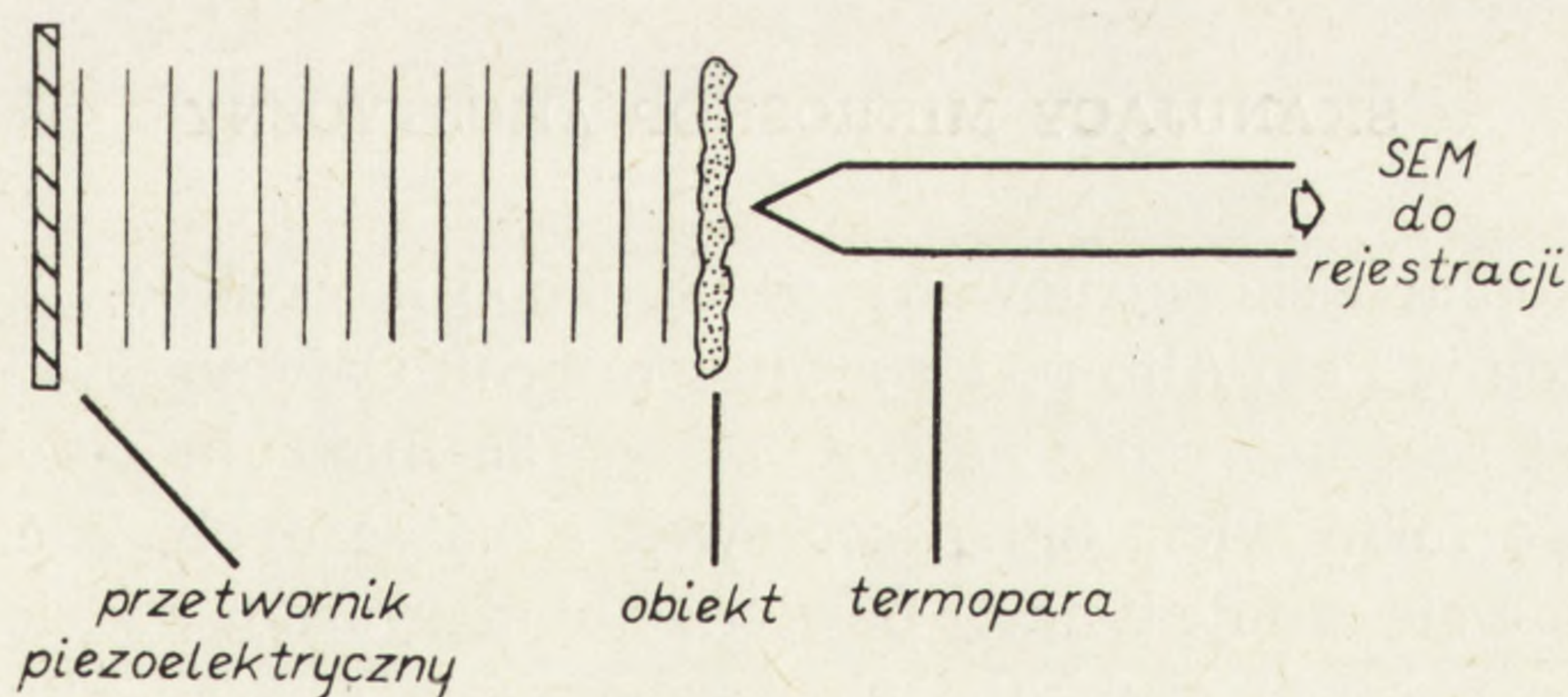
Pierwsze dane dotyczące struktury komórki widzianej w mikroskopie akustycznym opublikowane zostały w latach siedemdziesiątych [23]. Sama jednak idea zastąpienia wiązki świetlnej wiązką ultradźwięków zrodziła się już w latach trzydziestych tego stulecia [34]. Sokołow [35] postulował użycie ultradźwięków o częstotliwości rzędu 3 GHz, jednakże przedstawiony przez niego mikroskop (rys. 1) pracował na częstotliwości kilku MHz. Zasada działania tego mikroskopu (znanego obecnie pod nazwą ka-

mery ultradźwiękowej) sprowadzała się do odczytu zlokalizowanych ładunków elektrycznych wytwarzanych przez wiązkę akustyczną na przetworniku piezoelektrycznym. Inne rozwiązanie zaproponowali Dunn i Fry [4]. W ich mikroskopie (rys. 2) efektywność zamiany energii ultradźwięków



Rys. 1. Kamera ultradźwiękowa ([35] zmienione)

na ciepło w trakcie ich absorpcji przez obiekt była wykrywana przez termoparę o średnicy $12\ \mu\text{m}$. Obraz całego obiektu uzyskiwano na drodze mechanicznego skanowania „stolikiem” mikroskopu. Zdolność rozdzielcza tego mikroskopu wynosiła około $75\ \mu\text{m}$ przy częstotliwości 12 MHz.



Rys. 2. Mikroskop akustyczny według Dunn i Fry ([4], zmienione)

Oprócz prób konstrukcji mikroskopów, szereg laboratoriów prowadziło badania nad absorpcją dźwięku w tkankach i innych materiałach biologicznych. Prace te prowadzone były przeważnie przy częstotliwościach bliskich 1 MHz, tj. zupełnie niewystarczających dla mikroskopii akustycznej. Dopiero w latach siedemdziesiątych Kessler [13] wykazał, że absorpcja dźwięku przez tkanki miękkie zależy w sposób liniowy od częstotliwości

w zakresie do około 100 MHz, natomiast przy wyższych częstotliwościach zależność absorpcji od częstotliwości przybiera formę funkcji kwadratowej. Na tej podstawie Kessler wysnuł niezbyt optymistyczny wniosek, że w zakresie częstotliwości 100-200 MHz struktury o rozmiarach poniżej 25 μm nie będą dawać znaczącej absorpcji. Zdolność rozdzielczą, porównywalną z mikroskopem optycznym, mikroskop akustyczny uzyska przy ekspozycji tkanek wiązką ultradźwięków o częstotliwości rzędu 2 GHz, tj. gdy λ dźwięku w wodzie $\approx \lambda$ światła. Przy tej częstotliwości struktury biologiczne o rozmiarach rzędu 1 μm powinny dawać absorpcję co najmniej 4 dB.

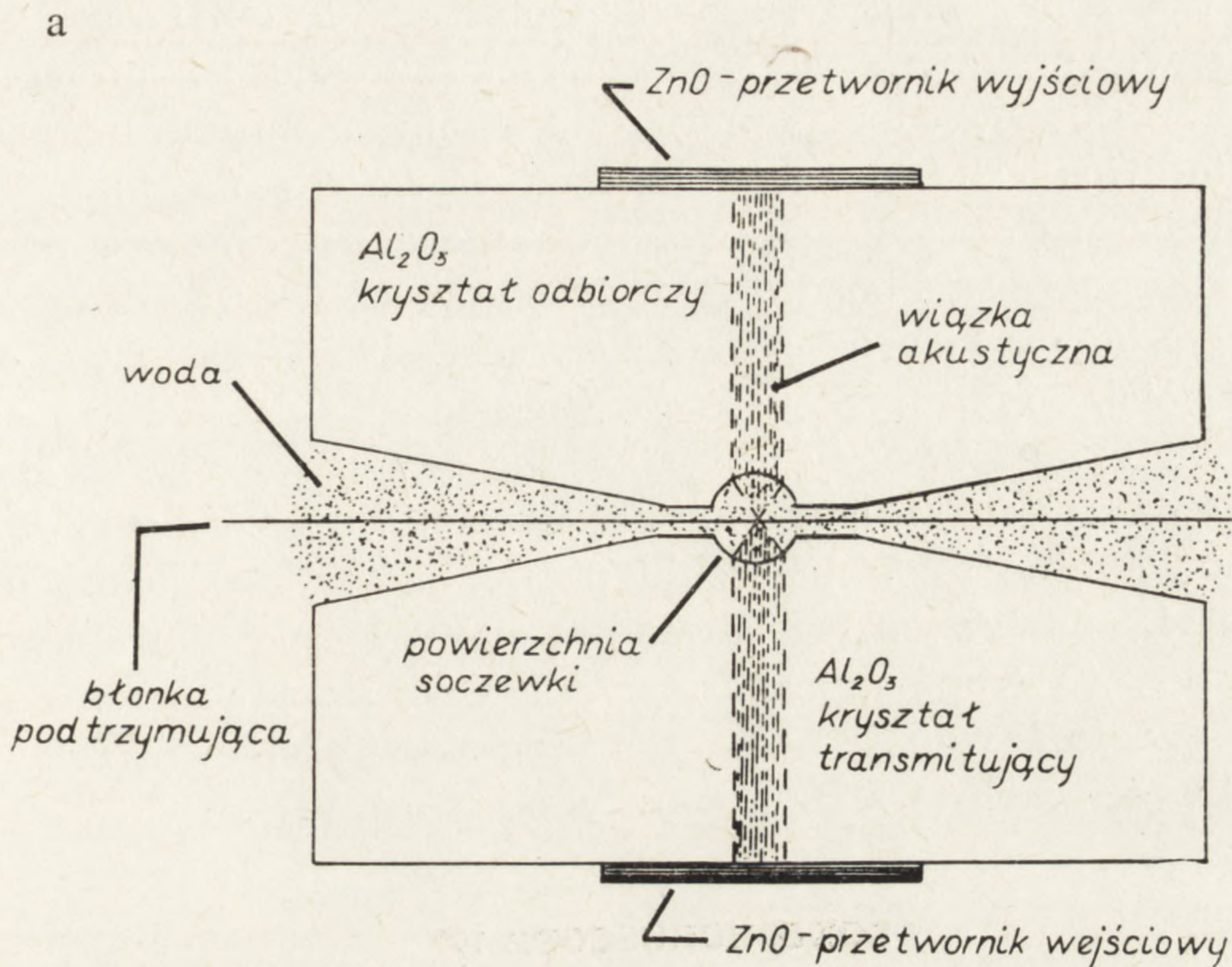
W latach sześćdziesiątych nastąpił zastój w dziedzinie konstrukcji mikroskopów akustycznych, spowodowany brakiem odpowiednio rozwiniętej technologii wytwarzania fal akustycznych o wysokich częstotliwościach. Niezbędne było wyprodukowanie przetworników, które mogły wystarczająco efektywnie przetwarzać energię elektromagnetyczną w akustyczną.

Z początkiem 1973 r. postęp w dziedzinie mikroskopii akustycznej osiągnął punkt, w którym możliwe było rejestrowanie obrazów ze zdolnością rozdzielczą rzędu 10-20 μm . Osiągnięcia z tego okresu zostały szczegółowo przedstawione w pracy przeglądowej Kesslera [15].

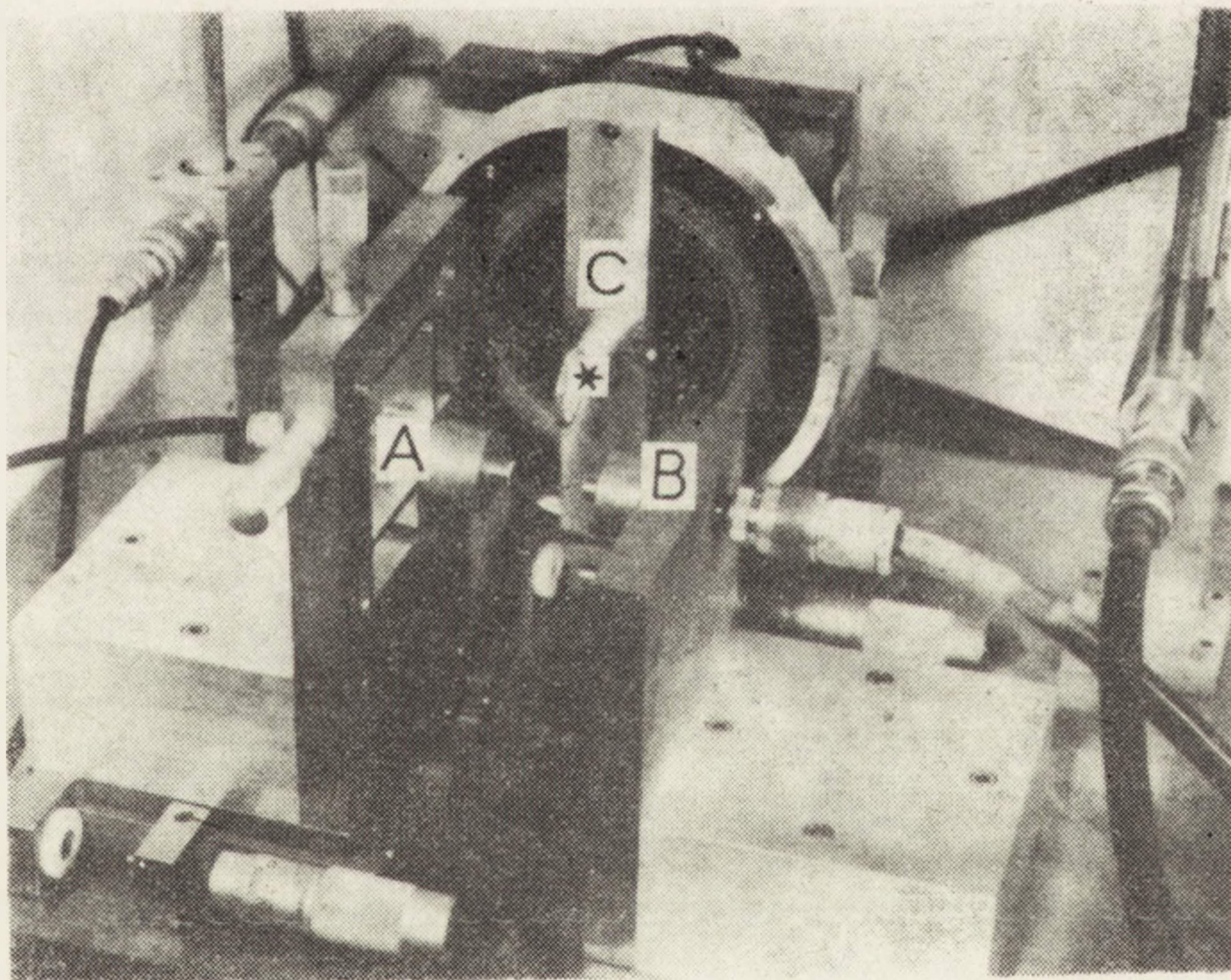
Chciałbym teraz przedstawić dwie konstrukcje, które wydają się być najbardziej użyteczne dla badań biologicznych. Są to skanujący mikroskop akustyczny i SONOMICROSCOPE 100; dokładniejszy przegląd innych ostatnio skonstruowanych mikroskopów akustycznych daje Korpel [22].

SKANUJĄCY MIKROSKOP AKUSTYCZNY

Mikroskop ten skonstruowany przez grupę naukowców z Uniwersytetu Stanforda w Palo Alto pod kierunkiem prof. Calvin'a F. Quate przedstawiony jest schematycznie na rys. 3. Rys. 3a ilustruje zasadniczą część mikroskopu, a mianowicie układ soczewek akustycznych. Soczewka akustyczna składa się z pojedynczej powierzchni sferycznej oddzielającej dwa środowiska o różnych szybkościach rozchodzenia się fali akustycznej — w tym przypadku są nimi szafir i woda. Duża różnica w szybkości rozchodzenia się fali akustycznej w szafirze i wodzie minimalizuje aberrację sferyczną. Fala akustyczna o częstotliwości 500-1000 MHz, generowana przez przetwornik piezoelektryczny umieszczony na kryształach transmitującym, jest ogniskowana na błoncie podtrzymującej badany obiekt. Częściowo jest ona odbijana lub rozpraszana przez obiekt umieszczony na błoncie, część jest przez obiekt absorbowana, a część transmitowana jest dalej. Po przejściu przez obiekt tworząca się fala sferyczna trafia na



b



Rys. 3. (a) układ soczewek skanującego mikroskopu akustycznego, (b) widok mechanicznego zespołu mikroskopu akustycznego: A — kryształ transmitujący, B — kryształ odbiorczy, C — mechaniczny zespół skanowania, ★ — pierścień z błoną podtrzymującą [27]

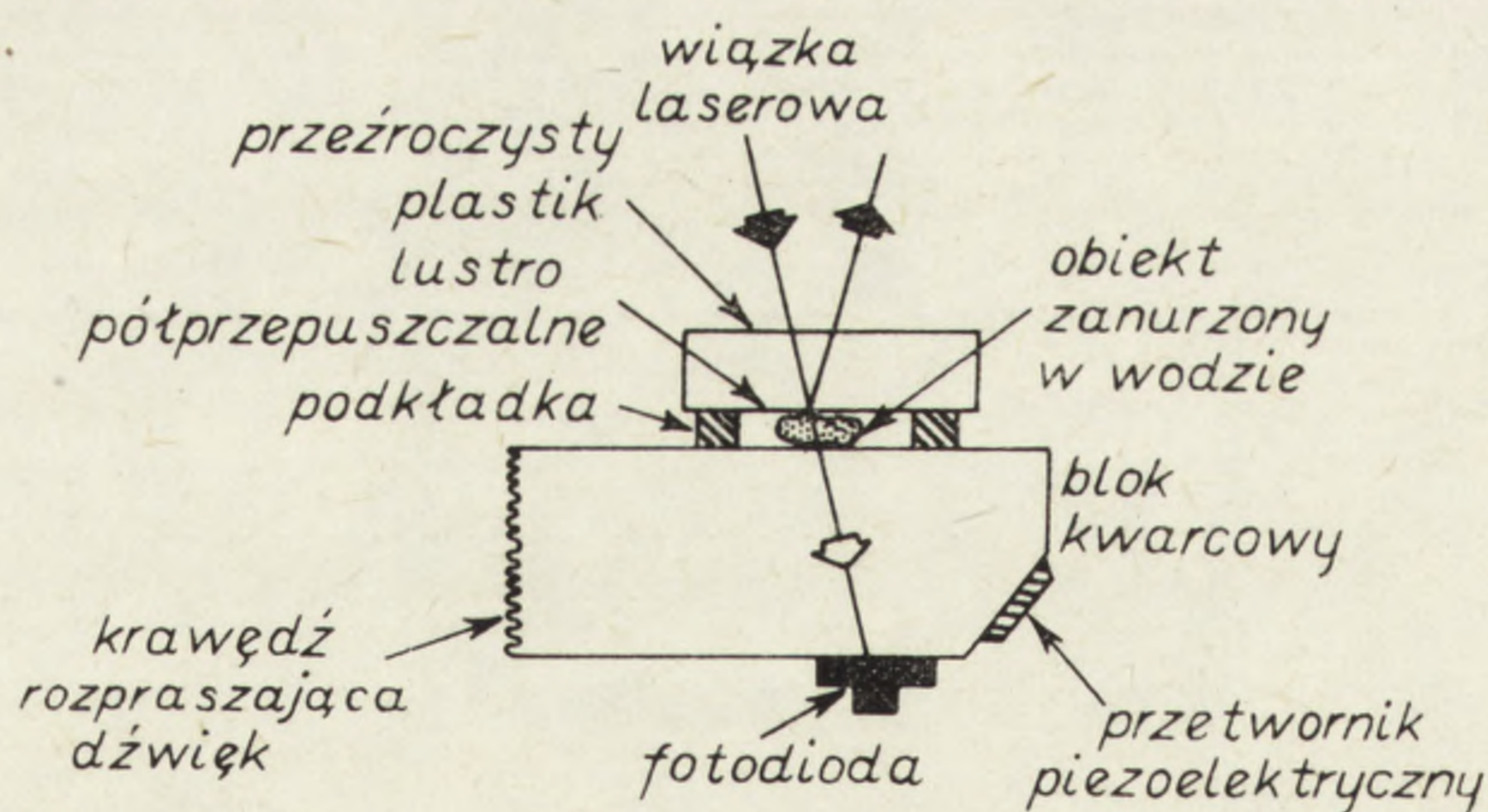
soczewkę zbierającą i poprzez kryształ odbierający dociera do drugiego przetwornika piezoelektrycznego. Sygnał generowany przez ten przetwornik, po wzmocnieniu i oczyszczeniu, służy do modulowania jasności wyświetlania na monitorze. Aby otrzymać dwuwymiarowy obraz, obiekt wraz z błoną podtrzymującą przesuwany jest w płaszczyźnie prostopadłej do osi soczewek za pomocą mechanicznego systemu skanującego (rys. 3b), przy czym odchylenie wiązki elektronowej monitora zsynchron-

nizowane jest z mechanicznym ruchem obiektu. W ten sposób stopień absorpcji dźwięku przez każdy punkt obiektu uwidoczniany jest przez stopień jasności odpowiedniego punktu na ekranie monitora. Przy używanych częstotliwościach tłumienie dźwięku w wodzie otaczającej obiekt jest tak duże, że rozproszone promieniowanie akustyczne nie powoduje spadku jakości obrazu. Ponadto fakt, że obie soczewki akustyczne mają wspólne ognisko (w którym umieszczony jest obiekt) powoduje ograniczenie transmisji do fali wychodzącej z ogniska.

Na rys. 3b przedstawiony jest mikroskop skanujący. Dla uwidocznienia pierścienia z błoną podtrzymującą obiekt (Mylar o grubości $2\ \mu\text{m}$) soczewki akustyczne są w położeniu pozwalającym na zmianę obiektu (rozsunięte). Do obserwacji przesuwane są one w stronę centralnego pierścienia za pomocą śruby mikrometrycznej. Czas skanowania maksymalnego pola widzenia wynosi około 1 s. Zdolność rozdzielcza przy pracy na częstotliwości około 1 MHz wynosi około $1\ \mu\text{m}$ [27].

SONOMICROSCOPE 100

Zasada działania tego mikroskopu oparta jest na technice wizualizacji powierzchniowych fal akustycznych [1]. Mikroskop został przedstawiony na początku lat siedemdziesiątych przez grupę pracowników Zenith Radio Co. w Chicago [23, 24], a obecnie dalsze prace nad ulepszeniem tej konstrukcji prowadzone są w Sonoscan Inc. (Bensenville) pod kierownictwem dra Lawrence W. Kesslera. Najistotniejszą częścią tego mikroskopu jest zespół przedmiotowy [17, 18], przedstawiony schematycznie na rys. 4.



Rys. 4. Zespół przedmiotowy (komórka dźwiękowa) SONOMICROSCOPE 100 [18]

Obiekt umieszczony jest na stoliku kwarcowym i przykrywany częściowo posrebrzonym, plastycznym szkiełkiem nakrywkowym. Fala akustyczna wytwarzana przez przetwornik piezoelektryczny dociera przez blok kwarcowy do obiektu i następnie, niosąc już informację o nim, uderza

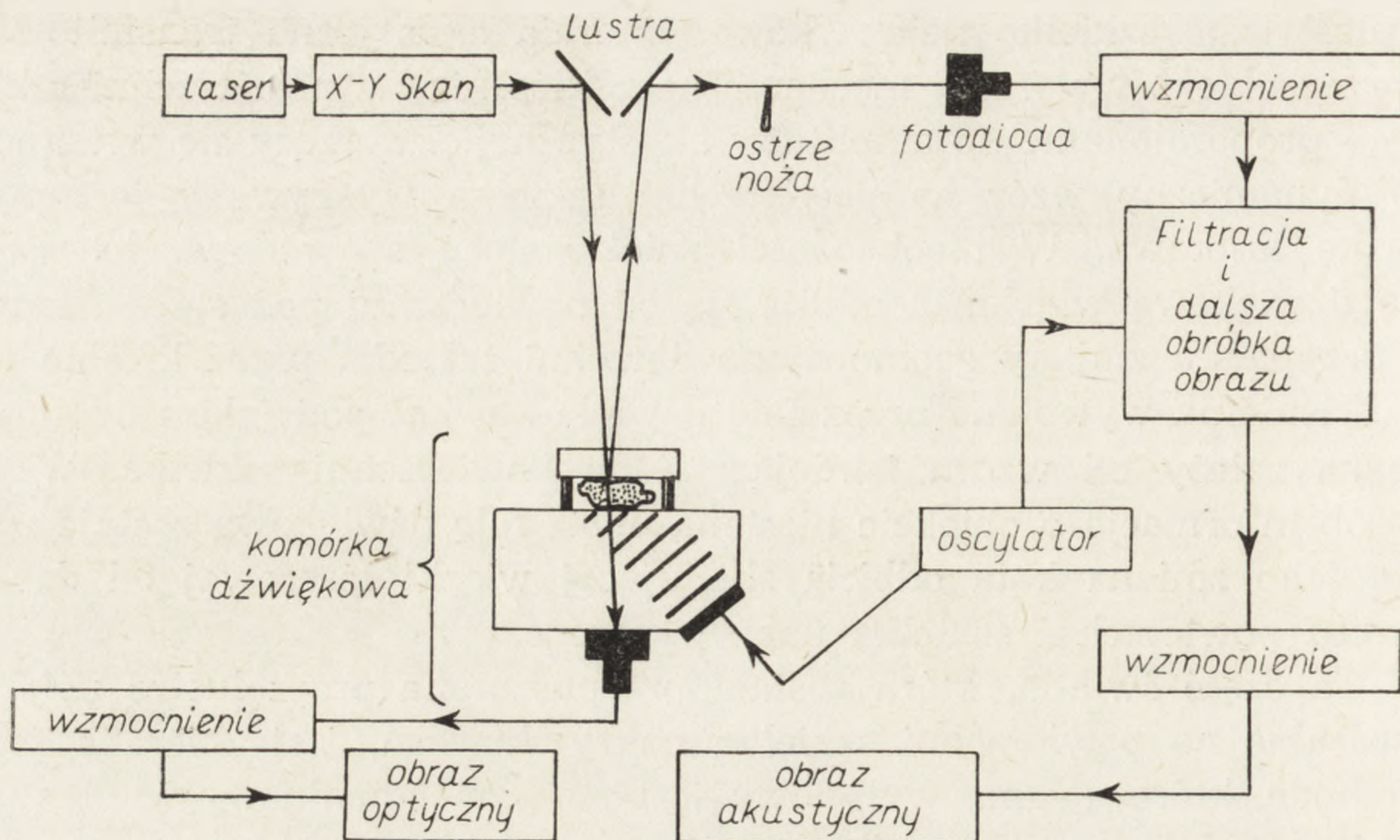
w plastyczne szkiełko nakrywkowe. Energia akustyczna transmitowana poprzez obiekt wytwarza mechaniczne zakłócenia na powierzchni szkiełka — proporcjonalne do amplitudy akustycznej. Tworzący się w ten sposób dynamiczny wzór na powierzchni szkiełka wykrywany jest przez wiązkę laserową. W nieobecności zniekształceń spowodowanych przez falę dźwiękową wiązka ta odbija się od powierzchni pod stałym kątem. W przypadku zmiany geometrii powierzchni szkiełka przez lokalne różnice ciśnienia wywołane przez falę dźwiękową, kąt pod jakim odbija się wiązka zależy od wzoru istniejącego na powierzchni szkiełka. W ten sposób informacja o obiekcie niesiona przez falę dźwiękową zostaje zapisana jako zmiana kąta odbicia skanującej wiązki laserowej od danego punktu powierzchni szkiełka nakrywkowego.

Ta część światła, która została przepuszczona przez lustro półprzezpuszczalne na powierzchni szkiełka nakrywkowego, jest zbierana przez fotodiodę, której sygnał wyjściowy jest po wzmacnieniu wyświetlany na monitorze, dając w ten sposób obraz optyczny.

Odbite od powierzchni szkiełka nakrywkowego, modulowane kątowno światło kierowane jest na ostrze noża, na którym modulacja kątowna zamieniana jest na modulację intensywności. Mianowicie, nóż umieszczony jest tak, że — przy nieobecności repliki obiektu na powierzchni szkiełka nakrywkowego — krawędź jego ostrza zasłania połowę odbitej wiązki, a ponieważ na krawędź tę rzutowany jest obraz źrenicy deflektora, położenie wiązki względem ostrza noża nie zależy od kąta skanowania, a jedynie od kąta odbicia od lustra na powierzchni szkiełka. Światło z ostrza noża zbierane jest przez fotodiodę, tak że sygnał przekazywany dalej do wzmacniacza jest proporcjonalny do kątownego przemieszczenia wiązki, a zatem i do lokalnej amplitudy akustycznej. W ten sposób wiązka laserowa działa jako mikrofon o dużej zdolności rozdzielczej.

Po wzmacnieniu i dalszej obróbce sygnał elektryczny przekazywany jest na monitor. Aby umożliwić pracę w czasie rzeczywistym, wiązka laserowa skanuje pole widzenia synchronicznie z wiązką elektronową monitora, w związku z czym czas skanowania pola widzenia wynosi $1/30$ s. Schemat blokowy całego urządzenia przedstawiony jest na rys. 5.

W celu uzyskania ostrego obrazu obiektu musi być on umieszczony względnie blisko szkiełka nakrywkowego. Jednakże nie zawsze jest to możliwe. W przypadku badania większych obiektów — duża ich część znajduje się poza ostrością. W takich sytuacjach możliwe jest zastosowanie holograficznej techniki rejestracji przez notowanie fazy sygnału za pomocą symulowanej elektronicznie wiązki odniesienia [18]. W zależności od charakteru badanego obiektu, żadaną gęstość prążków otrzymuje się przez zmianę kąta padania elektronicznie symulowanej wiązki odniesienia w stosunku do normalnej [19]. Zdolność rozdzielcza przedstawionego

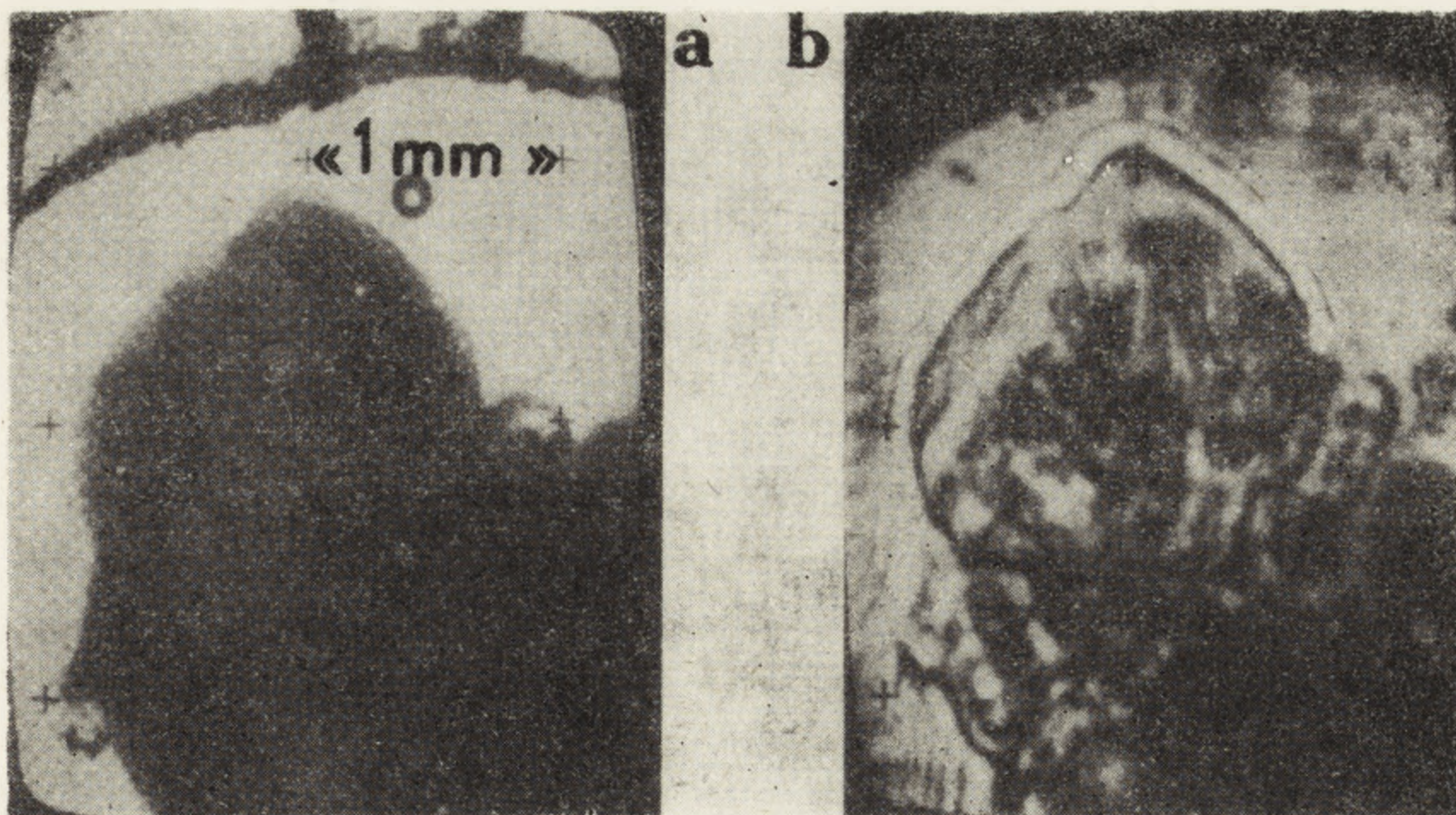


Rys. 5. Schemat blokowy SONOMICROSCOPE 100 ([18], zmienione)

mikroskopu wynosi około $20\ \mu\text{m}$ przy częstotliwości 100 MHz, około $10\ \mu\text{m}$ przy 220 MHz, a po przystosowaniu do pracy na częstotliwości 1 GHz prawdopodobnie wynosić będzie około $1,5\ \mu\text{m}$ [24].

ZASTOSOWANIA MIKROSKOPII AKUSTYCZNEJ W BADANIACH BIOLOGICZNYCH

A. *Badania makroobektów.* Mikroskop akustyczny wydaje się być doskonałym narzędziem do badania nieprzeźroczystych makroobektów [14]. Przykładem jest tu zastosowanie SONOMICROSCOPE 100 do badań anatomii larwy *Drosophila melanogaster* [15, 17, 18]. Anatomia *D. melanogaster* jest dość dobrze poznana, jednakże w czasie wzrostu larwy w zasadzie nie można otrzymać wyraźnych obrazów jej wnętrza. Za pomocą mikroskopu akustycznego udało się jednak takie obrazy uzyskać i z otrzymanych hologramów obliczyć prędkość dźwięku w poszczególnych organach, co pozwala na określenie ich własności mechanicznych [15]. Mikroskop akustyczny pozwala uwidocznnić mikroanatomię całych, niebarwionych zarodków mysich [30] i kurzych [2]. Wizualizacja przemian zachodzących w zarodkach w czasie ich rozwoju stanowić będzie z pewnością przedmiot zainteresowania embriologów, tym bardziej, że wstępne próby wypadły nadszpiewanie pomyślnie. Warto wspomnieć o fakcie, że powiodły się próby utrzymania narządów *in vitro* „na stoliku” mikroskopu akustycznego. Przykładem tego jest praca Eggletona i Kesslera [5] na izolowanym sercu zarodka myszy (rys. 6). Równoczesna optyczna i akustyczna

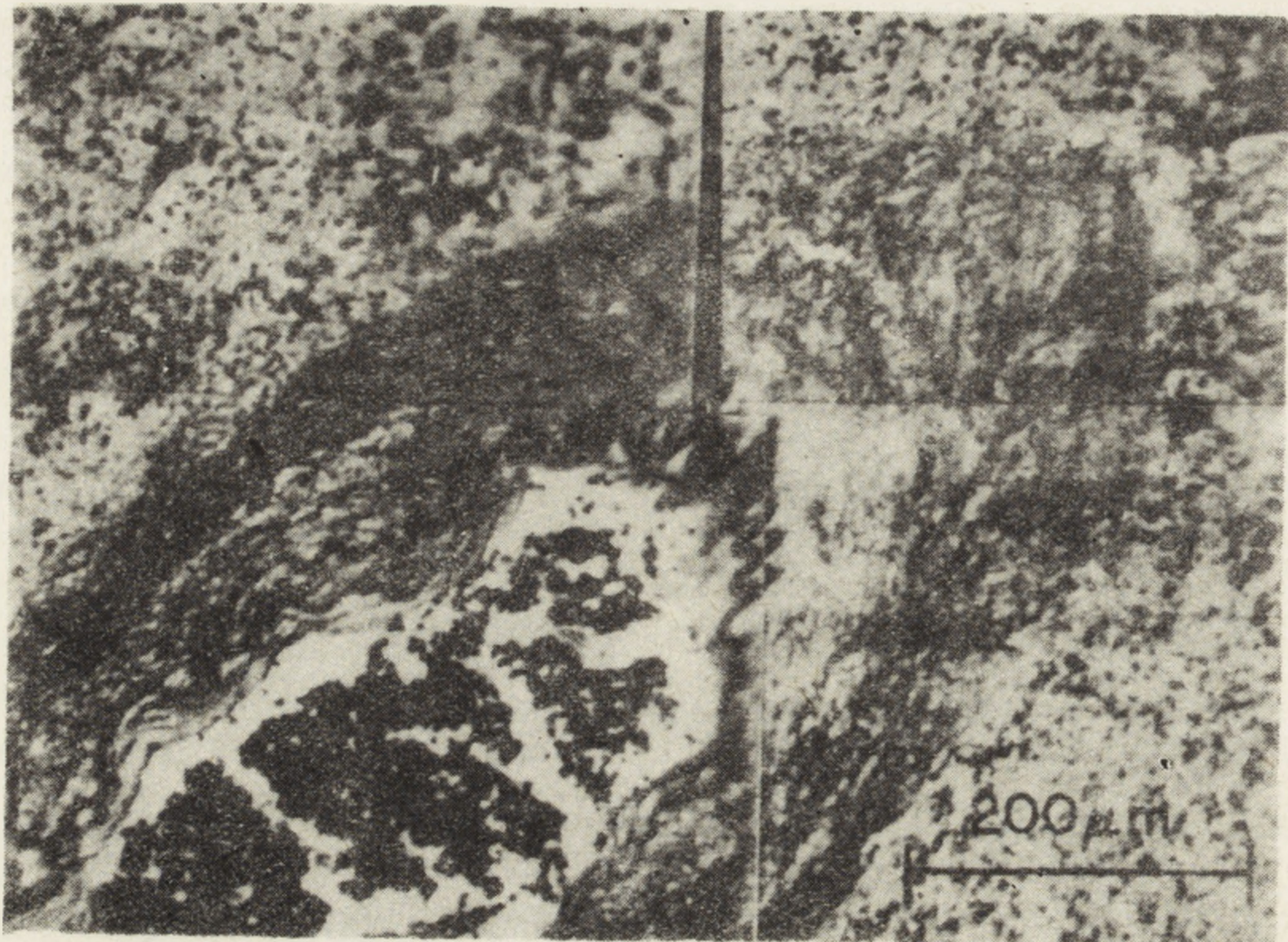


Rys. 6. Optyczny (a) i akustyczny (b) obraz serca zarodka myszy utrzymywanego w hodowli narządowej. Obraz akustyczny zarejestrowany przy częstotliwości 100 MHz ze zdolnością rozdzielczą około 20 μm . Odległość między krzyżykami oznacza 1 mm [5]

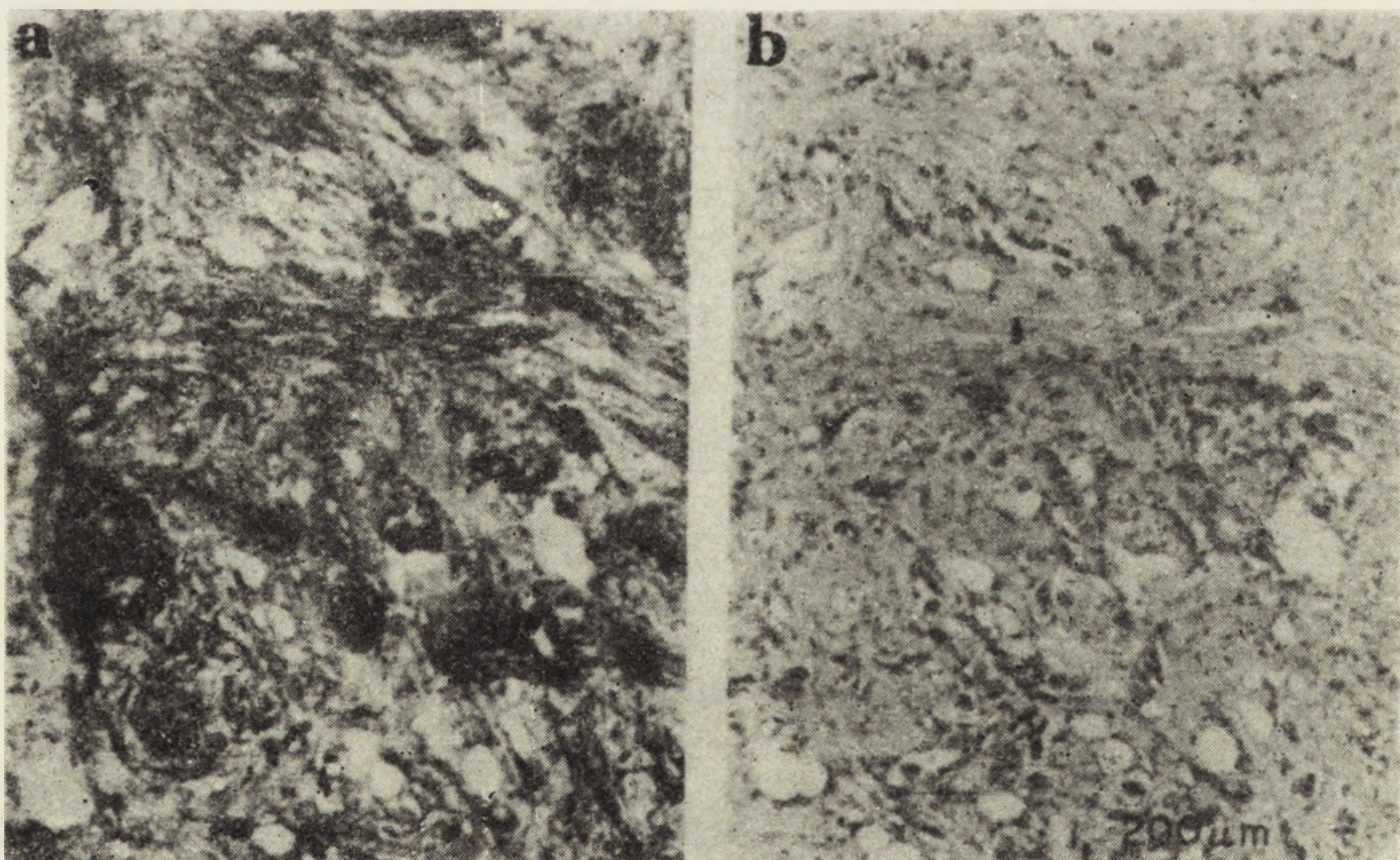
obserwacja pracy tego narządu pozwala na analizę zachodzących w nim zjawisk skurczowych.

B. Sonohistologia. Sonohistologią można nazwać próby rozróżniania i charakterystyki tkanek na poziomie mikroskopowym z punktu widzenia ich własności akustycznych. Jednym z pierwszych opisów sonohistologicznych był opis skrawka zęba ludzkiego (w przekroju podłużnym, grubość skrawka około 200 μm) [15]. Otrzymany obraz akustyczny wskazuje m. in. na niejednorodność (z mechanicznego punktu widzenia) szkliwa w odróżnieniu od jednorodnej dentyny. W tym samym czasie ukazał się także opis skrawków nerki mysiej widzianych w mikroskopie akustycznym [20].

W 1975 r. Lemons i Quate przedstawili akustyczne obrazy różnych tkanek otrzymane za pomocą skanującego mikroskopu akustycznego. Część obrazów uzyskana była przy częstotliwości 900 MHz, co daje zdolność rozdzielczą około 1 μm . Był to duży krok naprzód w kierunku osiągnięcia parametrów zadowolających biologów posługujących się mikroskopią. Otrzymane obrazy charakteryzują się dużą kontrastowością mimo braku jakiegokolwiek barwienia. Struktury odznaczające się wysokim tłumieniem dźwięku, jak np. ściany naczyń krwionośnych (rys. 7), dają charakterystyczne, bardzo ciemne obrazy. Autorzy dokonali także bardzo ciekawego porównania między optycznym a akustycznym obrazem tkanki rakowatej. Po zarejestrowaniu obrazu akustycznego ten sam preparat zabarwiony został hematoksyliną-eozyną. Centralna część obrazu akustycz-



Rys. 7. Skośny przekrój przez małe naczynie w tkance śledziony. Wewnątrz naczyń widoczne są gęsto upakowane erytrocyty; doskonale widoczna budowa ścianki naczyń. Częstotliwość 600 MHz; zdolność rozdzielcza około 2 μm [25]

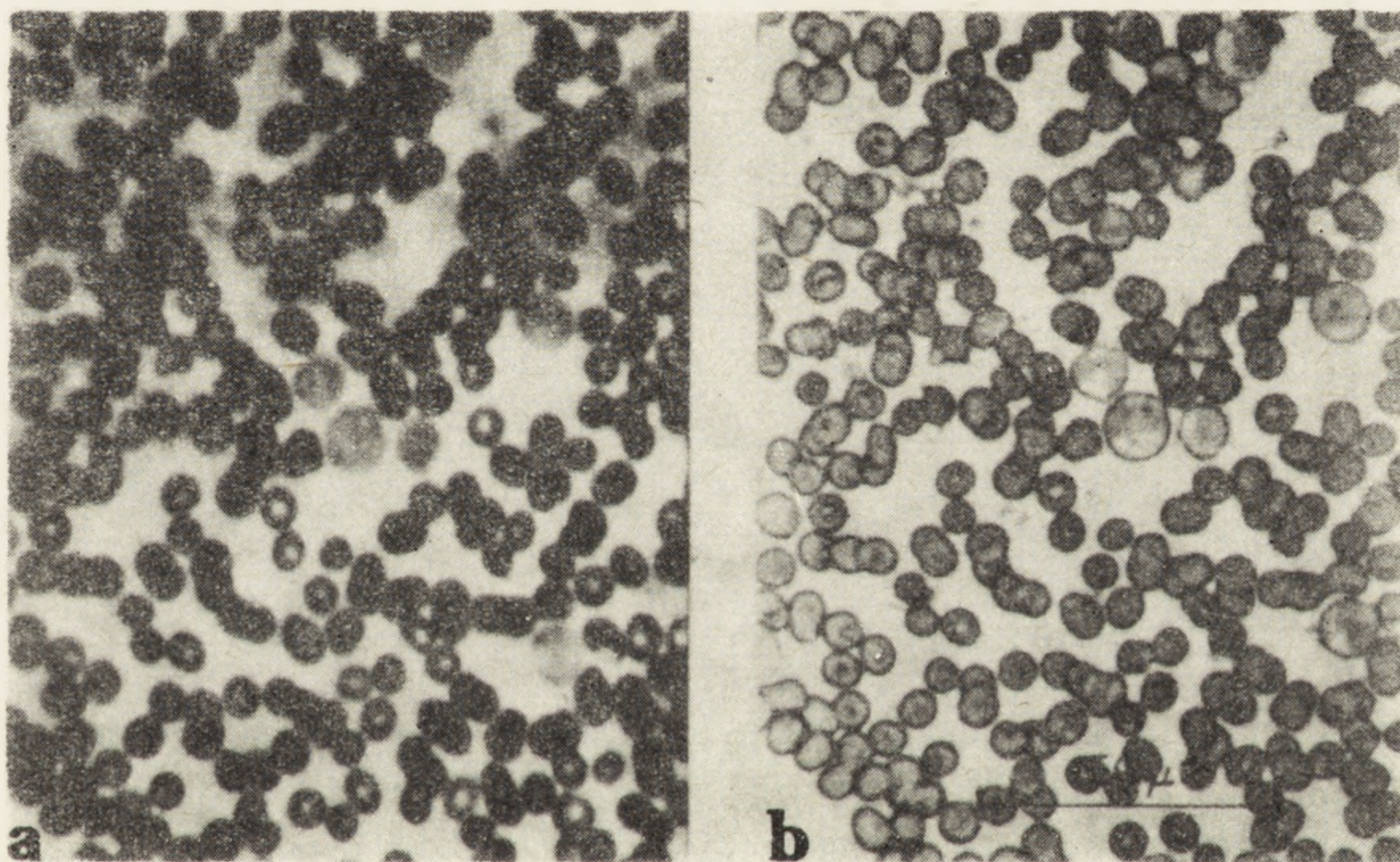


Rys. 8. Porównanie akustycznego (a) i optycznego (b) obrazu tkanki raka. Dokładniejszy opis w tekście. Częstotliwość 600 MHz; zdolność rozdzielcza około 2 μm [25]

nego (rys. 8a) wykazuje wysokie tłumienie dźwięku w tkance, prawdopodobnie dzięki dużej zawartości kolagenu, podczas gdy rejon ten na obrazie optycznym (rys. 8b) jest o wiele trudniejszy do zlokalizowania.

C. Sonocytologia. Skonstruowane do tej pory mikroskopy akustyczne nie mogą pod względem zdolności rozdzielczej konkurować z mikroskopami optycznymi — należy jednak żywić nadzieję, że szybki postęp techniczny w tej dziedzinie umożliwi rejestrację obrazów ze zdolnością rozdzielczą taką samą, a być może nawet większą niż w mikroskopii optycznej.

Optyczny i akustyczny obraz elementów upostaciowanych krwi — akustyczny otrzymany przy częstotliwości 900 MHz, ze zdolnością rozdzielczą zbliżoną do 1 μm — przedstawiony jest na rys. 9. Zdecydowane



Rys. 9. Porównanie akustycznego (a) i optycznego (b) obrazu elementów morfotycznych krwi. Częstotliwość 900 MHz; zdolność rozdzielcza około 1 μm [25]

zaczernienie erytrocytów na obrazach akustycznych jest wynikiem silnej absorpcji dźwięku przez hemoglobinę. Daje się zauważyć wyraźna różnica między granulocytami (nieco większe i dużo jaśniejsze niż otaczające je erytrocyty) a erytrocytami. Akustyczne kontrastowanie dzięki obecności hemoglobiny to przykład możliwości badań cytologicznych na podstawie różnic we własnościach mechanicznych na poziomie molekularnym [25].

Wydaje się, że mikroskopia akustyczna stworzy nowe możliwości badania komórek. Problemy związane z reologicznymi własnościami komórek stanowią przedmiot zainteresowania biologów od szeregu lat ([7],

patrz także dyskusja dotycząca ciśnienia wewnątrzkomórkowego i elastyczności składników komórki — Mela [28], Hiramoto [9]; Doerner [3], Hiramoto [10], Mela [29]). Poznanie takich parametrów jak lepkość czy elastyczność poszczególnych części komórki i prześledzenie ich zmian w cyklu komórkowym będzie niezmiernie istotne dla badań podziału, różnicowania czy ruchu komórki. Szereg zagadek związanych z ruchem ameboidalnym czy płynięciem cytoplazmy da się z pewnością rozwiązać przy znajomości mechanicznych własności cytoplazmy. O randze i złożoności tych problemów świadczy fakt, że — mimo licznych prób określenia reologicznych własności cytoplazmy [6, 8, 11] — ani mechaniczne własności powierzchni komórek, ani mechaniczne własności cytoplazmy, ani też mechanizmy ruchu komórkowego nie zostały wyjaśnione [21, 36].

Ciekawą próbę określenia mechanicznych własności cytoplazmy *Amoeba proteus* podjęli Lemons i Quate [26]. Żywe ameby, umieszczone w komorze utworzonej przez dwie błonki podtrzymujące, obserwowane były w skanującym mikroskopie akustycznym pracującym na częstotliwości 496 MHz (zdolność rozdzielcza około 2 μm). Aczkolwiek autorzy ci zaobserwowali obszary silnie absorbujące dźwięk, które poruszały się wraz z prądem cytoplazmatycznym, nie byli zdolni do ilościowego interpretowania obrazu ze względu na brak kontroli geometrii obiektu.

PERSPEKTYWY

Można przypuszczać, że mimo iż mikroskopia akustyczna jest na bardzo wczesnym etapie rozwoju, rysują się przed nią szerokie perspektywy zastosowań biologicznych. Porównanie opisanych mikroskopów, skonstruowanego w Palo Alto i skonstruowanego w Chicago, nie daje podstaw do jednoznacznego stwierdzenia wyższości jednego aparatu nad drugim. Mikroskop skanujący daje obrazy o większej zdolności rozdzielczej, jednakże technika montowania preparatów na błonce podtrzymującej jest kłopotliwa i mocno ograniczająca stosowanie tego mikroskopu do badań żywych obiektów o niewielkiej adhezywności. Jedynym ratunkiem jest w tej sytuacji umieszczanie ich między dwiema błonkami — co jeszcze bardziej utrudnia preparatykę, zmianę obiektu itd. Poważnym ograniczeniem jest tu także system skanowania mechanicznego, który uniemożliwia pracę w czasie rzeczywistym. Problemów tych nie stwarza SONOMICROSCOPE 100, który z kolei (w wersji handlowej) umożliwia rejestrację z maksymalną zdolnością rozdzielczą wynoszącą jedynie około 20 μm .

Należy jednak wierzyć oświadczeniom konstruktorów [16, 33], którzy

twierdzą, że można oczekiwać szybkiego ulepszenia obu mikroskopów, gdyż stanowią one jedynie początek generacji mikroskopów akustycznych. Nie ulega natomiast wątpliwości, że sama technika mikroskopii akustycznej pozwoli na nowe spojrzenie na niektóre problemy biologiczne.

LITERATURA

- [1] ADLER R., KORPEL A., DESMARES P., An instrument for making surface waves visible, *IEEE Trans. Sonic Ultrason.*, **SU-15**: 157—161, 1968.
- [2] AHMED M., KESSLER L. W., Microanatomy of a histologically unstained embryo as revealed by acoustic microscopy, *Acoustical Holography*, **6**: 319—325, 1975.
- [3] DOERNER K., Cellular pressure and protoplasmic elasticity, *Biorheology*, **10**: 75, 1973.
- [4] DUNN F., FRY W. J., Ultrasonic absorption microscope, *J. Acoust. Soc. Am.*, **31**: 632—633, 1959.
- [5] EGGLETON R. C., KESSLER L. W., Mouse embryo heart in organ culture visualized by the acoustic microscope, *Ultrasound in Medicine*, **1**: 537—542, 1975.
- [6] FRANCIS D. W., ALLEN R. D., Induced birefringence as evidence of endoplasmic viscoelasticity in *Chaos caroliniensis*, *J. Mechanochem. Cell Motility*, **1**: 1—6, 1971.
- [7] FREY-WYSSLING A., *Submicroscopic morphology of protoplasm*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1953.
- [8] HEILBRUNN L. V., *The dynamics of living protoplasm*, Acad. Press., New York 1956.
- [9] HIRAMOTO Y., List do redakcji, *Biorheology*, **8**: 105—106, 1971.
- [10] — List do redakcji, *Biorheology*, **10**: 75—76, 1973.
- [11] KAMIYA N., KURODA K., Dynamics of cytoplasmic streaming in a plant cell, *Biorheology*, **10**: 179—187, 1973.
- [12] KELLY E., *Ultrasound energy: biological investigations and medical applications*, University Illinois Press, Urbana 1965.
- [13] KESSLER L. W., VHF ultrasonic attenuation in mammalian tissue, *J. Acoust. Soc. Am.*, **53**: 1759—1760, 1973.
- [14] — High resolution visualization of tissue with acoustic microscopy, [w] *Ultrasonics in Medicine*, red. M. de Vlieger, D. N. White i V. R. McCready, *Excerpta Medica*. Amsterdam 1973, 248—256.
- [15] — Review of progress and applications in acoustic microscopy, *J. Acoust. Soc. Am.*, **55**: 909—918, 1974.
- [16] — Prezentacja możliwości SONOMICROSCOPE 100, George Washington University. Washington D. C. 28 lipca 1976.
- [17] KESSLER L. W., KORPEL A., PALERMO P. R., Simultaneous acoustic and optical microscopy of biological specimens, *Nature*, **239**: 111—112, 1972.
- [18] — Practical high resolution acoustic microscopy, *Acoustical Holography*, **4**: 51—71, 1972.

- [19] — Recent developments with the scanning laser acoustic microscope, *Acoustical Holography*, 5, 15—23, 1974.
- [20] KESSLER L. W., FIELDS S. I., DUNN F., Acoustic microscopy of mammalian kidney, *J. Clinical Ultrasound*, 2: 317—320, 1974.
- [21] KOMNICK K., STOCKEM W., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and amoeboid movement, *Int. Rev. Cyt.*, 34: 169—249, 1973.
- [22] KORPEL A., Acoustic microscopy, [w] *Ultrasonic imaging and holography*, red. G. W. Stroke, W. E. Kock, Y. Kikuchi, J. Tsujiuchi, Plenum Press, New York 1974, 345—362.
- [23] KORPEL A., KESSLER L. W., PALERMO P. R., An acoustic microscope operating at 100 MHz, *Nature*, 232: 110—111, 1971.
- [24] KORPEL A., KESSLER L. W., Comparison of methods of acoustic microscopy, *Acoustical Holography*, 3: 23—43, 1971.
- [25] LEMONS R. A., QUATE C. F., Acoustic microscopy: biomedical applications, *Science*, 188: 905—911, 1975.
- [26] — Acoustic microscopy — a tool for medical and biological research, *Acoustical Holography*, 6: 305—317, 1975.
- [27] — Advances in mechanically scanned acoustic microscopy, Stanford University, W. W. Hansen Laboratories of Physics, M. L. Report 2453, 1975.
- [28] MELA M. J., Some remarks about membrane elasticity, *Biorheology*, 8: 105, 1971.
- [29] — List do redakcji, *Biorheology*, 10: 76—77, 1973.
- [30] O'BRIEN W. D., KESSLER L. W., Examination of mouse embryological development with an acoustic microscope, *Am. Zoologist*, 15: 807, 1975.
- [31] PAWLUCZYK R., Mikroskopia holograficzna, *Post. Fiz.*, 22: 105—121, 1971.
- [32] PLUTA M., Mikroskopia fazowo-kontrastowa i interferencyjna, PWN, Warszawa 1965.
- [33] QUATE C. F., Prezentacja możliwości skanującego mikroskopu akustycznego, George Washington University. Washington D. C. 28 lipca 1976.
- [34] SOKOŁOW S. J., Patent nr 49426. ZSRR, 31 sierpnia 1936.
- [35] — Ultrazwukowej mikroskop, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, 64: 333—335, 1949.
- [36] WOLPERT L., GINGELL D., Cell surface membrane and amoeboid movement, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 22: 169—198, 1968.

Otrzymano: 20 czerwca 1977.

Przyjęto: 28 czerwca 1977.

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

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne, składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

SPIS TREŚCI

D. AMMERMANN, DNA jąder niektórych orzęsków	323
H. HÜBNER i A. K. KONONOWICZ, Postulowane mechanizmy powstawania wzorów prążkowych w chromosomach metafazowych	339
J. MICHALSKA, Struktura chromosomów metafazowych	371
J. KOPEĆ, Homeostaza naskórka	393
P. JANIK, Kinetyka i mechanizmy zmian w populacji komórkowej nowotworów o zatrzymanym wzroście lub zanikających w następstwie odczynów immunologicznych organizmu	405
M. OPAS, Możliwości zastosowań mikroskopii akustycznej w badaniach biologicznych	445