

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

**TOM 9-NR 3-4
1982 (347-502)**

Postępy Biologii Komórki

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, Antoni HORST, 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 518 + 92 egz. Ark. wyd. 12,25. Ark. druk. 9,75 + 1 wkl. kred. Papier druk. sat. III kl.,
80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania w czerwcu 1982 r. Podpisano do druku w grudniu
1982 r. Druk ukończono w grudniu 1982 r. Zam. 1194/82

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

STRUKTURA KOMÓREK MIĘŚNI GŁADKICH

STRUCTURE OF SMOOTH MYOCYTES

Leszek KORDYLEWSKI

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego,
Kraków

Streszczenie. W artykule przedstawiono obecny stan wiedzy o strukturze miocytów gładkich uzyskany z badań mikroskopowo-elektronowych, histologicznych, cyto-, histo- i immunohistochemicznych oraz biochemicznych. Omówiono poszczególne organelle komórkowe: jądro, sarkolemmę, kaweole, centriole, mikrotubule, mitochondria, siateczkę sarkoplazmatyczną, a przede wszystkim aparat kurczliwy: taśmy i ciała gęste oraz system miofilamentów i jego funkcjonowanie na zasadzie mechanizmu ślizgowego. Zróżnicowane połączenia międzykomórkowe (pośrednie, szczelinowe, przyleganie, aparaty końcowe) odgrywają rolę w strukturalnej i funkcjonalnej integracji mięśnia gładkiego. Udział materiału pozakomórkowego (błona podstawna, kolagen, elastyna) w organizacji mięśnia został również przedstawiony. Podobieństwa strukturalne miocytów gładkich do komórek budujących pozostałe rodzaje mięśni: szkieletowy i sercowy zostały wyeksponowane ze względu na fakt, iż mięsień gładki stanowi najstarszy filogenetycznie typ tkanki mięśniowej.

Summary. The present knowledge of the structure of smooth myocytes has been presented basing mainly on the electron-microscopic observations. Also histological, cyto-, histo- and immunohistochemical data have been used. The main organelles have been described: nucleus, sarcolemma, caveolae, centrioles, microtubules, mitochondria, sarcoplasmic reticulum, contractile apparatus — dense bands and bodies and their relation to the system of myofilaments, which is relevant for the sliding mechanism of contraction. The role of the extracellular material (basement membrane, collagen and elastin) has been discussed. Also intercellular connections (intermediate, simple appositions, nexuses, tapering apparatus) have been described in connection with their possible role in muscle integration. Structural similarities of the smooth muscle to the cardiac and skeletal muscles have been emphasized, since the smooth muscle is phylogenetically the oldest muscle tissue that the other types of muscle might have originated from.

WSTĘP

Wśród morfologów opisujących strukturę mięśni, mięsień gładki cieszy się daleko mniejszym zainteresowaniem aniżeli mięsień prążkowany szkieletowy lub sercowy. Uchodzi bowiem za materiał o wiele mniej efektowny, bardzo odmienny, a w „obróbce” i interpretacji o wiele trudniejszy niż pozostałe rodzaje mięśni. Stąd też istnieje wielka dysproporcja w ilości prac poświęconych morfologii mięśni gładkich w porównaniu do obfitości badań fizjologicznych i farmakologicznych prowadzonych na tym mięśniu. Ostatnie lata przyniosły jednak znaczny postęp w zrozumieniu struktury elementów budujących mięsień gładki dzięki zastosowaniu mikroskopii elektronowej, a w szczególności badań seryjnych ultraskrawków, zdjęć stereoskopowych z wysokonapięciowego mikroskopu elektronowego i zastosowaniu techniki przygotowywania preparatu nazywanej kriorytownictwem (freeze-fracture) [8,44,58].

W miarę poznawania szczegółów struktury miocytów gładkich możliwe jest wysuwanie coraz to dalej idących analogii strukturalnych i funkcjonalnych pomiędzy miocytem z mięśnia gładkiego a elementami komórkowymi mięśnia szkieletowego i sercowego. Niektóre z cech wspólnych i różnic zestawiono w tabeli 1. Dochodzimy do wniosku, że mięsień gładki nie jest aż tak odmienny od pozostałych, jak wynikałoby

TABELA 1

Podobieństwa i różnice struktury mięśni kręgowców

| Wyszczególnienie | Rodzaj mięśnia | | |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|---|
| | sercowy | szkieletowy | gładki |
| Miofilamenty | układ uporządkowany | układ uporządkowany | układ nieregularny |
| cienkie | obecne | obecne | obecne |
| grube | obecne | obecne | obecne |
| Filamenty pośrednie | obecne | obecne | obecne |
| Mechanizm ślizgowy skurczu | występuje | występuje | występuje |
| Miofibryle | obecne | obecne | brak, ale sarkoplazma podzielona na obszary o zróżnicowanej zawartości filamentów |
| Sarkomery | obecne | obecne | brak |
| Prążkowanie | obecne | obecne | brak |
| Linia Z | obecna | obecna | ciała gęste |
| T-system | obecny | obecny | kaweole (?) |
| Wstawka | obecna | brak | taśmy gęste (?) |
| Siateczka kompartmentująca wapń | obecna regularna | obecna regularna | obecna nieregularna |
| Połączenie szczelinowe — nekusus | obecny | nie obserwowano | obecny |

to z pobieżnej oceny obrazów histologicznych. Na uwagę zasługuje fakt, iż mięsień gładki stanowi najstarszy filogenetycznie rodzaj tkanki mięśniowej, z której wywodzić można pozostałe, doskonalsze: szkieletowy i sercowy. Wielka jednorodność morfologii elementów komórkowych mięśnia gładkiego — niezależnie od tego z jakiego narządu pochodzą: jelita, naczyń, macicy, nasieniowodu czy jajowodu — pozwala na opisanie zasadniczej struktury typowej komórki mięśnia gładkiego. Większość danych w niniejszym opracowaniu pochodzi jednak z obserwacji mięśniówki jelita [34–36, 45, 93].

KSZTAŁT I ROZMIARY MIOCYTÓW GŁADKICH

Komórki mięśni gładkich (miocyty) są jednojądrowe, wrzecionowate (ryc. 1–4 i 16). W stanie spoczynku ich przeciętna długość w jelicie cienkim świnki morskiej wynosi 500–700 μm , ale w czasie skurczu zmniejszyć się może ponad czterokrotnie [36]. W rozwoju osobniczym objętość komórki powiększa się; u osobników dorosłych wartość objętości komórek mięśniowych pozostaje zasadniczo na poziomie nie zmienionym, z tym że komórki mięśnia gładkiego zachowują zdolność do hipertrofii jako odpowiedzi na zmienione warunki fizjologiczne lub podlegają jej w warunkach patologicznych [33]. Przeciętna objętość komórki mięśniowej wynosi 3500 μm^3 [31, 63]. Rozmiary komórek mięśni gładkich nie dają się skorelować z rozmiarami ciała zwierzęcia. Nie ma też istotnych różnic w wielkościach komórek mięśniowych wśród różnych gatunków zwierząt [36]. Ze względu na swą małą objętość komórki mięśni gładkich wykazują wysoki stosunek powierzchni do masy. Powierzchnia przeciętnej komórki mięśniowej (z wyłączeniem kaweoli) wynosi nieco ponad 5000 μm^2 , co oznacza, że na 1 μ^3 objętości przypada około 1,5 μm^2 powierzchni komórki [36].

JĄDRO

Jądro znajduje się w centrum najszerszej części komórki (ryc. 2–4). Kształt jego jest wydłużony (ryc. 4, 6), długa oś pokrywa się z długą osią komórki. Przeciętne rozmiary jądra: 15–25 μm długości i 1–3 μm szerokości [33]. Kształt jądra zależy od stanu funkcjonalnego komórki. W komórkach obkurczonych jądro staje się pofałdowane lub spiralnie skrócone [9]. Na elektronogramach znajduje to wyraz w zafałdowaniach osłonki jądrowej (ryc. 6).

Ultrastruktura wnętrza jądra komórkowego miocytów gładkich nie wyróżnia się niczym szczególnym. Chromatyna jest rozmieszczona jedno-

rodnie, zwykle występują wyraźne jąderka (ryc. 4, 5), szczególnie w komórkach młodych [88]. Osłonka jądrowa ma wygląd typowy, jest wyposażona w pory [26, 93].

Godna uwagi jest zdolność zróżnicowanych, dojrzałych miocytów gładkich do podejmowania podziałów mitotycznych. Podziały te obserwowano u młodych zwierząt w okresie wzrostu, np. w żołądku mięśniowym kurczęcia [14], w aorcie prosiąt [55] oraz w hodowli tkanek [13], a także w warunkach eksperymentalnych w mięśni hipertroficznym [33].

BŁONA KOMÓRKOWA

W miocytach gładkich ilość błony komórkowej dostępnej do wymiany substancji z przestrzenią pozakomórkową jest dość znaczna. Na jeden gram tkanki przypada bowiem ok. 1 m² błony [36]. Wymiana jonowa poprzez błonę komórkową ma istotne znaczenie w regulacji procesów skurczu i rozkurczu komórki mięśniowej [3, 23, 93]. Błonę tę nazywa się też sarkolemma (ryc. 4). Na powierzchni komórki występują liczne modyfikacje błony w postaci połączeń międzykomórkowych lub połączeń z elementami substancji pozakomórkowej. Osobne zagadnienie stanowią specjalistyczne połączenia nerwowo-mięśniowe, których opis wykracza poza ramy niniejszego opracowania.

BŁONA PODSTAWNA

Na prawie całej powierzchni komórki mięśniowej jej błona komórkowa pokryta jest błoną podstawną. Wyposażenie w błonę podstawną jest z reguły obfite. Jej grubość w taśmie okrężnicy wynosi ok. 20 nm; w kapilarach jest 2–3 krotnie grubsza. Jedynie te części błony komórkowej, które wpuklają się budując kaweole oraz obszary błony zajęte przez połączenia międzykomórkowe, określane jako neksusy, nie są pokryte błoną podstawną. Ze względu na stosunkowo małe rozmiary komórek mięśni gładkich i związany z tym wysoki stosunek powierzchni do masy, w tkance mięśnia gładkiego znajdują się duże ilości materiału błony podstawnej. Szacuje się, iż w taśmie okrężnicy świnki morskiej każdy gram tkanki zawiera 10 000 cm² błony komórkowej pokrytej błoną podstawną [34]. Błona podstawna mocno przylega do powierzchni komórki; oddziela się od niej jedynie w pewnych stanach patologicznych. Pomiedzy błoną podstawną a błoną komórkową występuje zawsze jasna przestrzeń o szerokości ok. 10 nm (lamina lucida). Przestrzeń ta wypełniona jest zapewne mukopolisacharydami, które wnikają do samej błony podstawnej. Mukopolisacharydy niewąt-

pliwie występują w substancji międzykomórkowej mięśni gładkich, ale ich lokalizacja nie jest jednoznaczna [34].

Błona podstawna wykazuje zagęszczenia nad obszarami cytoplazmy zajętej przez taśmy gęste. Odwrotnie, ponad rejonami kaweoli błona podstawna wykazuje mniej gęstą strukturę [34]. W przekrojach stycznych do powierzchni komórki w błonie podstawnej stwierdza się obecność delikatnej siatki zbudowanej z mikrowłókienek (mikrofibryli) o średnicy 5–10 nm [34, 39].

MATERIAŁ POZAKOMÓRKOWY

Zawartość kolagenu w mięśniach gładkich jest znacznie wyższa niż w mięśniach szkieletowych. Gabella [32] podaje, że ilość kolagenu w taśmie okrężnicy (wyznaczona na podstawie określania ilości hydroksyproliny) jest ponad trzykrotnie większa niż w mięśniu krawieckim (m. sartorius). W hodowli tkanek wykazano, że kolagen może być wytwarzany przez same miocyty gładkie [78]. Podobnie odkładanie kolagenu przez komórki mięśniowe gładkie obserwowano w rosnących naczyniach krwionośnych [79] i w mięśniu gładkim podlegającym hipertrofii [39]. Za syntezą kolagenu przez miocyty przemawia również kompletny brak fibroblastów wśród komórek mięśni gładkich, które mimo tego obficie otoczone są kolagenem.

Kolagen występuje głównie w postaci włókien, lecz jest on również składnikiem mikrowłókienek (mikrofibryli) i samej błony podstawnej. Fakt ten wykazano co prawda w innych tkankach, ale wydaje się że odnosi się to również do komórek mięśni gładkich [34]. Włókna kolagenowe rzadko zanurzone są w materiale błony podstawnej; zwykle leżą one w odległości kilkudziesięciu nanometrów od niej i wiążą się z jej materiałem za pomocą mikrowłókienek (mikrofibryli) o średnicy 5–10 nm [34]. Włókna kolagenowe mięśni gładkich posiadają jednorodną średnicę ok. 30–35 nm [34], która jest znacznie mniejsza od średnicy włókien kolagenowych w tkance łącznej (ponad 50 nm). Włókna kolagenowe wykazują typową periodyzację struktury o okresie 65 nm [36, 39].

Elastyna występuje w mięśniach gładkich w dwu formach: w postaci lamelli oddzielających rzędy miocytów w ścianie aorty lub jako włókna biegnące poprzecznie do długiej osi komórek w mięśniach trzewi [34]. Jest ona również tworzona przez same miocyty gładkie [49, 79].

Stosunki ilościowe elementów pozakomórkowych w mięśniu gładkim są bardzo zmienne i zależą od rodzaju mięśnia i jego zadań. Nie ulega wątpliwości, że pełnią one istotną rolę przy przenoszeniu efektów pracy poszczególnych komórek mięśniowych na komórki sąsiednie i otaczające tkanki. Są ważnym elementem integrującym strukturalnie cały mięsień.

KAWEOLE

Błona komórkowa tworzy bardzo liczne wpuklenia w kierunku cytoplazmy miocytów, zwane kaweolami (*caveolae intracellulares*). Mają one charakterystyczny, bańkowaty kształt (ryc. 7). Ich długa oś jest zawsze skierowana prostopadle do powierzchni komórki. Wysokość kaweoli wynosi ok. 120 nm, a szerokość — 70 nm. Występują na większej części powierzchni komórki. Błona tworząca kaweole nie jest pokryta błoną podstawną, która nie wpukla się do wnętrza kaweoli. Ich światło jest otwarte wąską szyjką na zewnątrz komórki. Przełomy poprzez szyjki widoczne są w postaci „kraterów” na preparatach uzyskanych techniką „freeze-fracture” (ryc. 8 i 15). Kaweole mogą występować pojedynczo, choć zwykle ustawione są w szeregi o przebiegu równoległym do długiej osi komórki. Zespoły takich szeregów występują przemiennie z obszarami błony zajętyymi przez taśmy gęste (ryc. 4) [64, 67, 71, 103, 109]. Widoczne jest to zarówno na elektronogramach przekrojów poprzecznych przez miocyt, jak i na preparatach uzyskiwanych na drodze kriorytownictwa (ryc. 8) [21, 108].

Na 1 μm^2 powierzchni komórki przypada 20–30 kaweoli, co tworzy średnią liczbę ok. 170 000 kaweoli w komórce. Ich obecność sprawia, że powierzchnia błony komórkowej jest faktycznie o 50–70% większa od tej, która wynikać by mogła z kształtu komórki [31]. Zarówno liczba kaweoli, jak i rozmiary ich szyjek nie podlegają zmianom w czasie pracy mięśnia [37]. Technika kriorytownictwa ujawniono, że cząstki międzybłonowe (*intramembrane particles*) grupują się w obszarach błony bezpośrednio sąsiadujących z szyjkami kaweoli [37, 109], podczas gdy są bardzo rzadko spotykane w błonie budującej same kaweole [37, 70].

We wcześniejszej literaturze kaweole nazywano także pęcherzykami pinocytocycznymi (*pinocytotic vesicles*) [9, 10, 71, 74]. Fakt ten stanowi klasyczny przykład pochopnej funkcjonalnej interpretacji obserwowanej struktury. Szczególnie w przekrojach, których płaszczyzna nie trafia na szyjkę kaweoli bądź w przekrojach stycznych do powierzchni komórki kaweole przedstawiają się jako pęcherzyki o kolistym obrysie (ryc. 5, 9, 10). Kaweole podlegają penetracji koloidalnym lanthanem (ryc. 10), ferrytyną (ryc. 9) i peroksydazą, co dowodzi łączności ich światła z przestrzenią pozakomórkową [93]. W żadnym przypadku nie wykazują jednak aktywności mikropinocytocycznej [23], mimo że o tę funkcję podejrzewano je powszechnie, dzięki ich kształtowi i przypowierzchniowej lokalizacji.

Niektórzy autorzy skłaniają się do opinii, że kaweole pełnią rolę T-systemu przenoszącego impuls z powierzchni komórki w jej głąb [29, 56]. Taką rolę błoniastego T-systemu przenikającego poprzecznie

włókna mięśniowe przyjmuje się obecnie w mięśniu prążkowanym [57]. Za tą koncepcją roli kaweoli przemawia fakt szeregowego ich rozmieszczenia przy powierzchni komórki (ryc. 8), rzekomo zgodnie z elementami aparatu kurczliwego. Bez względu na treść poglądów na temat funkcji kaweoli w miocycie nie ulega wątpliwości, że są one typowymi organelami dla komórek mięśni gładkich i zawsze w nich występują. Podobne struktury stwierdza się co prawda w mięśniach szkieletowym i sercowym, w komórkach endotelialnych i niektórych epitelialnych, ale z pewnością spełniają tam inne zadania [36]. Brak kompleksowych badań porównawczych tych struktur sprawia, że wszelkie rozważania na temat ewentualnych cech wspólnych lub różnic w ich funkcjonowaniu mają charakter spekulatywny.

TASMY GĘSTE

Na wewnętrznej stronie błony komórkowej nie zajętej przez kaweole spotyka się przylegające do niej nagromadzenia gęstego elektronowo, bezpostaciowego materiału (ryc. 6, 13). Zajmują one obszary o 0,2–0,4 μm szerokości i rozciągają się na ponad 1–2 μm wzdłuż długiej osi komórki. Ze względu na wydłużony kształt i silną tendencję do impregnowania się solami metali ciężkich nazwano je „taśmami gęstymi” (dense bands lub dense patches). W zależności od typu mięśnia zajmują one od 1/3 do 1/4 powierzchni komórki [31]. Grubość taśm gęstych osiąga zwykle 30–100 nm. Wydaje się, że ich gęstość i wyrazistość w preparacie zależy może od procedury przygotowania tkanki do obserwacji w mikroskopie elektronowym (utrwalanie, zatapianie, barwienie). Materiał taśm gęstych barwi się z różną intensywnością nawet w różnych preparatach tego samego mięśnia [93]. Fakt wnikania miofilamentów cienkich i filamentów pośrednich w obszar taśm gęstych trudny był do jednoznacznego wykazania. Dzięki zastosowaniu stereoskopowych zdjęć z mikroskopu elektronowego wysokonapięciowego stwierdzono bezspornie, że filamenty te sięgają wnętrza taśm gęstych [2, 15, 22, 31, 68]. Niektórzy autorzy nazywali też taśmy gęste „płytkami mocującymi” (attachement plaques) [6, 30, 68]. W czasie skurczu dochodzi do przyciągania obszarów błony komórkowej wyposażonej w taśmy gęste w głąb komórki, co nadaje powierzchni komórki pofałdowany przebieg (ryc. 16 A) [93].

Immunohistochemicznie została w taśmach gęstych wykryta α -akty-nina [84], która jest białkiem charakterystycznym dla linii Z w mięśni prążkowanym [85]. Linia Z stanowi tam miejsce przyczepu cienkich miofilamentów aktynowych [57], a także jest rejonem, w którym stwierdza się filamenty pośrednie desminowe [60]. Wskazuje to więc na podo-

bieństwo funkcji taśm gęstych i linii Z [68]. Strukturalnie obie te organelle wykazują również znaczne podobieństwo: amorficzność i wysoką gęstość budującego je materiału.

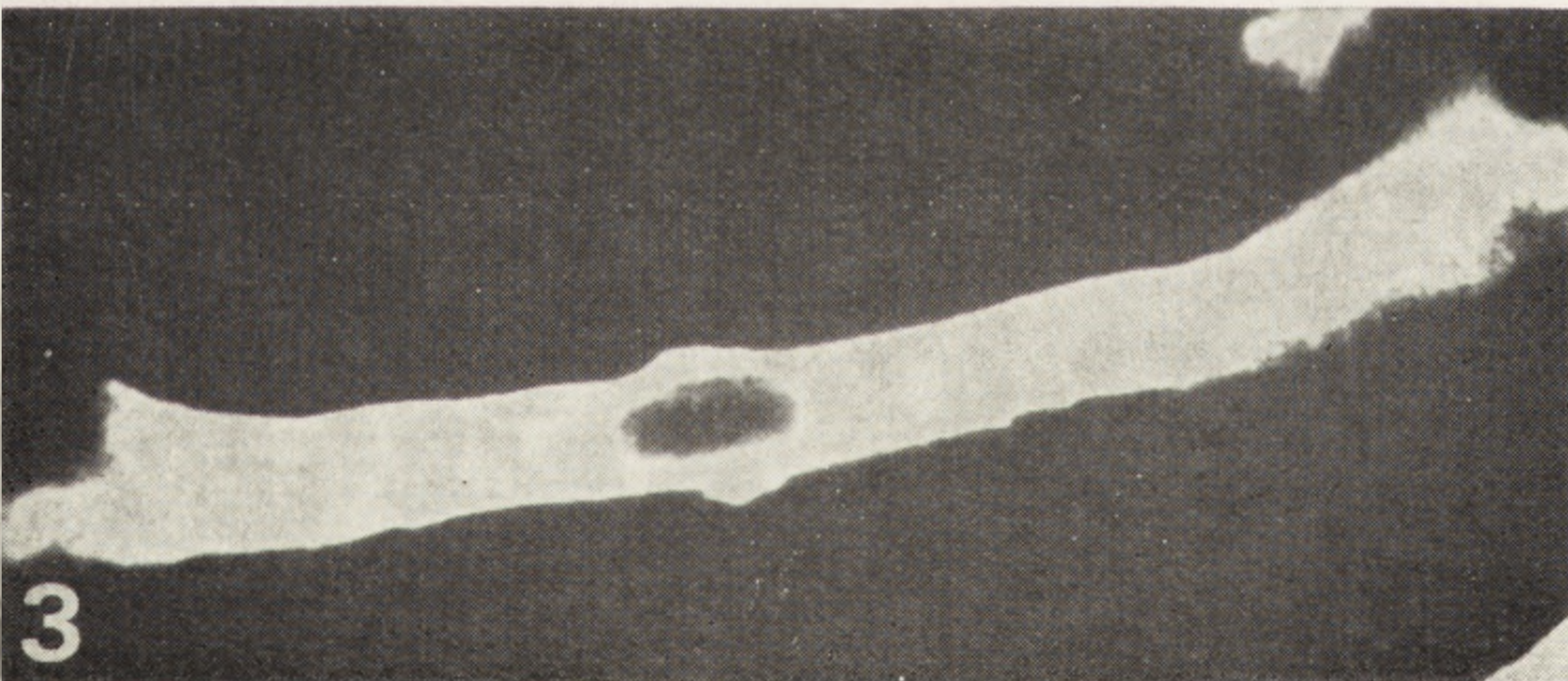
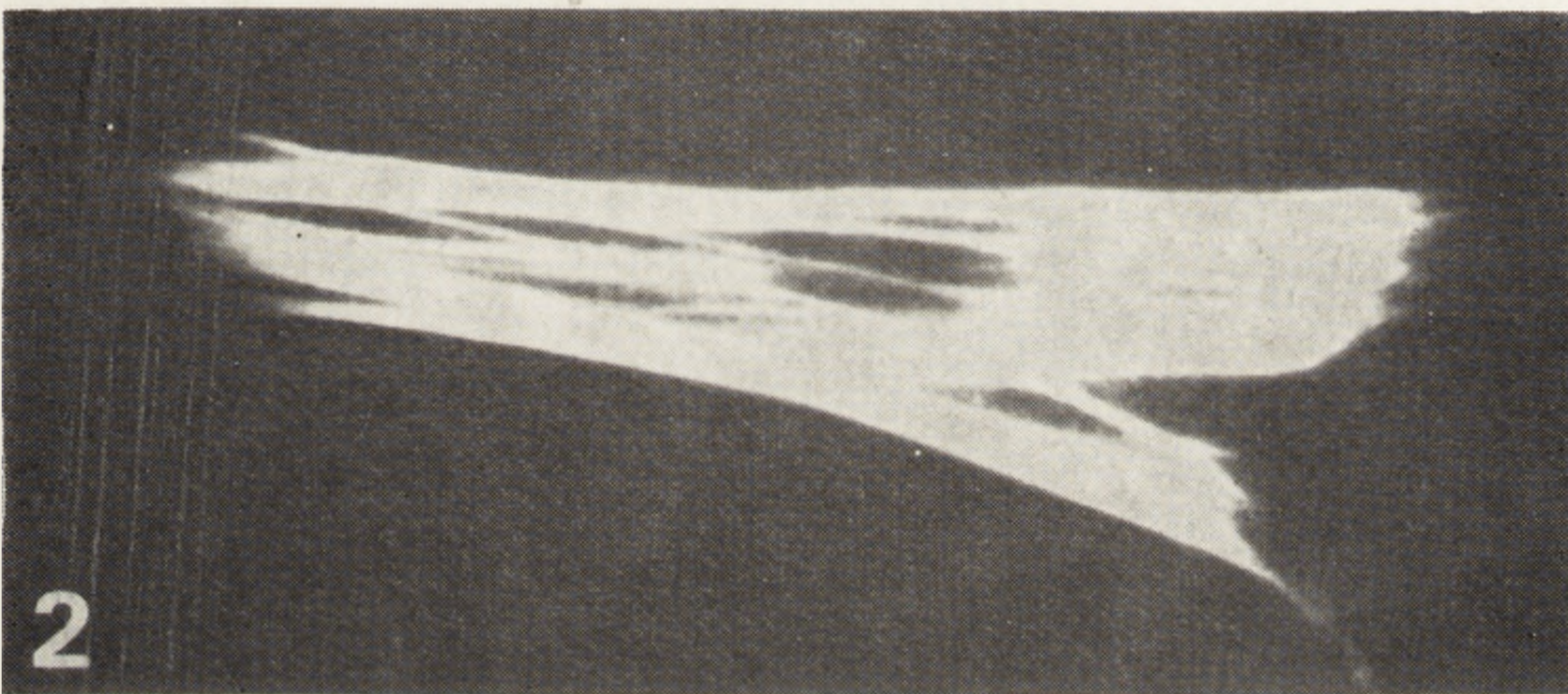
Taśmy gęste sąsiadują z elementami włóknistymi substancji pozakomórkowej po drugiej stronie błony komórkowej lub też występują na przeciwko taśm gęstych przyległej komórki. W ostatnim przypadku powstaje w ten sposób połączenie pośrednie (intermediate junction). Zwykle wtedy obszar taśmy gęstej występuje na wyniosłości błony komórkowej.

CIAŁA GĘSTE

Wydaje się, że ciała gęste (dense bodies) są takimi samymi nagromadzeniami amorficznego materiału co taśmy gęste, z tą jednak różnicą, że nie przylegają do wewnętrznej strony błony, lecz są rozmieszczone swobodnie w cytoplazmie miocyta (ryc. 4, 13). Mimo iż żaden z autorów nie podaje rozmiarów ciał gęstych i ich kształtu, z analizy załączonych elektronogramów wynika iż nie są one tworami wydłużonymi, lecz są mniejsze i mają kształt bardziej zwarty niż taśmy. Przedstawiają się jako „węzły” w sieci miofilamentów przenikających cytoplazmę miocyta (ryc. 17) [16]. Poznanie ich roli polegającej na wiązaniu miofilamentów przechodziło podobne koleje jak w przypadku taśm. Rola ciał gęstych w łączeniu miofilamentów cienkich (analogiczna do roli linii Z w mięśni prążkowanym) była hipotetyczna [15] dopóki nie wykazano na ultraskrawkach krojonych seryjnie oraz na stereoskopowych zdjęciach skrawków półcienkich, że miofilamenty cienkie istotnie wnikają w obręb ciał gęstych [2, 97]. Obserwacje te znalazły również potwierdzenie w obrazach ciał gęstych uzyskanych techniką „freeze-fracture” [108]. W końcu Schollmeyer i wsp. [84] wykazali bezsprzecznie obecność α -aktywniny w obrębie ciał gęstych i taśm. Sądzę, iż analogia do linii Z jest słuszniejsza w przypadku ciał gęstych niż taśm. Te ostatnie z racji powiązań z błoną komórkową bardziej przyrównać można do rejonów wstawek mięśnia sercowego lub do gęstych ciał wiążących miofibryle na poziomie linii Z do błony komórkowej w komórkach mięśnia sercowego [59].

SIATECZKA ŚRÓDPLAZMATYCZNA

Ziarnista siateczka śródplazmatyczna występuje z reguły w znacznej obfitości w miocytach rozwijających się, podczas gdy w komórkach dojrzałych przeważa siateczka gładka [36], która nazywana jest także

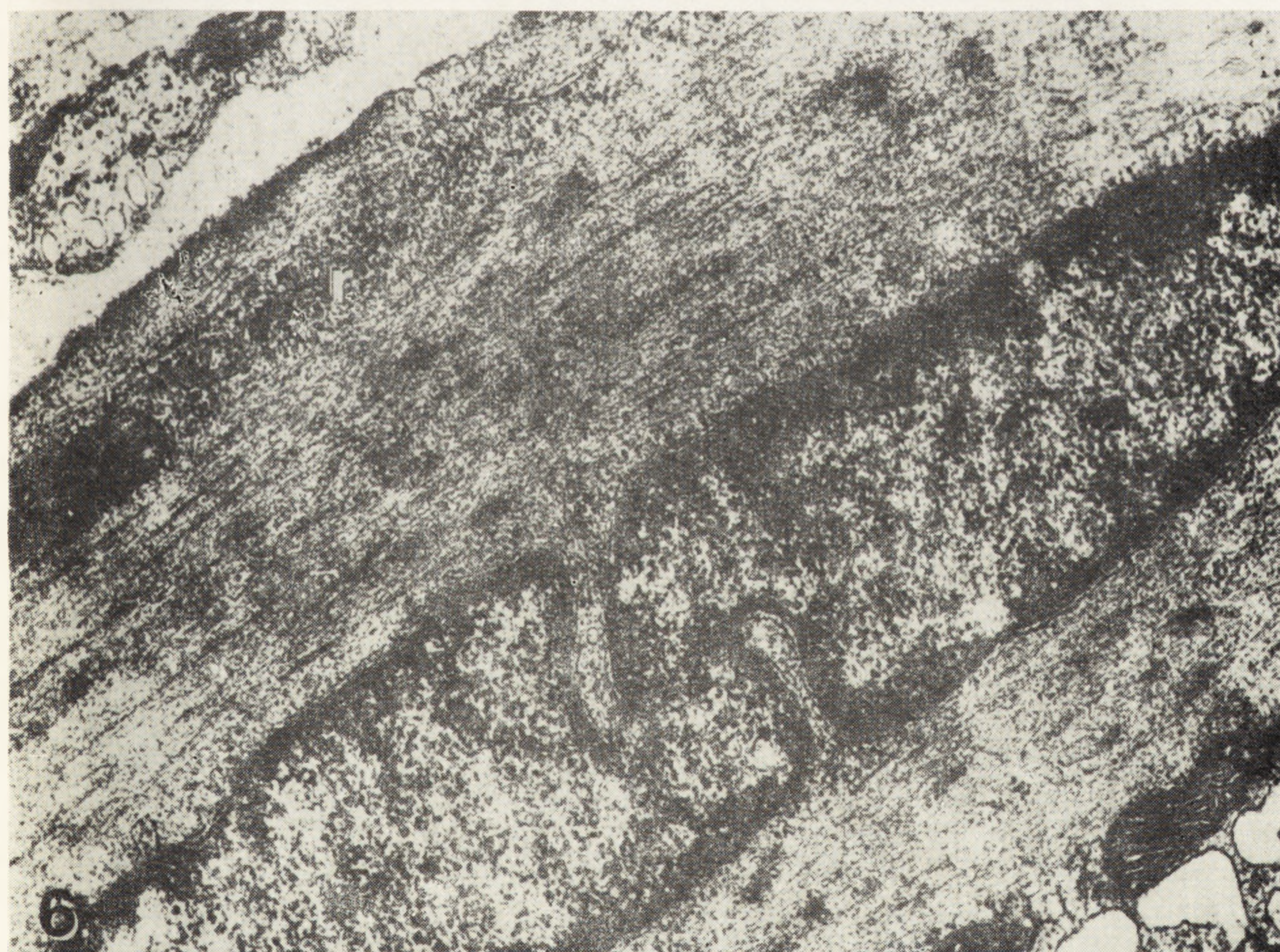
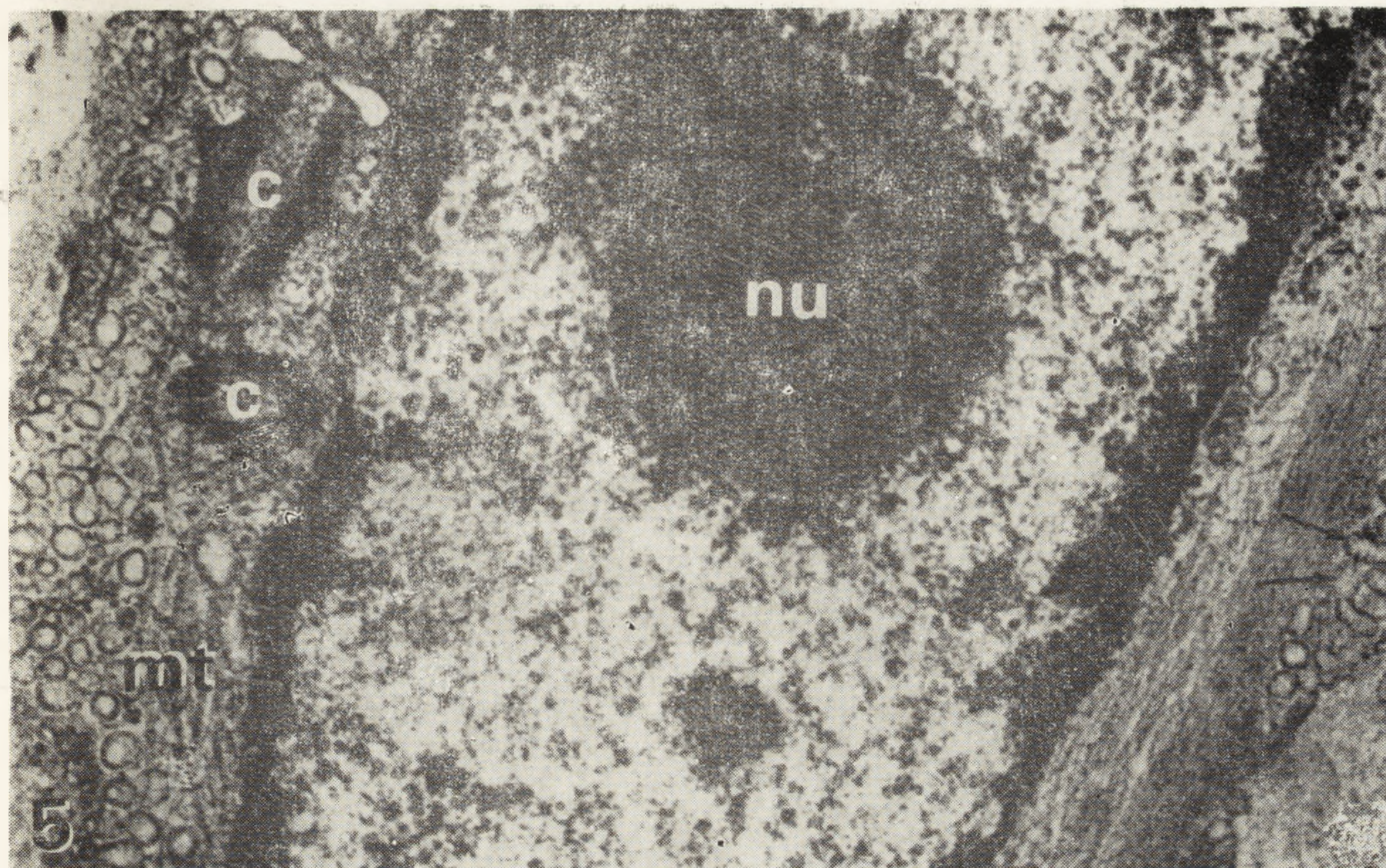


Ryc. 1. Komórka mięśnia gładkiego widziana w skaningowym mikroskopie elektronowym. 24-godzinna hodowla *in vitro* z żyły żółtkowo-krezkowej 13-dniowego zarodka kurczęcia. Kształt komórki wrzecionowaty, powierzchnia gładka. Liczne wypustki skierowane do podłoża. $\times 3400$, z Marwin i wsp., *Circul. Res.*, 45, 4, 528, 1979

Ryc. 2 i 3. Komórki mięśnia gładkiego z hodowli *in vitro* wybarwione immunofluorescencyjnie. $\times 770$, z Chamley i wsp., *Cell Tiss. Res.*, 177, 503, 1977. Ryc. 2. Miocyt z aorty królika wybarwiony barwnikiem fluorescencyjnym (FITC) sprzężonym z przeciwciałem skierowanym przeciw aktynie mięśni gładkich. Ryc. 3. Miocyt z żyły człowieka wybarwiony analogicznie przeciw miozynie mięśni gładkich

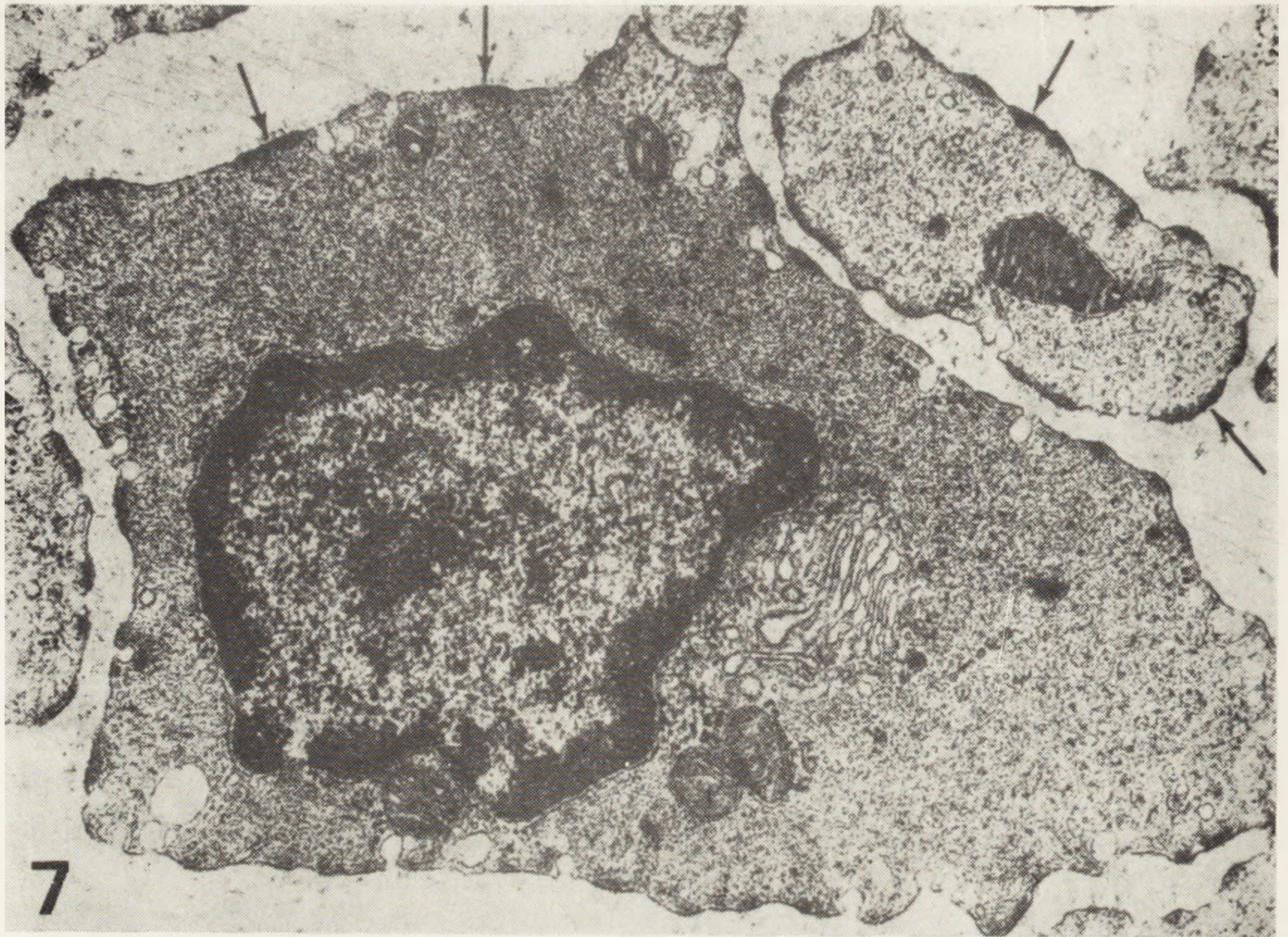


Ryc. 4. Schemat ultrastruktury komórki mięśnia gładkiego. BM — błona podstawna, S — sarkolemma, N — jądro, NU — jąderko, F — filamety, CG — ciała gęste, KA — kaweole, R — rybosomy, AG — aparat Golgiego, M — mitochondria, SS — siateczka sarkoplazmatyczna, P — połączenia międzykomórkowe. Według Lentza, Cell Fine Structure, Saunders 1971



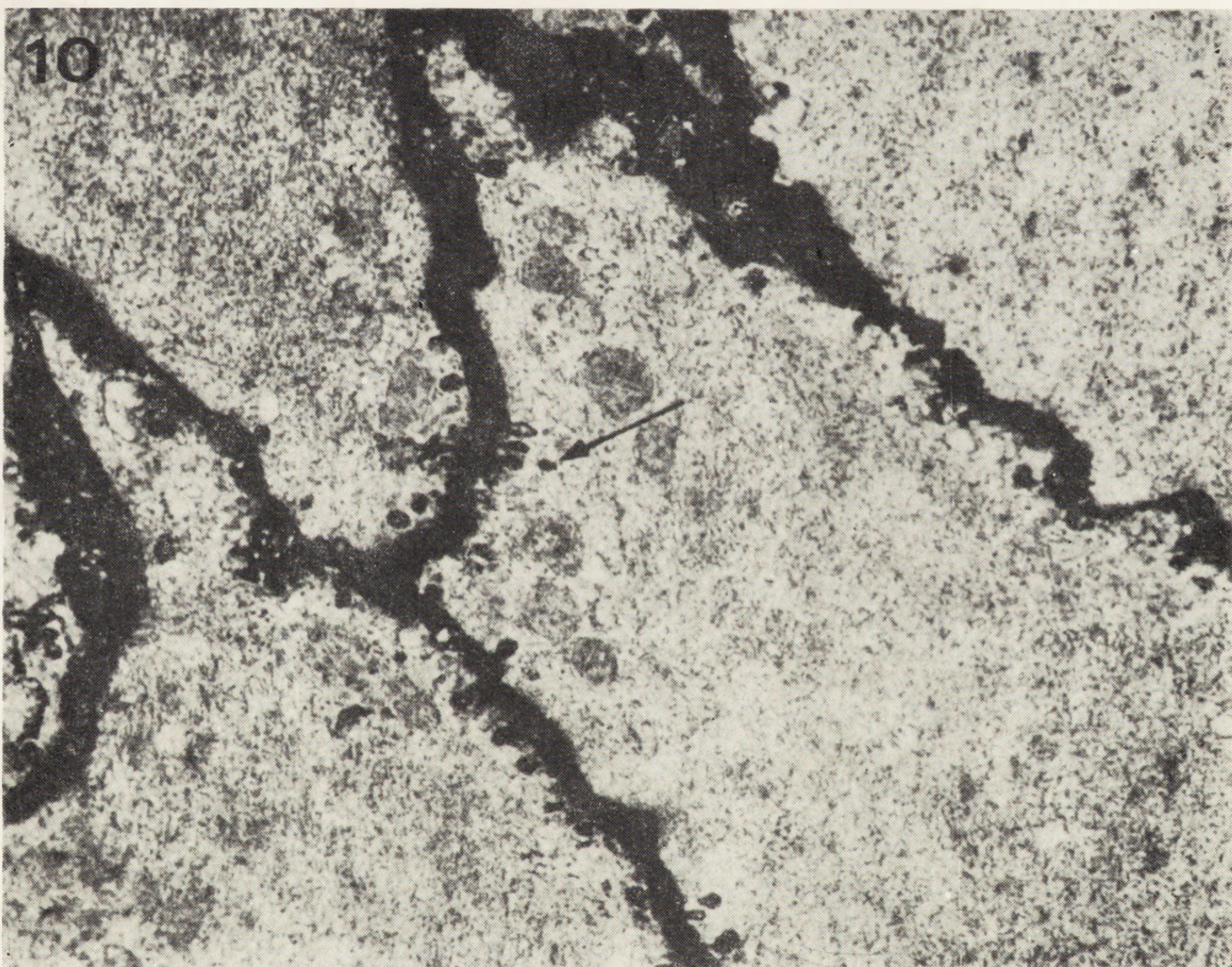
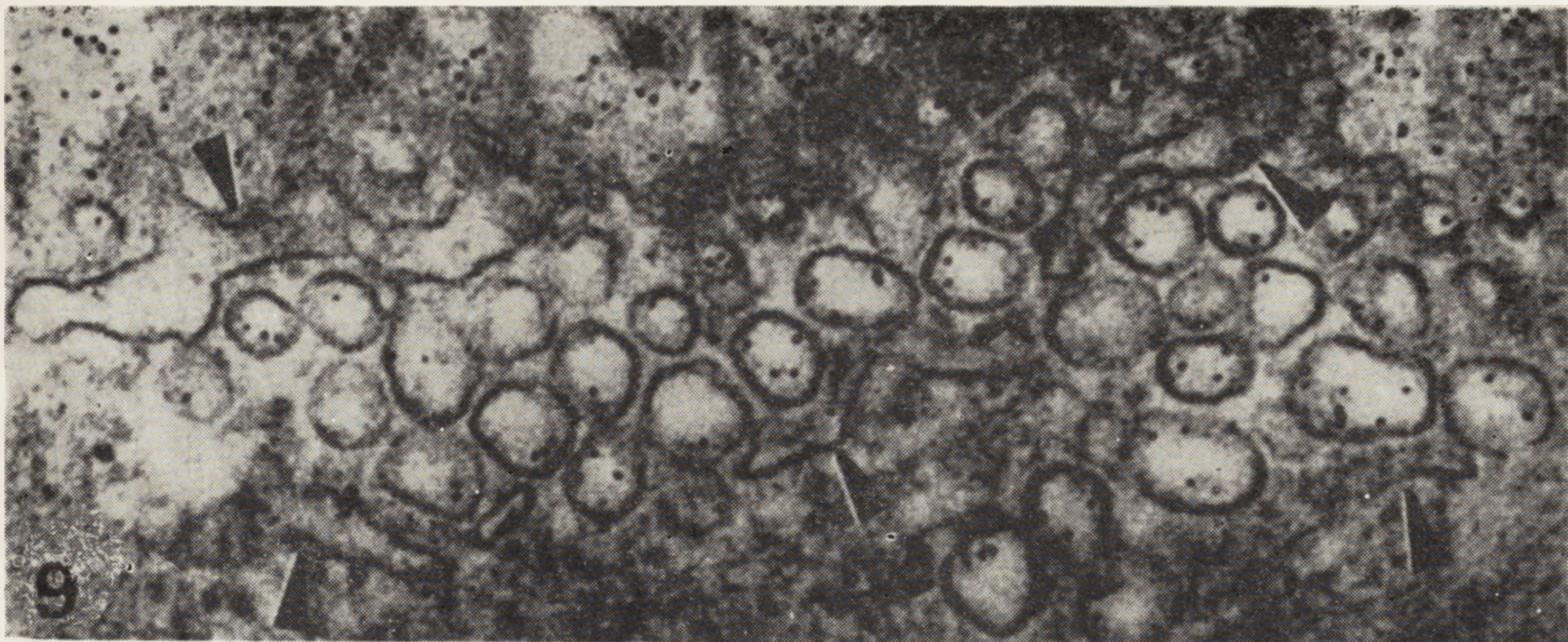
Ryc. 5. Fragment komórki mięśnia gładkiego z żyły głównej zółwia widziany w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. W jądrze obecne jąderko (nu), w sąsiedztwie jądra centriole (c) oraz mikrotubule (mt). Strzałkami oznaczono kaweole w przypowierzchniowym rejonie komórki. $\times 38\ 000$, z Somlyo i Somlyo [93]

Ryc. 6. Przekrój podłużny przez miocyt z jelita cienkiego szczura. Jądro wydłużone w osi komórki; widoczne zafałdowania osłonki jądrowej. W sarkoplazmie obecne filamenty o przebiegu podłużnym oraz wolne rybosomy (r). $\times 27\ 000$, z Bois [6]



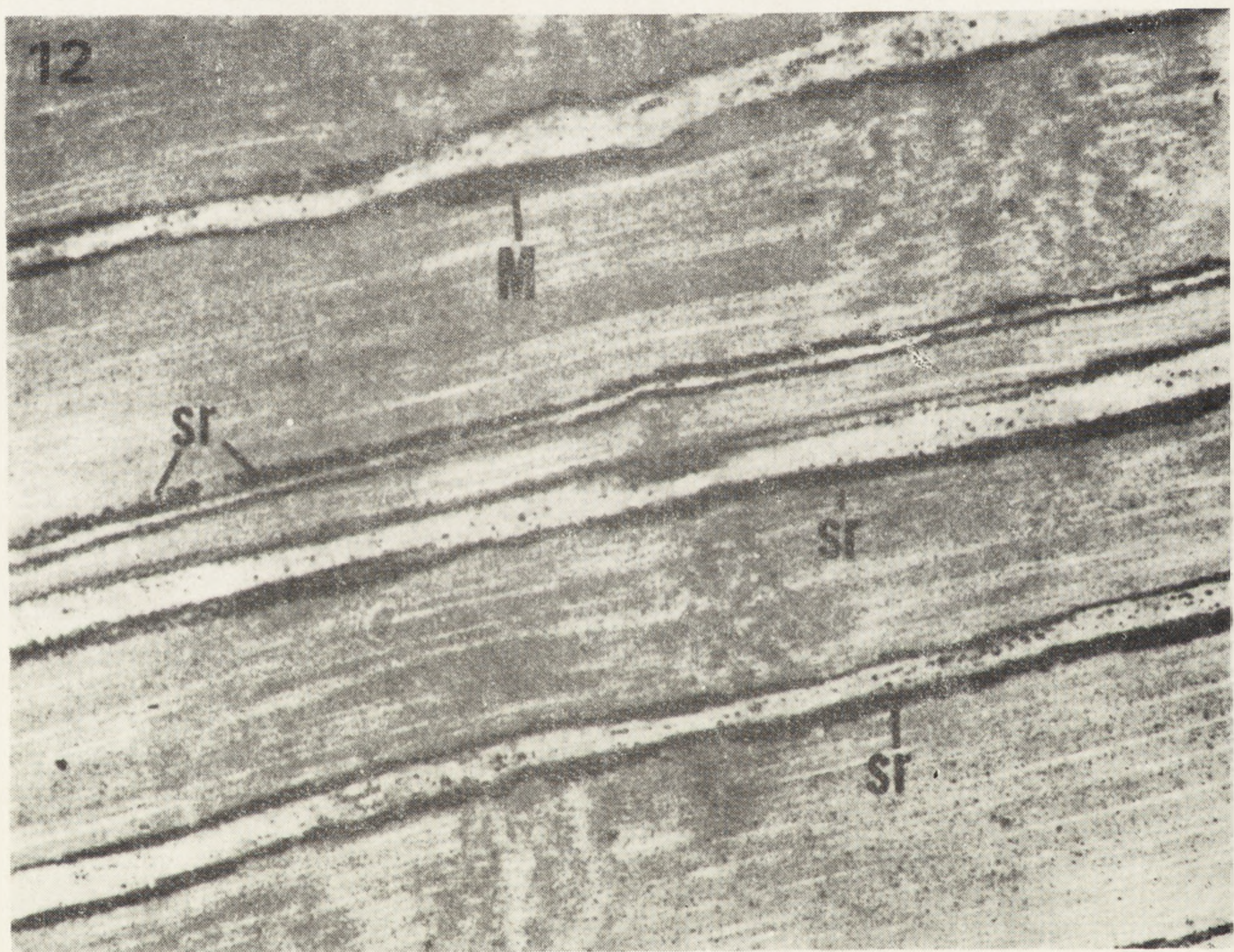
Ryc. 7. Przekrój poprzeczny przez miocyt gładki z jelita cienkiego szczura na poziomie jądra komórkowego. W prawym górnym rogu inny miocyt przekrojony poprzecznie w części końcowej. Strzałkami oznaczono taśmy gęste. Przy powierzchni komórki widoczne kaweole, a w sąsiedztwie jądra — aparat Golgiego. $\times 25\ 000$, z Bois [6]

Ryc. 8. Obraz fragmentu powierzchni miocyta gładkiego z taśmy okrężnicy świnki morskiej uzyskany techniką „freeze-fracture” (strona P). Widoczne przełomy szyjek kaweoli ustawionych szeregowo w pasmach na przemian z obszarami wolnymi od kaweoli. $\times 20\ 000$, z Watanabe i Yamamoto [108]



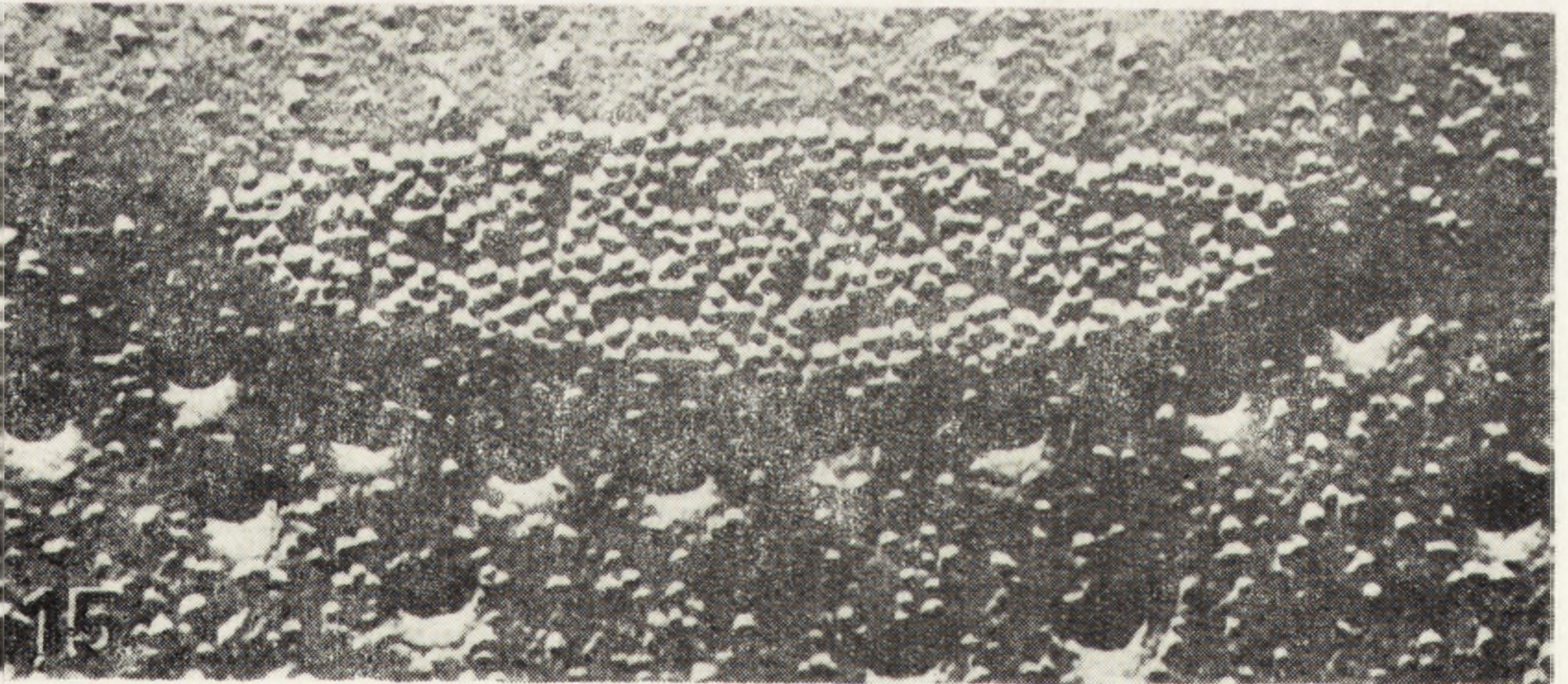
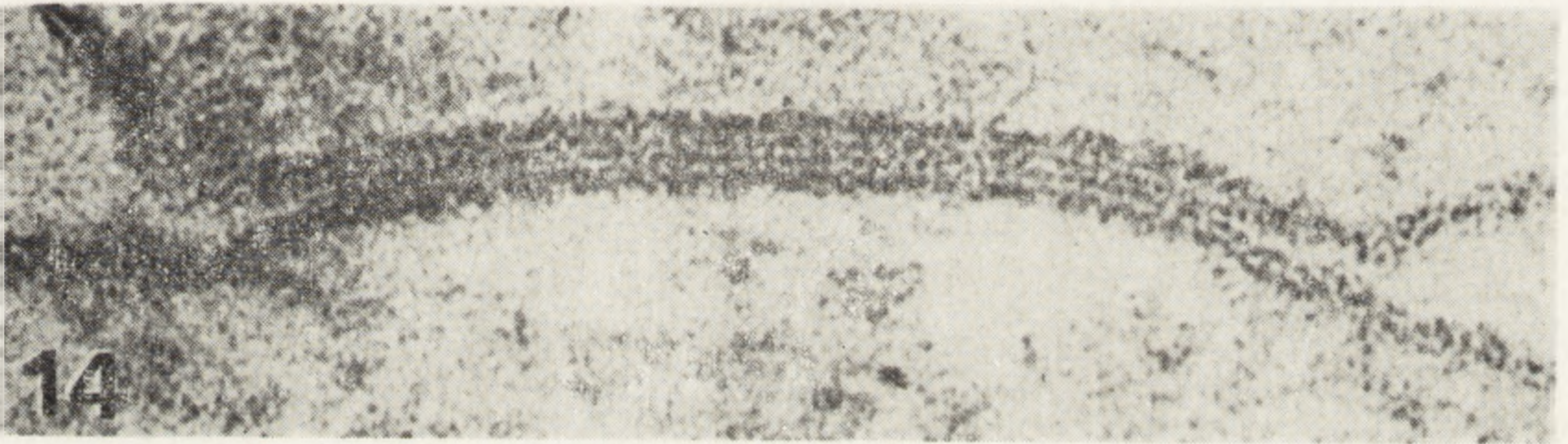
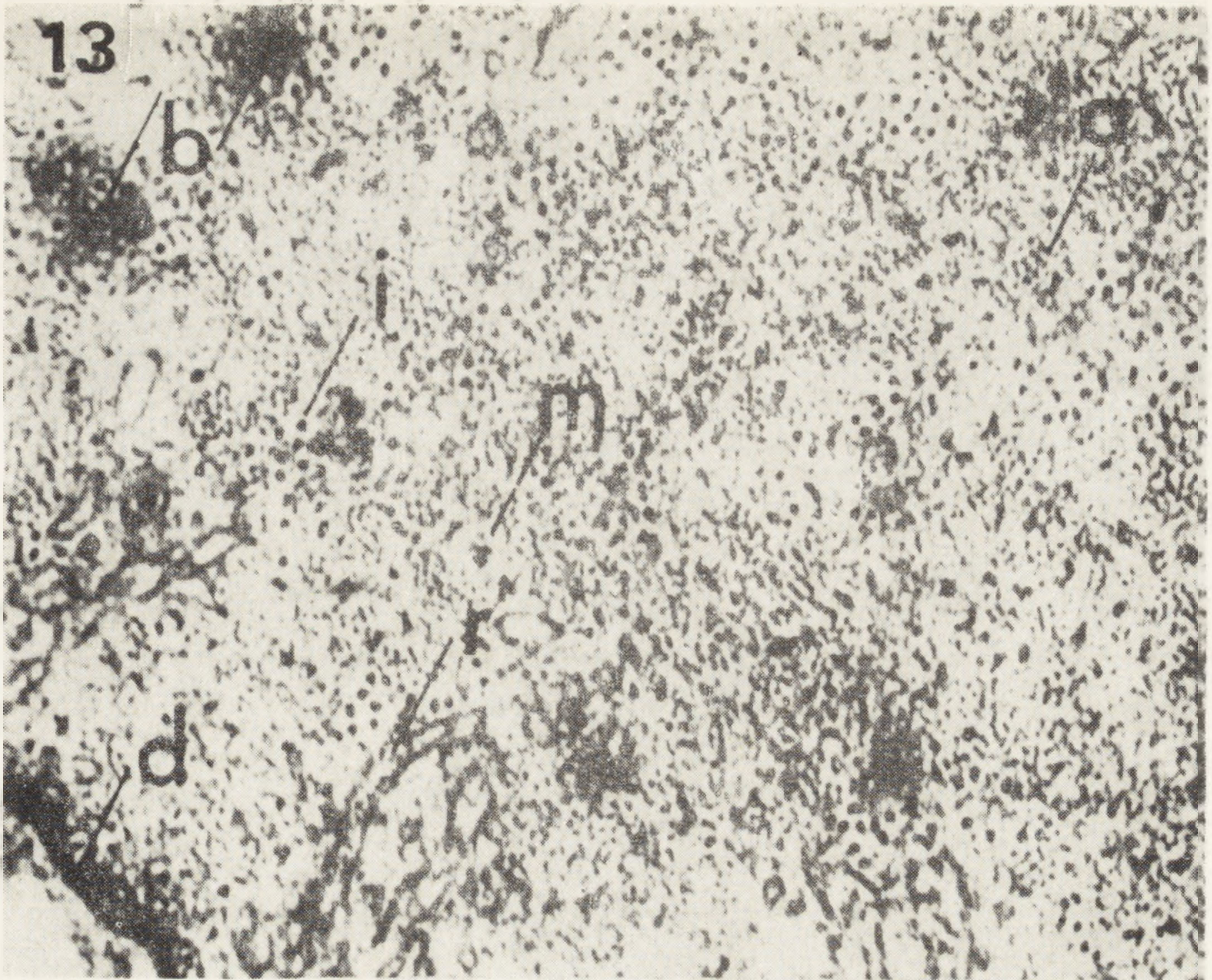
Ryc. 9. Peryferyczny fragment miocyta z żyły wrotnej królika. Przekrój styczny do powierzchni komórki. Tkanka inkubowana w obecności ferrytyny, której depozyty występują poza błoną komórkową (górna część zdjęcia) oraz w profilach przekrojów kaweoli, lecz nie są obecne w cysternach siateczki (strzałki). $\times 95\ 000$ z Somlyo i Somlyo [93]

Ryc. 10. Przekrój przez mięsień gładki żyły wrotnej królika inkubowany w czasie osmowania w koloidalnym lantanie. Przestrzeń międzykomórkowa wybarwiona ciemno. Wyznacznik wniknął do kaweoli. Szyjki niektórych z nich leżą poza płaszczyzną przekroju, stąd ich profile przyjmują wygląd oderwanych od błony pęcherzyków (strzałka). $\times 31\ 500$, z Somlyo i Somlyo [93]



Ryc. 11. Powierzchniowy fragment komórki mięśnia gładkiego z żyły wrotnej królika. Widoczne zespolenie cystern siateczki sarkoplazmatycznej (SR) z zewnętrzną błoną komórkową. Leżące między nimi elektronowo gęste ziarnistości zaznaczono strzałkami. SV — przekrój przez kaweolę. $\times 228\ 000$, z Somlyo i Somlyo [93]

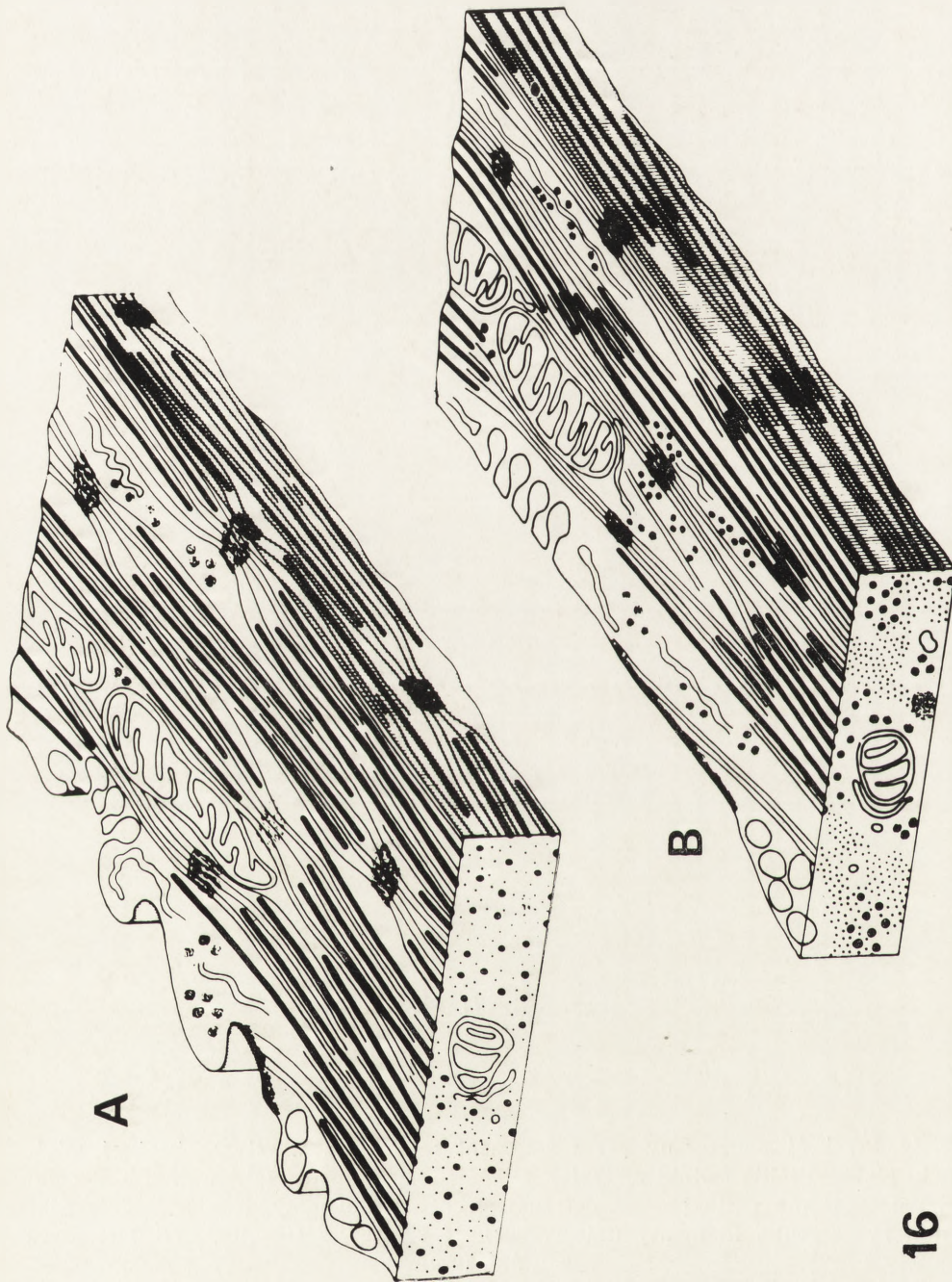
Ryc. 12. Przekrój podłużny przez przedni zwieracz muszli omółka *Mytilus* inkubowany w czasie osmowania w $K[Sb(OH)_6]$. Ciemne stronty w nie wybarwionym skrawku wskazują na obecność wapnia w przebiegających podłużnie pod powierzchnią komórki profilach siateczki (sr) oraz mitochondriach (M). $\times 12\ 000$, z Atsumi [3]



Ryc. 13. Przekrój poprzeczny przez fragment miocyta z warstwy okrężnej mięśniówki gładkiej jelita świnki morskiej; a — cienkie filamenty (aktynowe), b — ciała gęste, d — taśma gęsta po wewnętrznej stronie sarkolemmy, i — pośrednie filamenty, m — grube filamenty (miozynowe). $\times 935\ 000$, z Gabella, Cell Tiss. Res., 201, 277, 1979

Ryc. 14. Przekrój przez połączenie szczelinowe (nexus) między dwiema komórkami mięśnia gładkiego uwidoczniony po barwieniu octanem uranylu en bloc. Widoczna siedmiowarstwowa struktura połączenia. $\times 224\ 000$, z Henderson [45]

Ryc. 15. Obraz połączenia szczelinowego w mięśniu gładkim jelita świnki morskiej uzyskany techniką „freeze-fracture”. Widoczna powierzchnia P komórki mięśniowej. W rejonie połączenia zagęszczenie ziarn śródbłonowych. Poniżej — przełomy szyjek kaweoli widoczne w postaci „kraterów”. $\times 120\ 000$, z Gabella i Blundell [38]



Ryc. 16. Schemat organizacji sarkoplazmy komórki mięśnia gładkiego w skurczu (A) i rozkurczu (B), ilustrujący zasadę działania mechanizmu ślizgowego. Filamenty grube wsuwają się pomiędzy filamenty cienkie, które związane są „ciałami gęstymi”. „Taśmy gęste” pociągają sarkolemme, która ulega zafałdowaniu w czasie skurczu komórki. Z Heumann [46]

siateczką sarkoplazmatyczną. Pomędzy obu typami siateczki występują połączenia [93]. Ziarnista siateczka zaangażowana jest w procesy syntezy związane z tworzeniem błon, filamentów i substancji pozakomórkowych. Siateczka gładka stanowi główny przedział śródkomórkowy dla przechowywania jonów wapnia. Zawartość wapnia w obrębie siateczki wykazana została histochemicznie (ryc. 12) [3, 20, 47, 54, 69, 94, 111].

Siateczka sarkoplazmatyczna występuje w okolicy jądra i przenika komórkę w jej rejonach zajętych przez miofilamenty. W większości zlokalizowana jest jednak w okolicach podpowierzchniowych komórki (ryc. 12). Średnio zajmuje ona ok. 2% objętości komórki. Siateczka nie ma ciągłości z przestrzenią międzykomórkową, gdyż nie wypełnia się wyznacznikami przestrzeni pozakomórkowej takimi jak: ferrytyna (ryc. 9), peroksydaza chrzanowa i koloidalny lantan [23, 93]. Cysterny siateczki mają zasadniczo przebieg podłużny. W częściach peryferyjnych komórki zaznacza się wyraźnie ich związek z kaweolami i błoną komórkową, podczas gdy w częściach centralnych komórki cysterny siateczki wykazują tendencję sąsiadowania z mitochondriami [23, 24, 29, 91]. Cysterny siateczki przebiegają pomiędzy kaweolami; układają się równolegle do błony komórkowej w jej bezpośrednim sąsiedztwie tak, że przestrzeń pomiędzy nimi może wynosić zaledwie 10 nm. W miejscach tak bliskiej apozycji błon stwierdzono pomiędzy nimi występowanie gęstych ziarn rozmieszczonych regularnie w odstępach 20–25 nm (ryc. 11) [3, 23, 93]. Struktury te przyrównuje się do opisanych w mięśniu sercowym „zespołów peryferyjnych” (peripheral coupling) [101]. Sądzi się, że są one strukturalnym wyznacznikiem zachodzącej pomiędzy błonami wymiany jonowej, widocznym w transmisyjnym mikroskopie elektronowym przy dużych powiększeniach. Technika „freeze-fracture” wykazano, że błony siateczki zawierają cząstki o średnicy 8–12 nm, które zapewne zaangażowane są w transport wapnia poprzez błony [19, 21]. Jak wiadomo obieg wapnia w komórce mięśniowej ma istotne znaczenie dla regulacji procesów skurczu [7, 18].

MITOCHONDRIA

Mitochondria zajmują 5–9% objętości komórki miocyta [35]. Ilość ich zależy od rodzaju mięśnia [36]. Występują głównie przypowierzchniowo lub w okolicy biegunów jądra (ryc. 4). Z reguły są wydłużone, a osie ich leżą równolegle do przebiegu miofilamentów. Zwykle są drobne, choć ich długość może dochodzić do 7 μm [93]. Macierz (matrix) jest gęsta, zawiera wyraźne, ciemne ziarna śródmitochondrialne, które uważane są za depozyty niektórych jonów dwuwartościowych.

Ścisły związek mitochondriów z elementami siateczki [31], a także z kaweolami został zaobserwowany przez licznych autorów [42, 62, 91, 95]. Odstęp pomiędzy zewnętrzną błoną mitochondriów a błoną budującą kaweole często wynosi zaledwie 4–5 nm [93]. Uważa się, że tak bliski kontakt może wskazywać na wymianę kationów pomiędzy tymi organellami [42, 90]. Ze względu na ich zdolność do gromadzenia jonów dwuwartościowych, w tym wapnia [93, 100], uważa się, że mitochondria mogą odgrywać istotną rolę w gospodarce wapniowej komórki [24, 95, 107]. Zasadniczą rolę w tym względzie przypisuje się jednak siateczce [72]. Współpraca siateczki z mitochondriami w gospodarowaniu wapniem jest również możliwa ze względu na bliskość tych organelli w komórce, szczególnie w rejonach przypowierzchniowych (ryc. 12) [21, 42, 90, 95, 110]. Innymi możliwymi miejscami przechowywania wapnia są: jądro komórkowe, błona komórkowa, błona podstawna i przestrzenie międzykomórkowe [93].

INNE ORGANELLE

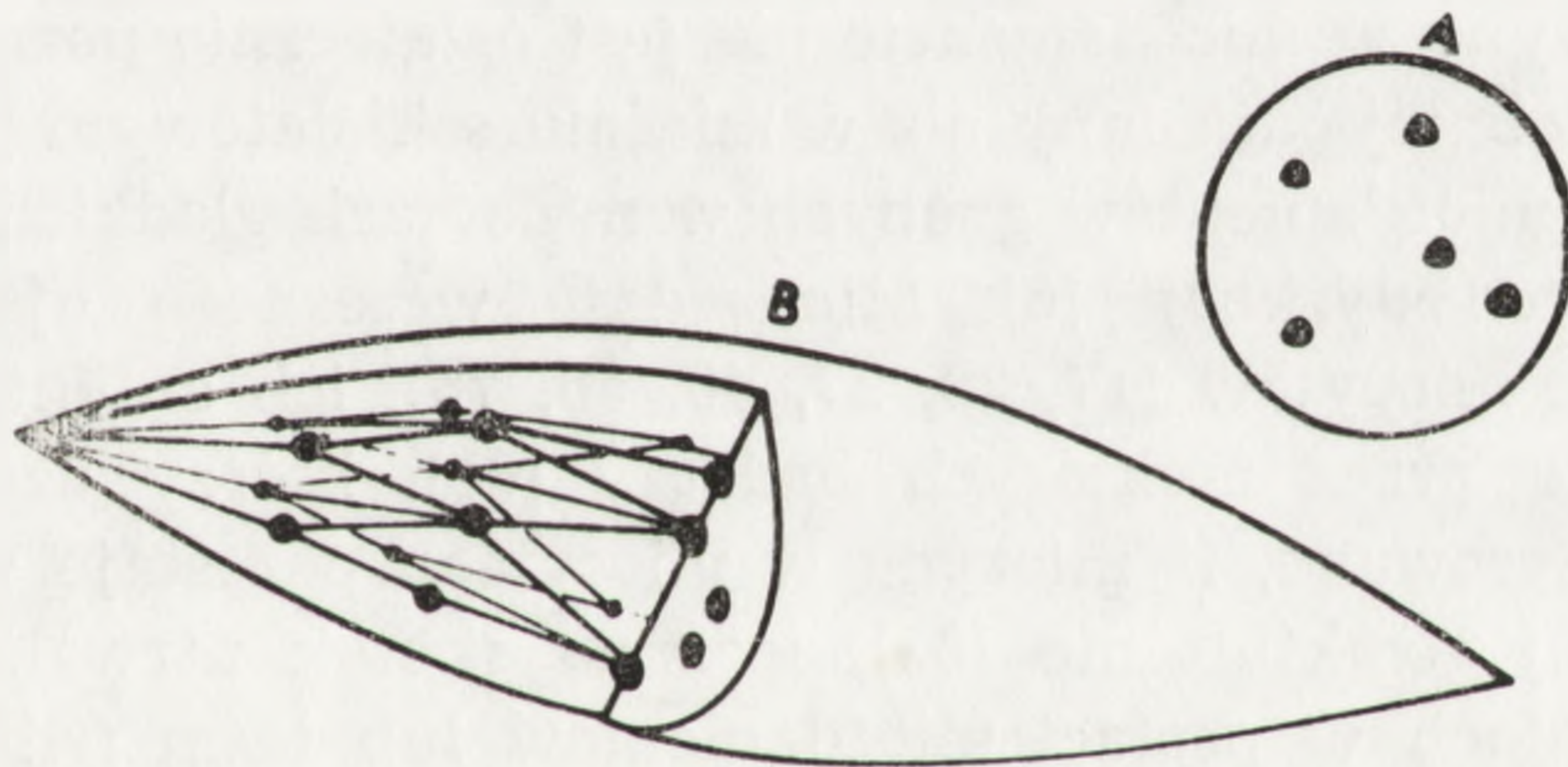
Powszechnie występującym elementem strukturalnym cytoplazmy komórek mięśni gładkich są mikrotubule (ryc. 5) [76]. Trudno im jednak przypisać jakąkolwiek specyficzną rolę [93]. Ogólnie uważa się, że mikrotubule stanowią element cytoszkieletu komórki. W miocycie mikrotubule mają typową strukturę, która zachowuje się lepiej po utrwaleniu glutaraldehydem niż osmem. Ich średnica wynosi 25 nm. W przekrojach poprzecznych w świetle mikrotubul sporadycznie spotyka się ciemny rdzeń [93].

Centriole występują zwykle przy jądrze komórkowym z jego jednej strony (ryc. 5) [36]. Ich obecność jest zrozumiała ze względu na zdolność miocytów gładkich do podejmowania podziałów komórkowych. Przy obu biegunach jądra rozciągają się w kierunku biegunów komórki stożki cytoplazmy, która w zasadzie wolna jest od filamentów (ryc. 4). W rejonie tym, oprócz licznych mitochondriów i siateczki, obecne są aparaty Golgiego (ryc. 7) i lizosomy [36]. W sarkoplazmie obecne są także wolne rybosomy (ryc. 6), oprócz tych które związane są z błonami ziarnistej siateczki i zewnętrzną błoną osłonki jądrowej (ryc. 4).

MIOFILAMENTY I FILAMENTY

Miofilamenty są najistotniejszym elementem aparatu kurczliwego komórki mięśniowej. Jego organizacja w miocycie gładkim jest o wiele mniej przejrzysta niż w mięśni prążkowanym. Stąd też wyjaśnienie

struktury i działania aparatu kurczliwego mięśni gładkich wymagało więcej czasu i do dziś nie pozostaje całkiem jednoznaczne. Rozróżnia się dwa typy miofilamentów: cienkie i grube, a ponadto filamenty pośrednie. Wraz z wiążącymi je ciałami i taśmami gęstymi oraz elementami błoniastymi magazynującymi wapń tworzą one aparat kurczliwy miocytów gładkich. Wzajemne ułożenie miofilamentów w komórce nie jest tak uporządkowane jak w mięśni prążkowanym, nie tworzą zatem miofibryl ani sarkomerów. Stanowią trójwymiarową wielokierunkową sieć, której zasadniczy przebieg zgodny jest jednak z długą osią komórki (ryc. 17). Ciągłość tej sieci dotyczy przynajmniej miofilamentów cienkich i filamentów pośrednich. Miofilamenty grube nastroczały najczęściej kłopotów badaczom, część z nich wątpiła w ogóle w ich realne istnienie w mięśni gładkim. Również chemizm miofilamentów był i jest nadal przedmiotem dociekliwych badań. Ustalono jednak jednoznacznie, iż miofilamenty miocytów gładkich, podobnie jak w mięśni prążkowanym, zawierają podstawowe białka kurczliwe: aktynę (ryc. 2) i miozynę (ryc. 3), co wykazano metodami biochemicznymi i immunohistochemicznymi [43, 65, 82].



Ryc. 17. Schemat modelu organizacji aparatu kurczliwego w komórce mięśnia gładkiego; A — przekrój poprzeczny, B — przekrój podłużny. Sieć filamentów o zasadniczym podłużnym przebiegu łączy się w ciałach gęstych. Z Cooke i Fay [16]

Miofilamenty cienkie (aktynowe) charakteryzują się średnicą przekroju ok. 7 nm. Po zastosowaniu utrwalania glutaraldehydem są zwykle dobrze zachowane. Na preparatach krojonych nie udaje się jednak określić ich maksymalnej długości. Często tworzą pęczki grupujące po ok. 20 sztuk, czasami zebrane są w rozety wokół miofilamentów grubych, ale nie jest to regułą [2, 92, 96, 97]. Miofilamenty cienkie są o wiele liczniejsze niż grube. Stosunek liczby miofilamentów cienkich do grubych wynosi 12:1, lecz jest zmienny w zależności od badanego mię-

śnia [6, 66]. Dochodzić może także do wartości 15:1 [93]. Stosunek ten, obliczony z preparatów krojonych obserwowanych w mikroskopie elektronowym, znajduje potwierdzenie w badaniach biochemicznych [43, 65, 86, 104]. Wykazano jednoznacznie, że miofilamenty cienkie wnikają w obręb taśm i ciał gęstych [22, 68, 92, 104], które stanowią miejsca ich zakotwiczenia.

Miofilamenty grube uznaje się za miozynowe [52]. W preparatach utrwalonych zachowują się o wiele trudniej. Ich ilość ocenia się na 160 na $1 \mu\text{m}^2$ przekroju poprzecznego komórki mięśniowej. Zwykle mają nieregularny obrys przekroju poprzecznego, którego rozmiary wahają się w granicach 15–17 nm. W mięśniach naczyń długość miofilamentów grubych oceniono na $2,2 \mu\text{m}$ [2]. Długość izolowanych miofilamentów grubych nie przekraczała zwykle $3 \mu\text{m}$, choć niektóre dochodziły do $8 \mu\text{m}$ [36]. Końce miofilamentów grubych wykazują charakterystyczne zaostrenie. Podobnie jak w mięśniach szkieletowych na miofilamentach grubych miocytów gładkich stwierdzono obecność mostków poprzecznych (cross-bridges) [22, 92–94, 99]. Prawdopodobnie ułożone są one helisowato na powierzchni miofilamentu [92, 98, 99]. Mostki uważa się za głowy cząsteczek miozyny budujących miofilament gruby, choć sposób agregacji miozyny w miofilamencie nie jest ostatecznie poznany. Jest on najprawdopodobniej odmienny niż w mięśni szkieletowym [89].

Obecność miofilamentów grubych w miocytach gładkich była przedmiotem licznych dyskusji [6]. Mimo dość wczesnego ujawnienia ich w cytoplazmie miocytów [17, 22, 27, 40, 56, 76], ich autentyczność była kwestionowana przez niektórych badaczy [61], którzy uznawali je za artefakty. Sugerowano, iż miozyna w miocytach pozostaje w formie nie zorganizowanej strukturalnie [83], lecz na skutek utrwalania ujawnia się w preparatach w postaci miofilamentów lub taśm (ribbons). Trudności z uwidocznieniem grubych miofilamentów spowodowały również powstanie zarzuconej już dziś teorii głoszącej, że miozyna obecna w komórce w postaci dimerów agreguje w miofilamenty jedynie w momencie skurczu [93]. Obecnie miofilamenty grube uważa się za niewątpliwą składnik żywych komórek mięśni gładkich, niezależny od ich stanu funkcjonalnego. Nadal jednak ich morfologia może przedstawiać się rozmaicie, głównie w zależności od zastosowanej techniki utrwalania. Szczególnie zastosowanie osmu jako wyłącznego utrwalacza destabilizuje strukturę miofilamentów grubych [97].

Filamenty pośrednie zostały najbardziej jednoznacznie określone. Są one o wiele bardziej stabilne od miofilamentów, odporne na destrukcję w wyniku procedury utrwalania [93, 97]. Filamenty pośrednie są stałym elementem strukturalnym komórki mięśnia gładkiego. Charakteryzują się bardzo jednorodną średnicą przekroju równą 10 nm. Ich przekrój

poprzeczny ma obrys wyraźny, często w ich wnętrzu widoczny jest jaśniejszy rdzeń [76, 87, 93, 106]. Składają się z czterech podjednostek, każda o średnicy 3,5 nm [93]. Liczebność filamentów pośrednich może podlegać znacznym wahaniom, nawet w obrębie tej samej populacji komórek [36]. Występują w znacznej liczbie w rozwijającym się mięśniu *in vitro* i *in vivo* [12, 51, 106]. Nie stanowią jednak prekursorów miofilamentów; nigdy nie występują w ciągłości z nimi [97]. Nie jest też słuszny pogląd, iż stanowią one rusztowanie, na podłożu którego agregują miofilamenty ani też nie stanowią produktu ich rozpadu [93]. Rozmieszczenie filamentów pośrednich w komórce jest bardzo rozmaite. Mogą tworzyć pęczki w centralnym obszarze komórki [15] lub występować pojedynczo, albo w małych grupach wśród miofilamentów. Zwykle występują w sąsiedztwie ciał gęstych i taśm gęstych [2, 15, 75, 92] i wnikają do ich wnętrza [76, 93]. Ze względu na fakt, że filamente pośrednie przebiegają pomiędzy ciałami gęstymi, łącząc je ze sobą i z taśmami gęstymi przylegającymi do błon [2, 15], przypuszcza się, że tworzą one system szkieletowy komórki, podobny do opisanego w mięśniu skóśnie prążkowanym bezkręgowców [77]. Ze względu na przypuszczalne funkcje szkieletowe filamentów pośrednich proponuje się by białko, które je buduje, nazywać „szkieletyną” (skeletin) [86].

Występowanie filamentów pośrednich nie ogranicza się jedynie do komórek mięśni gładkich [53]. Poza innymi rodzajami mięśni spotykane są one również licznie w komórkach niemięśniowych [36, 60]: fibroblastach [51], komórkach endotelialnych [5], komórkach epitelialnych, gdzie nazywane są tonofilamentami [48], komórkach glejowych, gdzie określa się je jako gliofilamenty [80] oraz w neuronach, gdzie znane są pod nazwą neurofilamentów [80]. W komórkach mezenchymatycznych i ich pochodnych nazywa się je filamentami vimentynowymi [60]. We włóknach mięśni prążkowanych ich obecność wykryto na obrzeżach dysków linii Z. Nazwano je filamentami desminowymi i stwierdzono, że ich rola polega na utrzymywaniu wzajemnie zliniowanej struktury prążkowej sąsiadujących miofibryli [60]. Podobnie przypuszcza się, że filamente pośrednie odpowiedzialne być mogą za mocowanie dysków linii Z do błony komórkowej w miocytach mięśnia sercowego [59]. Tak więc rola filamentów pośrednich jako mechanicznych integratorów elementów aparatu kurczliwego byłaby zbieżna we wszystkich typach mięśni.

Brak prążkowania poprzecznego w mięśniach gładkich jest jedną z bardziej istotnych cech odróżniających ten mięsień od pozostałych typów. Znajduje to wyraz w nazwie mięśnia. Brak prążkowania jest wynikiem nieperiodycznego rozmieszczenia miofilamentów cienkich i grubych, a co za tym idzie brakiem sarkomerów i miofibryli — tak charakterystycznych elementów strukturalnych mięśni prążkowanych. Okazuje

się jednak, że przy wnikliwej analizie elektronogramów licznych skrawków miocytów gładkich można dopatrzeć się analogii do miofibrył w organizacji sarkoplazmy miocyta gładkiego. W sarkoplazmie tej występują bowiem naprzemiennie obszary zawierające miofilamenty cienkie i grube i takie rejony, które ich nie zawierają, lecz wykazują obecność wyłącznie filamentów pośrednich. Na elektronogramach udaje się te obszary wyraźnie rozgraniczyć przez obwodzenie linią ciągłą. Obszary cytoplazmy zawierające miofilamenty cienkie i grube zachowują ciągłość na skrawkach seryjnych, można więc je uznać za słabo uorganizowane, trudne do dostrzeżenia analogi miofibryli (Gabella, w przygotowaniu). Ich struktura wewnętrzna wykazuje obecność tych samych lub analogicznych struktur budujących sarkomery: miofilamentów i materiału linii Z. Można więc uznać, że w mięśni gładkim mamy do czynienia ze słabo uorganizowanymi miofibrylami i sarkomerami „w rozproszeniu”.

MECHANIZM SKURCZU

Przyjmuje się, że w mięśni gładkim skurcz realizowany jest według podobnego modelu jak w mięśni szkieletowym [57] — na zasadzie mechanizmu ślizgowego zachodzących na siebie miofilamentów kompleksu miozynowo-aktynowego (ryc. 16) [18, 46]. Przemawia za tym wiele podobieństw strukturalnych aparatu kurczliwego mięśni gładkich do mięśni prążkowanych, których prześledzenie nie było jednak proste. Pozostaje nadal wiele wątpliwości i ewidentnych różnic, dzięki którym obraz zjawiska skurczu mięśnia gładkiego nie jest tak jasny jak w mięśni szkieletowym. O wiele większy zakres skurczu, niska zawartość miozyny, występowanie miofilamentów aktynowych w pęczkach, znaczna siła mięśnia gładkiego, niejasny sposób zakotwiczenia ciał gęstych w cytoplazmie, wielokierunkowość przebiegu miofilamentów, brak T-systemu i hipotetyczna rola kaweoli w przenoszeniu bodźca z powierzchni do wnętrza komórki, wielość możliwości kompartmentalizacji wapnia i niejasności mechanizmu jego uwalniania to czynniki, które nie tylko zaciemniają nam obraz, lecz także niewątpliwie decydują o funkcjonalnej i strukturalnej odrębności mięśnia gładkiego [34].

POŁĄCZENIA MIĘDZYKOMÓRKOWE

Każda pojedyncza komórka mięśnia gładkiego otoczona jest w sposób kompletny własną błoną i stanowi niezależną jednostkę wykonującą skurcz. Mimo obfitego unerwienia mięśnia gładkiego nie wszystkie komórki mięśniowe otrzymują jednak indywidualny akson z płytką moto-

ryczną [34, 36, 45]. Nasuwają się więc pytania: w jaki sposób propagowany jest bodziec z komórki na komórkę przy braku kompletnego unerwienia? jaki czynnik mechaniczny utrzymuje zespoły komórek w całości i zapobiega rozrywaniu się mięśnia w trakcie jego pracy? Odpowiedzi na te pytania ściśle się ze sobą wiążą, gdyż dotyczą elektrycznego i mechanicznego zespolenia komórek mięśniowych, realizowanego przez wielorakie połączenia międzykomórkowe [45]. Zarzucone dawne koncepcje, iż mięsień gładki stanowi syncytium komórkowe odzyskują poniekąd swe uzasadnienie, ponieważ — mimo jednokomórkowych składników — mięsień gładki traktować można jako funkcjonalne syncytium [26].

POŁĄCZENIA POŚREDNIE

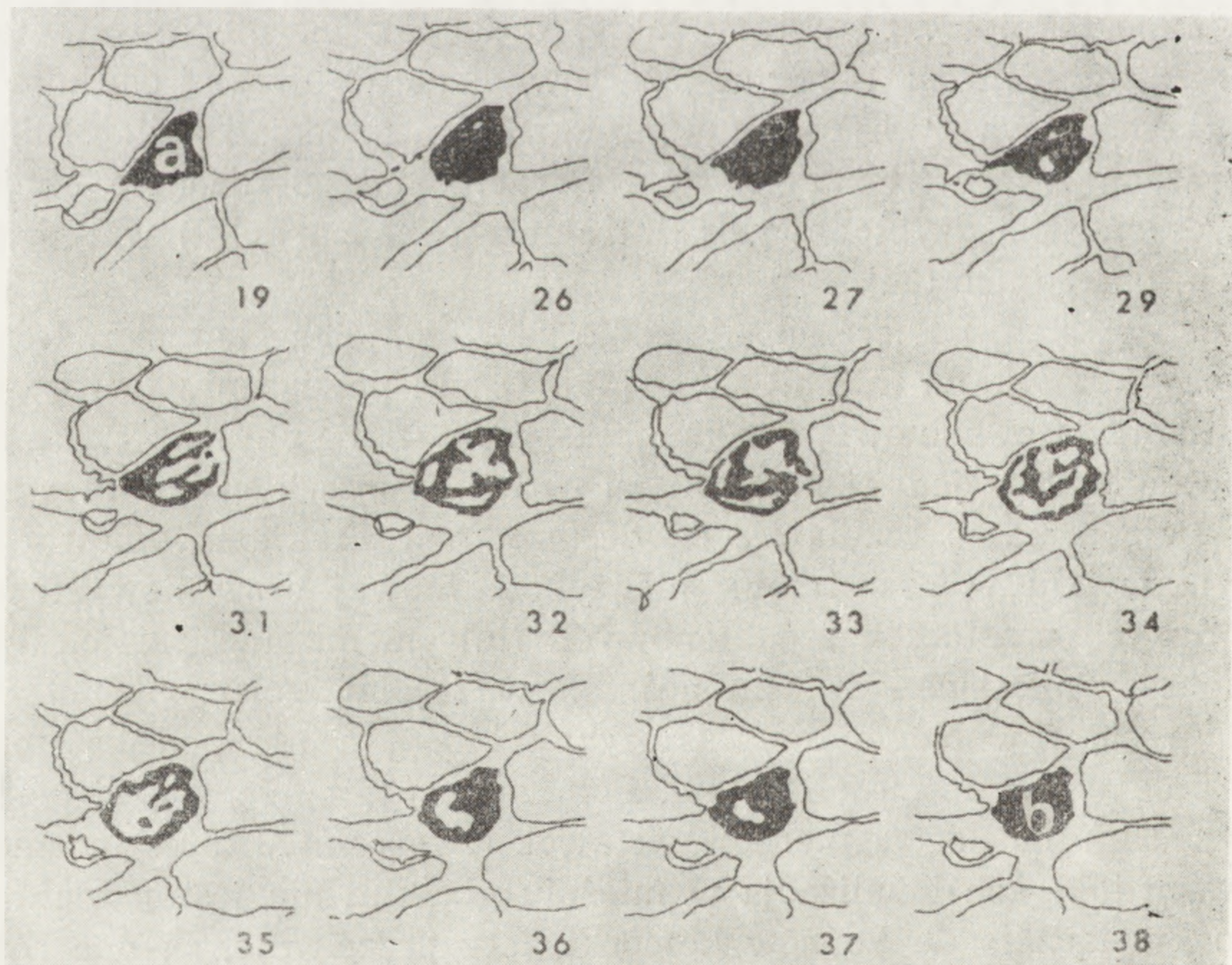
Połączenie pośrednie (intermediate junction) polega na apozycji dwu taśm gęstych w sąsiadujących ze sobą komórkach [45]. Ze względu na to, że struktury takie często występują na skierowanych do siebie wyniosłościach sąsiednich komórek nazywano je także mostkami (bridges) [50]. Przestrzeń dzieląca obie komórki w tym miejscu zawęża się do szczeliny o szerokości 30–40 nm. Jest ona wypełniona materiałem błony podstawnej obu komórek, który w tym obszarze wykazuje niewyraźną periodyzację struktury [36]. Wspólna blaszka zbudowana z materiału błony podstawnej najwyraźniej cementuje obie komórki w miejscu połączenia pośredniego. Struktury takie, podobnie jak nieparzyste taśmy gęste, osiągają długość 1–2 μm i leżą równolegle do długiej osi komórek. Błona komórkowa tych rejonów nie wykazuje specjalizacji struktury. W obrazach kriorytownicznych (freeze-fracture) stwierdza się obniżoną liczbę cząstek międzybłonowych (intramembrane particles) w obszarach połączeń pośrednich [34].

Jak się sądzi, połączenia pośrednie zapewniają mechaniczny kontakt pomiędzy komórkami mięśniowymi [36]. Dzięki powiązaniu taśmy gęstej z miofilamentami stanowią one miejsca przenoszenia siły skurczu z pęczka miofilamentów jednej komórki na podobny pęczek w komórce sąsiedniej. Połączenia te różnią się od desmosomów brakiem wielowarstwowego materiału w przestrzeni międzykomórkowej oraz niewystępowaniem dużych cząsteczek śródbłonowych (intramembrane particles) [36]. Filamenty wnikające do taśm gęstych w rejonie połączenia z reguły układają się równolegle do płaszczyzny błony, a nie pod kątem, jak ma to miejsce w desmosomie [45]. Połączenie pośrednie mięśni gładkich porównać można do fragmentów wstawek (intercalated discs) w mięśniu sercowym [34]. Ich lokalizacja w mięśniu gładkim nie jest jednak ograniczona wyłącznie do końców komórki, lecz przeciwnie, są one rozproszone równomiernie po jej powierzchni.

Nieco odmienny typ połączenia pośredniego występuje w mięśniach gładkich naczyń. Połączenia takie są mniejsze, nie są wydłużone, lecz zwykle mają kształt zaokrąglony. Przestrzeń międzykomórkowa w ich obrębie mierzy 15–20 nm szerokości, a materiał wchodzący w ich obręb taśm gęstych nie wykazuje związku z miofilamentami, lecz jest wyłącznie zagęszczeniem cytoplazmy. Takie połączenia występują też czasem pomiędzy komórkami mięśni gładkich a zakończeniami nerwowymi. Ich funkcja nie jest jednak jasna [36].

INNE RODZAJE POŁĄCZEŃ MIĘDZYKOMÓRKOWYCH

Błona komórkowa miocyta wykazuje rozmaite zafalowania, które mają swoje odpowiedniki w ukształtowaniu błony komórkowej sąsiedniej komórki. Nie związane są one z występowaniem żadnych specyficznych struktur w cytoplazmie, specjalizacji błon ani szczególnym nagromadzeniem substancji międzykomórkowych. Stąd też połączenia takie nazywa się prostym przyleganiem (simple apposition) [45]. Ze względu na kształt wypustek wpuklających cytoplazmę komórki sąsiedniej (ryc. 4, P) używane są też takie nazwy, jak: połączenie intruzyjne lub przegubowe. W literaturze zagranicznej stosowane są bardzo rozmaite nazwy: instrusions, socket joints [50], interdigitations [45], bulbous projections [30]. Odległość pomiędzy błonami komórkowymi w takich



Ryc. 18.

rejonach może zostać zmniejszona do przestrzeni ok. 10 nm; następuje tam wtedy utrata błony podstawnej pomiędzy błonami komórkowymi sąsiednich komórek biorących udział w tworzeniu połączenia [30, 45]. Wydaje się, że struktury tego typu realizują zadania mechanicznego zespalania komórek mięśni gładkich, nie brak jednak opinii, iż mogą one być także odpowiedzialne za istnienie niskooporowych połączeń dla propagacji potencjałów elektrycznych z jednej komórki na drugą [45].

Na uwagę zasługuje także struktura samych końców wrzecionowatych miocytów. Mikroskop elektronowy ujawnia, że nie są one ostro wyciągniętymi „szpicami”, lecz przedstawiają się jako rozbudowany system zafałdowań i wypustek, za pomocą których końce komórek leżących w tej samej osi kontaktują się ze sobą. Strukturę tych połączeń przeanalizowano na poprzecznych seryjnych ultraskrawkach i przedstawiono graficznie (ryc. 18) [32]. Ze względu na złożoną strukturę rejony te określa się terminem „końcowe aparaty kotwiczące” (terminal anchoring apparatus). Przypominają one nieco strukturę końców włókien mięśni prążkowanych, na których tworzą się zakończenia mięśniowo-ścięgniste.

POŁĄCZENIE SZCZELINOWE (NEKSUS)

Nazwą neksus określa się połączenie szczelinowe (gap junction) występujące w mięśni gładkim [26, 28, 38]. Neksus stanowi zespolenie błon komórkowych tak bliskie, że przestrzeń pomiędzy nimi ograniczona jest jedynie do pozbawionej błony podstawnej szczeliny o szerokości 2–3 nm. Są to rozmiary rzędu elementów składowych samej błony komórkowej, stąd szczelinę trudno jest uwidocznić. Na przeciętnych elektronogramach połączenia te przedstawiają się tak, jak gdyby dochodziło do kompletnej fuzji błon. Więcej szczegółów uwidaczniają jednak wysokiej jakości elektronogramy sporządzone przy zastosowaniu dużych powiększeń. W szczelinę połączeń mogą wnikać drobnocząsteczkowe wyznaczniki przestrzeni pozakomórkowej (np. koloidalny wodorotlenek lantanu). Wykazać można, że jest ona wypełniona delikatnymi mostkami przebiegającymi od jednej błony do drugiej. Wygląd połączenia typu „gap junctions” w preparatach krojonych, a szczególnie ilość warstw uwidoczonych w strukturze połączenia, zależy w znacznym stopniu od zastosowanej procedury utrwalania tkanki [4, 45]. Przy rutynowym preparowaniu tkanki do mikroskopu elektronowego (aldehyd glutarowy i OsO_4 lub KMNO_4 , podwójne barwienie skrawków cytrynianem ołowiu i octanem uranylu) ukazuje się pięciowarstwowa struktura połączenia [25]. Pochodzi to stąd, że szczelina pomiędzy błonami nie jest widoczna. Dlatego też zrodziło się przypuszczenie, że dochodzić tu może do zespalania się błon. Połączenie szczelne (tight junction) nie występuje jednak

w mięśniu gładkim [45]. Barwienie en bloc octanem uranylu pozwala na uwidocznienie 2 nm szczeliny pomiędzy błonami [73], struktura połączenia zaś złożona jest z siedmiu warstw (ryc. 14) [105].

Połączenia szczelinowe przedstawiają się efektownie na preparatach przygotowywanych techniką kriorytownictwa (freeze-fracture). Widoczne są jako dyskowate obszary, które po stronie zewnętrznej przełomu błony (strona P) obsadzone są cząstkami międzybłonowymi (intramembrane particles) o średnicy 8–10 nm (ryc. 15), podczas gdy po stronie wewnętrznej (strona E) występują ich odpowiedniki w postaci dołeczek. Struktura tego typu połączenia nie odbiega od opisywanej w innych tkankach [14], w szczególności w nerwowej i nabłonkowej [36]. Morfologia połączeń szczelinowych mięśni gładkich w dużym stopniu pokrywa się z morfologią tych połączeń występujących w obrębie wstawek w mięśniu sercowym [1, 102]. Uważa się, że połączenie typu „gap junction” umożliwia wzajemną wymianę jonów i związków drobnocząsteczkowych pomiędzy komórkami [41]. Obserwowane ziarnistości stanowią prawdopodobnie rodzaj kanałów, poprzez które mogą przenikać substancje na wskroś błon z komórki do komórki [4]. W przypadku mięśnia gładkiego połączenia te stanowią również miejsca elektrycznego sprzężenia miocytów.

Połączenia szczelinowe często występują na wypustkach cytoplazmatycznych lub wyniosłościach powierzchni komórki [45]. Zespolecie błon w połączeniu szczelinowym zwykle występuje na obszarze o średnicy 0,5 μm , choć maksymalne rozmiary tego połączenia mogą dochodzić do 2–3 μm [45]. Ilość połączeń szczelinowych jest bardzo różnaita. W jelicie świnki morskiej zajmują one ok. 0,2% powierzchni komórek, a ich ilość ocenia się na ok. 250 sztuk w każdej komórce [38]. Są jednakże inne mięśnie, w których prawie całkowicie nie stwierdza się obecności połączeń szczelinowych [28, 37]. Stąd też wniosek, że sprzężenie elektryczne miocytów gładkich nie musi być realizowane wyłącznie za pośrednictwem tych połączeń [36].

ORGANIZACJA MIĘŚNIA GŁADKIEGO

Mięsień gładki zwykle zbudowany jest z zespołów miocytów, które układają się w warstwy tworząc tzw. błony, np. w mięśniówce przewodu pokarmowego. Niekiedy komórki mięśniowe występują też pojedynczo, np. w ścianach cienkich naczyń lub kosmkach jelita [34]. W błonie mięśniowej jelita miocyty są ciasno upakowane. Na 1 mm^3 tkanki przypada około 180 000 komórek [31]. Komórki dzieli wąska przestrzeń rzędu kilku nanometrów, wypełniona kolagenem. Nieliczne większe przestrzenie zajęte są przez elementy tkanki nerwowej, kapilary, komórki

interstycjalne i przegrody łącznotkankowe. Pojemność przestrzeni międzykomórkowych mięśnia gładkiego została wyznaczona morfometrycznie na elektronogramach. Wynosi ona ok. 10–30% objętości mięśnia [34].

Mięsień gładki w zasadzie nie wykazuje powiązań ze ścięgnami. Wysoka zawartość kolagenu w tym mięśniu pozwala na stwierdzenie, że w przypadku mięśnia gładkiego mamy do czynienia ze „ścięgnem śródmięśniowym” (intermuscular tendon) [34]. Wszechobecne wśród miocytów włókna kolagenowe muszą odgrywać znaczną rolę w przeniesieniu siły skurczu z jednych komórek na drugie. Grupy komórek tworzą pęczki wyodrębnione przegrodami (septa). Przegrody nie otaczają pęczków w sposób kompletny, tak że zawsze każde grupy komórek są w kontakcie z wszystkimi innymi komórkami mięśniowymi danego mięśnia. W mięśniu gładkim jelita nie występuje omięsna (perimysium) [36].

INNE ELEMENTY KOMÓRKOWE MIĘŚNIA GŁADKIEGO

Miocyty stanowią zdecydowaną większość wśród populacji komórek mięśnia gładkiego. Nie brak tam także innych elementów komórkowych, które są jednak mało liczne. Obecne w mięśniu gładkim komórki interstycjalne opisane były przez Cajala [11] jako zmodyfikowane neurony. Impregnują się one srebrem i barwią błękitem metylenowym oraz wykazują pozytywną reakcję na niespecyficzne esterazy. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe wskazują jednak, że ich struktura jest bliższa mikroblastom, ale ich funkcja nadal pozostaje niejasna [36].

Inne komórki spotykane w mięśniu gładkim to makrofagi wykazujące intensywną aktywność fagocytarną, komórki tuczne i komórki niezróżnicowane o charakterze mioblastów [36]. Mięsień przeniknięty jest siecią kapilar i innych naczyń oraz elementów nerwowych.

LITERATURA

- [1] AKESTER A. R., Intercalated discs, nexuses, sarcoplasmic reticulum and transitional cells in the heart of the adult domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*), *J. Anat.*, **132**: 161–179, 1981.
- [2] ASHTON F. T., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereo electron microscopy, *J. Mol. Biol.*, **98**: 17–29, 1975.
- [3] ATSUMI S., Sarcoplasmic reticulum and intracellular calcium localization at rest and during contraction in *Mytilus* smooth muscle, *Archiv. hist. jap.*, **41**: 239–258, 1978.
- [4] BILIŃSKI S., KLAG J., Ultrastruktura i funkcja połączeń międzykomórkowych, [w:] *Ultrastruktura i funkcja komórki*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka, PWN, Warszawa, t. II, 233–253, 1982.

- [5] BLOSE S. H., SHELANSKI M. L., CHACKO S., Localization of bovine brain filament antibody on intermediate (100 Å) filaments in guinea pig vascular endothelial cells and chick cardiac muscle cells, *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, **74**: 662-665, 1977.
- [6] BOIS R. M., The organization of the contractile apparatus of vertebrate smooth muscle, *Anat. Rec.*, **177**: 61-78, 1973.
- [7] BREMEL R. D., Myosin linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **252**: 405-407, 1974.
- [8] BULLIVANT S., Freeze etching and freeze fracturing, [w:] *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*, red. J. K. Koehler, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 67-112, 1973.
- [9] BURNSTOCK G., Structure of smooth muscle and its innervation, [w:] *Smooth muscle*, red. E. Bülbbring, A. F. Brading, A. W. Jones, T. Tomita, wyd. Arnold, London, 1-69, 1970.
- [10] CAESAR R., EDWARDS G. A., RUSKA H., Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue, *J. biophys. bioch. Cytol.*, **3**: 867-889, 1957.
- [11] CAJAL S. R., Sur les ganglions et le plexus nerveux de l'intestin, *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **5**: 217-223, 1893.
- [12] CAMPBELL G. R., CHAMLEY-CAMPBELL J., GRÖSCHEL-STEWARD U., SMALL J. V., ANDERSON P., Antibody staining of 10-nm (100 Å) filaments in cultured smooth, cardiac and skeletal muscle cells, *J. Cell Sci.*, **37**: 303-322, 1979.
- [13] CHAMLEY J. H., CAMPBELL G. R., Mitosis of contractile smooth muscle cells in tissue culture, *Exp. Cell Res.*, **84**: 105-110, 1974.
- [14] COBB J. L. S., BENNETT T., An ultrastructural study of mitotic division in differentiated gastric smooth muscle cells, *Z. Zellforsch.*, **108**: 177-189, 1970.
- [15] COOKE P., A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibres, *J. Cell Biol.*, **68**: 539-556, 1976.
- [16] COOKE P. H., FAY F. S., Correlation between fiber length, ultrastructure, and the length tension relationship of mammalian smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **52**: 105-116, 1972.
- [17] COOKE P. H., FAY F. S., Thick myofilaments in contracted and relaxed mammalian smooth muscle, *Exp. Cell Res.*, **71**: 265-272, 1972.
- [18] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni, *Post. Bioch.*, **22**: 467-481, 1976.
- [19] DEAMER D. W., BASKIN R. J., Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum preparations, *J. Cell Biol.*, **42**: 296-307, 1969.
- [20] DEBBAS G., HOFFMAN L., LANDON E. J., HURWITZ L., Electron microscopic localization of calcium in vascular smooth muscle, *Anat. Rec.*, **182**: 447-472, 1975.
- [21] DEVINE C. E., RAYNS D. G., Freeze-fracture studies of membrane systems in vertebrate muscle II. Smooth muscle, *J. Ultr. Res.*, **51**: 293-306, 1975.
- [22] DEVINE C. E., SOMLYO A. P., Thick filaments in vascular smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **49**: 636-649, 1971.
- [23] DEVINE C., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., Sarcoplasmic reticulum and excitation contraction coupling in mammalian smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **52**: 690-718, 1972.
- [24] DEVINE C. E., SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., Sarcoplasmic reticulum and mitochondria as cation accumulation sites in smooth muscle, *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*, **265**: 17-23, 1973.

- [25] DEWEY M. M., BARR L., Intercellular connection between smooth muscle cells: the nexus, *Science*, **137**: 670-672, 1962.
- [26] DEWEY M. M., BARR L., Structure of vertebrate intestinal muscle, [w:] *Handbook of Physiology*, Sect. 6, Alimentary canal, red. C. F. Code, wyd. Am. Physiol. Soc., Washington, 1629-1654, 1968.
- [27] FAY F. S., COOKE P. H., Reversible disaggregation of myofilaments in vertebrate smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **56**: 399-411, 1973.
- [28] FRY G. N., DEVINE C. E., BURNSTOCK G., Freeze-fracture studies of nexuses between smooth muscle cells, *J. Cell Biol.*, **72**: 26-34, 1977.
- [29] GABELLA G., Caveolae intracellulares and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle, *J. Cell Sci.*, **8**: 601-609, 1971.
- [30] GABELLA G., Intercellular junctions between circular and longitudinal muscle layers, *Z. Zellforsch.*, **125**: 191-199, 1972.
- [31] GABELLA G., Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli, *Cell Tiss. Res.*, **170**: 161-186, 1976.
- [32] GABELLA G., Arrangement of smooth muscle cells and intramuscular septa in the taenia coli, *Cell Tiss. Res.*, **184**: 195-212, 1977.
- [33] GABELLA G., Hypertrophic smooth muscle I. Size and shape of cells, occurrence of mitoses, *Cell Tiss. Res.*, **201**: 63-78, 1978.
- [34] GABELLA G., Smooth muscle cell junctions and structural aspects of contraction, *Br. Med. Bull.*, **35**: 213-218, 1979.
- [35] GABELLA G., Structure of smooth muscle, [w:] *Smooth Muscle: an assessment of current knowledge*, red. E. Bülbring, A. F. Brading, A. W. Jones, T. Tomita, wyd. E. Arnold, London, 1-46, 1980.
- [36] GABELLA G., Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract, [w:] *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, red. L. R. Jahanson, wyd. Raven Press, New York, 197-241, 1981.
- [37] GABELLA G., BLUNDELL D., Effect of stretch and contraction on caveolae of smooth muscle cells, *Cell Tiss. Res.*, **190**: 255-271, 1978.
- [38] GABELLA G., BLUNDELL D., Nexuses between the smooth muscle cells of the guinea pig ileum, *J. Cell Biol.*, **82**: 239-247, 1979.
- [39] GABELLA G., YAMEY A., Synthesis of collagen by smooth muscle in the hypertrophic intestine, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **62**: 257-264, 1977.
- [40] GARAMVÖLGYI N., VIZI E. S., KNOLL J., Regular occurrence of thick filaments in stretched mammalian smooth muscle, *J. Ultr. Res.*, **34**: 135-143, 1971.
- [41] GILULA N. B., Structure of intercellular junctions, [w:] *Intercellular Junctions and Synapses*, red. J. Feldman, N. B. Gilula, J. D. Pitts, wyd. Chapman and Hall, London, 1-22, 1978.
- [42] GOODFORD P. J., WOLOWYK M. W., Localization of cation interactions in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli, *J. Physiol. (Lond.)*, **224**: 521-535, 1972.
- [43] HARTSHORNE D. J., AKSOY M., Introduction. Biochemistry of the contractile proteins in smooth muscle: a survey of current knowledge, [w:] *The biochemistry of smooth muscle*, red. Stephens, wyd. University Park Press, Baltimore, 363-378, 1977.
- [44] HAYAT M. A., Principles and Techniques of Electron Microscopy, vol. I. Biological applications, wyd. Van Nostrand Reinhold, New York 1970.
- [45] HENDERSON R. M., Cell-to-cell contacts, [w:] *Methods in Pharmacology*, vol. 3, Smooth Muscle, red. E. E. Daniel, D. M. Paton, wyd. Plenum Press, New York, London, 47-77, 1975.

- [46] HEUMANN H. G., Mechanisms of smooth muscle contraction. An Electron Microscopic study of the mouse large intestine, *Cytobiol.*, **3**: 259–282, 1971.
- [47] HEUMANN H. G., The subcellular localization of calcium in vertebrate smooth muscle: calcium-containing and calcium-accumulating structures in muscle cells of mouse intestine, *Cell Tiss. Res.*, **169**: 221–231, 1976.
- [48] HEUMANN H. G., WEIGOLD M., Are intermediate filaments of vertebrate smooth muscle cells an tonofilaments of epithelial cells identical cell structures? *Experientia*, **34**: 649–650, 1978.
- [49] HINEK A., Struktura i morfogeneza włókien sprężystych, *Post. Biol. Kom.*, **6**: 209–238, 1979.
- [50] HUDDART H., HUNT S., *Visceral muscle. Its structure and function*, wyd. Blackie, Glasgow, London 1975.
- [51] ISHIKAWA H., BISCHOFF R., HOLTZER H., Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle, *J. Cell Biol.*, **38**: 538–555, 1968.
- [52] ISHIKAWA H., BISCHOFF R., HOLTZER H., Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types, *J. Cell Biol.*, **43**: 312–328, 1969.
- [53] JAKUBIEC-PUKA A., Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych, *Post. Biochem.*, **3/4**, 1981 (w druku).
- [54] JONAS L., ZELCH U., The subcellular calcium distribution in the smooth muscle cells of the pig coronary artery, *Exp. Cell Res.*, **89**: 352–358, 1974.
- [55] KAMIO A., HUANG W. Y., IMAI H., KUMMEROW F. A., Mitotic structures of aortic smooth muscle cells in swine and in culture: paired cisternae, *J. Electron Microsc.*, **26**: 29–40, 1977.
- [56] KELLY R. E., RICE R. V., Ultrastructural studies on the contractile mechanism of smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **27**: 199–213, 1969.
- [57] KILARSKI W., *Zarys ultrastruktury mięśni prążkowanych kręgowców*, [w:] *Ultrastruktura i funkcja komórki*, red. J. Kawiak, Z. Osuchowska, A. Przełęcka. PWN, Warszawa 1973, 227–239.
- [58] KOEHLER J. K., *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy*, wyd. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.
- [59] KORDYLEWSKI L., VASSAL-ADAMS R., Structure of Z-line linkage to cell membrane in human heart, *J. Anat.* (w przygotowaniu).
- [60] LAZARIDES E., Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, *Nature*, **283**: 249–256, 1980.
- [61] LOWY J., SMALL J. V., The organization of myosin and actin in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **227**: 46–51, 1970.
- [62] MAKITA T., KIWAKI S., Connection of microtubules, caveolae, mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the taenia coli of guinea-pigs, *Arch. histol. Jap.*, **41**: 167–176, 1978.
- [63] MERRILLEES N. C. R., The nervous environment of individual smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens, *J. Cell Biol.*, **37**: 794–817, 1968.
- [64] MUGGLI R., BAUMGARTNER H. R., Pattern of membrane invaginations at the surface of smooth muscle cells of rabbit arteries, *Experientia*, **28**: 1212–1214, 1972.
- [65] MURPHY R. A., Contractile system in mammalian smooth muscle, *Blood vessels*, **13**: 1–23, 1976.
- [66] NONOMURA Y., Fine structure of myofilaments in chicken gizzard smooth muscle, [w:] *Recent Progress in Electron Microscopy of Cells and Tissues*,

- red. E. Yamada, V. Mizuhira, V. Kurosumi, T. Nagano, wyd. Georg Thieme, Stuttgart 1976, 40-48.
- [67] ORCI L., PERRELET A., Membrane-associated particles: increase at sites of pinocytosis demonstrated by freeze-etching, *Science*, **181**: 868-869, 1973.
- [68] PEASE D. C., MOLINARI S., Electron microscopy of muscular arteries: pial vessels of the cat and monkey, *J. Ultrastr. Res.*, **3**: 447-468, 1960.
- [69] POPESCU L. M., DICULESCU I., ZELEK U., JONESCU N., Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli, *Cell Tiss. Res.*, **154**: 357-378, 1974.
- [70] PRESCOTT L., BRIGHTMAN M. W., The sarcolemma of Aplysia smooth muscle in freeze-fracture preparations, *Tiss. Cell*, **8**: 158-241, 1976.
- [71] PROSSER C. L., BURNSTOCK G., KAHN J., Conduction in smooth muscle: comparative structural properties, *Am. J. Physiol.*, **199**: 545-552, 1960.
- [72] RAEYMAEKERS L., WUYTACK F., BATRA S., CASTEELS R., A comparative study of the calcium accumulation by mitochondria and microsomes isolated from the smooth muscle of the guinea pig taenia coli, *Pflügers Arch.*, **368**: 217-223, 1977.
- [73] REVEL J. P., OLSON W., KARNOWSKY M. J., A twenty-angstrom gap junction with a hexagonal array of subunits in smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **35**: 112 A, 1967.
- [74] RHODIN J. A. G., Fine structure of vascular walls in mammals, with special reference to smooth muscle component, *Physiol. Rev.*, **42**: 48-81, 1962.
- [75] RICE R. V., BRADY A. C., Biochemical and ultrastructural studies on vertebrate smooth muscle, [w:] *The mechanism of muscle contraction*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 37th ed., wyd. Cold Spring Harbor Lab., New York 1973, 429-438.
- [76] RICE R. V., MOSES J. A., McMANUS M., BRADY A. C., BLASIK L. M., The organization of contractile filaments in a mammalian smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **47**: 183-196, 1970.
- [77] ROSENBLUTH J., Obliquely striated muscle III. Contraction mechanisms of *Ascaris* body muscle, *J. Cell Biol.*, **34**: 15-33, 1967.
- [78] ROSS R., The smooth muscle cell II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibres, *J. Cell Biol.*, **50**: 172-186, 1971.
- [79] ROSS R., KLEBANOFF S. J., The smooth muscle cells I. In vivo synthesis of connective tissue proteins, *J. Cell Biol.*, **50**: 159-171, 1971.
- [80] SHELANSKI M. L., YEN S. H., LEE V. M., Neurofilaments and glial filaments, [w:] *Cell Motility*, red. R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum, wyd. Cold Spring Harbor Lab., 1007-1020, 1976.
- [81] SHOENBERG C. F., HASELGROVE J. C., Filaments and ribbons in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **249**: 152-154, 1974.
- [82] SHOENBERG C. F., NEEDHAM D. M., A study of the mechanism of contraction in vertebrate smooth muscle, *Biol. Rev.*, **51**: 53-104, 1976.
- [83] SHOENBERG C. F., RÜEGG J. C., NEEDHAM D. M., SCHIRMER R. H., NEMETCHEK-GLANSER H., A biochemical and electron microscope study of the contractile proteins in vertebrate smooth muscle, *Biochem.*, **2**: 255-266, 1966.
- [84] SCHOLLMAYER J. E., FURCHT L. T., GOLL D. E., ROBSON R. M., STROMER M. H., Localization of contractile proteins in smooth muscle cells and in normal and transformed fibroblasts, [w:] *Cell Motility*, red. R. Gold-

- man. T. Pollard, J. Rosenbaum, wyd. Cold Spring Harbor Lab., Harbor, New York 1976, 361-388.
- [85] SCHOLLMAYER J. E., GOLL, D. E., ROBSON D. E., STROMER M. H., Localization of α -actinin and tropomyosin in different muscles, *J. Cell Biol.*, **59**: 306 a, 1973.
- [86] SMALL J. V., SOBIESZEK A., Studies on the function and composition of the 10 nm (100 Å) filaments of vertebrate smooth muscle, *J. Cell Sci.*, **23**: 243-268, 1977.
- [87] SMALL J. V., SQUIRE J. M., Structural basis of contraction in vertebrate smooth muscle, *J. Mol. Biol.*, **67**: 117-149, 1972.
- [88] SMETANA K., GYORKEY F., GYORKEY P., BUSCH H., Studies on the ultrastructure of nucleoli in human smooth muscle cells, *Exp. Cell Res.*, **60**: 175-184, 1970.
- [89] SOBIESZEK A., Vertebrate smooth muscle myosin. Enzymatic and structural properties, [w:] *The Biochemistry of Smooth Muscle*, red. N. L. Stephens, wyd. University Park Press, Baltimore, 413-443, 1977.
- [90] SOMLYO A. P., DEVINE C. E., SOMLYO A. V., Sarcoplasmic reticulum, mitochondria and filament organization in vascular smooth muscle, [w:] *Vascular Smooth Muscle*, red. E. Betz, wyd. Springer, Berlin Heidelberg, New York 1972, 119-121.
- [91] SOMLYO A. P., DEVINE C. E., SOMLYO A. V., NORTH S. R., Sarcoplasmic reticulum and the temperature-dependent contraction of smooth muscle in calcium-free solutions, *J. Cell Biol.*, **51**: 722-741, 1971.
- [92] SOMLYO A. P., DEVINE C. E., SOMLYO A. V., RICE R. V., Filament organization in vertebrate smooth muscle, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **265**: 223-229, 1973.
- [93] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., Ultrastructure of smooth muscle, [w:] *Methods in Pharmacology*, vol. 3, *Smooth Muscle*, red. E. E. Daniel, D. M. Paton, wyd. Plenum Publ., New York 1975, 3-43.
- [94] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., ASHTON F. T., VALLIÈRES J., Vertebrate smooth muscle: ultrastructure and function, [w:] *Cell Motility*, red. R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum, wyd. Cold Spring Harbor Lab., New York 1976, 165-183.
- [95] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., DEVINE C. E., PETERS P. D., HALL T. A., Electron microscopy and electron probe analysis of mitochondrial calcium accumulation in smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **61**: 723-742, 1974
- [96] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., DEVINE C. E., RICE R. V., Aggregations of thick filaments into ribbons in mammalian smooth muscle, *Nature*, **231**: 243-246, 1971.
- [97] SOMLYO A. V., The contractile apparatus of vascular smooth muscle, [w:] *Mechanisms of Vasodilatation*, wyd. Karger, Basel 1978, 12-20.
- [98] SOMLYO A. V., Ultrastructure of vascular smooth muscle, [w:] *Handbook of Physiology*, Sect. 2, vol. II, wyd. American Physiological Society, Washington 1980, 33-67.
- [99] SOMLYO A. V., ASHTON F. T., LEMANSKI L., VALLIÈRES J., SOMLYO A. P., Filament organization and dense bodies in vertebrate smooth muscle, [w:] *The Biochemistry of Smooth Muscle*, red. Stephens, wyd. University Park Press, Baltimore 1977, 445-471.
- [100] SOMLYO A. V., SOMLYO A. P., Strontium accumulation by sarcoplasmic

- reticulum and mitochondria in vascular smooth muscle, *Science*, **174**: 955–958, 1971.
- [101] SOMMER J. R., JOHNSON E. A., Cardiac muscle. A comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers, *J. Cell Biol.*, **36**: 497–526, 1968.
- [102] SOMMER J. R., JOHNSON E. A., Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review, *Amer. J. Cardiol.*, **25**: 184–194, 1970.
- [103] TANI E., YAMAGATA S., ITO Y., Cell membrane structure of vascular smooth muscle of circle of Willis, *Cell Tiss. Res.*, **179**: 131–142, 1977.
- [104] TREGEAR R. T., SQUIRE J. M., Myosin content and filament structure in smooth and striated muscle, *J. Mol. Biol.*, **77**: 279–290, 1973.
- [105] UEHARA Y., BURNSTOCK G., Demonstration of “gap junctions” between smooth muscle cells, *J. Cell Biol.*, **44**: 215–217, 1970.
- [106] UEHARA Y., CAMPBELL G. R., BURNSTOCK G., Cytoplasmic filaments in developing and adult vertebrate smooth muscle, *J. Cell Biol.*, **50**: 484–497, 1971.
- [107] VALLIÈRES J., SCARPA A., SOMLYO A. P., Subcellular fractions of smooth muscle isolation, substrate utilization and Ca^{2+} transport by main pulmonary artery and mesenteric vein mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**: 659–669, 1975.
- [108] WATANABE H., YAMAMOTO T. Y., Freeze-etch study of smooth muscle cells from vas deferens and taenia coli, *J. Anat.*, **117**: 553–564, 1974.
- [109] WELLS G. S., WOLOWYK M. K., Freeze-etch observations on membrane structure in the smooth muscle of guinea pig taenia coli, *J. Physiol. (Lond.)*, **218**: 11–13 P, 1971.
- [110] WOOTTON G. S., GOODFORD P. J., An association between mitochondria and vesicles in smooth muscle, *Cell Tiss. Res.*, **161**: 119–132, 1975.
- [111] ZELCH U., JONAS L., WIEGERSCHAUSEN B., Ultrahistochemischer Nachweis von Calcium in glatten Muskelzellen der Arteria coronaria sinistra des Schweins, *Acta Histochem. (Jena)*, **44**: 180–182, 1972.

Otrzymano: 23 grudnia 1981.

Przyjęto: 8 marca 1982.

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

- [101] ...
- [102] ...
- [103] ...
- [104] ...
- [105] ...
- [106] ...
- [107] ...
- [108] ...
- [109] ...
- [110] ...
- [111] ...
- [112] ...
- [113] ...
- [114] ...
- [115] ...
- [116] ...
- [117] ...
- [118] ...
- [119] ...
- [120] ...
- [121] ...
- [122] ...
- [123] ...
- [124] ...
- [125] ...
- [126] ...
- [127] ...
- [128] ...
- [129] ...
- [130] ...
- [131] ...
- [132] ...
- [133] ...
- [134] ...
- [135] ...
- [136] ...
- [137] ...
- [138] ...
- [139] ...
- [140] ...
- [141] ...
- [142] ...
- [143] ...
- [144] ...
- [145] ...
- [146] ...
- [147] ...
- [148] ...
- [149] ...
- [150] ...

REAGOWANIE MIOZYN Y Z AKTYNĄ W MIĘŚNIU GŁADKIM

MYOSIN-ACTIN INTERACTION IN SMOOTH MUSCLE

Hanna STRZELECKA-GOŁASZEWSKA

Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Streszczenie. Fizjologiczny stan mięśnia zależy od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , które oddziałują na białka kurczliwe za pośrednictwem białek regulujących. Istotą wcześniej poznanego mechanizmu kontroli skurczu mięśni szkieletowych jest hamujące działanie białek regulujących na reagowanie miozyny z aktyną w nieobecności jonów Ca^{2+} ; a zatem *in vitro*, w nieobecności białek regulujących, miozyna z mięśni szkieletowych reaguje z aktyną niezależnie od stężenia jonów Ca^{2+} . Reagowanie miozyny z mięśni gładkich z aktyną wymaga natomiast udziału dodatkowych białek i Ca^{2+} , co wiąże się ściśle z odmiennym mechanizmem regulacji skurczu mięśni tego typu, polegającym na aktywacji aparatu kurczliwego w obecności jonów Ca^{2+} . Przedstawiono dwie równoległe rozwijane teorie regulacji reagowania miozyny z aktyną w mięśni gładkim. Znakomita większość obserwacji przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo* przemawia na korzyść teorii regulacji przez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny działaniem zależnej od jonów Ca^{2+} kinazy lekkich łańcuchów oraz defosforylację katalizowaną przez niezależną od Ca^{2+} fosfatazę. Omówiono możliwości modulowania stanu mięśni gładkich przez oddziaływanie dodatkowych czynników na aktywność kinazy lekkich łańcuchów miozyny. Przedstawiono bardzo jeszcze ograniczone informacje o kinetycznym mechanizmie aktywacji MgATPazowej aktywności miozyny z mięśni gładkich przez aktynę.

Summary. Physiological state of muscle is controlled by the intracellular concentration of Ca^{2+} . The effect of Ca^{2+} on the contractile proteins is mediated through regulatory proteins. The essential feature of the mechanism of regulation of skeletal muscle contraction is inhibition of actin-myosin interaction exerted by the regulatory proteins in the absence of Ca^{2+} ; *in vitro*, in the absence of the regulatory proteins, myosin and actin can interact irrespective of Ca^{2+} concentration. On the other hand, interaction of smooth muscle myosin with actin requires the presence of additional proteins and Ca^{2+} . This difference is connected with an entirely different mechanism of regulation of smooth muscle contraction, the essential feature of which is activation of contractile proteins by the regulatory factor in the presence of Ca^{2+} . In this article two parallelly developed theories

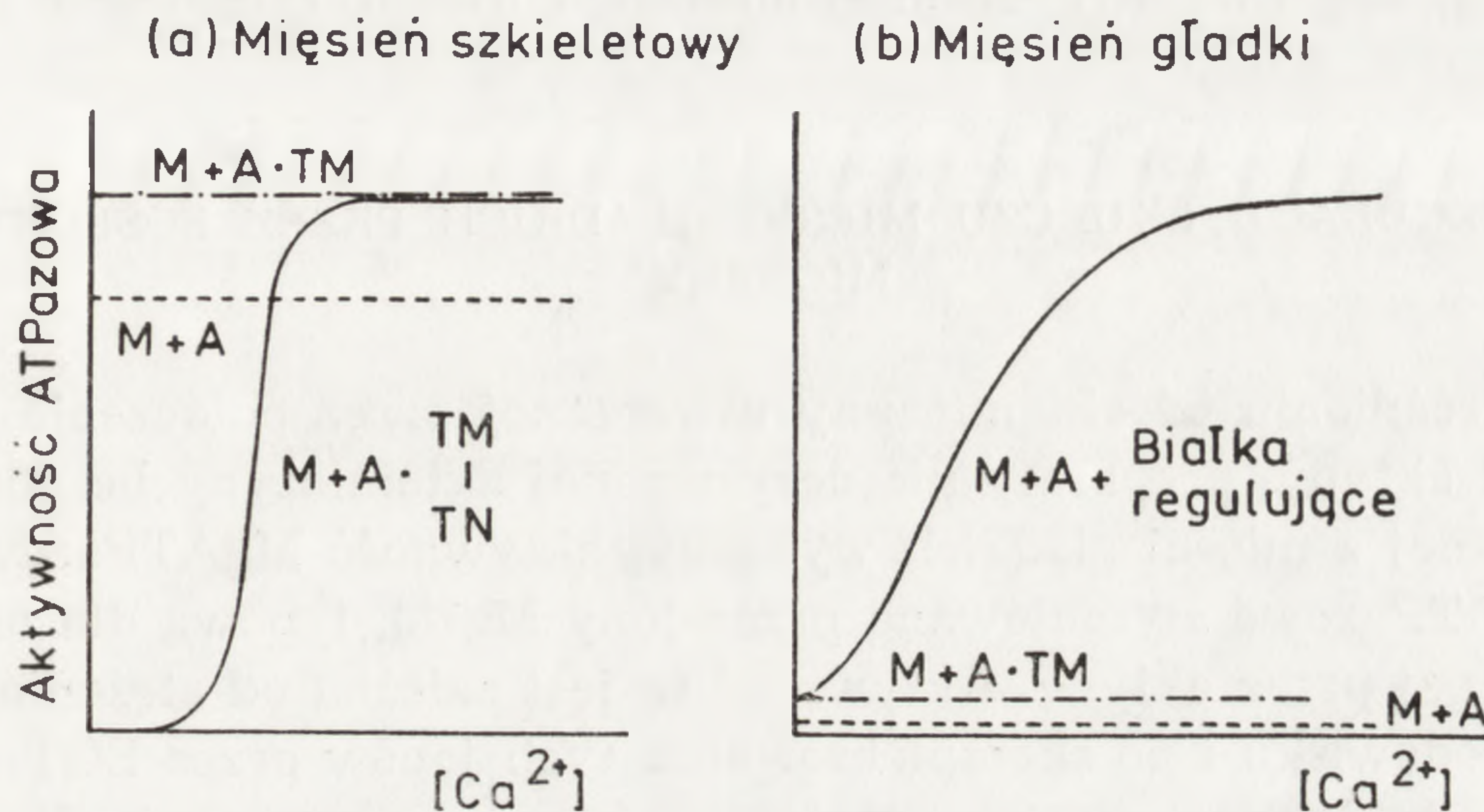
of regulation of actin-myosin interaction in smooth muscle are presented. The majority of the *in vitro* as well as *in vivo* observations favours the view that the regulation is effected through phosphorylation of myosin light chains by a Ca^{2+} — dependent myosin light chain kinase and dephosphorylation by Ca^{2+} — independent phosphatase. A possibility of modulation of the physiological state of smooth muscle by additional factors affecting the activity of the myosin light chain kinase is discussed. The still very limited information about the kinetic mechanism of actin-activation of the MgATPase activity of smooth muscle myosin is also presented.

Strukturalna organizacja białek kurczliwych w komórkach mięśni gładkich i mięśni szkieletowych kręgowców jest podobna. W obu przypadkach miozyna i aktyna występują w formie filamentów ułożonych równolegle do dłuższej osi komórki, a jedynie rozmieszczenie tych struktur w komórce mięśnia gładkiego nie jest tak regularne, jak w mięśniu szkieletowym [58]. Można zatem przypuszczać, że skurcz mięśni gładkich, podobnie jak szkieletowych, zachodzi wskutek cyklicznego reagowania „główek” cząsteczek miozyny, periodycznie rozmieszczonych na powierzchni miozynowych miofilamentów, z miofilamentami aktynowymi. Międzyfilamentowe połączenia za pośrednictwem główek miozyny są miejscami generacji siły powodującej wytworzenie napięcia (skurcz izometryczny) lub przesuwanie się miofilamentów miozynowych i aktynowych wzdluż siebie, co prowadzi do skrócenia mięśnia (skurcz izotoniczny). Nie ulega też wątpliwości, że źródłem energii dla tych procesów jest aktywowana przez aktynę enzymatyczna hydroliza ATP katalizowana przez miozynę, jakkolwiek sposób, w jaki energia chemiczna hydrolizy ATP przekształcona jest w energię mechaniczną pozostaje jeszcze w sferze przypuszczeń [47, 48].

Z badań przeprowadzonych na włóknach pozbawionych sarkolemmy (skinned fibers) wiadomo również, że stan mięśnia gładkiego, podobnie jak szkieletowego, jest uzależniony od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia: przy wysokich stężeniach zjonizowanego wapnia, w zakresie $5 \cdot 10^{-7}$ — $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$, zachodzi skurcz, przy niższych następuje rozkurcz [32, 84]. Natomiast molekularny mechanizm transmisji zmian stężenia zjonizowanego wapnia do aparatu kurczliwego w mięśniu gładkim jest różny od mechanizmu regulacji skurczu mięśnia szkieletowego.

Jak pokazano na ryc. 1a, czysta miozyna i aktyna z mięśni szkieletowych reagują ze sobą niezależnie od stężenia jonów Ca^{2+} . Białka regulujące — tropomiozyna i troponina, które występują w tym typie mięśnia wraz z aktyną w cienkich miofilamentach, a *in vitro* również reagują wyłącznie z aktyną, hamują aktywację miozyny przez aktynę przy niskich stężeniach jonów Ca^{2+} . Wzrost stężenia Ca^{2+} znosi to

hamowanie, a zatem w tym układzie Ca^{2+} działa jako derepresor. Szczegółowemu omówieniu regulacji skurczu mięśni szkieletowych poświęcone są wcześniejsze artykuły w Postęпах Biochemii [18a, 20].



Ryc. 1. Schemat ilustrujący różnice w reagowaniu miozyny z aktyną oraz w sposobie działania białek regulujących w tych dwóch typach mięśnia

Po odkryciu troponiny w mięśni szkieletowym [28] próbowano znaleźć podobne białko w mięśniach gładkich i w kilku doniesieniach postulowano jego istnienie w żołądku kury [29, 41, 60], macicy [9, 41] i tętnicy szyjnej ssaków [41, 98]. Inni autorzy, zauważając obecność tropomiozyny, stwierdzili jednak brak troponiny w reagujących zmianą aktywności ATPazowej na zmiany stężenia jonów Ca^{2+} preparatach aktomiozyny z żołądka kury [27, 94], we włóknach mięśniowych okrężnicy świnki morskiej [7], jak również w cienkich miofilamentach wyizolowanych z żołądka kury [27, 94, 95]. Okazało się wkrótce, że białko przypominające podjednostkę troponiny TN-C, wyizolowane z różnych mięśni gładkich [41], jest w rzeczywistości calmoduliną [25, 26, 40]. Przeciwno regulacji skurczu mięśni gładkich przez troponinę lub białko o podobnym działaniu przemawiał również fakt, że w odróżnieniu od białek kurczliwych z mięśni szkieletowych, czysta miozyna z mięśni gładkich nie jest aktywowana przez aktynę [6, 27, 31, 68, 106]. Mechanizm regulacji skurczu mięśni tego typu musi zatem polegać na aktywacji aparatu kurczliwego w obecności jonów Ca^{2+} (ryc. 1b), podczas gdy rolą troponiny jest hamowanie aktywności ATPazowej aktomiozyny w nieobecności jonów Ca^{2+} .

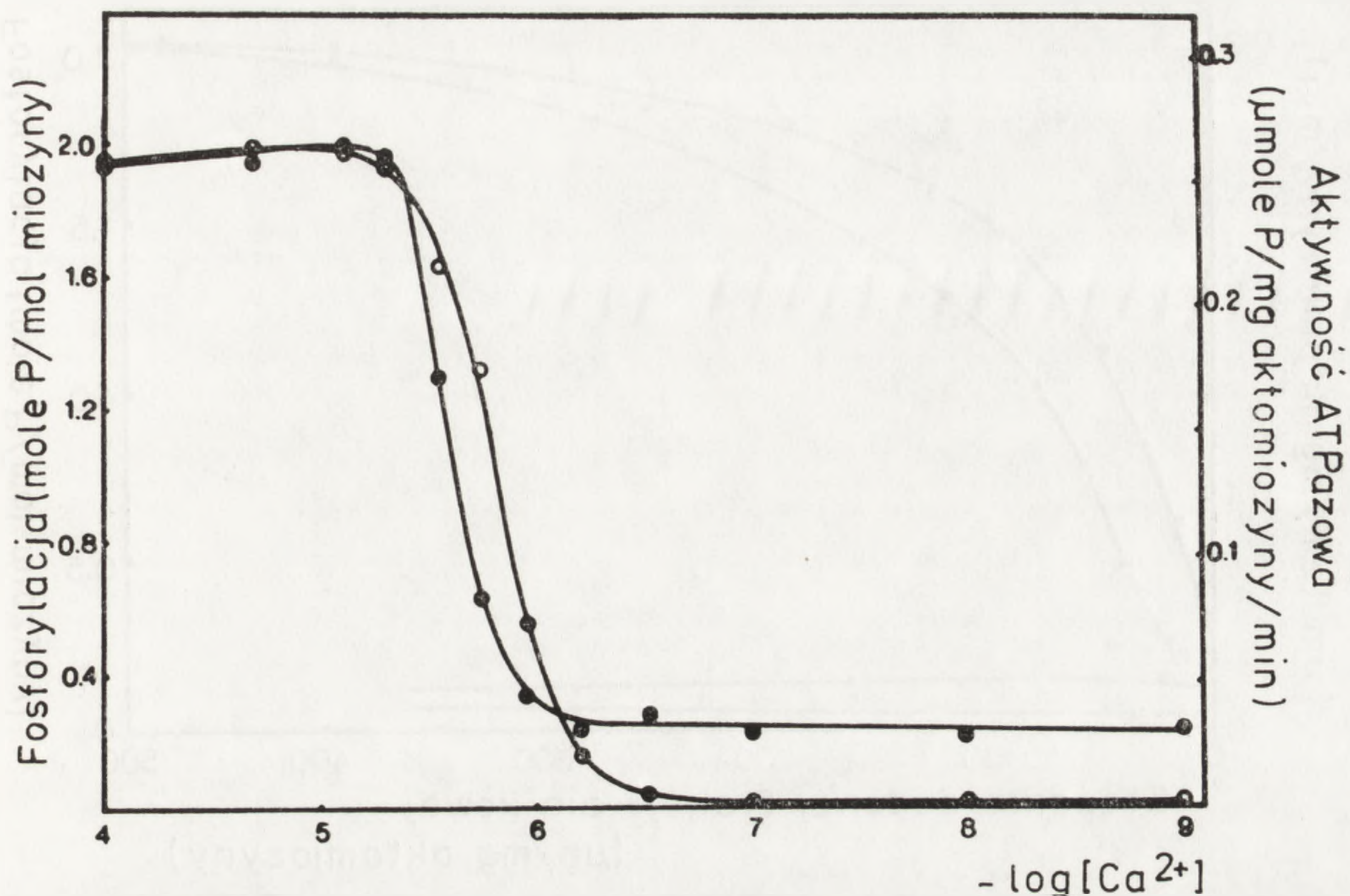
Jakkolwiek istnieje obecnie całkowita zgodność co do tego, że reagowanie miozyny z mięśni gładkich z aktyną wymaga udziału dodatko-

wych białek, nie ma jednolitego poglądu na temat charakteru tych białek i mechanizmu ich działania. Badania w tej dziedzinie, mające dość krótką historię, bo zapoczątkowane dopiero w połowie lat siedemdziesiątych, doprowadziły do sformułowania dwóch całkowicie różnych teorii.

TEORIA REGULACJI SKURCZU MIĘŚNI GŁADKICH PRZEZ FOSFORYLACJĘ MIOZYNY

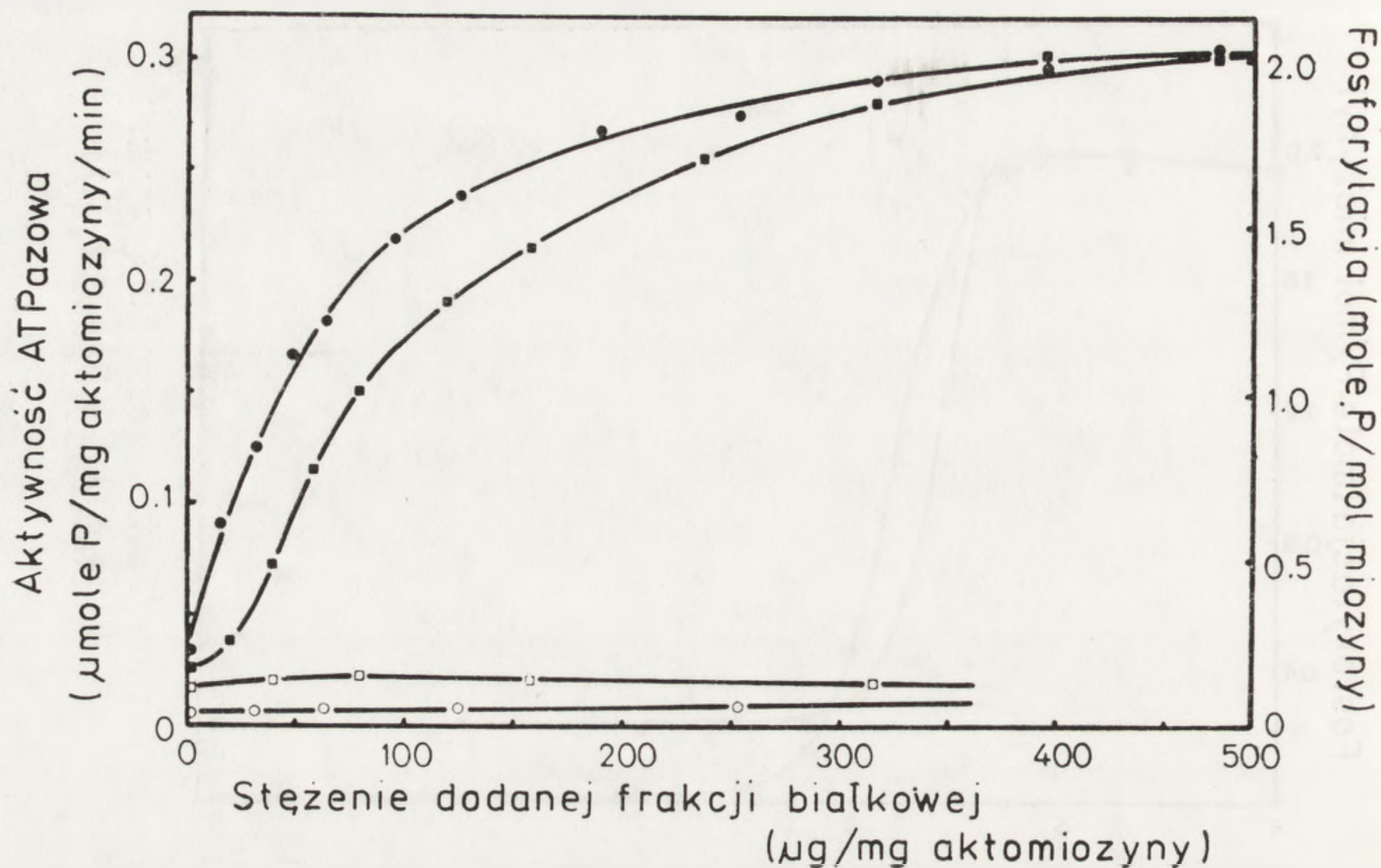
W odróżnieniu od aktomiozyny utworzonej przez połączenie czystej miozyny i aktyny, preparaty nie oczyszczonej aktomiozyny bezpośrednio wyizolowanej z mięśni gładkich wykazują aktywność MgATPazową (aktywność ATPazową stymulowaną przez jony Mg^{2+}), typową dla miozyny aktywowanej przez aktynę. Aktywność ta jest zależna od stężenia jonów Ca^{2+} w środowisku i po skompleksowaniu tych jonów przez EGTA ulega obniżeniu do bardzo niskich wartości, charakterystycznych dla samej miozyny. Kolejne zastępowanie komponenty aktynowej i miozynowej takiego układu przez dodaną w nadmiarze czystą aktynę i czystą miozynę z mięśni szkieletowych, które jak już powiedziano nie są bezpośrednim akceptorem jonów Ca^{2+} w procesie regulacji, pozwala stwierdzić który ze składników aktomiozyny jest odpowiedzialny za jej reagowanie na zmiany stężenia jonów Ca^{2+} . Zastosowanie tego testu do aktomiozyny otrzymanej z mięśnia żołądka ptaków [8], jak również z warstwy mięśniowej aorty świni [35] wykazało, że regulacja aktywności tych układów zachodzi za pośrednictwem komponenty miozynowej.

Cząsteczka miozyny z mięśni gładkich zbudowana jest z trzech par łańcuchów polipeptydowych: dwóch łańcuchów „ciężkich”, o ciężarach podjednostkowych ok. 200 000 i dwóch par łańcuchów „lekkich”, o ciężarach podjednostkowych 20 000 i 17 000. Łańcuchy o ciężarze podjednostkowym 20 000, podobnie jak homologiczne łańcuchy miozyny z innych typów mięśni kręgowców [34, 82], są fosforylowane przez endogenną kinazę (fosfotransferazę ATP — lekkie łańcuchy miozyny) wymagającą Ca^{2+} do swojej aktywności [33, 92]. Donorem reszty fosforanowej jest MgATP, a jej akceptorem reszta serynowa w pozycji 13 łańcucha (w przypadku lekkich łańcuchów miozyny z mięśnia żołądka kury) [51]. Hydroliza wytworzonego wiązania estrowego (defosforylacja lekkiego łańcucha) katalizowana jest przez endogenną fosfatazę (fosfohydrolazę ufosforylowanych lekkich łańcuchów miozyny), której aktywność nie zależy od stężenia jonów Ca^{2+} [33]. W 1975 r. Sobieszek [92] pierwszy zwrócił uwagę na jednakową zależność fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny i aktywności MgATPazowej aktomiozyny z mięśnia żołądka kury od stężenia jonów Ca^{2+} (ryc. 2), a porównując przebieg obu reakcji



Ryc. 2. Zależność fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny (O) i aktywności MgATPazowej (●) naturalnej aktomiozyny z mięśnia żołądka kury od stężenia jonów Ca^{2+} . Według Sobieszka [93]

w czasie stwierdził, że fosforylacja nieco wyprzedza aktywację MgATPazy. Obserwacje te sugerowały, że zależna od Ca^{2+} fosforylacja miozyny przez kinazę jej lekkich łańcuchów i defosforylacja przez fosfatazę mogą reprezentować mechanizm regulacji reagowania miozyny z aktyną w mięśni gładkim. Istniała jednak możliwość przypadkowej tylko zbieżności procesów fosforylacji i aktywacji MgATPazowej aktywności miozyny. Równocześnie z fosforylacją zaobserwowano, że miozyna z mięśni gładkich wiąże Ca^{2+} , w proporcji 2 moli na mol białka, w tym samym zakresie stężeń tego kationu jakie aktywują MgATPazową aktywność preparatów aktomiozyny [37, 92, 95]. Miejszem wiązania Ca^{2+} jest ten sam lekki łańcuch, który ulega fosforylacji [54]. Należało zatem rozważyć możliwość bezpośredniego działania Ca^{2+} na miozynę, analogicznego do opisanego wcześniej mechanizmu regulacji skurczu w niektórych mięśniach mięczaków, gdzie wiązanie Ca^{2+} przez jeden z dwóch rodzajów lekkich łańcuchów miozyny jest, jak się dotąd uważa, jedynym warunkiem reagowania miozyny z aktyną [55]. Postęp w oczyszczaniu aktomiozyny i miozyny z mięśni gładkich od towarzyszącej im kinazy umożliwił wykluczenie istnienia tego typu regulacji skurczu w przypadku mięśni gładkich kręgowców. Stwierdzono, że aktomiozyna pozbawiona kinazy traci aktywność MgATPazową, której przywrócenie wy-



Ryc. 3. Zmiany stopnia fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny (●, ○) i aktywności MgATPazowej (■, □) oczyszczonej aktomiozyny z mięśnia żołądka kury pod wpływem frakcji białkowej zawierającej kinazę lekkich łańcuchów miozyny. Symbolami ciemnymi i jasnymi zaznaczono wyniki uzyskane odpowiednio w obecności i nieobecności jonów Ca²⁺. Według Sobieszka [93]

maga ponownego dodania kinazy [3, 93]. Rycina 3 pokazuje równoległy przebieg krzywych fosforylacji miozyny i wzrostu aktywności MgATPazowej oczyszczonej aktomiozyny w zależności od stężenia dodanej kinazy. Maksymalna aktywność MgATPazowa osiągnięta jest przy pełnej fosforylacji, tj. inkorporacji 1 mola ortofosforanu na mol lekkiego łańcucha. Te obserwacje, potwierdzone dalszymi badaniami prowadzonymi na aktomiozynie i miozynie z żołądka ptaków [36, 49, 50, 96] i szeregu innych mięśni gładkich: żołądka świni [91] i krowy [13], nasieniowodu świnki morskiej [12], aorty krowy [24] i świni [83], tętnicy szyjnej świni [71], macicy krowy [59] i łożyska ludzkiego [46], ugruntowały teorię regulacji skurczu mięśni gładkich przez fosforylację i defosforylację lekkich łańcuchów miozyny.

Kolejnym wnioskiem z doświadczeń *in vitro* było stwierdzenie, że regulacja aktywności kinazy lekkich łańcuchów miozyny jest jedyną funkcją jonów Ca²⁺ w regulacji skurczu mięśni gładkich. Jeżeli badany układ nie był zanieczyszczony fosfatazą, to usunięcie jonów Ca²⁺ po ufosforylowaniu miozyny nie hamowało aktywowanej przez aktywne hydrolizy ATP [13, 50, 59, 90, 91]. Najbardziej przekonujący dowód aktywacji ufosforylowanej miozyny przez aktywne niezależnie od stężenia

jonów Ca^{2+} uzyskano stosując analog ATP, adenozy-5'-0-(3-tiotrójfosforan ($\text{ATP}\gamma\text{S}$) do fosforylacji miozyny. Związek ten jest donorem grupy tiofosforanowej dla kinazy lekkich łańcuchów miozyny, natomiast tiofosforylowana miozyna nie jest substratem dla fosfatazy. Aktywność MgATP azowa miozyny z mięśnia żołądka kurzego utrwalonej w ten sposób w formie ufosforylowanej była aktywowana przez aktynę niezależnie od stężenia jonów Ca^{2+} [88]. Odosobnione obserwacje wskazujące na dodatkowy, bezpośredni wpływ Ca^{2+} na reagowanie z aktyną ufosforylowanej miozyny z nasieniowodu świnki morskiej [12] i aorty świni [83] można przypisać niekompletnemu usunięciu fosfatazy i defosforylacji miozyny po usunięciu Ca^{2+} . Postulowana przez autorów tych obserwacji możliwość specyficznych różnic właściwości aparatu kurczliwego różnych mięśni gładkich wymaga jednak dokładniejszego sprawdzenia.

W ślad za publikacjami wyników uzyskanych na izolowanych białkach pojawiły się doniesienia informujące o wynikach podobnych badań *in vivo*. W doświadczeniach przeprowadzonych na paskach warstwy mięśniowej tętnicy szyjnej świni [4, 5, 23], macicy szczura [52], tchawicy krowy [58] oraz pozbawionych sarkolemmy pęczkach komórek mięśnia żołądka kury [45] i jelita cienkiego królika [56] stwierdzono zwiększoną inkorporację radioaktywnego ortofosforanu do lekkiego łańcucha miozyny o cięż. podj. 20 000 podczas skurczu zainicjowanego różnymi środkami farmakologicznymi oraz defosforylację miozyny podczas rozkurczu wywołanego środkami farmakologicznymi lub usunięciem Ca^{2+} przez wprowadzenie EGTA do środowiska inkubacyjnego. Chociaż w doświadczeniach *in vivo* nie uzyskuje się ani kompletnej fosforylacji miozyny w stanie skurczu, ani pełnej defosforylacji w stanie rozkurczu, dokładne pomiary wykazały korelację między wzrostem stopnia fosforylacji miozyny a napięciem wytworzonym w skurczu izometrycznym [45, 56, 58] lub szybkością skurczu pasków mięśniówki „zwolnionej” z obciążenia w różnych stadiach wytwarzania napięcia [23]. Jak wiadomo, napięcie jest proporcjonalne do liczby międzyfilamentowych połączeń, szybkość skurczu zaś miarą szybkości cyklicznego tworzenia i rozrywania tych połączeń; jej odpowiednikiem *in vitro* jest aktywność MgATP azowa aktomiozyny, uważa się bowiem, że każdemu wytworzeniu i rozerwaniu takiego miejscowego połączenia towarzyszy hydroliza jednej cząsteczki ATP [47].

Zaobserwowano również, że preinkubacja pozbawionych sarkolemmy pęczków komórek w roztworze $\text{ATP}\gamma\text{S}$ i Ca^{2+} , powodując nieodwracalną fosforylację miozyny, znosi zależność aktywności skurczowej od stężenia jonów Ca^{2+} — wytworzone napięcie utrzymywało się po usunięciu Ca^{2+} [10, 45, 56, 98]. A zatem wytworzenie i utrzymanie napięcia

mięśnia gładkiego, tak jak aktywność MgATPazowa preparatów aktomiozyny, nie wymaga bezpośredniego udziału Ca^{2+} i zależy wyłącznie od stopnia fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny.

W badaniach fosforylacji miozyny *in vitro* początkowo stosowano surowe preparaty kinazy lekkich łańcuchów, izolowanej w postaci frakcji białkowej, której głównym składnikiem była tropomiozyna. Zastosowanie preparatów kinazy oddzielonej od tropomiozyny przez wytrącenie tropomiozyny w jej punkcie izoelektrycznym [38] lub oczyszczonoj metodą chromatografii kolumnowej na Sepharose 4B [96], wględnie oddzielenie już ufosforylowanej miozyny od innych białek na kolumnie wypełnionej Sepharose 4B [12, 13], pozwoliło wykazać dodatkową stymulację aktywności MgATPazowej aktomiozyny, zawierającej miozynę w formie ufosforylowanej, przez tropomiozynę [12, 13, 38, 96]. Maksymalny efekt — dwu-trzykrotny wzrost aktywności obserwowano przy proporcji tropomiozyny do aktyny odpowiadającej stechiometrii wiązania tych białek. Ciekawe jest, że w przypadku aktomiozyny z mięśni gładkich zarówno tropomiozyna z mięśni gładkich, jak i szkieletowych działa stymulująco, natomiast aktywność aktomiozyny z mięśni szkieletowych jest stymulowana przez tropomiozynę z mięśni gładkich, podczas gdy w tych samych warunkach tropomiozyna z mięśni szkieletowych pozostaje w tym układzie bez wpływu lub wykazuje działanie hamujące [22, 97]. Ostatnio wykazano w badaniach kinetycznych, że efekt tropomiozyny na aktomiozynę z mięśni gładkich polega na zwiększeniu powinowactwa aktyny do miozyny [101]. Jednocześnie jednak zaobserwowano, że stymulujące działanie tropomiozyny zmniejsza się ze wzrostem siły jonowej i niemal zanika przy fizjologicznych stężeniach KCl, co stawia pod znakiem zapytania udział tropomiozyny w reagowaniu miozyny z aktyną w mięśniu gładkim. Nie jest wykluczone, że rola tropomiozyny w mięśniu tego typu ogranicza się do stabilizacji cienkich miofilamentów [101].

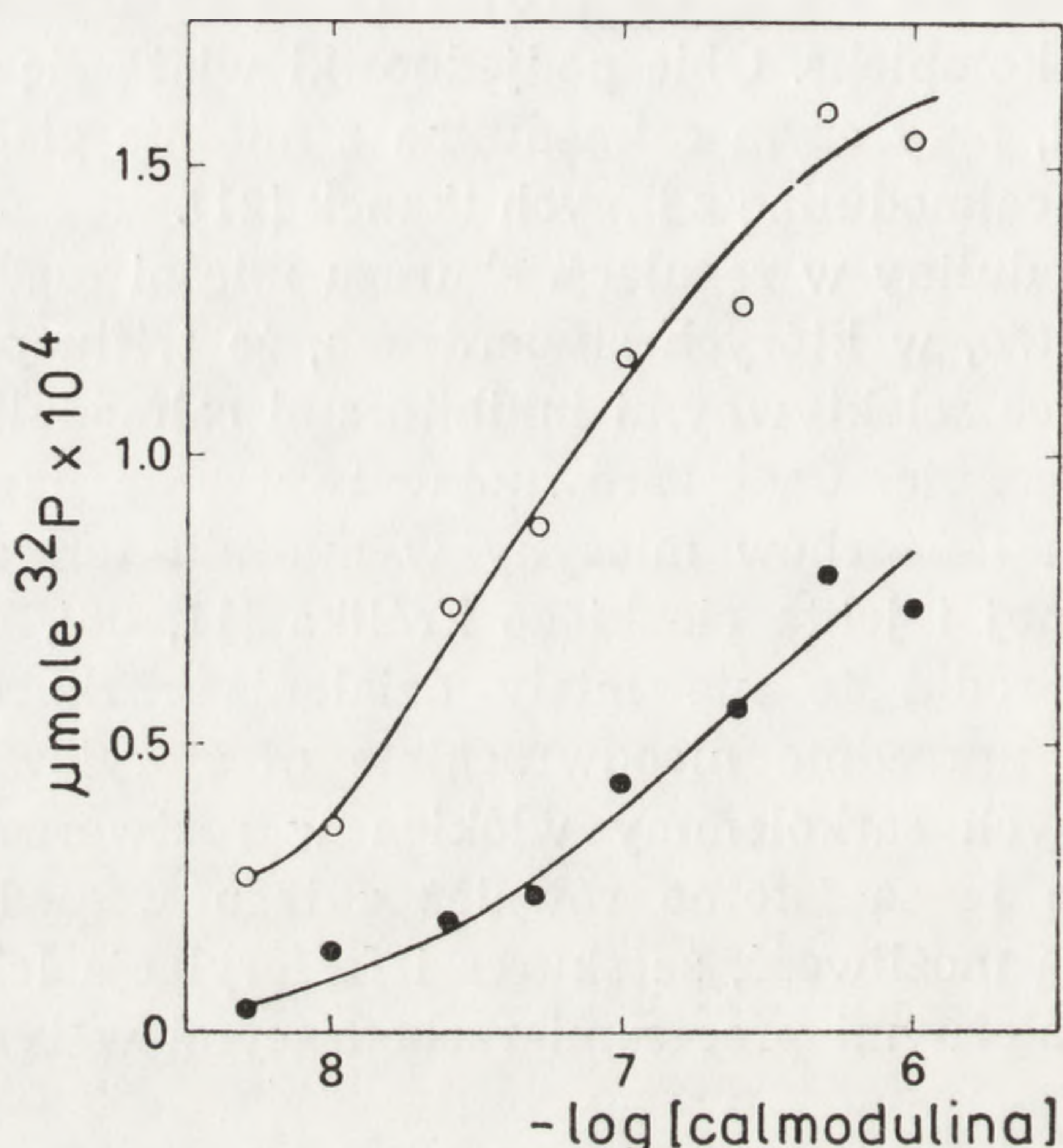
Zwrócenie uwagi na rolę fosforylacji w regulacji skurczu mięśni gładkich spowodowało wzrost zainteresowania kinazą lekkich łańcuchów miozyny. Wykazano, że kinaza otrzymana z mięśnia żołądka kury zbudowana jest z dwóch podjednostek, które rozdzielono i określono ich ciężary podjednostkowe na 105 000 i 17 000 [19]. Podjednostkę o niższym ciężarze zidentyfikowano następnie jako calmodulinę [21], białko wiążące Ca^{2+} z wysoką stałą wiązania, powszechnie występujące w różnych tkankach i biorące udział w regulacji bardzo wielu procesów enzymatycznych. Wyniki te potwierdzono w innych laboratoriach, uzyskując nieco wyższe wartości ciężaru cząsteczkowego cięższej podjednostki: 130 000 dla enzymu z żołądka indyka [2, 104], 142 000 dla enzymu z aorty krowy [103] i 145 000 dla enzymu z żołądka kury [91]. Różnice

mogą wynikać z podatności kinazy na działanie endogennych proteaz [2, 103, 104]. Żadna z dwóch podjednostek kinazy oddzielnie nie wykazuje aktywności fosfotransferazowej [19, 21]. Przypuszcza się, że Ca^{2+} aktywuje kinazę wiążąc się z calmoduliną, która dopiero w kompleksie z Ca^{2+} może łączyć się z większą podjednostką kinazy tworząc aktywny, trójskładnikowy kompleks. Obie podjednostki wiążą się w molowej proporcji 1:1 [2, 39], przy czym calmodulina z mięśnia gładkiego może być zastąpiona przez calmodulinę z innych tkanek [21].

Udział calmoduliny w regulacji skurczu mięśni gładkich potwierdziły badania *in vitro*, w których stwierdzono, że trifluoperazyna i chlorpromazyna, będące selektywnymi inhibitorami calmoduliny [14, 42, 105], hamowały w obecności Ca^{2+} zarówno wytwarzanie napięcia, jak i fosforylację lekkich łańcuchów miozyny w mięśni tętnicy szyjnej świni [5], tętnicy płucnej i jelita cienkiego królika [11, 56], okrężnicy świnki morskiej [98]. Środki te nie miały działania rozkurczającego, jeżeli miozyna została uprzednio nieodwracalnie ufosforylowana przez inkubację pozbawionych sarkolemy włókien w roztworze $\text{ATP}\gamma\text{S}$ i Ca^{2+} [56]. Obserwacje te są istotne również z tego względu, że w dużym stopniu eliminują możliwość, że skurcz i fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny są niezależnymi procesami zachodzącymi w tym samym zakresie stężeń Ca^{2+} .

Wkrótce po określeniu budowy kinazy lekkich łańcuchów miozyny zarysowała się możliwość dodatkowego mechanizmu regulacji skurczu mięśni gładkich przez modulację aktywności tego enzymu. Okazało się, że większa podjednostka kinazy lekkich łańcuchów otrzymanej z mięśni gładkich (żołądka indyka, aorty krowy) ulega sama fosforylacji pod wpływem innej kinazy, która jest regulowana przez cAMP [1, 103, 104], co powoduje około dwukrotne zmniejszenie aktywności kinazy lekkich łańcuchów [1, 16]. Jak pokazano na ryc. 4, efekt fosforylacji polega na obniżeniu powinowactwa większej podjednostki kinazy lekkich łańcuchów do kompleksu Ca^{2+} -calmodulina: ufosforylowana kinaza wymaga do swej aktywności wyższego stężenia calmoduliny [16, 17, 103]. Wykazano następnie, że kinaza lekkich łańcuchów miozyny zawiera co najmniej dwa miejsca fosforylacji. Jeżeli fosforylacja przez kinazę zależną od cAMP przeprowadzona jest w obecności EGTA, kiedy brak Ca^{2+} uniemożliwia wiązanie calmoduliny przez większą podjednostkę kinazy lekkich łańcuchów, oba miejsca są fosforylowane, co powoduje 10-20-krotne obniżenie powinowactwa do calmoduliny w obecności Ca^{2+} . W obecności związanej calmoduliny (w obecności Ca^{2+}) zależna od cAMP kinaza fosforyluje tylko jedno z tych miejsc, co pozostaje bez wpływu na właściwości kinazy lekkich łańcuchów. W badaniach tych stosowano kinazę z żołądka indyka [17].

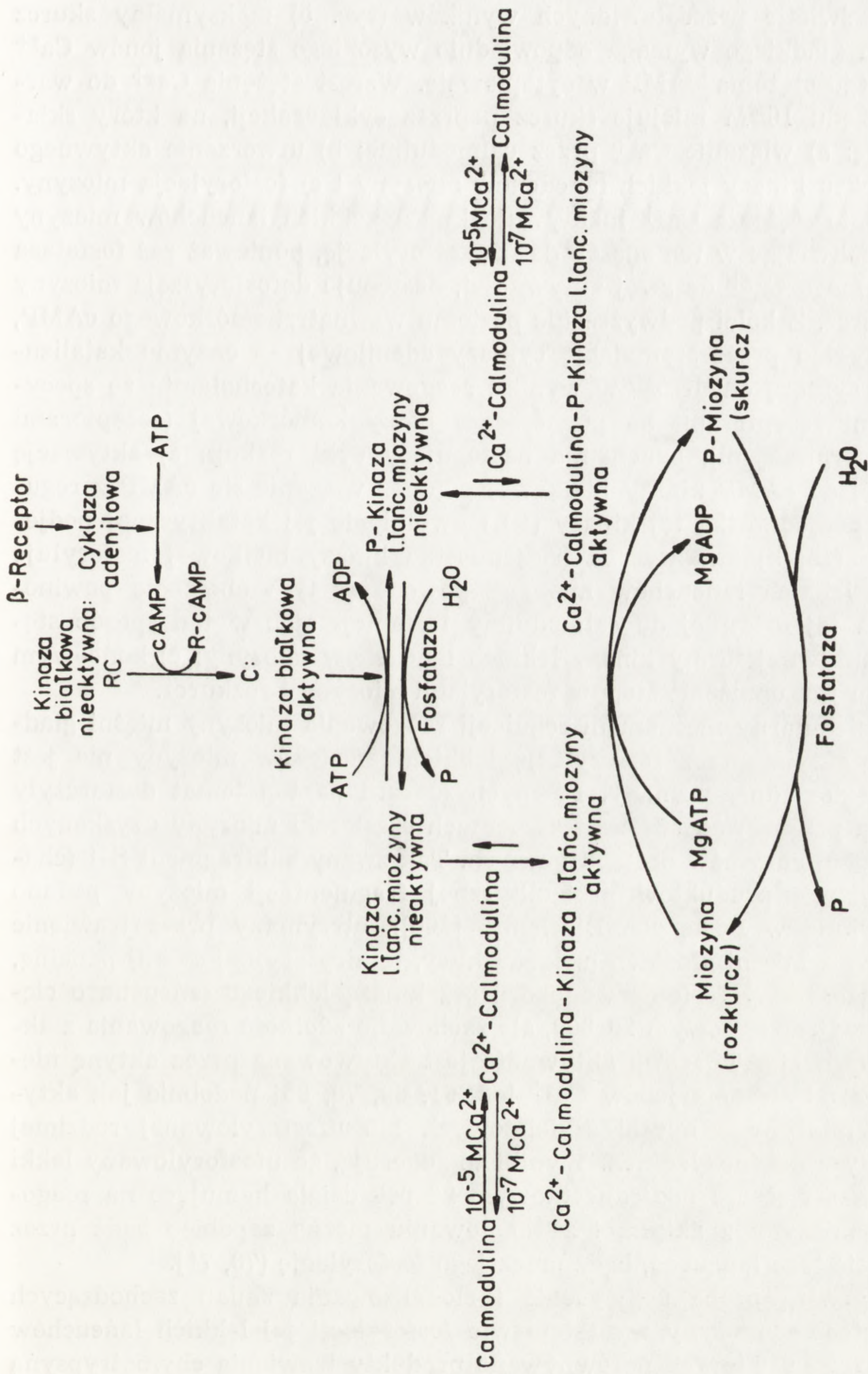
Zmiana zdolności wiązania calmoduliny pod wpływem fosforylacji jest odwracalna: defosforylacja przez fosfatazę wyizolowaną z mięśnia żołądka indyka przywraca kinazie lekkich łańcuchów miozyny jej pierwotne właściwości [17].



Ryc. 4. Zależność aktywności ufosforylowanej (●) i nieufosforylowanej (○) kinazy lekkich łańcuchów miozyny od stężenia calmoduliny. Aktywność enzymu badano mierząc przeniesienie ^{32}P z AT^{32}P na izolowany lekki łańcuch miozyny w obecności Ca^{2+} w ciągu 5 min przy stężeniu kinazy 10^{-9}M . Według Conti i Adelsteina [16]

Możliwość udziału zależnej od cAMP fosforylacji kinazy lekkich łańcuchów miozyny w regulacji skurczu mięśni gładkich potwierdzają doniesienia o spadku aktywności MgATPazowej [72, 89] i stopnia fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny [89] w surowych preparatach aktomiozyny z aorty krowy i tętnicy szyjnej świni pod wpływem cAMP i zależnej od niego kinazy w obecności Ca^{2+} . Stwierdzono również rozkurczające działanie cAMP w obecności Ca^{2+} na pozbawione sarkolemmy pęczki włókien okrężnicy świnki morskiej [72].

Najsłabiej scharakteryzowanym enzymem układu fosforylującego-defosforylującego mięśni gładkich jest fosfataza. Jakkolwiek obserwowano jej aktywność w preparatach białek kurczliwych i ekstraktach z różnych mięśni gładkich [12, 33, 49, 77, 88], dopiero ostatnio doniesiono o izolacji i oczyszczeniu dwóch fosfataz z mięśnia żołądka indyka [79]. Dla obu substratem były ufosforylowane lekkie łańcuchy miozyny z mięśni gładkich, natomiast tylko jedna z nich defosforylowała ponadto ufosforylowaną kinazę lekkich łańcuchów miozyny.



Ryc. 5. Schemat regulacji aktywności skurczowej mięśni gładkich przez zmiany stężenia jonów Ca²⁺ i cAMP. Strzałkami o różnicowanej długości zaznaczono przesunięcia równowagi między nieaktywną i aktywną formą kinazy lekkich łańcuchów miozyny. Modyfikacja schematu Conti i Adelsteina [16]

W świetle przedstawionych wyników (ryc. 5) maksymalny skurcz mięśnia gładkiego wymaga odpowiednio wysokiego stężenia jonów Ca^{2+} i niskiego stężenia cAMP w cytoplazmie. Wzrost stężenia Ca^{2+} do wartości rzędu 10^{-5}M inicjuje skurcz poprzez cykl reakcji, na który składają się: a) wiązanie Ca^{2+} przez calmodulinę; b) utworzenie aktywnego kompleksu kinazy lekkich łańcuchów miozyny i c) fosforylacja miozyny. Obniżenie stężenia Ca^{2+} inaktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny uniemożliwiając w ten sposób dalszą fosforylację, ponieważ zaś fosfataza nie wymaga Ca^{2+} do swej aktywności, następuje defosforylacja miozyny i rozkurcz. Z kolei podwyższenie poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP, na przykład przez stymulację cyklazy adenilowej — enzymu katalizującego syntezę cAMP — w wyniku reagowania katecholamin ze specyficznymi receptorami na powierzchni błony komórkowej (receptorami β -adrenergicznymi), uruchamia następujący cykl reakcji: a) aktywację zależnej od cAMP kinazy białkowej poprzez wiązanie się cAMP z regulującą podjednostką tej kinazy (R) i uwolnienie jej katalitycznej podjednostki (C); b) katalityczna podjednostka kinazy białkowej fosforyluje kinazę lekkich łańcuchów miozyny powodując tym obniżenie powinowactwa tej ostatniej do calmoduliny i zmniejszając w ten sposób stężenie aktywnej formy kinazy lekkich łańcuchów miozyny; c) końcowym efektem jest obniżenie stopnia fosforylacji miozyny i rozkurcz.

Molekularny mechanizm regulacji reagowania miozyny mięśni gładkich z aktyną przez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny nie jest jeszcze dokładnie poznany. Pewnych sugestii na ten temat dostarczyły badania przeprowadzone na fragmentach cząsteczki miozyny uzyskanych działaniem enzymów proteolitycznych. Tak zwany subfragment S-1 (charakterystykę produktów proteolitycznej fragmentacji miozyny podano w artykule w *Postęпах Biochemii* [100]), otrzymany przez trawienie miozyny z mięśni gładkich (żołądka kury, tętnicy szyjnej świni) papainą, jest pozbawiony fosforylowanego przez kinazę lekkiego łańcucha o ciężarze podjednostkowym 20 000, ale zachowuje zdolność reagowania z aktyną. Jego MgATP azowa aktywność jest aktywowana przez aktynę niezależnie od stężenia jonów Ca^{2+} [53, 61, 69, 70, 85] podobnie jak aktywność miozyny z mięśni szkieletowych lub ufosforylowanej rodzimej miozyny z mięśni gładkich. Wyniki te sugerują, że ufosforylowany lekki łańcuch o ciężarze podjednostkowym 20 000 działa hamująco na reagowanie miozyny z aktyną i że hamowaniu można zapobiec bądź przez usunięcie tego łańcucha, bądź przez jego fosforylację [70, 71].

Pierwszą próbą uchwycenia i zlokalizowania zmian zachodzących w cząsteczce miozyny w następstwie fosforylacji jej lekkich łańcuchów są badania, w których porównywano produkty trawienia chymotrypsyną ufosforylowanej i nieufosforylowanej miozyny z mięśnia żołądka kury.

Zauważono, że pod wpływem fosforylacji lekkich łańcuchów następuje zmiana miejsca fragmentacji ciężkich łańcuchów miozyny w ich N-końcowej części, przy czym obecność ATP podczas trawienia niweluje wpływ fosforylacji. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że fosforylacja lekkich łańcuchów powoduje zmianę konformacji ciężkich łańcuchów w pobliżu ich N-końca, gdzie znajduje się również miejsce wiązania lub biorące udział w wiązaniu ATP [74]. Porównanie właściwości produktów trawienia ufosforylowanej miozyny w obecności i nieobecności ATP potwierdziło możliwość udziału N-końcowej części ciężkiego łańcucha w katalitycznej aktywności miozyny, jest więc bardzo prawdopodobne, że właśnie ten fragment cząsteczki odgrywa kluczową rolę w odbieraniu oraz reagowaniu na sygnał, jakim jest fosforylacja lekkich łańcuchów [75, 76].

TEORIA REGULACJI SKURCZU MIĘŚNI GŁADKICH PRZEZ LEIOTONINĘ

Równoległe z teorią regulacji przez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny rozwijana była odrębna koncepcja, reprezentowana przez Ebashi i współpracowników. Wyizolowali oni z mięśnia żołądka kury [68], a następnie z aorty krowy [43], białko o ciężarze cząsteczkowym 80 000, nazwane przez nich leiotoniną, które nie wykazując aktywności kinazy lekkich łańcuchów miozyny aktywowało układ aktomiozynowy z mięśnia gładkiego (żołądka kury) w obecności jonów Ca^{2+} i tropomiozyny [68]. W dalszych badaniach Ebashi i współpracownicy doszli do wniosku, że aktywacja wymaga obecności jeszcze jednego białka, o ciężarze cząsteczkowym 18 000, które nazwali leiotoniną C, zaś wcześniej wyizolowanemu białku o ciężarze cząsteczkowym 80 000 nadali nazwę leiotonina A [67]. Leiotoninę C określili jako kwaśne białko, podobne do calmoduliny m.in. w zdolności wiązania Ca^{2+} z wysoką stałą powinowactwa [44], ale różniące się od niej nieco ruchliwością elektroforetyczną w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS, składem aminokwasowym i obrazem map peptydowych oraz brakiem zdolności aktywowania fosfodwuesterazy [67]. Zarówno leiotonina C, jak i leiotonina A wykazują powinowactwo do aktyny i według japońskich autorów właśnie aktyna, nie zaś miozyna jest miejscem działania tych białek. Pełną regulację aktywności aktomiozyny uzyskiwano przy molowej proporcji obu leiotonin do aktyny rzędu 1:100 [30, 65]. Autorzy nie zaproponowali dotąd molekularnego mechanizmu regulacji przez system leiotoninowy. Przy tak niskiej stechiometrii działania dość trudno wyobrazić sobie jakkolwiek mechanizm nie postulując enzymatycznej aktywności leiotoniny, której jednak dotąd nie zauważono. W dyskusjach ze zwolennikami teorii regulacji skurczu mięśni gładkich przez fosforylację lekkich łań-

cuchów miozyny Ebashi i współpracownicy niezmiennie podtrzymują pogląd, że fosforylacja, jakkolwiek obserwowana przez nich w pewnych warunkach, nie wykazuje korelacji z aktywacją ATPazowej aktywności aktomiozyny [43, 66].

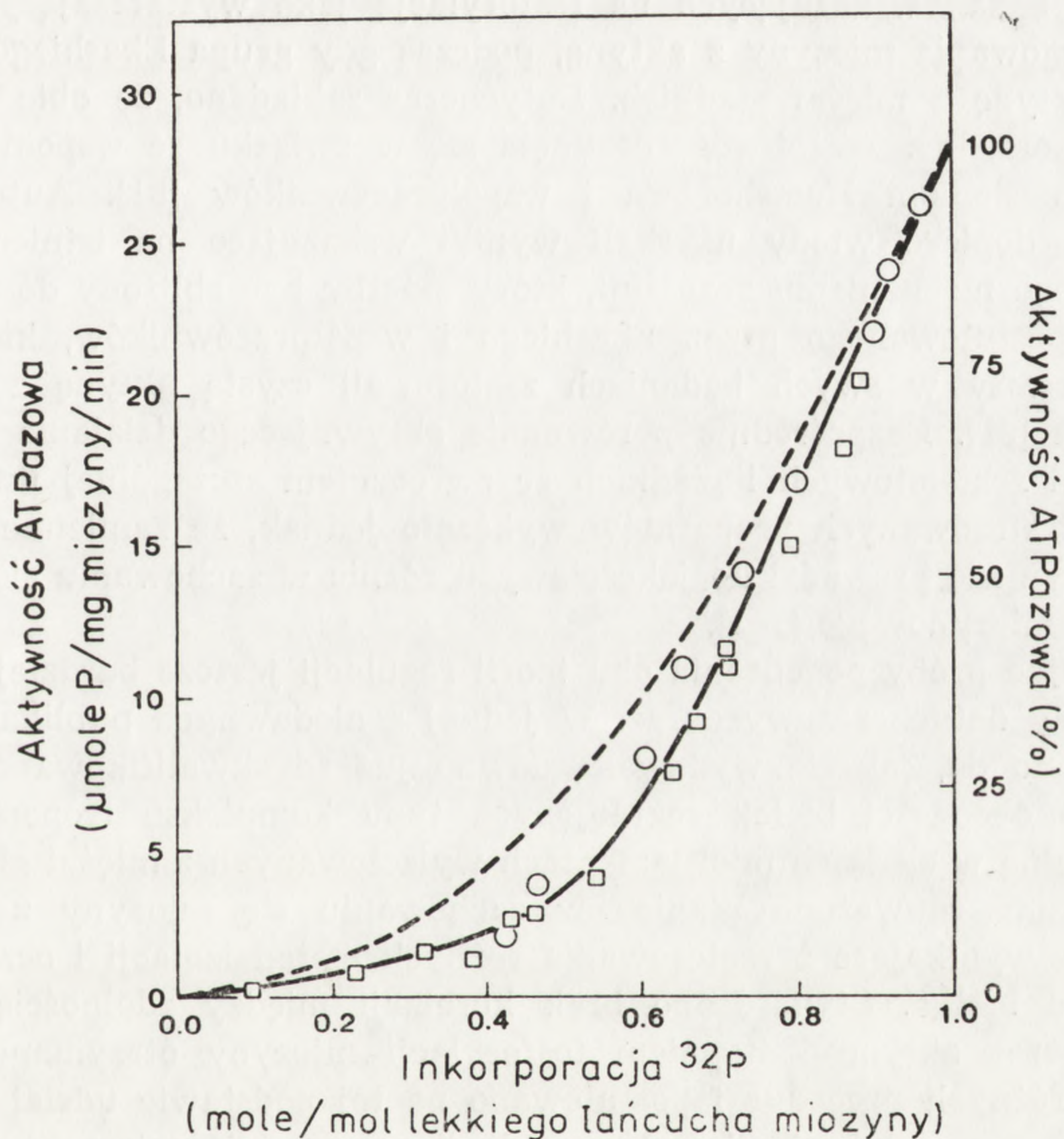
Argumentem przemawiającym za występowaniem w mięśni gładkim systemu regulacji skurczu przez cienkie miofilamenty, jak proponuje Ebashi i współpracownicy, są wyniki doświadczeń z cienkimi miofilamentami wyizolowanymi z mięśni gładkich i „utrwalonymi” w różnych stanach przez sieciowanie aldehydem glutarowym. Cienkie miofilamenty z żołądka kury, zawierające aktynę, tropomiozynę i — według grupy Ebashiego — również leiotoninę, usieciowane w nieobecności Ca^{2+} , czyli w stanie „nieaktywnym”, nie aktywowały ATPazowej aktywności miozyny z mięśni gładkich; usieciowane w obecności Ca^{2+} aktywowały miozynową ATPazę tak w obecności, jak i w nieobecności Ca^{2+} [64].

ARGUMENTY ZA I PRZECIWIW ISTNIENIU PODWÓJNEGO SYSTEMU REGULACJI

Dotychczasowe próby ustalenia przyczyny rozbieżności wyników uzyskiwanych przez zwolenników teorii fosforylacji z jednej, a systemu leiotoninowego z drugiej strony, nie przyniosły rezultatu. Zwolennicy jednej i drugiej teorii pracowali na materiale białkowym z tych samych mięśni gładkich (żołądka kury, aorty krowy), co eliminuje możliwość przypisania obserwowanych różnic specyficzności tkankowej różnych mięśni gładkich.

Należy zaznaczyć, że nietrudno jest przeoczyć obecność w preparatach białkowych dodatkowych składników, które przejawiają swoją aktywność w tak niskiej proporcji molowej do białek kurczliwych, jak to postulują Ebashi i współpracownicy. Ostatnio z pracowni D. J. Hartshorne'a, mającej duże zasługi w sformułowaniu teorii regulacji przez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny, wyszło krótkie doniesienie, w którym postuluje się konieczność dodatkowych czynników do pełnej aktywacji ATPazowej aktywności miozyny przez aktynę [81]. Autorzy stwierdzają, że w układzie utworzonym z czystej miozyny i aktyny z mięśnia żołądka kury, w obecności kinazy lekkich łańcuchów miozyny, aktywność MgATPazowa jest niska i wzrasta — przy tym samym stopniu fosforylacji miozyny — dopiero po dodaniu tropomiozyny. Zastrzegają się przy tym, że dodatkowe oczyszczenie tropomiozyny zmniejsza jej aktywujące działanie, nie określają jednak charakteru ewentualnych dodatkowych czynników koniecznych do pełnej aktywacji. Z drugiej strony, w takim samym układzie białkowym inni autorzy [101] uzyskali znacznie wyższą aktywność MgATPazową bez konieczności dodawania

tropomiozyny, a w obecności elektroforetycznie czystej tropomiozyny — dodatkową stymulację aktywności. Przytoczone tu wyniki Hartshorne'a i współpracowników [81] można, jak się wydaje, wyjaśnić stosunkowo niskim stopniem fosforylacji miozyny (do 50% jedynie) w ich doświadczeniach. Ci sami autorzy dowodzą bowiem w kolejnej publikacji [80], że przy fosforylacji poniżej 50% miejsc w miozynie stopień aktywacji miozyny przez aktynę jest bardzo nieznaczny, a wzrasta, proporcjonalnie do stopnia fosforylacji, dopiero w miarę fosforylacji pozostałych 50%



Ryc. 6. Zależność aktywowanej przez aktynę MgATPazowej aktywności miozyny z mięśnia żołądka kury od stopnia fosforylacji miozyny. Linia przerywaną zaznaczono teoretyczną krzywą ilustrującą badaną zależność przy założeniu, że (a) aktywacja przez aktynę wymaga fosforylacji obu lekkich łańcuchów w cząsteczce miozyny i (b) fosforylacja obu lekkich łańcuchów zachodzi w sposób przypadkowy. Przebieg punktów doświadczalnych zgodny jest z założeniem, że (a) fosforylacja pierwszego lekkiego łańcucha w cząsteczce zachodzi łatwiej niż drugiego i (b) miozyna zawierająca tylko jeden lekki łańcuch w formie ufosforylowanej aktywowana jest przez aktynę w niewielkim tylko stopniu — w około 10% w stosunku do miozyny całkowicie ufosforylowanej. Według Persechini i Hartshorne [80]

lekkich łańcuchów (ryc. 6). Ta niewątpliwie ciekawa obserwacja posłużyła za podstawę dla przypuszczenia o kooperatywnym oddziaływaniu dwóch centrów aktywności enzymatycznej w cząsteczce miozyny [80], a dotyczy układu nie zawierającego tropomiozyny. Zbadanie wpływu tropomiozyny i ewentualnie innych czynników na kooperatywne zachowanie się miozyny pozostaje zadaniem na przyszłość.

Zastanawiano się ostatnio, czy rozbieżność poglądów na temat mechanizmu regulacji skurczu mięśni gładkich nie ma związku ze stosowaniem aktyny z mięśni szkieletowych w przeważającej większości dotychczasowych badań wskazujących na fosforylację jako wystarczający warunek reagowania miozyny z aktyną, podczas gdy grupa Ebashiego stosowała aktynę z mięśni gładkich. Dotychczas zakładano, że obie aktyny są równorzędne. Wątpliwość nasunęła się w związku ze wspomnianym już doniesieniem Hartshorne'a i współpracowników [81]. Autorzy ci bowiem dopiero wtedy uzyskali wyniki wskazujące na istnienie dodatkowego mechanizmu regulacji, który mógłby być zbliżony do mechanizmu postulowanego przez Ebashiego i współpracowników, kiedy po raz pierwszy w swych badaniach zastosowali czystą aktynę z mięśni gładkich [81]. Bezpośrednie porównanie aktywującego działania aktyny z mięśni szkieletowych i gładkich ze zwróceniem szczególnej uwagi na czystość stosowanych preparatów wykazało jednak, że zamienne użycie obu aktyn nie prowadzi do jakościowych różnic w zachowaniu się systemu aktomiozynowego [101].

Kolejne próby pogodzenia obu teorii regulacji jeszcze bardziej skomplikowały dotychczasowy obraz. W jednej z niedawnych publikacji [63] powrócono do, jak się wydawało, dawno już zdyskwalifikowanego poglądu o obecności białek regulujących typu kompleksu tropomiozyny z troponiną w cienkich miofilamentach wyizolowanych z mięśni gładkich.

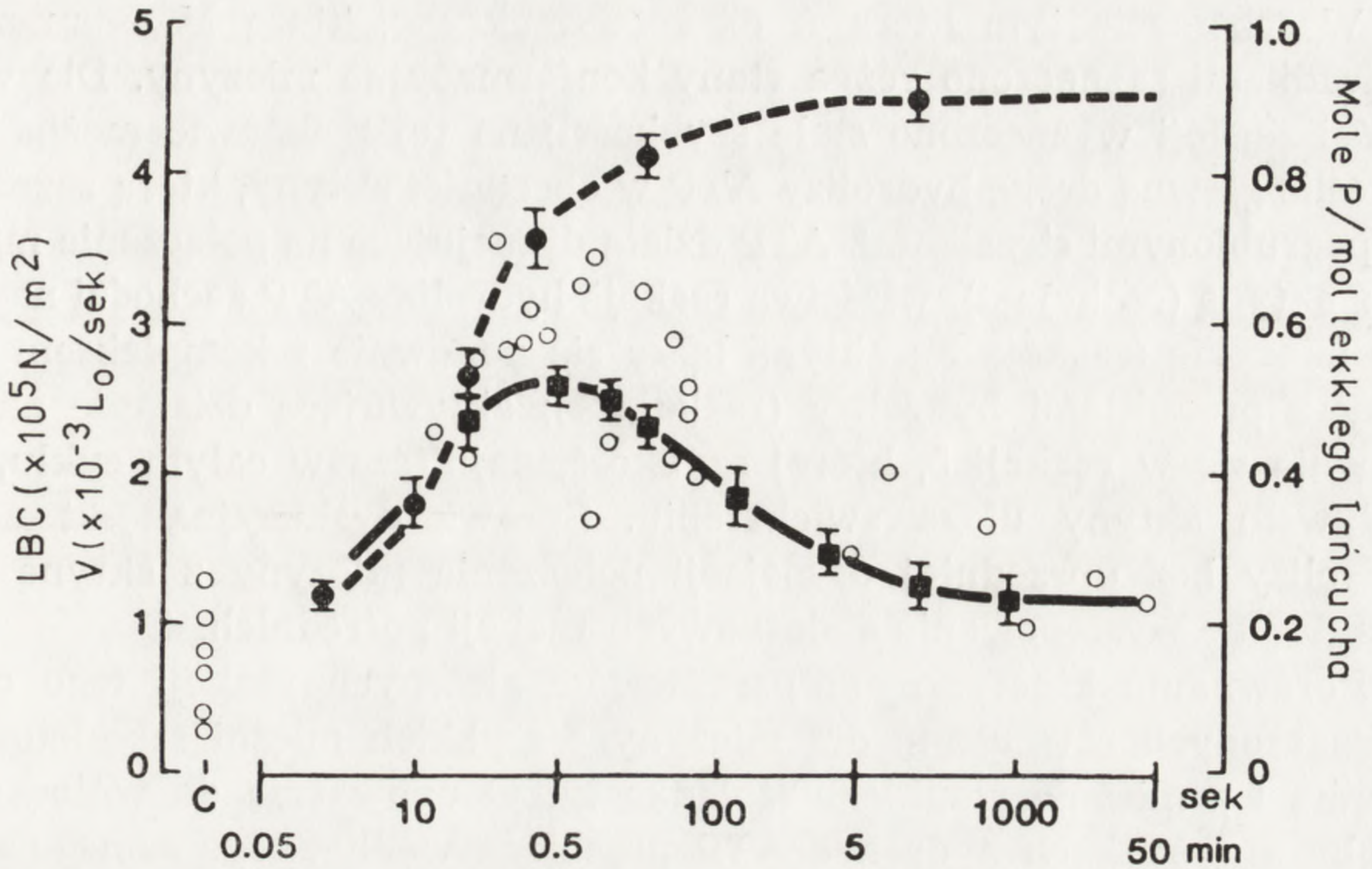
Ostatnio zauważono różnice w zachowaniu się miozyny z mięśni gładkich wynikające z zastosowania różnych metod izolacji i oczyszczania tego białka. Stwierdzono brak korelacji między zdolnością aktywacji przez aktynę i stopniem fosforylacji miozyny otrzymanej przy użyciu różnych procedur i postulowano na tej podstawie udział innych czynników w zależnej od Ca^{2+} regulacji reagowania miozyny z aktyną [15]. Wyjaśnienie przyczyn zaobserwowanych różnic wymaga jednak dalszych szczegółowych badań ze zwróceniem uwagi zarówno na ewentualną obecność zanieczyszczeń dodatkowymi białkami, jak też na wpływ różnych procedur oczyszczania na integralność cząsteczki miozyny, a w szczególności jej lekkich łańcuchów ulegających fosforylacji. Już wcześniej zauważono na przykład, że w trakcie przechowywania preparatów aktomiozyny z mięśniówki tętnicy, przy nieznacznej tylko zmianie poziomu ich aktywności MgATPazowej, zanika zależność aktyw-

ności od stężenia jonów Ca^{2+} , a jednocześnie zanika zdolność fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny w tych preparatach przez świeżo dodaną kinazę lekkich łańcuchów. Sugerowano, że w trakcie przechowywania zachodzi jakaś zmiana w konformacji lekkich łańcuchów miozyny, w wyniku której łańcuchy te tracą zdolność hamowania MgATP azowej aktywności aktomiozyny [71]. Nie wykluczone jest, że zmiana ta wywołana jest utlenieniem grup SH miozyny, stwierdzono bowiem, że utlenienie lub modyfikacja grup SH miozyny z żołądka kury przy użyciu imidu kwasu N-etylomaleinowego znosi zależność aktywacji miozyny przez aktynę od obecności Ca^{2+} i fosforylacji [86]. Inną przyczyną zmian właściwości miozyny może być częściowa proteoliza jej lekkich łańcuchów ulegających fosforylacji. Jak już wspomniano w jednym z poprzednich rozdziałów, trawienie miozyny i aktomiozyny papainą lub trypsyną pozbawia je lekkich łańcuchów ulegających fosforylacji, eliminując jednocześnie konieczność dodatkowych białek (fosforylacji) i Ca^{2+} do aktywacji miozynowej ATPazy przez aktynę [54, 61, 71, 73, 83, 85, 95]. Stwierdzono, że degradacja lekkich łańcuchów ulegających fosforylacji znacznie wyprzedza fragmentację ciężkich łańcuchów miozyny [54, 71, 73]. Zauważono też, że trawienie miozyny z żołądka kury trypsyną prowadzi najpierw do zaniku jej aktywacji przez aktynę, a dopiero w miarę dalszego trawienia zdolność reagowania z aktyną jest stopniowo przywracana z jednoczesnym zanikiem jej zależności od obecności jonów Ca^{2+} i fosforylacji [73]. W początkowej fazie trawienia lekki łańcuch o ciężarze podjednostkowym 20 000 ulega degradacji do fragmentu o ciężarze 17 000, który nie jest fosforylowany przez kinazę lekkich łańcuchów miozyny [73]. Bardziej jeszcze skomplikowany jest efekt chymotrypsyny. Trawienie tym enzymem jest stosowane do otrzymywania tzw. ciężkiej meromiozyny — dwugłówkowego fragmentu cząsteczki miozyny [100]. Łagodne trawienie chymotrypsyną prowadzi do otrzymania ciężkiej meromiozyny z zachowanymi lekkimi łańcuchami, fosforylowanymi przez kinazę lekkich łańcuchów, przy czym fosforylacja jest konieczna dla aktywacji przez aktynę. A zatem preparat ten zachowuje właściwości rodzimej miozyny. Dłuższe trawienie lub użycie wyższych stężeń chymotrypsyny powodowało degradację lekkiego łańcucha o ciężarze podjednostkowym 20 000 do produktu o ciężarze 17 000, który nie jest fosforylowany, a otrzymana w ten sposób ciężka meromiozyna nie jest aktywowana przez aktynę [78, 85, 87]. Jeżeli jednak taki preparat poddawano następnie trawieniu papainą, otrzymywano jednogłówkowy fragment cząsteczki miozyny — subfragment S-1, który, podobnie jak preparaty subfragmentu S-1 otrzymane działaniem papainy bezpośrednio na miozynę, reagował z aktyną bez fosforylacji i niezależnie od stężenia jonów Ca^{2+} [87]. Na podstawie tych obserwacji można przypuszczać,

że zarówno nieufosforylowany lekki łańcuch o ciężarze podjednostkowym 20 000, jak i produkt jego degradacji przez chymotrypsynę (17 000), pozbawiony N-końcowej części łańcucha zawierającej ulegającą fosforylacji resztę serynową [54], działają hamująco na reagowanie miozyny z aktyną. Fragmentacja lekkiego łańcucha w nieco innym miejscu (przez papainę) usuwa inhibicję.

Przedstawione możliwości wpływania na zdolność reagowania miozyny z mięśni gładkich z aktyną przez różne modyfikacje cząsteczki miozyny stanowią dodatkowy argument na korzyść teorii regulacji skurczu tych mięśni za pośrednictwem miozyny. Nie ulega wątpliwości, że jeżeli system regulacji przez oddziaływanie na aktynę występuje w mięśniu gładkim, to tylko jako uzupełniający w stosunku do regulacji przez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny. Jak niejednokrotnie wskazywano [5, 45, 56, 58], za podwójnym mechanizmem kontroli skurczu może przemawiać fakt osiągnięcia maksymalnego izometrycznego napięcia przy niepełnej fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny. Niektórzy autorzy rozważali jednak inne możliwości wytłumaczenia tej niezgodności z wynikami badań *in vitro*. Zwracano uwagę na to, że stopień fosforylacji jest wypadkową działania kinazy i fosfatazy [45, 58], których względne aktywności w mięśniu nie są znane. Wskazywano na możliwość kooperatywności aktywacji, tj. wpływu ufosforylowanych cząsteczek miozyny na sąsiadujące z nimi w miofilamencie miozynowym nieufosforylowane cząsteczki [56]. Taka interpretacja pozostaje w sprzeczności z przytoczonymi w tym rozdziale wynikami ostatnich badań na czystych białkach *in vitro*, wskazującymi raczej na zahamowanie reagowania miozyny z aktyną przed ufosforylowaniem około 50% lekkich łańcuchów w preparacie miozyny [80]. Występowanie tej sprzeczności potwierdza złożoność mechanizmu regulacji *in vivo* i wskazuje na konieczność dalszych poszukiwań.

Całkiem nowy aspekt relacji między fosforylacją miozyny a stanem mięśnia ujawniły ostatnie badania Murphy'ego i współpracowników [23]. Porównując wzrost napięcia pasków mięśniówki tętnicy ze zmianami stopnia fosforylacji miozyny po zainicjowaniu skurczu autorzy ci zauważyli, że stopień fosforylacji, początkowo wzrastający wraz z napięciem, przed osiągnięciem maksymalnego napięcia ulegał obniżeniu, chociaż napięcie po osiągnięciu maksimum utrzymywane było przez długi czas (ryc. 7). Ponieważ napięcie jest proporcjonalne do liczby międzyfilamentowych połączeń, zaobserwowany spadek stopnia fosforylacji bez zmiany napięcia autorzy tłumaczą jako defosforylację cząsteczek miozyny pozostających w połączeniu z aktyną, zakładając, że defosforylacja miozyny połączonej z aktyną utrwala połączenie — stąd liczba połączeń, określająca wielkość napięcia, pozostaje niezmienną. Na razie jest to tylko hipoteza, nie wiadomo też co jest przyczyną spadku fosforylacji

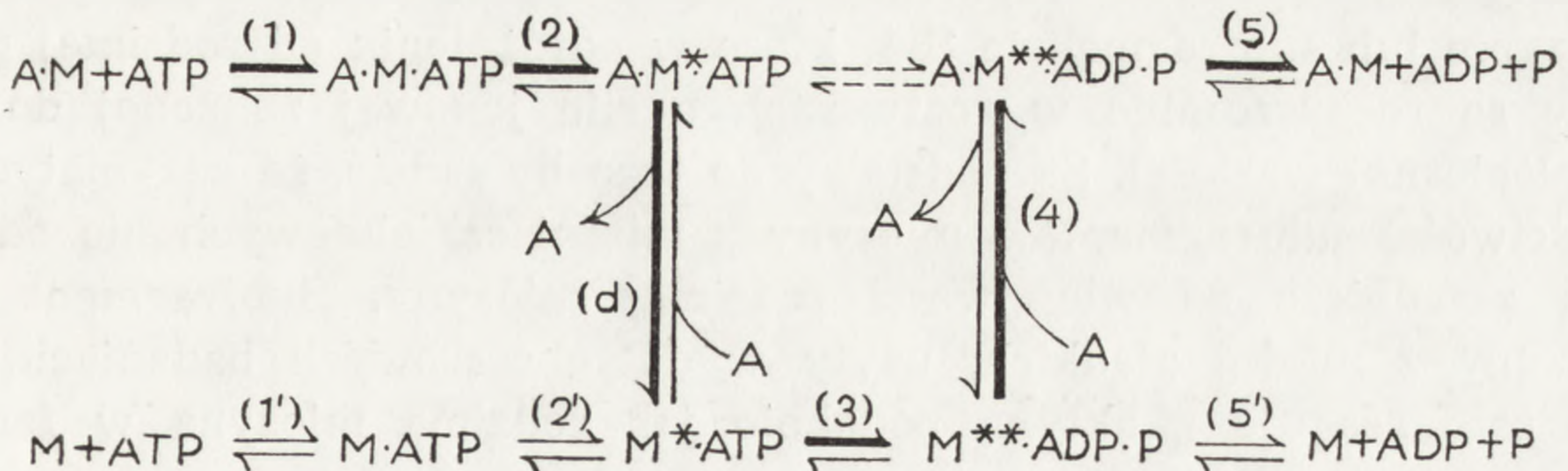


Ryc. 7. Zdolność utrzymywania obciążenia (●), szybkość skurczu po zwolnieniu z obciążenia (■) i stopień fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny (○) w skrawkach mięśniówki tętnicy szyjnej świni w różnym czasie po stymulacji. Zdolność utrzymywania obciążenia (LBC) odpowiada różnicy między całkowitym napięciem i napięciem pasywnym, jakie obserwuje się przy szybkim rozciągnięciu aktywnego mięśnia. Według Dillon, Aksoy, Driska i Murphy [23]

(bezpośrednią przyczyną musi być zmiana względnej aktywności kinazy i fosfatazy). Hipoteza ta zasługuje jednak na uwagę jako pierwsza próba wytłumaczenia wysokiej ekonomiczności utrzymywania napięcia mięśniówki tętniczej, której fizjologiczną funkcją jest stałe przeciwdziałanie rozszerzaniu się naczyń tętniczych pod wpływem ciśnienia krwi.

KINETYCZNY MECHANIZM REAGOWANIA MIOZYNY Z AKTYNĄ

Na podstawie kinetycznych badań hydrolizy ATP przez miozynę i aktomiozynę, prowadzonych dotąd prawie wyłącznie na miozynie z mięśni szkieletowych szybkich królika, zaproponowano następujący mechanizm [102]:



W schemacie tym literą A oznaczono aktywę, literą M — miozynę, gwiazdkami zaznaczono różne stany konformacyjne miozyny. Dla większości reakcji wyznaczono stałe szybkości; na tej podstawie można było określić główną drogę hydrolizy ATP w obecności aktywy, którą zaznaczono pogrubionymi strzałkami. ATP działa dysocjująco na połączenie miozyny z aktyną (reakcja d); właściwa reakcja hydrolizy ATP zachodzi na wolnej miozynie (reakcja 3); aktyna łączy się ponownie z kompleksem miozyny z produktami hydrolizy (reakcja 4); aktywujące działanie aktywy ujawnia się w reakcji 5, której szybkość, najniższa w całym cyklu, pod wpływem aktywy ulega zwiększeniu. Sprawą dyskusyjną jest udział hydrolizy bez uprzedniej dysocjacji połączenia miozyny z aktyną oraz ewentualne występowanie dodatkowych reakcji pośrednich.

Porównanie kinetycznych parametrów głównych reakcji tego cyklu wyznaczonych równoległe dla miozyny z szybkich mięśni szkieletowych królika i z mięśnia gładkiego (żołądka kury) upoważnia do wniosku, że w obu przypadkach hydroliza ATP przebiega według tego samego schematu, jakkolwiek stałe szybkości poszczególnych reakcji nie są jednakowe. Szybkość stadium hydrolizy (reakcja 3) w przypadku miozyny z mięśnia gładkiego jest 2–3-krotnie niższa, wyraźnie niższe są również stałe szybkości dysocjacji kompleksu aktomiozynowego pod wpływem ATP (reakcja d), reasocjacji aktywy z kompleksem miozyny z produktami (reakcja 4) oraz uwalniania ADP. Na podstawie szerszego porównania, uwzględniającego również kinetyczne parametry poszczególnych stadiów hydrolizy ATP katalizowanej przez miozynę z mięśni szkieletowych wolnych i z mięśnia sercowego wykazano, że o szybkości skurczu mięśnia decyduje szybkość uwalniania produktów hydrolizy z kompleksu aktomiozynowego [62].

Jakkolwiek koncepcja wspólnego dla wszystkich typów mięśnia mechanizmu procesu dostarczającego energii dla skurczu wydaje się bardzo atrakcyjna, dotychczas uzyskane wyniki dla miozyny z mięśni gładkich należy jednak traktować z pewną rezerwą. Ze względu na konieczność zastosowania specjalnych technik pomiarowych, głównie spektralnych, badania kinetyki pośrednich reakcji procesu hydrolizy ATP wymagają materiału rozpuszczalnego i dlatego prowadzone są wyłącznie na enzymatycznie czynnych fragmentach cząsteczki miozyny: ciężkiej mero-miozynie lub subfragmentcie S-1, które w odróżnieniu od rodzimej miozyny są rozpuszczalne w roztworach o sile jonowej zbliżonej do jej fizjologicznej wartości. Są podstawy do tego by sądzić, że enzymatyczne właściwości subfragmentów miozyny z mięśni szkieletowych nie odbiegają zasadniczo od właściwości rodzimej miozyny. Subfragment S-1 miozyny z mięśni gładkich, użyty w dotychczasowych badaniach, jakościowo reaguje z aktyną podobnie jak rodzima miozyna w formie

ufosforylowanej. Nie wiadomo jednak, czy brak lekkiego łańcucha ulegającego fosforylacji nie wpływa na kinetyczne parametry poszczególnych reakcji procesu hydrolizy ATP. Ponadto subfragment S-1, występujący wyłącznie w formie „aktywnej” (reagującej z aktyną), nie daje możliwości uzyskania odpowiedzi na pytanie, która z reakcji pośrednich podlega regulacji. Otrzymanie ostatnio ciężkiej meromiozyny z zachowanymi lekkimi łańcuchami ulegającymi fosforylacji [87] pozwala przypuszczać, że rozstrzygnięcie nasuwających się wątpliwości i uzyskanie brakujących informacji jest sprawą niedalekiej przyszłości.

UWAGI KOŃCOWE

We wstępie do niniejszego artykułu podkreślono zasadniczą różnicę w reagowaniu miozyny z aktyną w mięśni gładkim i szkieletowym kręgowców, związaną z innym systemem regulacji aktywności skurczowej tych dwóch typów mięśnia. Z przeglądu literatury dotyczącej regulacji skurczu mięśni gładkich kręgowców wynika jasno, że podstawowym, jeżeli nie wyłącznym, mechanizmem regulacji reagowania miozyny z aktyną w mięśni tego typu jest enzymatyczna fosforylacja i defosforylacja lekkich łańcuchów miozyny. Poziom fosforylacji, określający zdolność reagowania miozyny z aktyną, regulowany jest przez zmiany stężenia jonów Ca^{2+} , a ponadto może być modulowany przez inne czynniki wpływające na aktywność kinazy lekkich łańcuchów miozyny. Pogląd Ebashiego i współpracowników, według których aktywacja białek kurczliwych w mięśni gładkim dochodzi do skutku za pośrednictwem białek działających na aktynę, jest odosobniony. Dla wytłumaczenia wielu niejasnych jeszcze punktów w teorii fosforylacji niektórzy autorzy sugerowali możliwość podwójnej regulacji, nie potrafili jednak określić charakteru i miejsca działania ewentualnych dodatkowych czynników regulujących. Można przypuszczać, że dokładniejsze zbadanie zauważonego ostatnio kooperatywnego zachowania się miozyny, możliwości defosforylacji miozyny pozostającej w połączeniu z aktyną, oraz funkcji tropomiozyny w reagowaniu ufosforylowanej miozyny z aktyną pozwoli wyjaśnić zauważone sprzeczności na gruncie teorii fosforylacji. Zbadania wymaga też wpływu fosforylacji na kinetyczny mechanizm reagowania miozyny z aktyną.

Podstawowe znaczenie fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny w regulacji aktywności skurczowej mięśni gładkich stanowi kolejną różnicę w stosunku do mięśni szkieletowych. Jakkolwiek fosforylacja lekkich łańcuchów miozyny z mięśni szkieletowych i sercowego została opisana wcześniej, jej znaczenie w mięśni szkieletowym i w sercu wciąż nie jest jasne. Wobec niezgodności dotychczasowych wyników uzyskanych

w różnych laboratoriach niezbędne są dalsze badania. Nie ulega jednak wątpliwości, że jeżeli fosforylacja odgrywa jakąś rolę w reagowaniu miozyny z aktyną w mięśniu szkieletowym i sercowym, to może to być tylko działanie modulujące, a nie warunkujące skurcz. Szereg dowodów przemawia natomiast za tym, że podobnie jak w mięśniu gładkim, fosforylacja przez endogenne kinazy ma zasadnicze znaczenie w regulacji reagowania z aktyną miozyny z różnego typu komórek niemięśniowych, a co za tym idzie — w kontroli różnych form ruchliwości komórkowej. Zagadnienie to omawiane jest szerzej w artykule [18b].

LITERATURA

- [1] ADELSTEIN R. S., CONTI M. A., HATHAWAY D. R., KLEE C. B., Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **253**: 8347-8350, 1978.
- [2] ADELSTEIN R. S., KLEE C. B., Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **256**: 7501-7509, 1981.
- [3] AKSOY M. O., WILLIAMS D., SHARKEY E. M., HARTSHORNE D. J., A relationship between Ca^{2+} sensitivity and phosphorylation of gizzard actomyosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**: 35-41, 1976.
- [4] BARRON J. T., BÁRÁNY M., BÁRÁNY K., Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction, *J. Biol. Chem.*, **254**: 4954-4956, 1979.
- [5] BARRON J. T., BÁRÁNY M., BÁRÁNY K., STORTI R. V., Reversible phosphorylation and dephosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin during the contraction-relaxation-contraction cycle of arterial smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **255**: 6238-6244, 1980.
- [6] BÁRÁNY M., BÁRÁNY K., GAETJENS E., BAILIN G., Chicken gizzard myosin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**: 205-221, 1966.
- [7] BOREJDO J., OPLATKA A., Evidence for myosin-linked regulation in guinea pig taenia coli muscle, *Pflügers Arch.*, **366**: 177-184, 1976.
- [8] BREMEL R. D., Myosin linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *Nature*, **252**: 405-407, 1974.
- [9] CARSTEN M., Uterine smooth muscle: troponin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**: 353-357, 1971.
- [10] CASSIDY P. S., HOAR P. E., KERRICK W. G. L., Irreversible thiophosphorylation and activation of tension in functionally skinned rabbit ileum strips by [^{35}S] ATP γ S, *J. Biol. Chem.*, **254**: 11148-11153, 1979.
- [11] CASSIDY P. S., HOAR P. E., KERRICK W. G. L., Inhibition of Ca^{2+} -activated tension and myosin light chain phosphorylation in skinned smooth muscle strips by phenothiazines, *Pflügers Arch.*, **387**: 115-120, 1980.
- [12] CHACKO S., CONTI M. A., ADELSTEIN R. S., Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca^{2+} regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 129-133, 1977.

- [13] CHACKO S., Effects of phosphorylation, calcium ion, and tropomyosin on actin-activated adenosine 5'-triphosphatase activity of mammalian smooth muscle myosin, *Biochemistry*, **20**: 702-707, 1981.
- [14] COHEN P., Identification of calmodulin as the fourth subunit of phosphorylase kinase, *Fed. Proc.*, **38**: 788, 1979.
- [15] COLE H. A., GRAND R. J. A., PERRY S. V., Phosphorylation of smooth muscle myosin and actin activation of the ATPase, *J. Muscle Res. Cell Motility*, **1**: 468, 1980.
- [16] CONTI M. A., ADELSTEIN R. S., Phosphorylation by cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase regulates myosin light chain kinase, *Fed. Proc.*, **39**: 1569-1573, 1980.
- [17] CONTI M. A., ADELSTEIN R. S., The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3': 5'cAMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **256**: 3178-3181, 1981.
- [18a] DĄBROWSKA R., Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy, *Post. Biochem.*, **22**: 467-481, 1976.
- [18b] DĄBROWSKA R., Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni, *Post. Biochem.*, w druku, 1982.
- [19] DĄBROWSKA R., AROMATORIO D., SHERRY J. M. F., HARTSHORNE D. J., Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**: 1263-1272, 1977.
- [20] DĄBROWSKA R., DRABIKOWSKI W., Molekularne podstawy skurczu mięśni, *Post. Biochem.*, **19**: 343-359, 1973.
- [21] DĄBROWSKA R., SHERRY J. M. F., AROMATORIO D. K., HARTSHORNE D. J., Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard, *Biochemistry*, **17**: 253-258, 1978.
- [22] DĄBROWSKA R., SOSIŃSKI J., DRABIKOWSKI W., Comparative studies of various kinds of tropomyosin, [w:] *Plasticity of Muscle*, red. D. Pette, Walter de Gruyter and Co, Berlin, New York 1980, 225-239.
- [23] DILLON P. F., AKSOY M. O., DRISKA S. P., MURPHY R. A., Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle, *Science*, **211**: 495-497, 1981.
- [24] DiSALVO J., GRUENSTEIN E., SILVER P., Ca²⁺ dependent phosphorylation of bovine aortic actomyosin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**: 410-414, 1978.
- [25] DRABIKOWSKI W., KUŹNICKI J., GRABAREK Z., Similarity of Ca²⁺-induced conformational changes in troponin-C, protein activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase and their tryptic fragments, [w:] *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*, red. R. H. Wasserman, R. A. Corradino, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. Mac Lennan, F. L. Siegel, Elsevier North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford 1977, 270-272.
- [26] DRABIKOWSKI W., KUŹNICKI J., GRABAREK Z., Distribution of troponin C and protein activator of 3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in vertebrate tissues, *Comp. Biochem. Physiol.*, **60**: 1-6, 1978.
- [27] DRISKA S., HARTSHORNE D. J., The contractile proteins of smooth muscle. Properties and components of a Ca²⁺-sensitive actomyosin from chicken gizzard, *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**: 203-212, 1975.
- [28] EBASHI S., ENDO M., Calcium ion and muscle contraction, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **18**: 123-183, 1968.
- [29] EBASHI S., IWAKURA H., NAKAJIMA H., NAKAMURA R., OOI Y., New

- structural proteins from dog heart and chicken gizzard, *Biochem. Z.*, **345**: 201–211, 1966.
- [30] EBASHI S., MIKAWA T., HIRATA M., TOYO-OKA T., NONOMURA Y., Regulatory proteins in smooth muscle, [w:] *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Rüegg, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1977, 325–334.
- [31] EBASHI S., TOYO-OKA T., NONOMURA Y., Gizzard troponin, *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**: 859–861, 1975.
- [32] ENDO M., KITAZAWA T., YAGI S., IINO M., KAKUTA Y., Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers, [w:] *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Rüegg, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1977, 199–209.
- [33] FREARSON N., FOCANT B. W. W., PERRY S. V., Phosphorylation of a light chain component of myosin from smooth muscle, *FEBS Lett.*, **63**: 27–32, 1976.
- [34] FREARSON N., PERRY S. V., Phosphorylation of the light-chain components of myosin from cardiac and red skeletal muscles, *Biochem. J.*, **151**: 99–107, 1975.
- [35] FREDERIKSEN D. W., Myosin-mediated Ca^{++} -regulation of actomyosin-adenosinetriphosphatase from porcine aorta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2706–2710, 1976.
- [36] GÓRECKA A., AKSOY M. O., HARTSHORNE D. J., The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**: 325–331, 1976.
- [37] HARTSHORNE D. J., ABRAMS L., AKSOY M., DĄBROWSKA R., DRISKA S., SHARKEY E., Molecular basis for the regulation of smooth muscle actomyosin, [w:] *The Biochemistry of Smooth Muscle*, red. N. L. Stephens, University Park Press, Baltimore 1977, 513–532.
- [38] HARTSHORNE D. J., GÓRECKA A., AKSOY M. O., Aspects of the regulatory mechanism in smooth muscle, [w:] *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Rüegg, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977, 377–384.
- [39] HARTSHORNE D. J., SIEMIANKOWSKI R. F., AKSOY M. O., Ca regulation in smooth muscle and phosphorylation: some properties of the myosin light chain kinase, [w:] *Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms*, red. S. Ebashi, K. Maruyama, M. Endo, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin 1980, 287–301.
- [40] HEAD J. F., MADER S., KAMINER B., Troponin-C-like modulator protein from vertebrate smooth muscle, [w:] *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*, red. R. H. Wasserman, R. A. Corradino, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. Mac Lennan, F. L. Siegel, Elsevier North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford 1977, 275–277.
- [41] HEAD J. F., WEEKS R. A., PERRY S. V., Affinity-chromatographic isolation and some properties of troponin C from different muscle types, *Biochem. J.*, **161**: 465–471, 1977.
- [42] HIDAKA H., NAKA M., YAMAKI T., Effect of novel specific myosin light chain kinase inhibitors on Ca^{2+} -activated Mg^{2+} -ATPase of chicken gizzard actomyosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**: 694–699, 1979.
- [43] HIRATA M., MIKAWA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Ca^{2+} regulation in vascular smooth muscle, *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**: 1793–1796, 1977.

- [44] HIRATA M., MIKAWA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Ca^{2+} regulation in vascular smooth muscle. II. Ca^{2+} binding of aorta leiotoxin. *J. Biochem. (Tokyo)*, **87**: 369–378, 1980.
- [45] HOAR P. E., KERRICK W. G. L., CASSIDY P. S., Chicken gizzard: relation between calcium-activated phosphorylation and contraction, *Science*, **204**: 503–506, 1979.
- [46] HUSZAR G., BAILEY P., Relationship between actin-myosin interaction and myosin light chain phosphorylation in human placental smooth muscle, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **135**: 718–726, 1979.
- [47] HUXLEY A. F., The origin of force in skeletal muscle, [w:] *Energy Transformation in Biological Systems*, Ciba Foundation Symposium 31, Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland, Amsterdam 1975, 271–278.
- [48] HUXLEY H. E., The mechanism of muscular contraction, *Science*, **164**: 1356–1366, 1969.
- [49] IKEBE M., AIBA T., ONISHI H., WATANABE S., Calcium sensitivity of contractile proteins from chicken muscle, *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**: 1643–1655, 1978.
- [50] IKEBE M., ONISHI H., WATANABE S., Phosphorylation and rephosphorylation of a light chain of the chicken gizzard myosin molecule, *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**: 299–302, 1977.
- [51] JAKES R., NORTHROP F., KENDRICK-JONES J., Calcium binding regions of myosin “regulatory” light chains, *FEBS Lett.*, **70**: 229–234, 1976.
- [52] JANIS R. A., MOATS-STAATS B. M., GUALTIERI R. T., Protein phosphorylation during spontaneous contraction of smooth muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**: 256–270, 1980.
- [53] KENDRICK-JONES J., The subunit structure of gizzard myosin, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, **265**: 183–189, 1973.
- [54] KENDRICK-JONES J., JAKES R., Regulatory light chains in myosin, [w:] *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Rüegg, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1977, 343–352.
- [55] KENDRICK-JONES J., LEHMAN W., SZENT-GYÖRGYI A. G., Regulation in molluscan muscles, *J. Mol. Biol.*, **54**: 313–326, 1970.
- [56] KERRICK W. G. L., HOAR P. E., CASSIDY P. S., Calcium-activated tension: the role of myosin light chain phosphorylation, *Fed. Proc.*, **39**: 1558–1563, 1980.
- [57] KORDYLEWSKI L., Struktura komórek mięśni gładkich, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 343–367, 1982.
- [58] LANEROLLE P., STULL J. T., Myosin phosphorylation during contraction and relaxation of tracheal smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9993–10000, 1980.
- [59] LEBOWITZ E., COOKE R., Phosphorylation of uterine smooth muscle myosin permits actin activation, *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**: 1489–1494, 1979.
- [60] MAKIOKA A., HIRABAYASHI T., Troponin C-like protein in chicken gizzard muscle, *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**: 967–975, 1979.
- [61] MARSTON S. B., TAYLOR E. W., Mechanism of myosin and actomyosin ATPase in chicken gizzard smooth muscle, *FEBS Lett.*, **86**: 167–170, 1978.
- [62] MARSTON S. B., TAYLOR E. W., Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the four types of vertebrate muscles, *J. Mol. Biol.*, **139**: 573–600, 1980.

- [63] MARSTON S. B., TREVETT R. M., WALTERS M., Calcium ion-regulated thin filaments from vascular smooth muscle, *Biochem. J.*, **185**: 335–365, 1980.
- [64] MIKAWA T., "Freezing" of Ca regulated structures of the gizzard thin filament by glutaraldehyde, *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**: 879–881, 1979.
- [65] MIKAWA T., HIRATA M., SAIDA K., NONOMURA Y., EBASHI S., KAKIUCHI S., Calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *Abstr. 6th Int. Congr. Biophys. Kyoto*, **233**, 1978.
- [66] MIKAWA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Does phosphorylation of myosin light chain have direct relation to regulation in smooth muscle? *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**: 1789–1791, 1977.
- [67] MIKAWA T., NONOMURA Y., HIRATA M., EBASHI S., KAKIUCHI S., Involvement of an acidic protein in the regulation of smooth muscle contraction by the leiotonin-tropomyosin system, *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**: 1633–1636, 1978.
- [68] MIKAWA T., TOYO-OKA T., NONOMURA Y., EBASHI S., Essential factor of gizzard "troponin" fraction, *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**: 237–275, 1977.
- [69] MRWA U., RÜEGG J. C., Myosin-linked calcium regulation in vascular smooth muscle, *FEBS Lett.*, **60**: 81–84, 1975.
- [70] MRWA U., RÜEGG J. C., The role of the regulatory light chain in pig carotid smooth muscle ATPase, [w:] *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Rüegg, Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1977, 353–357.
- [71] MRWA U., TROSCHKA M., GROSS C., KATZINSKY L., Calcium-sensitivity of pig-carotid-actomyosin ATPase in relation to phosphorylation of the regulatory light chain, *Eur. J. Biochem.*, **103**: 415–419, 1980.
- [72] MRWA U., TROSCHKA M., RÜEGG J. C., Cyclic AMP-dependent inhibition of smooth muscle actomyosin, *FEBS Lett.*, **107**: 371–374, 1979.
- [73] OKAMOTO Y., SEKINE T., Effects of tryptic digestion on the enzymatic activities of chicken gizzard myosin, *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**: 1375–1379, 1978.
- [74] OKAMOTO Y., SEKINE T., Light chain phosphorylation alters the N-terminal structure of gizzard myosin heavy chain in an ATP dependent manner, *J. Biochem. (Tokyo)*, **89**: 697–700, 1981.
- [75] OKAMOTO Y., SEKINE T., N-terminal region of gizzard myosin heavy chain is critical for the ATPase activity, *J. Biochem. (Tokyo)*, **90**: 833–842, 1981.
- [76] OKAMOTO Y., SEKINE T., Enhancement of ADP binding to gizzard HMM upon cleavage of site 1 in the heavy chain, *J. Biochem. (Tokyo)*, **90**: 843–849, 1981.
- [77] ONISHI H., IIJIMA S., ANZAI H., WATANABE S., Possible role of myosin light-chain phosphatase in the relaxation of chicken gizzard muscle, *J. Biochem. (Tokyo)*, **86**: 1283–1290, 1979.
- [78] ONISHI H., WATANABE S., Chicken gizzard heavy meromyosin that retains the two light-chain components, including a phosphorylatable one, *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**: 457–472, 1979.
- [79] PATO M. D., ADELSTEIN R. S., Dephosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **255**: 6535–6538, 1980.
- [80] PERSECHINI A., HARTSHORNE D. J., Phosphorylation of smooth muscle myosin: evidence for cooperativity between the myosin heads, *Science*, **213**: 1383–1385, 1981.

- [81] PERSECHINI A., MRWA U., HARTSHORNE D. J., Effect of phosphorylation on the actin-activated ATPase activity of myosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 800–805, 1981.
- [82] PIRES E., PERRY S. V., THOMAS M. A. V., Myosin light-chain kinase, a new enzyme from striated muscle, *FEBS Lett.*, **41**: 292–296, 1974.
- [83] REES D. D., FREDERIKSEN D. W., Calcium regulation of porcine aortic myosin, *J. Biol. Chem.*, **256**: 357–364, 1981.
- [84] SAIDA K., NONOMURA Y., Characteristics of Ca^{2+} -and Mg^{2+} -induced tension development in chemically skinned smooth muscle fibers, *J. Gen. Physiol.*, **72**: 1–14, 1978.
- [85] SEIDEL J. C., Chymotryptic heavy meromyosin from gizzard myosin: a proteolytic fragment with the regulatory properties of the intact myosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**: 107–113, 1978.
- [86] SEIDEL J. C., Activation by actin of ATPase activity of chemically modified gizzard myosin without phosphorylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 958–964, 1979.
- [87] SEIDEL J. C., Fragmentation of gizzard myosin by α -chymotrypsin and papain, the effects on ATPase activity, and the interaction with actin, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4355–4361, 1980.
- [88] SHERRY J. M. F., GÓRECKA A., AKSOY M. O., DĄBROWSKA R., HARTSHORNE D. J., Roles of calcium and phosphorylation in the regulation of the activity of gizzard myosin, *Biochemistry*, **17**: 4411–4418, 1978.
- [89] SILVER P. J., DiSALVO J., Adenosine 3':5'-monophosphate-mediated inhibition on myosin light chain phosphorylation in bovine aortic myosin, *J. Biol. Chem.*, **254**: 9951–9954, 1979.
- [90] SMALL J. V., SOBIESZEK A., Myosin phosphorylation and Ca-regulation in vertebrate smooth muscle, [w:] *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Rüegg, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977, 385–393.
- [91] SMALL J. V., SOBIESZEK A., Ca-regulation of mammalian smooth muscle actomyosin via a kinase-phosphatase-dependent phosphorylation and dephosphorylation of the 20,000 — M_r light chain of myosin, *Eur. J. Biochem.*, **76**: 521–530, 1977.
- [92] SOBIESZEK A., Vertebrate smooth muscle myosin. Enzymatic and structural properties, [w:] *The Biochemistry of Smooth Muscle*, red. N. L. Stephens, University Park Press, Baltimore 1977, 413–443.
- [93] SOBIESZEK A., Ca-linked phosphorylation of a light chain of vertebrate smooth-muscle myosin, *Eur. J. Biochem.*, **73**: 477–483, 1977.
- [94] SOBIESZEK A., BREMEL R. D., Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin, *Eur. J. Biochem.*, **55**: 49–60, 1975.
- [95] SOBIESZEK A., SMALL J. V., Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle, *J. Mol. Biol.*, **102**: 75–92, 1976.
- [96] SOBIESZEK A., SMALL J. V., Regulation of the actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle: activation via a myosin light-chain kinase and the effect of tropomyosin, *J. Mol. Biol.*, **112**: 559–576, 1977.
- [97] SOBIESZEK A., SMALL J. V., Effect of muscle and non-muscle tropomyosins in reconstituted skeletal muscle actomyosin, *Eur. J. Biochem.*, **118**: 533–539, 1981.
- [98] SPARROW M. P., MRWA U., HOFMANN F., RÜEGG J. C., Calmodulin is essential for smooth muscle contraction, *FEBS Lett.*, **125**: 141–145, 1981.

- [99] SPARROW M. D., VAN BOCKXMEER J., Arterial tropomyosin and a relaxing protein fraction from vascular smooth muscle. Comparison with skeletal tropomyosin and troponin, *J. Biochem.*, **72**: 1075–1080, 1972.
- [100] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., PIWOWAR U., Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych, *Post. Biochem.*, **26**: 517–558, 1980.
- [101] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., SOBIESZEK A., Activation of smooth muscle myosin by smooth and skeletal muscle actins, *FEBS Lett.*, **134**: 197–202, 1981.
- [102] TAYLOR E. W., Mechanism of actomyosin ATPase and the problem of muscle contraction, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **4**: 103–164, 1979.
- [103] VALLET B., MOLLA A., DEMAILLE J. G., Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent regulation of purified bovine aortic calcium/calmodulin-dependent myosin light chain kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **674**: 256–264, 1981.
- [104] WALSH M. P., CAVADORE J-C., VALLET B., DEMAILLE J. G., Calmodulin-dependent myosin light chain kinase from cardiac and smooth muscle: a comparative study, *Can. J. Biochem.*, **58**: 299–308, 1980.
- [105] WEISS B., LEVIN R. M., Mechanism for selectively inhibiting the activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase and adenylate cyclase by antipsychotic agents, [w:] *Advances in Cyclic Nucleotide Research 9*, red. W. J. George, L. J. Ignarro, Raven Press, New York 1978, 285–303.
- [106] YAMAGUCHI N., MIYAZAWA Y., SEKINE T., Preparation and properties of smooth muscle myosin from horse esophagus, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**: 411–421, 1970.

Otrzymano: 13 stycznia 1982.

Przyjęto: 8 marca 1982.

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

MIOCYTY NACZYNIOWE — KOMÓRKI WIELOCZYNNOŚCIOWE

VASCULAR MYOCYTES — THE MULTIFUNCTIONAL CELLS

Aleksander HINEK

Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

Streszczenie. Przedstawiono informacje o ultrastrukturze i funkcjach miocytów naczyniowych, które reprezentują odmienny typ komórki mięśnia gładkiego. Są to komórki wieloczynnościowe, które obok funkcji skurczowych mają zdolność syntezy i wydzielania składników substancji międzykomórkowej tkanki łącznej. Komórki te odgrywają ważną rolę w patogenezie miażdżycy oraz innych schorzeń dotyczących elementów substancji międzykomórkowej. Na podstawie literatury i własnych obserwacji autora przedstawiono procesy wydzielania elastyny, glikoproteidów, kolagenu i proteoglikanów przez miocyty obecne w ścianach naczyń naczyniowych oraz przez te komórki w hodowli i po ich przeszczepieniu. Omówiono również rolę tych składników substancji międzykomórkowej w procesie powstawania płytek miażdżycowych. Zajęto się również problemem proliferacji miocytów naczyniowych *in vivo* i *in vitro* oraz przedyskutowano wpływ znanych czynników mitogennych na te komórki.

Summary. The paper presents informations on the ultrastructure and functions of arterial myocytes which represent the different type of smooth muscle cell. These cells are multifunctional in the sense that despite their contraction abilities they have capacity to synthesize and secrete proteins and glycosaminoglycans associated with the extracellular connective tissue matrix. They are of prime importance in the pathogenesis of atherosclerosis and other diseases involving the extracellular matrix components of the arterial wall. On the basis of literature data and the authors own experiments on the intact arterial walls, cultures and transplants of isolated myocytes the secretory pathways for elastin, glycoproteins, collagen and proteoglycans are described. The role of particular matrix components secreted by the arterial myocytes in the process of atherosclerotic plaque formation is discussed. Subsequently the problem of the arterial smooth muscle cell proliferation and humoral requirements for their growth and secretion *in vivo* and in the culture are also mentioned.

BUDOWA MIOCYTÓW NACZYNIOWYCH

Komórkami najliczniej występującymi w ścianach naczyń tętnicznych są miocyty. Znajdują się one we wszystkich trzech warstwach ściany naczyniowej. W błonie wewnętrznej towarzyszą komórkom śródbłonna, a w przydanie — fibroblastom. W błonie środkowej występują jako jedyny typ komórek. W tętnicach typu mięśniowego komórki te przylegają do siebie łącząc się połączeniami typu macula i zonula adherens. W tętnicach typu sprężystego tworzą warstwy oddzielone od siebie błonami sprężystymi, włóknami kolagenowymi i skupiskami proteoglikanów [30, 54, 73]. Miocyty naczyniowe zachowują wszystkie typowe cechy komórek mięśni gładkich, są jednak nieco odmienne morfologicznie i funkcjonalnie od miocytów gładkich obecnych w innych narządach [31–34, 54, 73]. Błona komórkowa tych owalnych lub wrzecionowatych komórek pokryta jest mukoproteidową błoną podstawną — basement membrane. Obecność tej amorficznej lub ziarnistej struktury jest cechą charakterystyczną pozwalającą odróżnić miocyty już we wczesnych okresach ich różnicowania od fibroblastów i komórek mezenchymatycznych [54, 59, 73]. Błona komórkowa miocytów naczyniowych wytwarza długie wypustki zlokalizowane na biegunach komórki oraz liczne wpuklenia wnikaające w obszar cytoplazmy. Jądra tych komórek są zwykle nieregularne w kształcie, czasem płatowne. Cytoplazma zawiera liczne miofilamenty aktynowe zorganizowane w wiązki łączące się z zawierającymi alfa-aktyninę ciałkami ciemnymi lub taśmami błony komórkowej. Przy użyciu specjalnej procedury przygotowawczej można uwidocznić w cytoplazmie miocytów naczyniowych również grube miofilamenty miozynowe [73]. Liczne są tu również filamenty pośrednie zawierające desminę i wimentynę oraz mikrotubule [18]. Komórki te są zwykle bogate w mitochondria i lizosomy [56]. Mają również dobrze rozwiniętą ziarnistą siateczkę śródplazmatyczną oraz aparat Golgiego składający się z kilku lub kilkunastu diktiosomów, co sprawia, że te okolice cytoplazmy przypominają cytoplazmę fibroblastów lub innych komórek mezenchymalnych [31, 32, 34]. Liczba organelli i ich rozmieszczenie wynika ze stopnia różnicowania poszczególnych miocytów i ich aktualnej aktywności metabolicznej [73]. Ogólny schemat ultrastruktury miocytów naczyniowych podlega również pewnej zmienności wynikającej z ich umiejscowienia na określonej głębokości w ścianie naczyniowej i umiejscowienia w określonym segmencie drzewa naczyniowego [30, 73].

FUNKCJE MIOCYTÓW NACZYNIOWYCH

Miocyty naczyniowe uważane są za komórki wieloczynnościowe, które oprócz funkcji skurczowych mają zdolność szybkiej migracji i podziałów, intensywnej fagocytozy oraz syntezy składników substancji

międzykomórkowej [5, 17, 42, 64]. W badaniach mikroskopowo-elektrowych i biochemicznych udowodniono, że produkują one kolagen, fibronektynę, proteoglikany oraz elementy strukturalne włókien i błon sprężystych — elastynę i glikoproteidy [35, 36, 39, 59, 65]. Miocyty znacznie zwiększają produkcję elementów substancji międzykomórkowej w miejscach mechanicznego lub chemicznego uszkodzenia ściany naczyniowej [50] w nadciśnieniu oraz w czasie formowania się blaszek miażdżycowych [16, 29, 40, 80]. Są one również zdolne do intensywnej syntezy substancji międzykomórkowej w hodowlach tkankowych i komórkowych [1, 2, 6, 8, 13, 33, 36, 49, 51, 71]. Miocyty naczyniowe jako komórki zdolne do produkcji elementów substancji międzykomórkowej są aktywnie zaangażowane w wielu wrodzonych zespołach chorobowych dotyczących jednocześnie tkanki łącznej i naczyń. W zespołach tych dochodzi do zniekształceń budowy prekursorów włókien kolagenowych i sprężystych zarówno na etapie transkrypcji, jak i translacji. Częściej jeszcze zależą one od zaburzeń modyfikacji potranslacyjnych warunkujących prawidłową ostateczną strukturę tych białek oraz ich wydzielenie z komórki [20].

Do schorzeń dziedzicznych, w których dochodzi do zaburzeń budowy włókien sprężystych i kolagenowych należą: zespół Marfana, kilka odmian zespołu Ehlers-Danlosa, zespół Menkesa, cutis laxa, dermatosparaxis i pseudoxanhoma elasticum, sclerodermia i homocystynuria [26, 37, 68]. W schorzeniach tych oprócz szeregu objawów klinicznych dotyczących skóry, więzadeł, rozciągnięć, kości i chrząstek obserwuje się również liczne zmiany w ścianach naczyń krwionośnych doprowadzające do powstawania tętniaków, lokalnych pęknięć, wylewów i zakrzepów [57, 68].

SYNTEZA ELEMENTÓW SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ PRZEZ MIOCYTY NACZYNIOWE

WŁÓKNA SPREŻYSTE

Włókna sprężyste składają się z dwóch różnych elementów strukturalnych — elastyny i mikrofibryli glikoproteidowych. Elastyna składa się z fibrylarnych monomerów połączonych między sobą w trójwymiarową sieć zawieszoną w fazie wodnej. Monomery elastynowe zbudowane są naprzemiennie z odcinków peptydowych bogatych w glicynę, prolinę i walinę tworzących giętką beta helisę oraz z odcinków zawierających powtarzalne sekwencje Ala-Ala-Ala-Liz formujących sztywną strukturę alfa helisy — odpowiedzialnych za wytwarzanie wiązań krzyżowych zawierających w swej strukturze dezmozyny [22, 23, 25, 68]. Jedynym prekursorem elastyny jest tropoelastyna, białko o charakterze

zasadowym rozpuszczalne w roztworach soli. Częsteczka tropoelastyny składa się z 800 aminokwasów, jej masa cząsteczkowa wynosi 70 000. Białko to nie zawiera dezmozyn, jest za to kilka razy bogatsze w lizynę niż dojrzała elastyna [61, 68]. Badając pod mikroskopem elektronowym komórki aorty *in situ* oraz hodowle izolowanych miocytów stwierdza się w ich cytoplazmie obecność kulistych pęcherzyków o średnicy około 100-300 nm. Pęcherzyki te otoczone są pojedynczą błoną i zawierają materiał o identycznej gęstości elektronowej jak grudki elastyny leżące w przestrzeni międzykomórkowej [33-36, 74]. Metodami immunohistochemicznymi udowodniono, że zawierają one tropoelastynę [12, 42]. Pęcherzyki te są najliczniejsze w okolicy aparatu Golgiego i wykazują również aktywność tiaminopirofosfatazy, co pozwoliło wysunąć przypuszczenie, że pochodzą one właśnie z tego organellum. Pęcherzyki zawierające tropoelastynę widoczne są również pod błoną komórkową oraz w bezpośrednim kontakcie z kanałami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Ponieważ pęcherzyki położone pod błoną komórkową nie mają aktywności tiaminopirofosfatazy mogą one reprezentować bezpośrednią drogę wydzielania prekursora elastyny z pominięciem aparatu Golgiego. Być może również, że pewna część produkowanej przez komórkę tropoelastyny po opuszczeniu śródplazmatycznej siateczki ziarnistej przesuwa się poprzez cytoplazmę podstawową, wzdłuż mikrofilamentów i mikrotubuli w kierunku błony komórkowej, jest następnie przejściowo włączana w jej układ strukturalny (prawdopodobnie połączenie z lipidami) i stopniowo wydzielana na zewnątrz komórki w postaci małych gęstych elektronowo ziarenek. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że w większości miocytów obserwuje się agregaty ziarenek elastynopodobnego materiału przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej w miejscu występowania charakterystycznych taśm. Taśmy te są zewnętrzną powierzchnią przylegają do konglomeratów wydzielonej już elastyny dołączającej się do włókien sprężystych. Być może, że zbudowane z alfa aktyniny taśmy oprócz swej funkcji zakotwiczenia elementów strukturalnych cytoszkieletu zamocowują przestrzennie całe miocyty, co zapewnia efektywne przenoszenie skurczów komórki oraz napięcie włókien i błon sprężystych. Wydaje się, że miocyty wydzielają prekursor elastyny właśnie poprzez te okolice błony komórkowej, na których znajdują się taśmy, lub też proces wydzielania odbywa się w ich bezpośredniej bliskości. Rejony cytoplazmy przylegające do taśm są zwykle bogate w puste elektronowo pęcherzyki i kaweole, które — jak się wydaje — mogą również odgrywać pewną rolę w wydzielaniu prekursorów włókien sprężystych. Być może, że pęcherzyki takie przenoszą prekursor mikrofibrylarnego szkieletu włókna sprężystego. Prekursory mikrofibryli są prawdopodobnie wydzielane niezależnie od tropoelastyny.

Formowanie się wiązek 10 nm mikrofibryli wyprzedza w czasie pojawienie się konglomeratów amorficznej elastyny w przestrzeni okołokomórkowej [33, 62]. Prekursory mikrofibryli wydzielane są w formie gęstych elektronowo ziarenek, które układając się liniowo formują wspomniane już mikrofibryle. Mikrofibryle włókien sprężystych składają się z dwóch odmiennych białek (Mikrofibrillar proteins MFP I i MFP II) [68–70]. Oba te białka mają charakter glikoproteidowy. Główny składnik mikrofibryli MFP I białko o masie cząsteczkowej 150 000 podobne jest nieco do łańcucha pro-alfa-kolagenu i podatne na trawienie kolagenazą. Zawiera ono również 4-hydroksyprolinę i hydroksylizynę, ale jest znacznie bogatsze w reszty cukrowcowe. To podobne do kolagenu białko nie jest jednak identyczne z żadnym z opisywanych dotychczas typem kolagenu. Drugi składnik mikrofibryli włókna sprężystego MFP II — glikoproteid o masie cząsteczkowej 300 000 nie zawiera hydroksyproliny i hydroksylizyny, nie jest podatny na działanie kolagenazy, jest bogaty w cystynę, heksozy i heksozaminę. Wyrażono przypuszczenie, że glikoproteid ten ma za zadanie agregację monomerów MFP I i stabilizację przestrzenną mikrofibryli [70]. Mikrofibryle glikoproteidowe mając charakter polianionu obdarzone są dużym ujemnym ładunkiem elektrycznym, który może powodować odkładanie się na nich dodatnio naładowanych agregatów tropoelastyny wydzielonej z komórek [66]. Niewykluczone jest też formowanie się wiązań typu lizynonorleucyny pomiędzy kolagenopodobnym MFP I a elastyną [20, 70].

Dojrzewanie włókien sprężystych polega na łączeniu się ze sobą licznych agregatów tropoelastyny, zakotwiczonych na wiązaniach mikrofibryli, ich polimeryzacji i wytworzeniu homogennego rdzenia włókien sprężystych, który oblepia i maskuje obecne w nim mikrofibryle. Ten zachodzący pozakomórkowo proces uwarunkowany jest powstawaniem wiązań krzyżowych pomiędzy lizynami zawartymi w zbliżonych do siebie monomerach tropoelastyny [1, 19, 24, 68, 72]. Początkowym etapem tworzenia wiązań jest oksydacyjna dezaminacja reszt lizylowych prowadząca do powstania tzw. allilizyny — produktu o charakterze semi-aldehydu. Jest to proces katalizowany przez enzym oksydazę lizylową aktywowaną jonami miedzi [28, 52].

W następnym etapie tworzenia wiązań krzyżowych dwie reszty aldehydowe allilizyny mogą połączyć się ze sobą drogą kondensacji aldolowej lub reagować z następną grupą ϵ -aminową nie zmienionej lizyny tworząc wiązania aldoiminowe, co prowadzi do powstania trwałego wiązania — dehydrolizynonorleucyny. Produkt kondensacji aldolowej po odwodornieniu wchodzi również w reakcję z następną resztą lizylową kolejnego łańcucha polipeptydowego tworząc produkt zwany dehydro-merodesmozyną. Może on być następnie zredukowany do merodesmozyny

lub reagować z kolejną resztą wspomnianego już semialdehydu tworząc w końcu produkt, który po odszczepieniu cząsteczki wody i utlenieniu przechodzi w desmozynę.

Połączenie produktu kondensacji aldolowej z dehydrolizynonorleucyną z jednoczesnym odłączeniem cząsteczki wody i utlenieniem prowadzi do powstania isodesmozyny. Desmozyna i izodesmozyna mogą stanowić punkty węzłowe pomiędzy dwoma, trzema lub czterema łańcuchami peptydowymi. Merodesmozyna może łączyć dwa lub trzy, a lizynonorleucyna tylko dwa łańcuchy peptydowe elastyny [22, 24, 68].

WŁÓKNA KOLAGENOWE

Synteza i wydzielanie kolagenu przez miocyty naczyniowe przebiega zwykle równoległe do produkcji elastyny i białek mikrofibrylarnych [8, 36, 76]. 70% kolagenu produkowanego przez komórki zdrowej ściany naczyniowej to kolagen typu III. Miocyty mogą również produkować kolagen typu I i IV. Biosynteza kolagenu jest procesem wieloetapowym bardziej złożonym niż produkcja elastyny. Ostateczny przestrzenny kształt włókien kolagenowych zależy od sprawnego przebiegu translacji oraz kilku modyfikacji potranslacyjnych prekursorów kolagenu zależnych od obecności szeregu aktywnych enzymów katalizujących te reakcje [57]. Reakcje te przebiegają głównie na terenie siateczki ziarnistej oraz w cysternach aparatu Golgiego. Bezpośredni prekursor kolagenu prokolagen jest gromadzony w rozszerzonych kanałach siateczki śródplazmatycznej oraz w wakuolach wydzielniczych znacznie większych niż pęcherzyki niosące prekursor elastyny. W wakuolach tych jest on widoczny w formie ziarnistego, włókienkowego materiału, choć widuje się w nich również pojedyncze prążkowane fibryle, co może świadczyć, że proces polimeryzacji tropokolagenu może odbywać się również śródkomórkowo [34, 36, 37]. Wydzielony z komórki tropokolagen formuje mikrofibryle, które z kolei tworzą większe włókna dzięki dołączaniu się nowych cząstek tropokolagenu i wytwarzaniu się wiązań krzyżowych pomiędzy sąsiednimi cząsteczkami kolagenu. Punktami wyjściowymi dla formowania tych wiązań są aminokwasy, lizyna i hydroksylizyna, które są podobnie jak w elastynie utleniane do semialdehydów przez oksydazę lizylową. Następnie leżące w różnych łańcuchach semialdehydy mogą łączyć się ze sobą na drodze kondensacji aldolowej lub reagować z ϵ -aminowymi grupami reszt lizyny tworząc połączenia typu lizynonorleucyny. Semialdehydy lub aldole mogą łączyć się również z imidazolowymi grupami histydyny, co prowadzi do powstania hydroksyaldo-histydyny lub histydynomerodezmozyny zdolnych również do tworzenia wiązań krzyżowych w kolagenie [39, 57].

GLIKOZAMINOGLIKANY-PROTEOGLIKANY

Procesy syntezy glikozaminoglikanów opisywano w poszczególnych warstwach ściany naczyniowej [13, 46, 55, 79], jak i w hodowlach tkankowych i komórkowych [13, 30, 58]. Glikozaminoglikany są heteropolimerami acetylowanej i siarczanowanej glikozaminy lub galaktozaminy związanych wiązaniami glikozydowymi z kwasem glukuronowym lub iduronowym. Miocyty naczyniowe syntezują głównie siarczany dermatanu, heparanu, chondroityny A i C oraz kwas hialuronowy. Substancje te jednak nie występują w formie wolnej, a w połączeniach z białkami włóknistymi tworzą proteoglikany. Pierwszym etapem syntezy proteoglikanów, który ma miejsce w kanałach siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, jest przeniesienie cząsteczek ksylozy z urydynodwufosforanu na grupy hydroksylowe seryny lub treoniny łańcucha polipeptydowego. Reakcja ta jest katalizowana przez specyficzny enzym transferazę UDP-ksylozy. Wydłużanie się łańcuchów polisacharydowych przez dołączanie galaktoz, reszt kwasu uronowego i acetylowanej galaktozaminy odbywa się w kanałach siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, jak i gładkiej. Reakcje te są katalizowane przez swoiste transferazy aktywowane jonami manganu i magnezu. Włączanie znakowanych cukrów do syntetyzowanych przez hodowane miocyty glikozaminoglikanów jest hamowane przez puromycynę, co sugeruje, że proces polimeryzacji łańcucha polisacharydowego zachodzi na gotowym już łańcuchu polipeptydowym i stąd nie może następować jeżeli zahamowana jest synteza białkowego akceptora tworzącego rdzeń proteoglikanów. Przy jednym trzonie białkowym mogą syntezować się łańcuchy różnych glikozaminoglikanów. Od innych glikozaminoglikanów odróżnia się kwas hialuronowy. Nie ma on rdzenia białkowego ani grup siarczanowych. Tworzy długie pętle i przyłącza znaczne ilości wody. Istnieją sugestie, że synteza kwasu hialuronowego w miocytach odbywa się oddzielnie od pozostałych glikozaminoglikanów z wykorzystaniem oddzielnej puli prekursorów.

Z kanałów siateczki śródplazmatycznej proteoglikany przenoszone są do aparatu Golgiego, gdzie odbywa się proces ich „dojrzewania” polegający na enzymatycznym sulfonowaniu niektórych reszt glikozaminy, galaktozaminy i kwasu uronowego, epimeryzacji niektórych reszt D-glukuronowych obecnych w łańcuchach polisacharydowych do reszt L-iduronowych oraz na agregacji z kwasem hialuronowym.

Przyłączanie kwasu hialuronowego następuje poprzez tzw. glikoproteid wiążący. Tworzenie się większych agregatów odbywa się już pozakomórkowo. W mikroskopie elektronowym proteoglikany są widoczne w formie licznych wielokątnych ziaren kontrastujących się czerwienią rutenową. Ziarna te o średnicy 20–50 nm łączą się ze sobą 3–6 nm wypustkami tworząc trójwymiarową sieć. Ziarna proteoglikanów przylegają

często do włókien kolagenowych głównie w miejscach jasnych prążków, opłaszczają glikoproteidy błon podstawnych miocytów oraz stapiają się z elementami strukturalnymi włókien sprężystych. Glikozaminoglikany ściany naczyniowej są substancjami o dużej aktywności metabolicznej. Ich czas półtrwania jest znacznie krótszy niż białkowych składników substancji międzykomórkowej. Przypuszcza się, że te kompleksowe związki pełnią funkcje regulujące transport wielu substancji poprzez ścianę naczyniową. Szczególną rolę mają odgrywać w transporcie lipoproteidów oraz jonów wapnia [15, 16].

PROCESY SYNTEZY SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ W HODOWLI I PRZESZCZEPACH MIOCYTÓW NACZYNIOWYCH

Wiele z podanych informacji dotyczących powstawania elementów substancji międzykomórkowej uzyskano w badaniach hodowli miocytów naczyniowych. Stosowano zarówno hodowle miocytów wolno migrujących z eksplantów ścian naczyniowych [13], jak i hodowle izolowanych enzymatycznie komórek [6, 8, 33, 62, 72]. Miocyty naczyniowe już po kilku dniach przebywania w hodowli podejmują syntezę substancji międzykomórkowej bogatej w elastynę. Ilość i jakość tej substancji tworzonej *in vitro* jest różna w zależności od rodzaju i wieku użytych komórek, typu hodowli, czasu jej trwania, a przede wszystkim od składu stosowanej pożywki [49, 51, 58].

Szczególnie ważnym składnikiem pożywek dla miocytów produkujących substancję międzykomórkową jest surowica [62]. Jej rodzaj i stężenie najwyraźniej wpływają na ilość elastyny tworzonej *in vitro* przez określoną liczbę komórek. Przy niskich stężeniach surowicy 1–5% komórki tworzą tylko niewielkie ilości elastyny [62], przy dodatku surowicy rzędu 10% powstaje znaczna ilość elastyny zawierającej jednak mało pełnych wiązań krzyżowych [72]. Produkcja kolagenu i proteoglikanów przez miocyty hodowane w pożywkach ubogich w surowicę też nie jest wysoka. Dopiero dodanie 20% płodowej surowicy cielęcej zapewnia szybkie powstawanie dojrzałych włókien sprężystych i kolagenowych w hodowli miocytów aortalnych [33]. Wykazano również, że pewne zmiany w składzie pożywki podstawowej mogą mieć wpływ na ilość i jakość elementów substancji międzykomórkowej. Dodanie do pożywki kwasu askorbinowego (aktywator hydroksylazy prolilowej) hamuje w znacznym stopniu wydzielanie elastyny przez miocyty przyspieszając jednocześnie syntezę kolagenu i mikrofibryli glikoproteidowych [76]. Zahamowanie syntezy elastyny uzyskać można po podaniu do pożywki koloidalnej zawiesiny dwutlenku toru [36], a zahamowanie powstawania wiązań krzyżowych w wydzielonej już elastynie po podaniu związków

chelatujących wiążących jony miedzi będących aktywatorami oksydazy lizylowej [76]. Dodanie związków wiążących jony żelaza potrzebnych do aktywacji hydroksylazy prolilowej, dodanie analogów proliny lub histydynolu hamuje wybiórczo tworzenie się włókien kolagenowych w hodowli bez zmniejszenia syntezy elastyny [61, 70, 76].

Elastyna powstająca w takich warunkach nie zawiera jednak hydroksyproliny, co może świadczyć, że cząsteczki prekursorów kolagenu i elastyny korzystają z tego samego enzymu (hydroksylaza prolilowa) obecnego w siateczce śródplazmatycznej miocytów odpowiedzialnego za posttranslacyjną modyfikację obu białek [76]. Procesy tworzenia elementów substancji międzykomórkowej *de novo* można również obserwować po heterotopowym przeszczepieniu izolowanych miocytów naczyniowych w układzie izo- lub allogenicznym. Taki model doświadczalny wydaje się być bardziej zbliżony do warunków naturalnych. Komórki po przeszczepieniu np. do mięśnia szkieletowego podejmują szybką syntezę wszystkich elementów substancji międzykomórkowej. W miejscu wstrzyknięcia zawiesiny komórek powstaje charakterystyczna tkanka przypominająca swym wyglądem ścianę aorty płodowej. Układ ten pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów elastogenezy oraz zmian morfologicznych w przeszczepionych miocytach [34, 36, 37]. W przeszczepach obserwuje się produkcję większej ilości elastyny i innych elementów substancji międzykomórkowej niż w hodowlach komórkowych w porównywalnych okresach czasowych. Widocznie taka „hodowla *in vivo*” zapewnia przeszczepionym miocytom optymalne stężenia substancji odżywczych oraz czynników humoralnych mogących mieć wpływ na różnicowanie się, podziały i zdolności wydzielnicze komórek naczyniowych. Układ ten może być również przydatny do badań nad wpływem leków, hormonów, substancji toksycznych, związków miążdżycorodnych w układzie pozwalającym na wyeliminowanie czynników hemodynamicznych, które mają wyraźny wpływ na metabolizm miocytów w ścianie naczyniowej.

PROCES MIAŻDŻYCOWY A ZABURZENIA W PRODUKCJI SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ ŚCIANY NACZYNIOWEJ

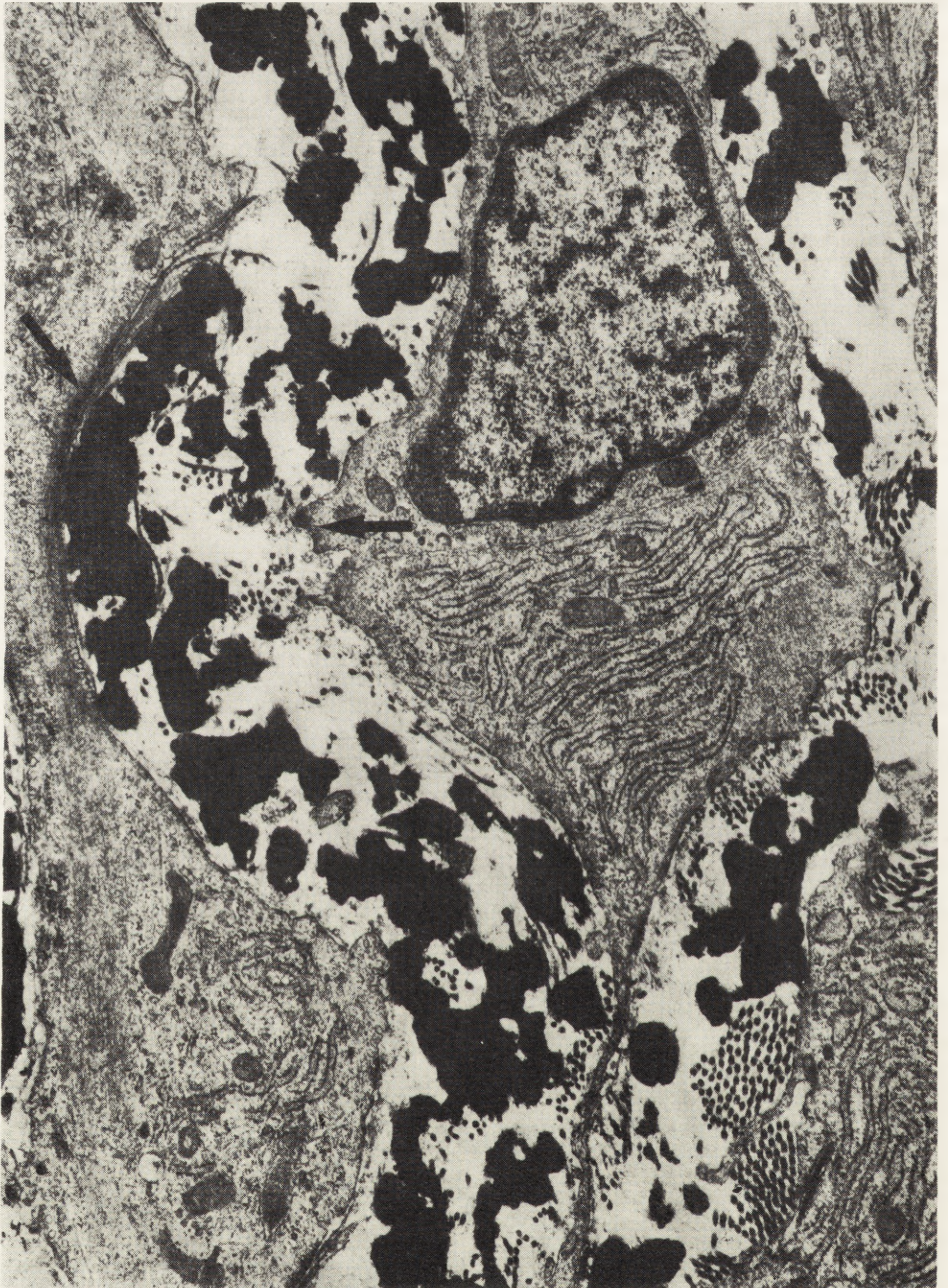
Ilościowe i jakościowe zaburzenia produkcji substancji międzykomórkowej przez miocyty naczyniowe są ważnym ogniwem w łańcuchu zmian patogenetycznych prowadzących do powstania płytek miążdżycowych [16, 21, 38, 63, 65].

Jednym z najistotniejszych i najwcześniej dostrzegalnych zmian w procesie formowania się płytek miążdżycowych jest nadmierna produkcja zmienionej strukturalnie elastyny [60, 68]. Nowa elastyna wytwarzana przez migrujące do błony wewnętrznej miocyty zawiera więcej

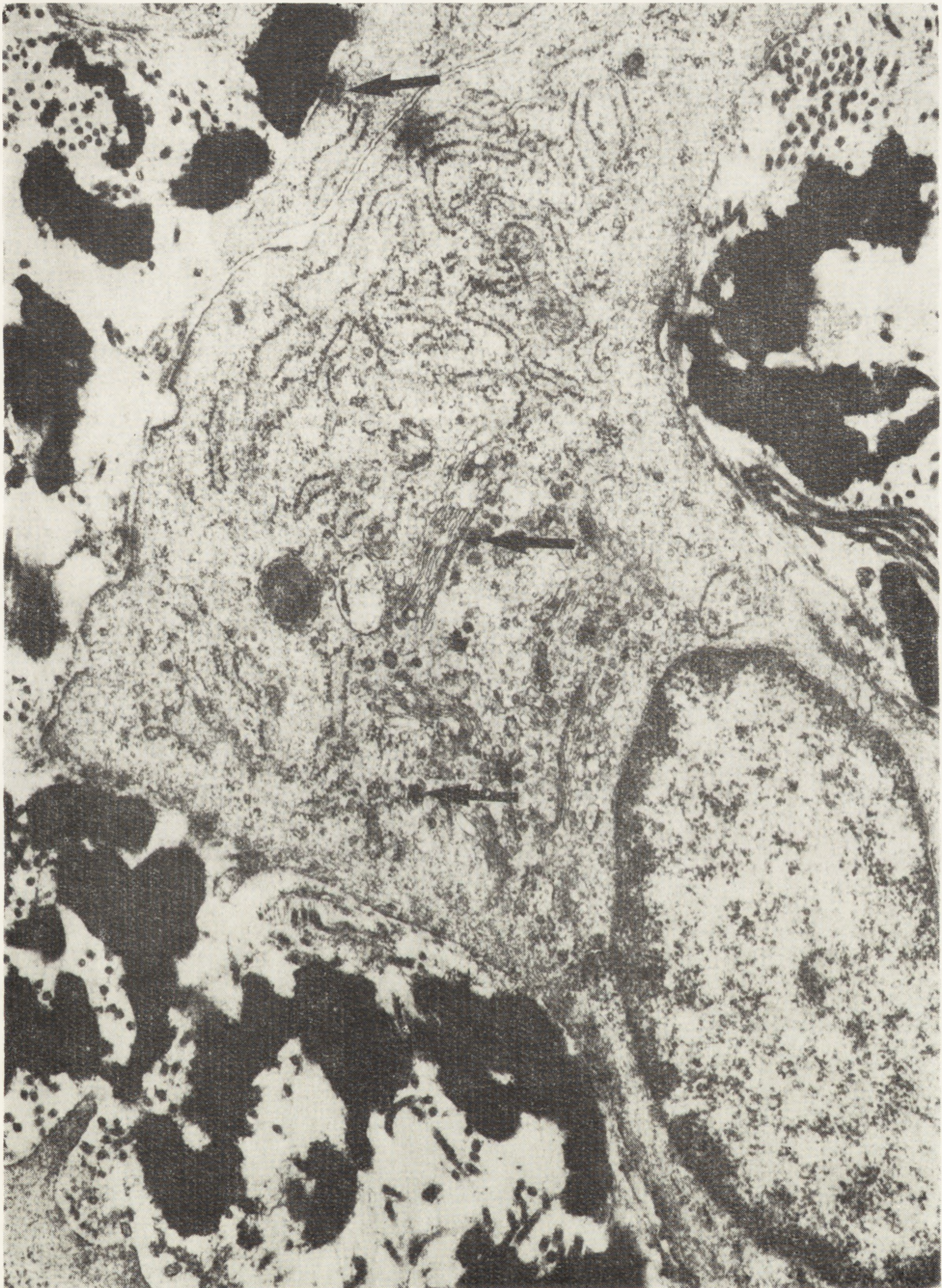
aminokwasów polarnych, takich jak: kwas glutaminowy i asparaginowy, arginina, lizyna, oraz znacznie mniej wiązań krzyżowych, co powoduje zmiany przestrzenne w trzecio- i czwartorzędowej strukturze tego białka, wpływając na zmniejszenie jego elastyczności i wytrzymałości oraz zwiększa jego podatność na działanie elastazy, a nawet innych nieswoistych proteaz [41]. Taka niepełnowartościowa elastyna zdolna jest do wiązania znacznych ilości substancji lipidowych. Około 1/3 lipidów obecnych w blaszkach miażdżycowych związana jest z elastyną [43]. Cholesterol i jego estry przenoszone przez infiltrujące ścianę naczyniową lipoproteidy VLDL i LDL są niemal wybiórczo wiązane z taką elastyną. Podstawą zjawiska łączenia się elastyny z lipidami jest prawdopodobnie łatwiejsze wnikanie lipidów pomiędzy nieusieciowane wiązaniem krzyżowymi łańcuchy tego białka i łączenie się z ich hydrofobowymi okolicami. Odsłanianie się tych hydrofobowych rejonów mogących przyłączać lipidy nasila się przy nadmiernym rozciąganiu włókien sprężystych, jakie ma miejsce w nadciśnieniu tętniczym [68]. Wybiórcze wiązanie lipidów z elastyną wyizolowaną z płytek miażdżycowych zachodzi również *in vitro*. Elastyna taka przyłącza kilkadziesiąt razy więcej cholesterolu i jego estrów niż elastyna ze zdrowych odcinków naczynia w czasie inkubacji z surowicą pobraną od pacjentów z hiperlipidemią. Patologicznie zmieniona elastyna płytek miażdżycowych przyłącza wybiórczo lipidy nawet wtedy, gdy inkubowana jest z surowicą zdrowych pacjentów, u których poziom lipoproteidów jest prawidłowy lub obniżony [68]. Obserwacje te sugerują, że nawet farmakologiczne obniżenie lipemii nie jest w stanie zapobiec dalszemu rozwojowi zmian miażdżycowych, jeżeli wcześniej nastąpiła już zmiana metabolizmu niektórych miocytów naczyniowych i produkują one zmienioną elastynę. Istnieją sugestie, że miocyty naczyniowe mogą produkować zmienioną elastynę jeszcze zanim zostaną pobudzone do niekontrolowanych podziałów i migracji [79]. Odpowiednio łagodna metoda izolacji elastyny i następne sączenie molekularne pozwala bowiem na wyizolowanie ze zdrowych aort dwóch frakcji, elastyny A i B. Frakcja A o większej masie cząsteczkowej przypomina swym składem aminokwasowym elastynę izolowaną z płytek miażdżycowych. Elastyna frakcji A występuje w śladowych ilościach w tętnicach młodych osobników, jej ilość rośnie jednak z wiekiem, ale w niezmienionych morfologicznie odcinkach naczynia nigdy nie osiąga wartości jakie obserwuje się w płytkach miażdżycowych. Pomimo podobieństw składu aminokwasowego istnieje jednak pewna różnica w konformacji elastyny frakcji A izolowanej ze zdrowych odcinków naczynia a konformacją elastyny odpowiadającej frakcji ze zmian miażdżycowych. Ta ostatnia elastyna przyłącza bowiem znacznie więcej lipidów w czasie inkubacji *in vitro*.



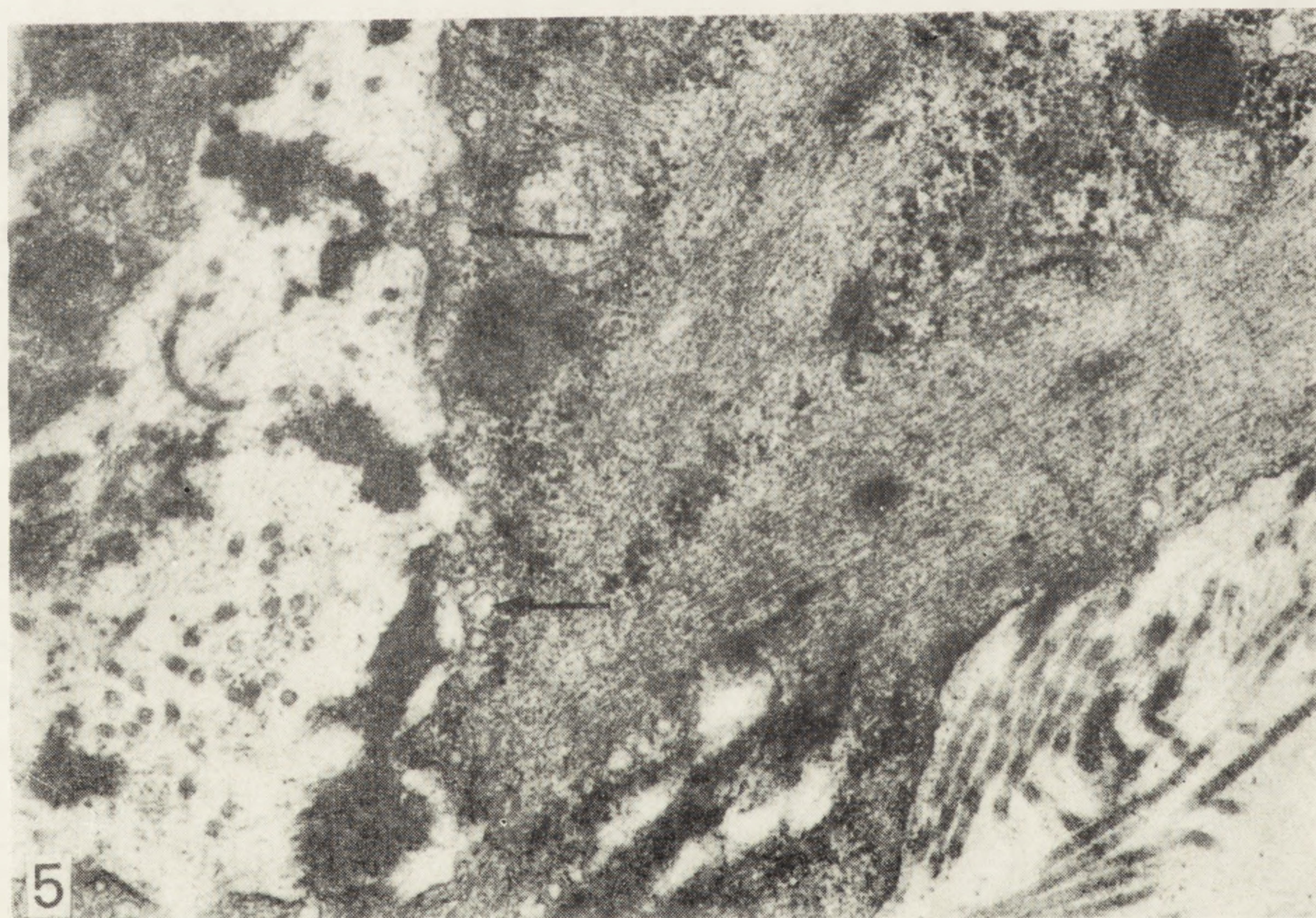
Ryc. 1. Fragment błony środkowej aorty dorosłego szczura. W cytoplazmie mio-cyta bogatej w miofilamenty aktynowe widoczne liczne ciała ciemne i taśmy zlokalizowane na błonie (strzałki). Widoczne ściśle przyleganie taśm do błon sprężystych leżących w przestrzeni międzykomórkowej. Materiał utrzw. w aldehydzie glutarowym, zatapiany w eponie i kontrastowany octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Pow. 32 000 ×



Ryc. 2. Fragment błony środkowej aorty noworodka szczura. Widoczne miocyty otoczone produkowaną przez siebie substancją międzykomórkową zawierającą liczne włókna kolagenowe, mikrofibryle glikoproteidowe i nowo powstające błony sprężyste. Strzałkami zaznaczono gęste elektronowo taśmy błony komórkowej przylegające do nowo powstających mikrofibryli i włókien sprężystych. Materiał utrwalony w aldehydzie glutarowym, zatopiony w środowisku Spurra i kontrastowany octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. $\times 20\ 000$

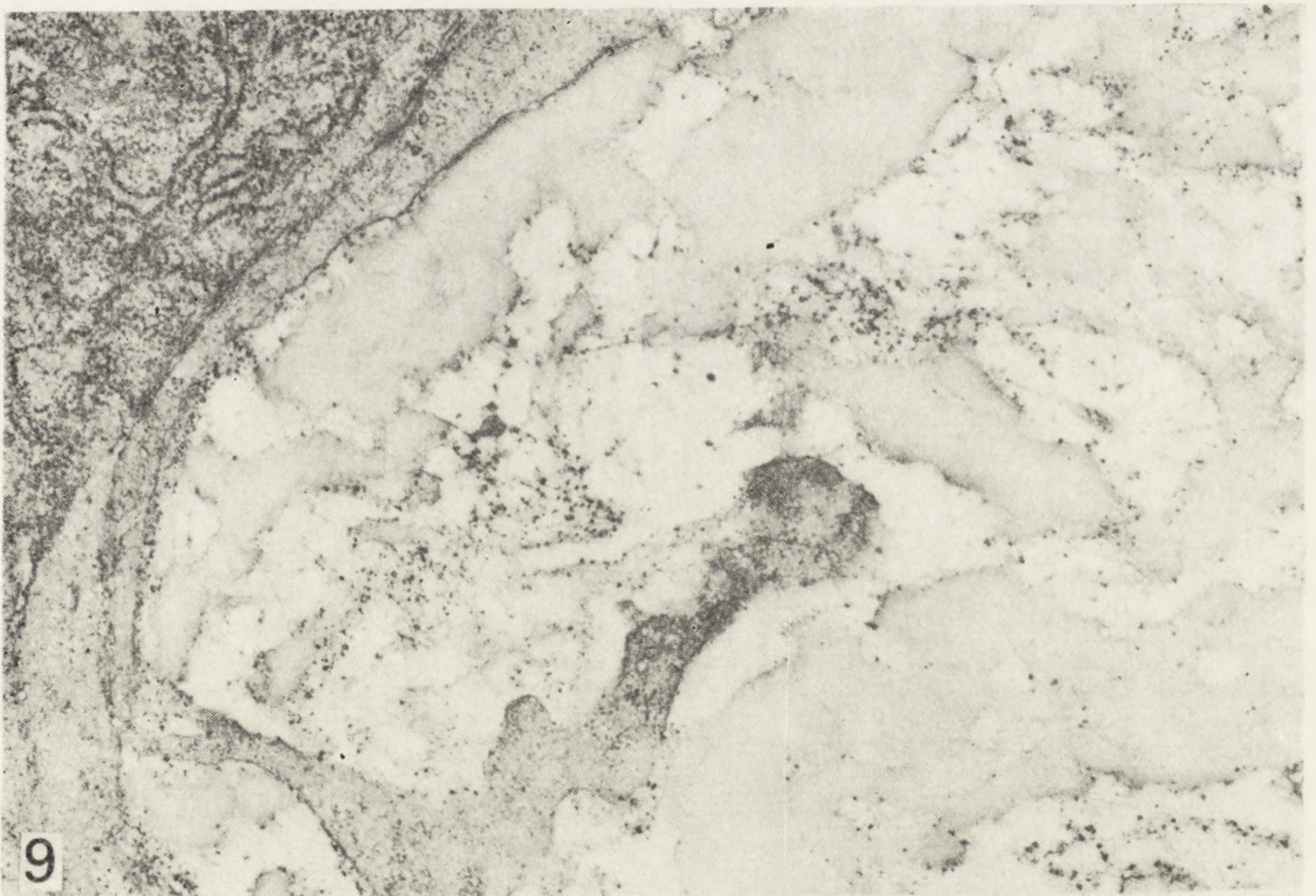
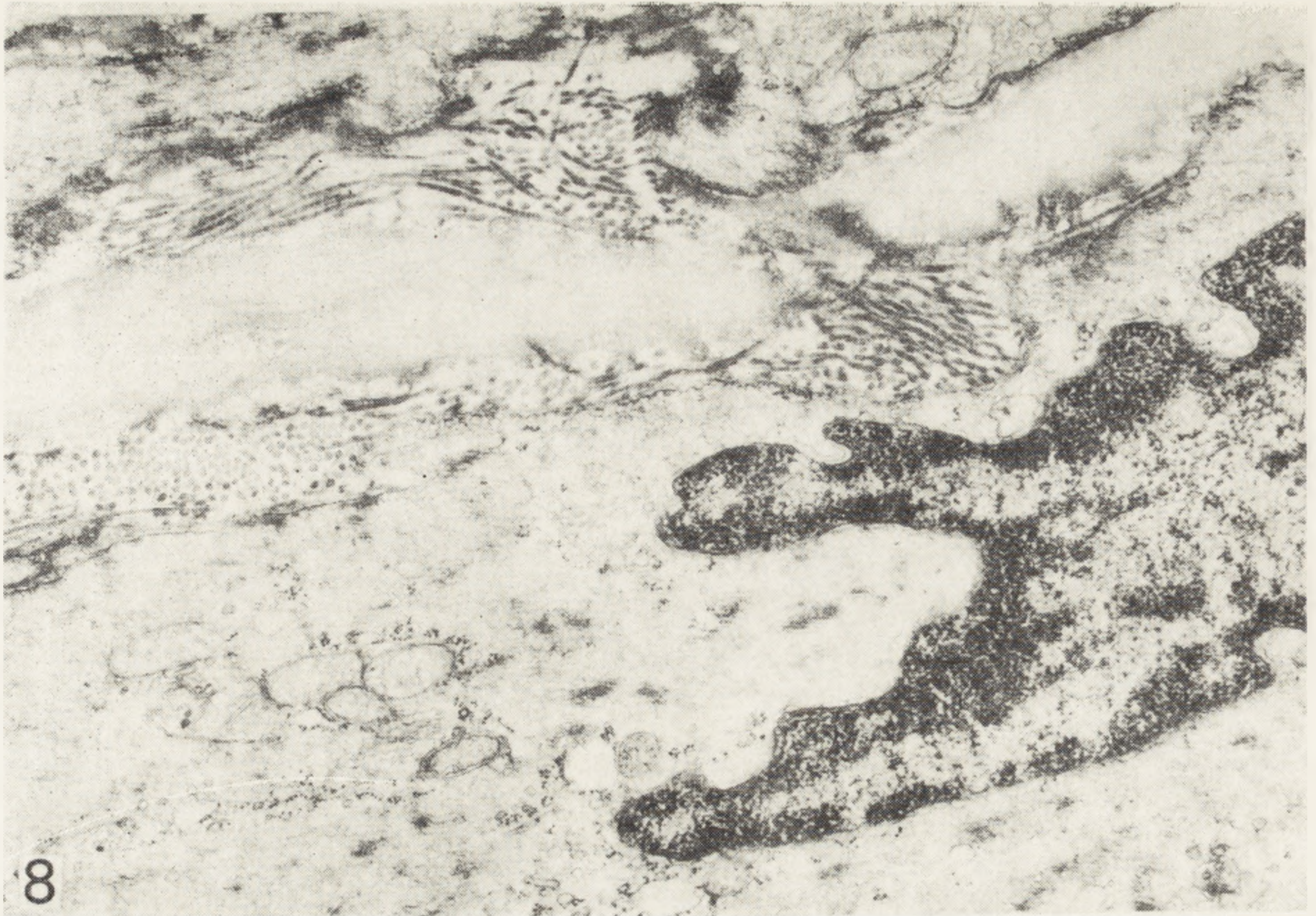


Ryc. 3. Miocyt w błonie środkowej noworodka szczura. Widoczne dobrze rozbudowana siateczka śródplazmatyczna ziarnista oraz aparat Golgiego. W okolicy aparatu Golgiego widoczne zaznaczone strzałkami małe pęcherzyki zawierające gęsty elektronowo prekursor elastyny. Na błonie komórkowej widoczne zgrubienia odpowiadające taśmom sąsiadujące z nowo powstającymi włóknami sprężystymi. Materiał przygotowany jak na ryc. 2. $\times 32\ 000$



Ryc. 4. Fragment bogatej w organelle cytoplazmy z błony środkowej 5-dniowego szczura. W okolicy aparatu Golgiego widoczne liczne pęcherzyki zawierające gęsty elektronowo prekursor elastyny (cienkie strzałki). Pod błoną komórkową widoczne liczne kaweole i puste elektronowo pęcherzyki. Są one najliczniejsze w rejonach przylegających do leżących pozakomórkowo wiązek mikrofibryli glikoproteidowych formujących szkielet dla włókien sprężystych (strzałki grube). Materiał przygotowany jak na ryc. 2 \times 18 000

Ryc. 5. Fragment cytoplazmy miocyta wyizolowanego z aorty 5-dniowego szczura po przeszczepieniu do mięśnia szkieletowego w układzie allogenicznym. Widoczne liczne miofilamenty aktynowe oraz przeziernie elektronowo pęcherzyki leżące pod błoną komórkową i otwierające się do przestrzeni międzykomórkowej zawierającej nowo powstającą substancję międzykomórkową. Materiał przygotowany jak



Ryc. 8. Fragment błony środkowej aorty dorosłego szczura. Widoczne błony sprężyste oraz liczne wiązki włókien kolagenowych leżące w przestrzeni międzykomórkowej. W cytoplazmie miocyta widoczne liczne ciała ciemne. Materiał utrwalony w aldehydzie glutarowym, zatopiony w Vestopalu i kontrastowany octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. $\times 20\ 000$

Ryc. 9. Fragment błony środkowej aorty dorosłego szczura. Widoczne liczne ziarna proteoglikanów przylegających do błon sprężystych i mikrofibryli. Materiał utrwalony w aldehydzie glutarowym, zatopiony w Vestopalu i kontrastowany octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. $\times 14\ 000$

Być może, że różnica w wiązaniu lipidów przez frakcje elastyny o podobnym składzie aminokwasowym wynika z faktu, że elastyna frakcji A z płytek miażdżycowych wiąże więcej wapnia niż elastyna tej samej frakcji ze zdrowych odcinków naczynia [75]. Sposób wiązania wapnia przez elastynę nie jest do końca wyjaśniony. Molinari-Tossati i wsp. [48] sugerują, że jony wapnia wiążą się głównie z okolicami hydrofilnymi elastyny, gdzie współzawodniczą o zjonizowane grupy karboksylowe aminokwasów polarnych z dodatnio naładowanymi grupami aminowymi. Przy lokalnym wzroście pH stężenie wolnych grup aminowych zmniejsza się i jony Ca^{++} łatwiej przyłączają się do elastyny. Wapń może wiązać się z grupami sulfhydrylowymi cysteiny zawartej w glikoproteidach mikrofibryli włókien sprężystych otoczonych przez elastynę. Urry [77] uważa, że ilość wapnia związanego przez elastynę przewyższa tę, która mogłaby się przyłączyć tylko do wolnych grup karboksylowych lub sulfhydrylowych i sugeruje, że kationy wapnia mogą być wyłapywane i „więzione” w załamanych pod kątem 180° odcinkach beta helisy elastyny.

Niezależnie od niejasnego jeszcze sposobu wiązania się jonów wapnia z różnymi frakcjami elastyny wydaje się, że stopień związania wapnia przez to białko wydaje się być jednym z najistotniejszych elementów modulujących wiązanie lipidów przez elastynę. Kramsch i wsp. [44] udowodnili, że środki hamujące odkładanie się wapnia w ścianach naczyń hamują powstawanie płytek miażdżycowych u małych zwierząt żywionych dietą bogatą w cholesterol. U zwierząt tych powstają tylko odwracalne nacieki lipofagów w niektórych odcinkach drzewa naczyniowego. Nie obserwuje się natomiast zwiększonej migracji i podziałów miocytów naczyń ani też wzmożonej produkcji elastyny i innych elementów substancji międzykomórkowej, które towarzyszą powstawaniu płytek miażdżycowych. Badacze ci sugerują również, że obniżenie stężenia wapnia na terenie ściany naczyniowej może mieć bezpośredni wpływ na metabolizm miocytów naczyń i zatrzymanie procesów komórkowych odpowiedzialnych za inicjację procesu miażdżycowego [44].

W miarę postępowania procesu miażdżycowego obserwuje się stopniowy spadek ilości elastyny w zmienionym chorobowo odcinku naczynia wynikający prawdopodobnie z przeważającej degradacji enzymatycznej zmienionego strukturalnie i opłaszczonego lipidami białka [4]. Jednocześnie ze wzmożonym rozpadem włókien sprężystych nasila się synteza włókien kolagenowych. Jest to prawdopodobnie mechanizm kompensujący utratę wytrzymałości objętych zmianami odcinków naczynia. Miocyty naczyniowe obecne w zmienionym miażdżycowo naczyniu produkują głównie kolagen typu I [5, 8], podczas gdy w nie zmienionych odcinkach naczynia przeważa produkcja kolagenu typu III [63]. Kolagen

powstający w płytkach miażdżycowych może również przyłączać pewne ilości lipidów prawdopodobnie ze względu na gorsze usieciowanie wiązaniami krzyżowymi, ale nie odgrywa on tak znacznej roli w pozakomórkowym spichrzaniu lipidów jak elastyna czy glikozaminoglikany [21]. Ilość glikozaminoglikanów syntetyzowanych przez miocyty znacznie wzrasta po mechanicznym uszkodzeniu ściany naczyniowej oraz we wczesnym stadium formowania się zmian miażdżycowych [40, 50]. Mogą one przyłączać jony wapnia, fibrynogen i znaczne ilości lipoproteidów (VLDL i LDL) [15, 16]. Jest to uważane za rodzaj mechanizmu obronnego chroniącego komórki przed nadmiernym włączaniem lipidów. Możliwość takiego działania glikozaminoglikanów jako czynników chroniących miocyty obserwowano również w hodowlach tkankowych. Dodanie do pożywki ekstraktu aorty cielej bogatego w glikozaminoglikany powodowało efekt oczyszczania hodowanych miocytów kurczęcia z lipidów uprzednio pobranych z pożywki zawierającej cholesterol [11]. Znaczne zmniejszenie włączania lipidów do komórek naczyniowych w hodowli obserwowano po dodaniu do pożywki zawierającej cholesterol chondroitynosiarczanu A [58]. Dodanie do hodowli komórek aorty kurczęcia chondroitynosiarczanu A i C hamowało włączanie lipidów egzogennych zawartych w pożywce, ale zwiększało jednocześnie o 10–20% syntezę endogenego cholesterolu. Podanie heparyny również zmniejszało włączanie lipidów z pożywki zawierającej surowicę hiperlipemiczną (wg [58]).

Brown i Goldstein [7] uważają, że glikozaminoglikany obecne w ścianie naczyniowej jako polianiony działają konkurencyjnie w stosunku do miejsc receptorowych na błonach komórkowych miocytów mogących wiązać lipoproteidy. Nagromadzenie się kompleksów lipoproteidowo-glikozaminoglikanowych stymuluje jednak aktywność fagocytarną miocytów, co przy stopniowym wyczerpywaniu się możliwości strawienia sfagocytowanego materiału prowadzi do przekształcenia się niektórych miocytów w komórki piankowe [56]. Hodowle takich komórek wykazały, że są to zmiany odwracalne. Po przeniesieniu komórek obciążonych lipidami do normalnej pożywki przekształcają się one na powrót w typowe miocyty [58]. Jeżeli jednak kontakt miocytów z lipidami trwa długo, to zarówno w warunkach *in vivo*, jak i w hodowli dochodzi do degeneracji większości komórek [9]. Sugeruje się jednak, że nadmierne wcielanie lipidów może być jednym z możliwych czynników stymulujących podziały mitotyczne miocytów [63]. Mechanizm mitogennego działania spichrzanych przez komórkę substancji nie jest jasny. Być może, że przy wyczerpaniu niektórych enzymów lizosomalnych, jak to ma miejsce w miażdżycy, lub ich braku we wrodzonych spichrzeniowych dochodzi do zwiększenia aktywności pozostałych enzymów lizosomalnych, które mogą odgrywać pewną rolę w pobudzaniu komórek do podziałów [56, 65].

BADANIE PROLIFERACJI MIOCYTÓW NACZYNIOWYCH W HODOWLI

Dokładniejsze zależności procesów proliferacyjnych miocytów naczyniowych wykazano dopiero po zastosowaniu techniki hodowli tkankowych i komórkowych. Stosując różne typy hodowli komórek naczyniowych uzyskiwanych z eksplantów lub metodą enzymatyczną wykazano, że są one zdolne do proliferacji *in vitro*. Największe zdolności proliferacyjne wykazywały komórki pobierane z naczyń zarodkowych lub naczyń młodych osobników. Komórki pobierane z naczyń dorosłych zwierząt i ludzi cechowały się różnym, często niepowtarzalnym stopniem proliferacji *in vitro* [58]. Miocyty naczyniowe są zdolne do proliferacji w pożywkach wzbogaconych surowicą [62]. Dodanie różnych surowic w zmiennych stężeniach w sposób istotny wpływało na stopień proliferacji nawet zarodkowych miocytów naczyniowych w hodowli [58]. Wyizolowano wiele czynników humoralnych, które stumulowały podziały miocytów hodowanych w pożywkach nie zawierających surowicy. Wśród substancji wyizolowanych z różnych surowic najsilniejszy wpływ mitogenny na hodowane miocyty miały transferyna, somatomedyny A i C, insulina, hydrokortyzon, hormon wzrostu, insulinopodobny czynnik wzrostowy produkowany przez podwzgórze oraz trombina [45, 55, 78]. Somatomedyna A dodawana do pożywki wspólnie z normalnie nie pobudzającym podziału miocytów nabłonkowym czynnikiem wzrostowym EGF jeszcze bardziej przyspieszała podziały tych komórek. Somatomedyna A i insulina działały razem znacznie silniej na procesy proliferacyjne miocytów niż obie te substancje oddzielnie [78]. Wykazano ponadto, że poliaminy obecne w wysokim stężeniu w surowicy pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek zwiększały znacznie liczbę miocytów w hodowli. Spermina dodana do hodowli miocytów w stężeniu 100 μM zwiększała dwukrotnie liczbę komórek po 16 dniach trwania hodowli w porównaniu z kontrolą [3]. Substancje te nie są mitogenami, ale wpływają na skrócenie czasu fazy S.

Ross i wsp. [27, 67] wykazali, że jednak najsilniejszym ze znanych obecnie i choć nie specyficznym czynnikiem mitogennym dla miocytów naczyniowych jest polipeptyd uwalniany podczas agregacji i rozpadu płytek krwi. Czynnikiem ten zwany PDGF (skrót angielskiej nazwy Platelet Derived Growth Factor) jest produkowany bądź wydzielany przez przysadkę mózgową, a po wychwyceniu go przez płytki krwi jest przeprowadzany w stan aktywny. Jak już wspomniano, większość doświadczeń dotyczących potencjalnego wpływu różnych substancji na czynność mitogenną miocytów została przeprowadzona w hodowlach komórkowych *in vitro*. Przeprowadzając tego typu doświadczenia na komórkach wieloczynnościowych, jakimi są miocyty naczyniowe, pamiętać należy o szeregu

ograniczeń, aby wyniki doświadczeń *in vitro* można było odnieść do sytuacji w ścianie naczyniowej.

Davies i Ross [14] wykazali, że hodowla miocytów, na której zamierza się testować określone mitogenne substancje, nie może być od początku zbyt gęsta. W gęstej hodowli już po kilkunastu godzinach jej trwania dochodzi do ścisłego przylegania miocytów do siebie i hodowla przestaje rosnać pomimo obecności wysokiego stężenia surowicy lub wolnych mitogenów w pożywce. Wytwarzanie dużej liczby połączeń pomiędzy ciasno przylegającymi do siebie miocytami angażuje znaczną powierzchnię ich błon komórkowych zmniejszając powierzchnię zdolną do endocytozy czynników mitogennych obecnych w pożywce. W takich pierwotnie gęstych hodowlach komórki stykają się ze sobą wcześniej zanim rozpoczną produkcję substancji międzykomórkowej. W hodowlach o pierwotnie niewielkiej liczbie komórek miocyty rozpoczynają produkcję substancji międzykomórkowej, której obecność sprawia, że komórki stykają się ze sobą znacznie mniejszymi powierzchniami, a to nie hamuje endocytozy czynników mitogennych i zdolności komórek do podziałów. Po kilku czy kilkunastu dniach powstaje hodowla wielopokładowa. Miocyty naczyniowe w takich hodowlach nie wykazują zjawiska zahamowania kontaktowego ruchu i mitoz czym przypominają inne elastoplasty [33, 36], a różnią się od fibroblastów wykazujących to zjawisko już po ograniczonym kontakcie wypustek sąsiednich komórek. Badania *in vitro* nad mitogenami miocytów mają duże znaczenie poznawcze, ale ścisłe odniesienie mitogennego działania określonych substancji z warunków *in vitro* do sytuacji w obrębie ściany naczyniowej *in vivo* wydaje się niemożliwe. W hodowli bowiem na podany mitogen reaguje wiele uwolnionych z substancji międzykomórkowej komórek. Sam fakt uwolnienia miocytów od substancji międzykomórkowej wydaje się być czynnikiem mitogennym. W ścianie naczyniowej nawet przy wysokim stężeniu substancji mitogennych w surowicy i płynie tkankowym nasiąkającym ścianę naczyniową odpowiedź proliferacyjna następuje tylko w niektórych odcinkach drzewa naczyniowego. Powstała więc koncepcja, że w określonym momencie tylko niektóre miocyty są zdolne odpowiedzieć na mitogen.

Benditt i Benditt [4] sugerują, że wszystkie miocyty obecne w pojedynczej płytce ateromatycznej pochodzą z klonalnego rozrostu komórki macierzystej pobudzonej do niekontrolowanych podziałów mitotycznych. Komórki te bowiem zawierały ten sam markerowy izoenzym dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (G-6-PD). Pearson [53], który badał ten sam problem, wykazał że 90% włóknistych płytek ateromatycznych obecnych w aortach czarnoskórych kobiet zawierało komórki posiadające ten sam izoenzym G-6-PD. Możliwość monoklonalnego rozrostu niektó-

rych miocytów naczyniowych może według Bendittów i Pearsona świadczyć o pewnej analogii pomiędzy procesem miażdżycowym a nowotworowym.

Martin i Sprague [47] uważają, że monoklonalny rozrost niektórych miocytów naczyniowych prowadzący do powstania płytki miażdżycowej może wynikać z równoczesnego włączenia się w cykl mitotyczny komórek niezróżnicowanych, które uprzednio nie przeszły tej samej liczby podziałów co komórki sąsiednie. Autorzy ci wykazali, że różnice w liczbie komórek niezróżnicowanych występują nawet pomiędzy odcinkami tego samego naczynia. Hodowane przez nich miocyty aorty brzusznej dorosłych małp przechodziły przez znacznie mniej podziałów niż miocyty aorty piersiowej pobrane od tych samych osobników. Martin i Sprague [47] uważają, że różna liczba komórek zdolnych jeszcze do podziałów, gotowych zareagować na mitogen lub brak czynnika hamującego mitozę w określonych segmentach drzewa naczyniowego może tłumaczyć różnice w częstości i nasileniu występowania płytek miażdżycowych.

Podsumowując przedstawione fakty dotyczące budowy i funkcji miocytów naczyniowych należy podkreślić ich odrębność od innych komórek mięśni gładkich. Chociaż miocyty naczyniowe spełniają kryteria morfologiczne, które pozwalają zaliczyć je do komórek tkanki mięśniowej, to wiele z ich funkcji wskazuje na ich podobieństwo do komórek tkanki łącznej. Dlatego w literaturze spotyka się różne nazwy tych komórek: miofibroblasty, zmodyfikowane komórki mięśni gładkich, czy wieloczynnościowe komórki mezenchymy. Trudno rozstrzygnąć dziś problemy nomenklaturowe. Wydaje się jednak, że komórki te należy traktować jako przykład przystosowania się do różnorodnych funkcji, jakie muszą one spełniać w ścianie naczyniowej.

LITERATURA

- [1] ABRAHAM P. A., SMITH D. W., CARNES W. H., Biosynthesis of lysine-derived elastin crosslinks in aortic cell culture, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **67**: 723-727, 1975.
- [2] ABRAHAM P. A., HART M. L., WINGLE A. R., CADNES W. H., The biosynthesis of elastin by aortic medial cell culture, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 397-412, 1977.
- [3] BAGDADE J., CAMPBELL R., GRETTIE D., BARTOS D., BARTOS F., Effects of polyamines on human arterial smooth muscle cells in tissue culture, *Adv. in Polyamine Res.*, vol. 2 edited by Campbell et al., Raven Press. New York 1978, 345-349.
- [4] BENDITT E. P., BENDITT J. M., Evidence for the monoclonal origin of human atherosclerotic plaques, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 1753-1756, 1973.

- [5] BIORKERUD S. B., EKROTH R., The growth of human atherosclerotic and non-atherosclerotic aortic intima and media in vitro, *Artery*, **8**: 329-335, 1980.
- [6] BLAU C., Elastin biosynthesis and cross-link formation in rabbit aortic smooth muscle cell cultures, *Biochemistry*, **20**: 2614-2618, 1981.
- [7] BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., Receptor mediated control of cholesterol metabolism, *Science*, **191**: 150-154, 1976.
- [8] BURKE J. M., ROSS R., Collagen synthesis by monkey arterial smooth muscle cells during proliferation and quiescence in culture, *Exp. Cell. Res.*, **107**: 387-395, 1977.
- [9] CHOI B. H., FLORENTIN R., LEEN S. K., Damaging effect of hypercholesterolemia swine serum in tissue culture, *Fed. Proc.*, **27**: 575-586, 1968.
- [10] CLOWES A. W., KARNOWSKY M. J., Supresion by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries, *Nature*, **255**: 625-626, 1977.
- [11] CURTIS R. G., GALIVN M. P., Application of tissue culture technique to screen compounds for the prevention of lipid deposition in aorta cells, *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **41**: 687-694, 1963.
- [12] DAMIANO V., TSANG A., KUCICH U., WEINBAUM G., ROSENBLOOM J., Immuno electron microscopic studies on cells synthesizing elastin, *Conn. Tiss. Res.*, **8**: 185-188, 1981.
- [13] DAUD S. A., FRITZ K. E., SINGH J., AUGUSTYN J. M., JARMOLYCH J., Production of mucopolisaccharides, collagen and elastic tissue by aortic medial explants, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **43**: 281-298, 1974.
- [14] DAVIES P. F., ROSS R., Growth-mediated, density-dependent inhibition of endocytosis in cultured arterial smooth muscle cells, *Exp. Cell Res.*, **129**: 329-336, 1980.
- [15] DAVIGNON J., The lipid hypothesis, *Arch. Surg.*, **113**: 28-34, 1978.
- [16] DOERR W., Arteriosclerosis without end., Principles of pathogenesis and attempt at a nosologic classification, *Virchows Arch. A.*, **380**: 91-106, 1978.
- [17] FERRIS B., SALCEDO L. L., COOK V., JOHNSON L., FOSTER J. A., FRANZBLAU C., The synthesis of connective tissue protein in smooth muscle cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, **418**: 93-103, 1976.
- [18] FRANK E. D., WARREN L., Aortic smooth muscle cells contain vimentin instead of desmin, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3020-3024, 1981.
- [19] FRANZBLAU C., FOSTER J. A., FARRIS B., Role of crosslinking in fiber formation, *Adv. Exp. Med Biol.*, **79**: 313-327, 1977.
- [20] GALLOP P. M., PAZ M. A., Posttranslational protein modifications with special attention to collagen and elastin, *Physiol. Rev.*, **55**: 418-486, 1975.
- [21] GLAGOV S., Morphology of collagen and elastin fibres in atherosclerotic lesions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **82**: 767-773, 1975.
- [22] GOSLINE J. M., The physical properties of elastic tissue, *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.*, **7**: 211-249, 1976.
- [23] GOTTEL L., Recent observations on the structure and composition of elastin, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 105-117, 1977.
- [24] GRAY W. R., Some kinetic aspects of crosslinks biosynthesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 285-290, 1977.
- [25] GRAY W. R., Molecular model for elastin, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 291-298, 1977.
- [26] HARKER L. A., ROSS R., SLICHTER S. J., SCOTT C. R., Homocysteine-induced arteriosclerosis, *J. Clin. Investig.*, **58**: 731-741, 1976.

- [27] HARKER L. A., ROSS R., GLOMSET J., Role of the platelet in atherosclerosis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **275**: 321–329, 1976.
- [28] HARRIS E. D., RAYTON J. K., DE GROT J. E., A critical role for copper in aortic elastin structure and synthesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 543–559, 1977.
- [29] HAUST M. D., MORE R. H., MOVAT H. Z., Role of smooth muscle cells in the fibrinogenesis of arteriosclerosis, *Am. J. Pathol.*, **37**: 377–389, 1960.
- [30] HINEK A., Badania nad morfologią i funkcją komórek naczyniowych, *Post. Biol. Komórki*, **1**: 277–298, 1974.
- [31] HINEK A., KONWINSKI M., Ultrastructure of cells isolated from aortas of newborn and adult rabbits, *Pol. Med. Scienc. Hist. Bull.*, **15**: 9–22, 1975.
- [32] HINEK A., ROSNOWSKI A., Comparison of morphology of isolated cells obtained from aortas of normal and cholesterol — fed rabbits, *Paroi Arteriel — Arterial Wall.*, **3**: 17–30, 1975.
- [33] HINEK A., THYBERG J., Electron microscopic observations on the formation of elastic fibers in primary cultures of aortic smooth muscle cells, *J. Ultrastruct. Res.*, **60**: 12–20, 1977.
- [34] HINEK A., THYBERG J., FRIBERG U., Heterotropic autotransplantation of isolated aortic cells, An electron microscopical study, *Cell Tissue Res.*, **172**: 59–79, 1976.
- [35] HINEK A., Struktura i morfogeneza włókien sprężystych, *Post. Biol. Kom.*, **6**: 209–238, 1979.
- [36] HINEK A., Morfogeneza elementów sprężystych tworzonych przez miocyty naczyniowe aorty i chondrocyty chrząstki sprężystej — streszczenie rozprawy habilitacyjnej. *Polski Tyg. Lek.*, **10**: 387–389, 1979.
- [37] HINEK A., THYBERG J., Elastin formation in heterotropic transplants of isolated arterial smooth muscle cells, *Connect. Tiss. Res.*, **8**: 181–184, 1981.
- [38] HOLLANDER W., Role of arterial lipoproteins in the formation of the fibrous plaque, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **82**: 793–799, 1975.
- [39] HOUSLEY T., TANZER M. L., Collagen crosslinking: Isolation of hydroksyaldol-histidine, a naturally-occurring crosslink, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**: 824–830, 1975.
- [40] IVERIUS P. H., Possible role of the glycosaminoglycans in the genesis of atherosclerosis, in *Ciba Foundation, Symposium 12* p. 185, Elsevier 1973.
- [41] KAGAN H. M., JORDAN R. E., LERCH R. M., MUKHERIJEE D. P., STONE P., FRANZBLAU C., Factors affective the proteolytic degradation of elastin, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 189–208, 1977.
- [42] KEELEY F. W., Identification of elastin in developing aortic tissue by immunological methods, *Conn. Tiss. Res.*, **8**: 193–198, 1981.
- [43] KRAMSCH D. M., FRANZBLAU C., HOLLANDER W., The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque, *J. Clin. Invest.*, **50**: 1666–1677, 1971.
- [44] KRAMSCH D. M., ASPEN A. J., ROZLER L. J., Atherosclerosis prevention by agents not affecting abnormal levels of blood lipids, *Science*, **213**: 1511–1512, 1981.
- [45] LEDET T., Growth hormone stimulating the growth of arterial medial cells in vitro, *Diabetes*, **25**: 1011–1017, 1976.
- [46] LINDAHL U., BAKSTROM G., HAMSTROM A., FRANSSON L. A., Formation of the mucopolisaccharides, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **46**: 981–985, 1972.

- [47] MARTIN G. M., SPRAGUE C. A., Symposium on in vitro studies related to atherogenesis: life histories of hyperplastic cell lines from aorta and skin, *Exp. Mol. Pathol.*, **18**: 125-141, 1973.
- [48] MOLINARI-TOSATTI M. P., GOTTE L., MORET V., Some features of the binding of calcium ions to elastin, *Calcif. Tissue Res.*, **6**: 329-334, 1971.
- [49] MOSKALEWSKI S., KONWIŃSKI M., HINEK A., In vitro elastic fiber formation by aggregated aortic cells of newborn rabbits, *Anat. Embryol.*, **150**: 113-122, 1976.
- [50] MURRAY M., SCHRODT R. G., BERG H. F., Role of smooth muscle cells in healing of injured arteries, *Arch. Pathol.*, **82**: 138-147, 1966.
- [51] NARAYANAN S., SANDBERG L. B., ROSS R., LAYMAN D. L., The smooth muscle cells III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell in culture, *J. Cell Biol.*, **68**: 411-419, 1976.
- [52] NARAYANAN A. S., PAGE R. C., KUZAN F., Studies on the action of lysyl oxidase on soluble elastin, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 491-508, 1977.
- [53] PEARSON T. A., KRAMER E. C., SOLEZ K., HEPTINSTALL R. H., The human atherotic plaque, *Am. J. Pathol.*, **86**: 657-664, 1977.
- [54] PEASE D. C., PAULE W. J., Electron microscopy of elastic arteries: the thoracic aorta of the rat., *J. Ultrastruct. Res.*, **3**: 469-483, 1960.
- [55] PFEIFLE B., DITSCHUNEIT H., The effect of insulin and insulin-like factors on cell proliferation of human smooth muscle cells., *Artery*, **8**: 336-341, 1980.
- [56] PETERS T. J., MULLER M., DeDUVE C., Lysosomes of the arterial wall, *J. Exp. Med.*, **136**: 1117-1139, 1972.
- [57] PROCKOP D. J., KIVIRIKKO K. I., TUDERMAN L., GUZMAN N. A., The biosynthesis of collagen and its disorders, *New Engl. J. Med.*, **301**: 13-23, 77-85, 1979.
- [58] POLLAK O. J., Monographs on atherosclerosis, Vol. 1, Tissue culture, wyd. Karger, New York 1969.
- [59] ROBERT L., KADAR A., ROBERT B., The macromolecules of the intercellular matrix of the arterial wall, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **43**: 85-123, 1974.
- [60] ROBERT L., ROBERT B., ROBERT A. M., Molecular biology of elastin as related to aging and atherosclerosis, *Exp. Gerontol.*, **5**: 339-356, 1970.
- [61] ROSENBLOOM J., HARSCH M., CYWINSKI A., Evidence that tropoelastin is the primary precursor in elastin biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **255**: 100-106, 1980.
- [62] ROSS R., The smooth muscle cells II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers, *J. Cell Biol.*, **50**: 172-186, 1971.
- [63] ROSS R., GLOMSET J. A., Atherosclerosis and the smooth muscle cells, *Science*, **180**: 1332-1339, 1973.
- [64] ROSS R., KLEBANOFF S. J., The smooth muscle cells. In vivo synthesis of connective tissue proteins, *J. Cell Biol.*, **50**: 159-1971, 1971.
- [65] ROSS R., GLOMSET J. A., The pathogenesis of atherosclerosis, *New Engl. J. Med.*, **295**: 369-377, 1976.
- [66] ROSS R., FIALKOFF P. J., ALTMAN L. K., The morphogenesis of elastic fibers, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **79**: 7-17, 1977.
- [67] RUTHERFORD R. B., ROSS R., Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate, *J. Cell Biol.*, **69**: 196-203, 1976.
- [68] SANDBERG L. B., SOSKEL N. T., LESLIE J. G., Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states, *New Engl. J. Med.*, **304**: 566-579, 1981.

- [69] SEAR C. H. J., KEWLEY M. A., JONES C. J. P., GRANT M. E., JACKSON D. S., The identification of glycoproteins associated with elastic-tissue microfibrils., *Biochem. J.*, **170**: 715-718, 1978.
- [70] SEAR C. H. J., GRANT M. E., JACKSON D. S., The nature of the microfibrillar glycoproteins of elastic fibres, *Biochem. J.*, **194**: 587-598, 1981.
- [71] SCHWARTZ E., ADAMANY A. M., BLUMENFELD O., Extracellular proteins of the calf aortic media smooth muscle cells in culture, *Biochim. Biophys. Acta*, **624**: 531-544, 1980.
- [72] SNIDER R., FARRIS B., VERBITZKI V., MOSCARITOLO R., SALCEDO L. L., FRANZBLAU C., Elastin biosynthesis and crosslink formation in rabbit aortic SMC cultures, *Biochemistry*, **20**: 2614-2618, 1981.
- [73] SOMLYO A. P., SOMLYO A. V., Vascular smooth muscle. Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics, *Pharmacol. Rev.*, **20**: 197-272, 1968.
- [74] THYBERG J., HINEK A., NILSSON J., FRIBERG U., Electron microscopic cytochemical studies of rat aorta: intra-cellular vesicles containing elastin- and collagen-like material, *Histochem. J.*, **11**: 1-17, 1979.
- [75] TOKITA K., KANNO K., IKEDA K., Elastin-sub-fraction as binding site for lipids, *Atherosclerosis*, **28**: 111-119, 1977.
- [76] UITTO J., HOFFMAN H. P., PROCOP D. J., Synthesis of elastin and procollagen by cells from embryonic aorta, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **173**: 187-200, 1976.
- [77] URRY D. W., Neutral sites for calcium ion binding to elastin and collagen: a charge neutralization theory for calcification and its relationship to atherosclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 810-814, 1971.
- [78] WEINSTEIN R. W., STEMERMAN M. B., Hormonal requirements for growth of arterial smooth muscle cells in vitro: An endocrine approach to atherosclerosis, *Science*, **212**: 818-820, 1981.
- [79] WEIGHT T. N., ROSS R., Proteoglycans in primate arteries, *J. Cell. Biol.*, **67**: 660-674, 1975.
- [80] WISSLER R. W., Overview of problems of atherosclerosis in cerebrovascular diseases, edited by P. Scheinberg, Raven Press, New York, 59-75, 1976.

Otrzymano: 6 stycznia 1982.

Przyjęto: 8 marca 1982.

Adres autora: Al. Powstańców Wielkop. 72, 70-111 Szczecin.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

EWOLUCJA ODPORNOŚCI

EVOLUTION OF IMMUNITY

Barbara PŁYTYCZ i Maria KSIĄŻKIEWICZ

Zakład Anatomii Porównawczej i Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii,
Instytut Zoologii UJ

Streszczenie. Organizmy żywe rozróżniają struktury własne od obcych i chronią integralność własnego ustroju. Podstawowym i powszechnym mechanizmem obronnym zwierząt jest fagocytoza z udziałem komórek żernych (makrofagów). Wśród gąbek, jamochłonów, zwierząt pierwoustych i wtóroustych wykazano ponadto istnienie reakcji obronnych charakteryzujących się pamięcią i specyfiką, a więc odpowiadających kryteriom reakcji immunologicznych. Osiągnęły one najwyższy stopień rozwoju w organizmach kręgowców, u których przebiegają z udziałem makrofagów, oraz produktów limfocytów T i B, a w tym systemu przeciwciał. Drobin pokrewnych immunoglobulinom nie wykryto dotychczas u żadnych bezkręgowców. Homologi limfocytów kręgowców występują u zwierząt pierwoustych, natomiast analogi — u wtóroustych. Ze względu na odmienne podłoże komórkowe uważa się obecnie, że reakcje immunologiczne pojawiły się niezależnie w toku ewolucji gąbek, jamochłonów, *Protostomia* i *Deuterostomia*.

Summary. Animals are capable of distinguishing self from non-self and thus protect the integrity of their organisms. Phagocytosis effected by scavenger cells is a common and basic defense reaction. In addition, defense mechanisms involving specificity and memory, which are essential components of adaptive immunity, have been reported in sponges, coelenterates, protostomes and deuterostomes. A highly elaborate immune system has developed in vertebrates; it includes macrophages and products of T- and B- lymphocytes, e.g. antibodies. No molecules related to immunoglobulins have been reported in invertebrates. Homologues and analogues to the vertebrate lymphocytes are found in deuterostomes and protostomes, respectively. Because of diverse cellular basis, the immune reactions are thought to have evolved independently in sponges, coelenterates, *Protostomia* and *Deuterostomia*.

U podstaw współczesnych poglądów na zjawiska odporności leży sformułowana przez Burneta [6] myśl, że cechą żywych komórek jest

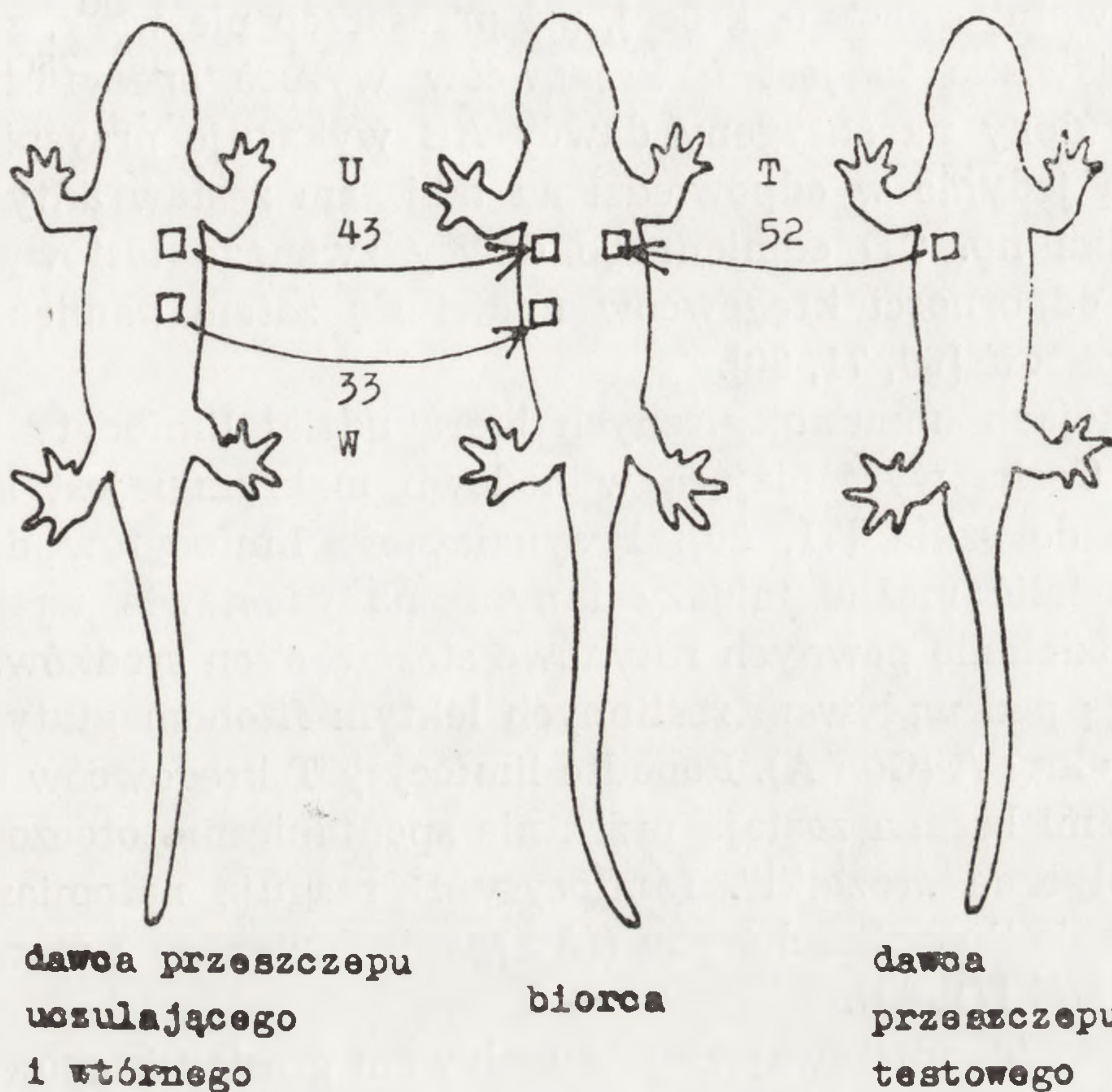
zdolność ich wzajemnego rozpoznawania się w obrębie organizmu, a w konsekwencji — możliwość odróżniania struktur obcych, stanowiących zagrożenie integralności danego osobnika. Nieprzebrana różnorodność form żywych jest bezsprzeczonym dowodem tego twierdzenia. Przetrwać mogły bowiem jedynie te gatunki, które w toku ewolucji nabyły właściwość precyzyjnego rozróżniania białek własnych od obcych i rozwinęły skuteczne środki obrony przed utratą indywidualności osobników na skutek fuzji z innymi organizmami, oraz przed wyniszczeniem przez czynniki chorobotwórcze pochodzenia zewnętrznego, czy też niekontrolowany rozplem własnych komórek zmienionych nowotworowo.

Od długiego czasu interesowano się reakcjami organizmu ludzkiego na zetknięcie się z elementami patogennymi i sposobami uodpornienia człowieka na szereg chorób. Zrodziła się w ten sposób nauka o odporności — immunologia. Na podstawie badań klinicznych i doświadczeń na ssakach laboratoryjnych udowodniono, że kluczowymi białkami w odpowiedzi immunologicznej ssaków są przeciwciała, zwane też immunoglobulinami, wytwarzane przez wyspecjalizowaną linię komórkową — limfocyty [71, 80]. W ostatnich latach twierdzenie to rozszerzono na wszystkie zwierzęta kręgowce, wykazując tym samym homologię reakcji immunologicznych w obrębie Vertebrata [54, 67, 69]. Brak jest natomiast dowodów na istnienie drobin pokrewnych immunoglobulinom u jakichkolwiek bezkręgowców, pomimo występowania u niektórych spośród tych zwierząt komórek przypominających morfologicznie limfocyty [24, 54, 76]. Część badaczy uważa zatem reakcje obronne bezkręgowców za tzw. pseudoodporność, odmawiając im rangi homologii w stosunku do odporności zwierząt kręgowych [54, 99, 100]. Dla tej grupy uczonych udział komórek limfatycznych i systemu przeciwciał jest podstawą definicji terminu odporność. Dyskutując z tym poglądem Hildemann i współpracownicy stwierdzają: „To podejście przypomina rozpatrywanie jedynie udziału samochodów w ruchu drogowym, z pominięciem motocykli, rowerów i transportu konnego. Ssaki mogą rzeczywiście reprezentować „samochodowy” model odporności, co nie wyklucza, iż równie udane modele „motocyklowe” i „rowerowe” występują u mniej skomplikowanych zwierząt bezkręgowych” [29]. Zdaniem Coopera „zdolność do odpowiedzi immunologicznej jest powszechną właściwością fizjologiczną wszystkich żywych organizmów, na równi z oddychaniem, rozmnażaniem, trawieniem, wydalaniem itp.” [15].

Ponieważ nauka dysponuje obecnie dość zwartym obrazem reakcji immunologicznych jedynie odnośnie zwierząt kręgowych — nasz przegląd rozpoczniemy od przypomnienia podstawowych informacji immunobiologii *Vertebrata*.

1. REAKCJE OBRONNE KRĘGOWCÓW

Wysoką swoistość i pamięć reakcji immunologicznych kręgowców przedstawić można na modelu odrzucania przeszczepów skórnych (ryc. 1), w którym to procesie uczestniczą zarówno komórki kompetentne, jak



Ryc. 1. Pamięć i specyfika reakcji transplantacyjnych kręgowców na przykładzie traszek (*Amphibia, Urodela*). Cyfry oznaczają medialne czasy przeżycia przeszczepów uczulających (U), wtórnych (W) i testowych (T) (według [70])

i przeciwciała. Przyczyną niszczenia tkanek allogenicznych, czyli wymienianych między partnerami z tego samego gatunku, jest wyposażenie praktycznie każdego osobnika w odmienny zestaw białek zwanych antygenami transplantacyjnymi [19, 69, 71, 80]. Sekwencja aminokwasów tych białek zakodowana jest w genach zgodności tkankowej. Niezgodność w wysoce polimorficznym zespole tych genów, zwanym głównym rejonem zgodności tkankowej — MHC (major histocompatibility complex), jest przyczyną szybkiego niszczenia przeszczepów. Przy niezgodności w innych genach niszczenie następuje powoli. Na przykład fragmenty skóry dawcy o antygenach transplantacyjnych AB zostają rozpoznane przez receptory immunoglobulinowe limfocytów gospodarza AC jako antygenowo obce ze względu na obecność białka B. Wnikają więc do wnętrza przeszczepu liczne komórki szeregu białokrwinkowego, zwane

ogólnie immunocytami, doprowadzając do zniszczenia obcej tkanki. Niektóre limfocyty „zapamiętują” napotykanie swoistych dla nich fragmentów obcych białek, czyli tzw. determinanty antygenowe. Limfocyty te zwane są więc komórkami pamięci immunologicznej. Ich obecność w organizmie sprawia, że drugi przeszczep od tego samego dawcy (AB) jest z reguły żywotny znacznie krócej, niż przeszczep pierwszy, zwany uczulającym. Zjawisko to jest u kręgowców wysoce specyficzne, a więc osobnik uczulony na antygeny dawcy AB wykazuje przyspieszoną reakcję wtórną jedynie w odpowiedzi na taki sam zestaw antygenów, lecz nie na białka np. CD odmiennego dawcy zwanego testowym (ryc. 1). W pojęciu odporności kręgowców mieści się zatem pamięć immunologiczna i swoistość [69, 71, 80].

W reakcjach immunologicznych biorą udział limfocyty T i B oraz makrofagi. Cechą wyróżniającą w hodowli makrofagi jest ich zdolność przylegania do szkła [71, 80]. Przynależność limfocytów do populacji T lub B ustalić można między innymi na podstawie wrażliwości na mitogenne działanie pewnych rutynowo stosowanych środków. Limfocyty T proliferują pod wpływem roślinnych lektyn: fitohemaglutyniny (PHA) i konkanawaliny A (Con A). Ponadto limfocyty T kręgowców wymieszane z erytrocytami barana zostają przez nie spontanicznie otoczone i tworzą charakterystyczne „rozetki”. Limfocyty B reagują natomiast na mitogenne działanie lipopolisacharydu (LPS) wyizolowanego z otoczek bakterii *Escherichia coli* [71, 80].

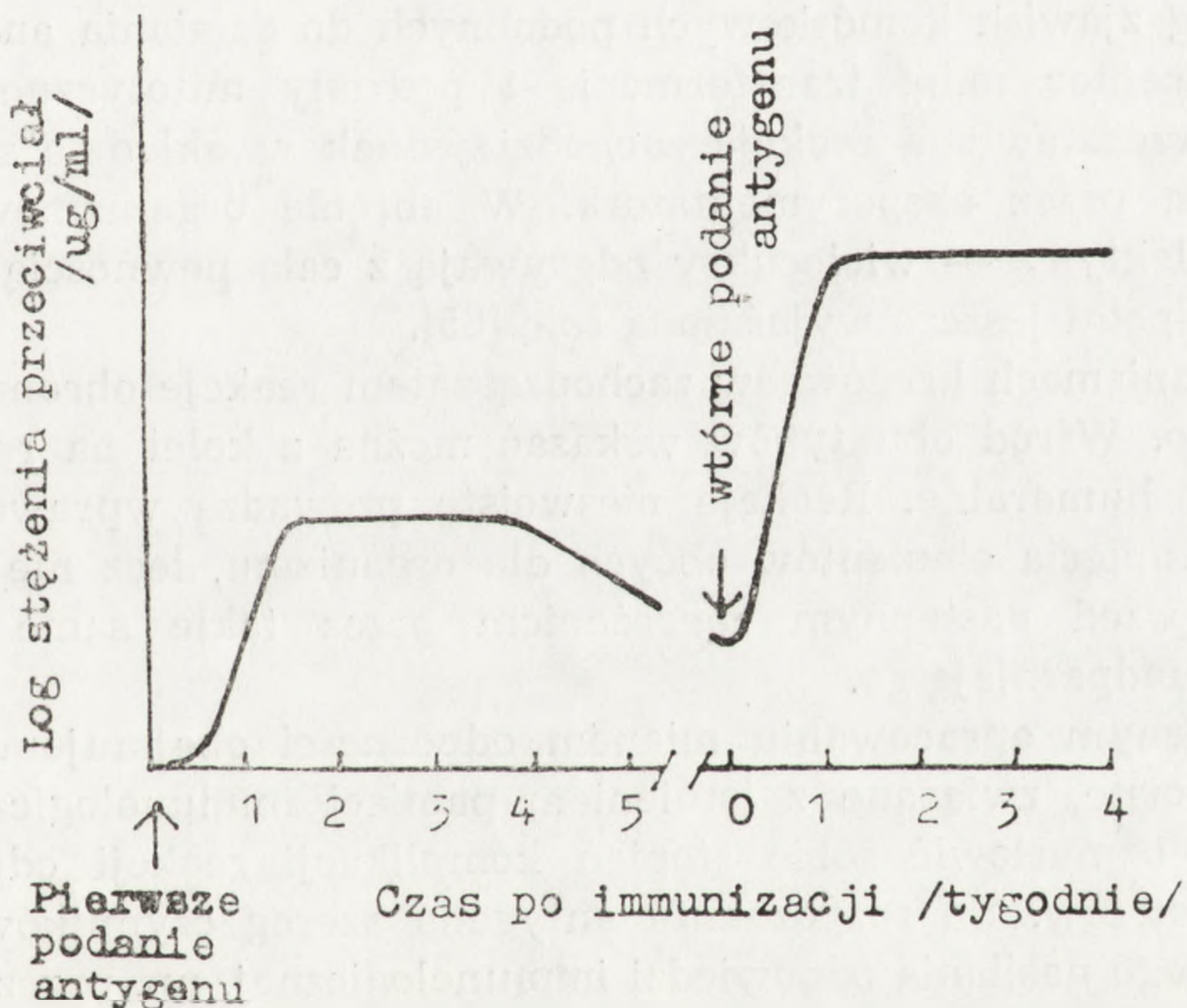
Limfocyty T, dojrzewające pod wpływem grasicy kręgowców, pełnią różnorodne funkcje, co skorelowane jest z występowaniem u nich antygenów powierzchniowych Ly 1 lub Ly 2 [80]. Subpopulacja limfocytów T o fenotypie Ly 1 to komórki pomocnicze, uczestniczące w interakcjach makrofag — limfocyt oraz limfocyt — limfocyt T lub B, co zapoczątkowuje rozwój odpowiedzi immunologicznej. Ich działanie może zostać zahamowane przez subpopulację limfocytów T supresyjnych, o antygenach powierzchniowych Ly 2 odpowiedzialnych zatem za stopniowe wygaszanie odpowiedzi i za zjawiska tolerancji immunologicznej [71, 80].

Niektóre limfocyty T stają się komórkami pamięci, inne przejmują w tzw. reakcjach typu komórkowego funkcję efektorową, uwalniając czynniki cytotoksyczne niszczące struktury antygenowo obce. Limfocyty tej populacji prowadzą również do narastania odpowiedzi przez wciąganie do niej komórek szeregu białokrwinkowego za pośrednictwem limfokinin, drobin rozpuszczalnych, odmiennych od przeciwciał [71, 80].

Limfocyty B, dojrzewające bez udziału grasicy, po pobudzeniu antygenowym przekształcają się w komórki plazmatyczne uwalniające przeciwciała do płynów tkankowych. Wolne immunoglobuliny nie niszczą wprawdzie antygenów „osobiście”, lecz wiążąc się ze swoistymi dla

nich determinantami ułatwiają (lecz niekiedy utrudniają) zniszczenie antygenowo obcych struktur przez wyspecjalizowane komórki lub białka surowicy. Na przykład przeciwciała z grupy opsonin łącząc się z antygenami „czynią je smacznymi” dla komórek żernych. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom powierzchniowym komórek aktywują system białek zwany układem dopełniacza, co prowadzi do uszkodzenia błony komórki docelowej.

Reakcje z udziałem wolnych przeciwciał zwiemy reakcjami humoralnymi. Dzięki limfocytom pamięci immunologicznej, we wtórnej reakcji humoralnej na dany antygen bierze udział więcej przeciwciał i osiągają one szybciej swój maksymalny poziom niż w reakcji uczulającej [71, 80] (ryc. 2).



Ryc. 2. Kinetyka pojawiania się przeciwciał u ssaków immunizowanych bakteriofagiem (według [54])

Rozwinięcie swoistej odpowiedzi immunologicznej kręgowców wymaga upływu czasu. Okres ten jest potrzebny na przypadkowe napotkanie antygeny przez krążące limfocyty o swoistych dla niego receptorach, a następnie na wielokrotne podziały mitotyczne tych komórek, prowadzące do powstania klonów limfocytów wykonawczych i limfocytów pamięci, co zachodzi w wyspecjalizowanych narządach limfatycznych [67, 80]. Zanim pojawi się odpowiednia liczba tych komórek pierwszą linię obrony stanowią reakcje nieswoiste: fagocytoza i odczyn zapalny. Biorą w nich udział komórki szeregu monocyt — makrofag oraz granu-

locyty. Komórki te, w przeciwieństwie do limfocytów, pozbawione są zdolności „zapamiętywania” napotkanych antygenów [2, 71, 80]. Reakcje obronne kręgowców wspomagane są też przez nieswoiste czynniki humoralne, niespokrewnione z przeciwciałami, zawarte w płynach ustrojowych, np. układ białek dopełniacza [71, 80].

Należy ponadto podkreślić, że oprócz wiążących antygeny receptorów immunoglobulinowych limfocytów, kręgowce posiadają szereg innych systemów rozpoznawczych, spośród których do dalszych rozważań przydatna będzie wzmianka o lektynach, czyli powszechnie występujących w organizmach roślinnych i zwierzęcych drobinach wiążących specyficznie wielocukry [65]. W rutynowych testach immunologicznych stosuje się wzmiankowane już lektyny roślinne, PHA i Con A, reagujące nieswoiście z polisacharydami powierzchniowymi limfocytów T. Wyzwała to szereg zjawisk komórkowych podobnych do działania antygeny na swoisty receptor m.in. transformację i podziały mitotyczne komórek [71, 80]. Przedstawiona reakcja zachodzi jednak w układzie sztucznym, stworzonym przez eksperymentatora. W obrębie organizmów żywych interakcje lektyny — wielocukry odgrywają z całą pewnością ogromną, choć nie w pełni jeszcze wyjaśnioną rolę [65].

W organizmach kręgowców zachodzą zatem reakcje obronne swoiste i nieswoiste. Wśród obu typów wskazać można z kolei na reakcje komórkowe i humoralne. Reakcje nieswoiste prowadzą wprawdzie sprawnie do usunięcia elementów obcych dla organizmu, lecz nie zabezpieczają go przed następnym zagrożeniem przez takie same czynniki, a więc nie uodparniają go.

W obecnym opracowaniu mianem odporności obejmujemy jedynie reakcje swoiste, związane z istnieniem pamięci immunologicznej.

Warto uzmysłwić sobie stopień komplikacji reakcji odpornościowych kręgowców. Po rozpoznaniu antygeny szereg czynników zmierza do lawinowego nasilania odpowiedzi immunologicznej, np. przez działanie limfocytów pośredniczących czy uwalnianie limfokinin „zwołujących sprzymierzeńców”. Musi zatem istnieć system „utrzymujący w ryzach” ten proces, co odbywa się na zasadzie sprzężeń zwrotnych ujemnych. Jako przykład posłużyła funkcja subpopulacji supresyjnej limfocytów T. Zaburzenia proporcji reakcji wzmacniających i hamujących odpowiedź immunologiczną mogą być zgubne w skutkach [71, 80].

2. DEFINICJA TERMINU „ODPORNOŚĆ” W UJĘCIU FILOGENETYCZNYM

Zdaniem Hildemanna i współpracowników [29] doświadczenia nad reakcjami obronnymi bezkręgowców uwzględniać powinny trzy elementy: 1. sposób odpowiedzi danego organizmu na zetknięcie z czynnikiem

antygenowo obcym, 2. istnienie w reakcji składowej pamięci, 3. stopień specyfiki reakcji.

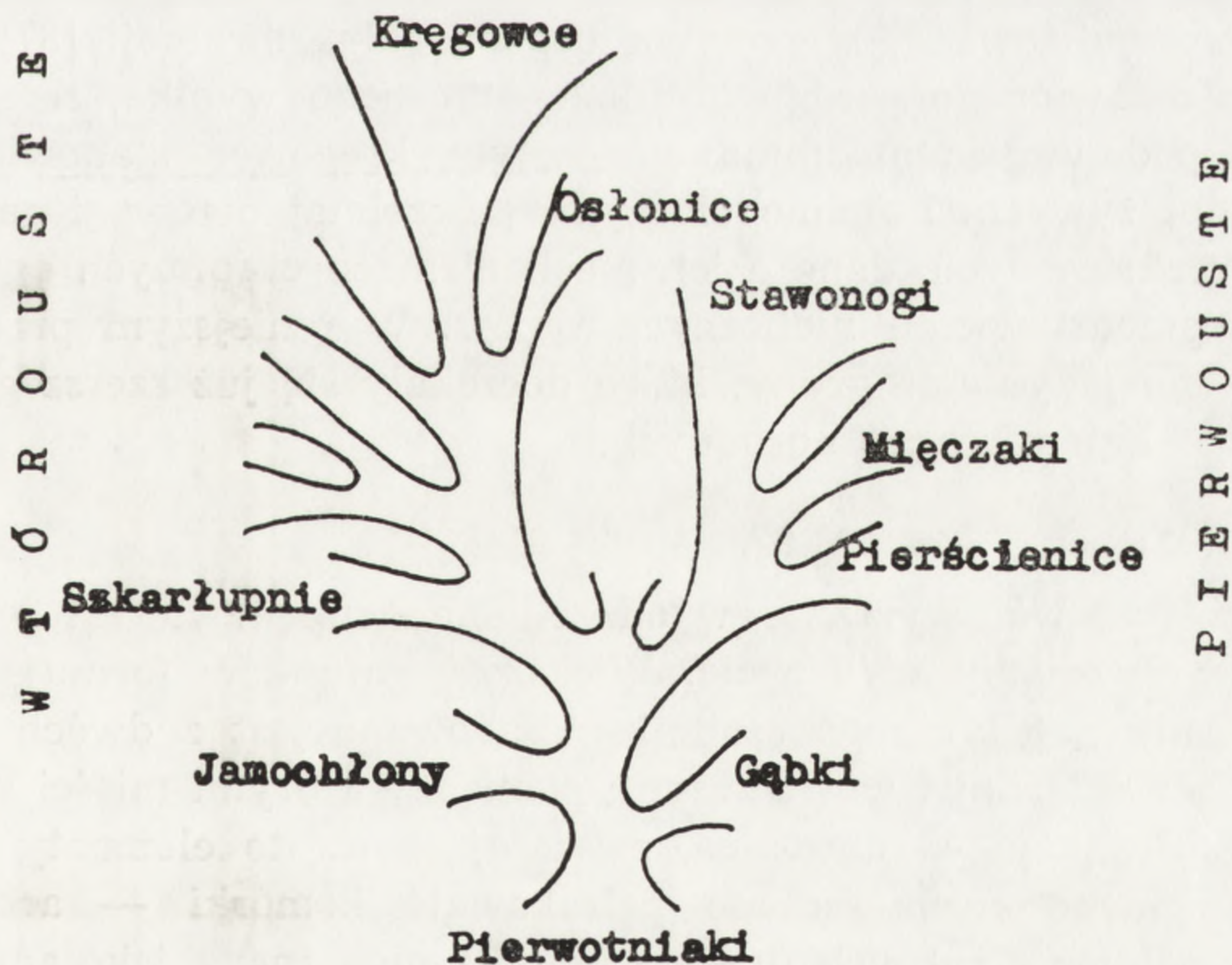
Jedynie reakcje wykazujące pamięć i swoistość nazywamy procesami immunologicznymi, czyli odpornościowymi, gdyż wyłącznie one zabezpieczają zwierzę przed powtórny zagrożeniem ze strony takiego samego antygeny. Następnym krokiem w rozważaniach filogenetycznych jest ustalenie homologii względnie analogii reakcji odpornościowych poszczególnych bezkręgowców w stosunku do odporności *Vertebrata*.

Nadrzędnym celem tego typu badań jest próba odtworzenia przebiegu ewolucji systemu obronnego istot żywych.

3. REAKCJE OBRONNE BEZKRĘGOWCÓW

Punktem odniesienia do badań filogenezy odporności jest akceptowane przez ogół badaczy drzewo rodowe zwierząt wielokomórkowych (*Metazoa*) (ryc. 3). Większość koncepcji ewolucyjnych za grupę wyjściową prowadzącą do tych organizmów uważa wiciowce (*Flagellata*). Wśród współcześnie żyjących *Metazoa* najniższy poziom organizacji reprezentują gąbki (*Spongiaria*), nie mające jeszcze właściwych tkanek. Organizmy te wyodrębniły się bardzo wcześnie od wspólnego pnia *Metazoa* i stanowią ślepą gałąź ewolucji.

Wyższy poziom strukturalno-funkcjonalny osiągnęły jamochłony



Ryc. 3. Drzewo filogenetyczne zwierząt (według [101]). Uwzględniono grupy omówione w artykule

(*Coelenterata*). Są to zwierzęta o pierwotnie promienistej symetrii ciała, zbudowane z dwóch warstw, ektodermy i endodermy, formujących prymitywne narządy. Obecnie zalicza się tu parzydełkowce (*Cnidaria*) oraz żebroplawy (*Ctenophora*).

Ze zwierząt przypominających współcześnie żyjące jamochłony, w zależności od stosunku prągu do definitywnego otworu gębowego, wyprowadza się dwie linie rozwojowe: pierwouste (*Protostomia*) i wtórouste (*Deuterostomia*) [26, 81]. Organizmy należące do tych grup stanowią przeważającą część świata zwierzęcego. Charakteryzuje je symetria dwuboczna oraz obecność mezodermy.

Pierwouste nie są grupą jednolitą. Wyróżnia się wśród nich kilka kierunków ewolucyjnych. W obrębie jednego z nich, z przodków pierścienic, niezależnie wyprowadza się linie prowadzące do współcześnie żyjących pierścienic (*Annelida*), stawonogów (*Arthropoda*) i mięczaków (*Mollusca*).

Również z prajamochłonów wyłania się linia rozwojowa wtóroustych, do których należą m.in. szkarłupnie (*Echinodermata*) oraz strunowce (*Chordata*): osłonice (*Tunicata*), beczaszki (*Acrania*) i kręgowce (*Vertebrata*). Szkarłupnie uważane są za typ, który dość wcześnie wyodrębnił się od wspólnego pnia prowadzącego do strunowców. Natomiast osłonice oddzieliły się dużo później, a od larwalnych form ich przodków nieliczni badacze wyprowadzają kręgowce [3]. Współcześnie żyjące osłonice, ze względu na szereg szczególnych cech uważa się za grupę wyspecjalizowaną, stanowiącą boczną gałąź ewolucji [37].

Z przedstawionego przeglądu filogenetycznego wynika, że „rozszyfrowane” pod względem immunologicznym kręgowce stanowią nikły ułamek istot żywych. Pomimo olbrzymiej liczebnej przewagi gatunków zwierząt bezkręgowych, dane o ich mechanizmach obronnych ograniczone są do przedstawicieli nielicznych typów. W niniejszym przeglądzie uwzględniono jedynie te grupy, które doczekały się już szerszego opracowania pod kątem reakcji obronnych.

3.1 GĄBKI (SPONGIARIA)

Gąbki stanowią wyraźnie wyodrębnioną grupę zwierząt wodnych, prowadzących osiadły tryb życia. Większość gatunków formuje zwarte kolonie. Ciało pojedynczego osobnika zbudowane jest z dwóch warstw komórek, zewnętrznej i wewnętrznej, pomiędzy którymi mieści się galaretowata substancja — mezoglea, zawierająca często elementy szkieletowe oraz luźno rozmieszczone pełzakowate komórki — archeocyty zdolne do pełnienia różnych funkcji. Część z nich znana jako amebocyty aktywnie fagocytuje obce drobiny. W przypadku napotkania elementów dużych, np. wstrzykniętych do mezoglei erytrocytów ludzkich, amebocyty otaczają je zwartą warstwą dokonując tzw. inkapsulacji [53].

Już w roku 1907 [42] Wilson stwierdził, że mechanicznie odizolowane komórki gąbki kolonijnej samorzutnie agregują odtwarzając funkcjonującą kolonię. Wykazano jednak ostatnio, że po rozdzieleniu w gradiencie stężeń archeocytów od komórek warstwy wewnętrznej — choanocytów, do odtworzenia drogą agregacji osiadłej kolonii zdolne są jedynie komórki pierwszego z wymienionych typów [21].

W latach pięćdziesiątych wykazano, że wyizolowane i wymieszane komórki dwóch różnych gatunków gąbek skupiają się oddzielnie, co dowodzi rozpoznawania międzygatunkowego, ksenogenicznego [28, 29, 42, 53]. Ostatnio dowiedziono również rozróżniania elementów allogeicznych; niezależna agregacja wystąpiła bowiem w mieszaninie komórek pochodzących z różnych szczepów gąbki słodkowodnej, *Ephydatia fluviatilis*. W procesie tym obserwowano również fagocytozę komórek obcych i martwych [21].

Zarówno w naturze, jak i w hodowlach laboratoryjnych, między sąsiednimi koloniami gąbek występuje zawsze wąska przestrzeń graniczna [21, 29, 42]. Sztuczną fuzję odpowiadającą przeszczepom, czy też parabiozie, wykonano natomiast w warunkach laboratoryjnych u hawajskiej gąbki z gatunku *Callyspongia diffusa* [29, 30]. Utrata purpurowej barwy jej części miękkich i ujawnienie jasnobrązowego szkieletu, jest w tym przypadku dogodnym wskaźnikiem martwoty tkanki. Przeszczepy wewnątrzkolonijne (autoprzyszczepy) przyjmują się trwale, natomiast na granicy zetknięcia różnych kolonii, czyli w alloprzeszczepach, obserwowano obumieranie komórek. Medialny czas przeżycia przeszczepów uczulających wyniósł u tego gatunku 11,3 dnia, natomiast wykazano krótsze przeżycie przeszczepów wtórnych (7,2 dnia), wykonanych na innych odgałęzieniach tej samej kolonii co uprzednio. Jest to zatem proces z atrybutem pamięci [29, 30].

Gąbki są również dogodnym materiałem do badania drobin odpowiedzialnych za wzajemne rozpoznawanie się komórek. W świetle nowych danych [62, 94, 97] uważa się, że istnieje u nich podwójny system rozpoznawczy; zespolenie komórek następuje wówczas, gdy gatunkowo specyficzne czynniki agregacji napotkają swoiste receptory komórek sąsiednich, natomiast lektyny powierzchniowe zablokują receptory antyagregacyjne partnerów [62, 94, 97]. Być może, dalsze badania tego systemu ułatwią zrozumienie struktury i funkcjonowania receptorów komórkowych organizmów wyższych.

3.2 JAMOCHŁONY (COELENTERATA)

Dane o mechanizmach obronnych parzydełkowców (*Canidaria*), typu zaliczanego do jamochłonów, pochodzą z doświadczeń prowadzonych na stułbiopławach (*Hydrozoa*) i koralowcach (*Anthozoa*).

Powszechnym zjawiskiem wśród niektórych parzydełkowców jest ich symbioza z jednokomórkowymi glonami [9, 56], które dostają się do wnętrza komórek stułbi czy polipa koralowego na drodze endocytozy [56]. Niektóre produkty ich fotosyntezy są wykorzystywane przez zwierzęce komórki gospodarza, zatem brak światła prowadzi do stopniowej atrofii polipa. W warunkach nie sprzyjających, np. w odpowiedzi na zranienie, zmianę temperatury czy zasolenia wody, obce antygenowo komórki roślinne nie mogą być dłużej tolerowane przez organizm gospodarza i zostają usunięte na drodze egzocytozy [56]. Uwolnione glony zachowują jednak pełną żywotność i przyjmują postać zdolną do aktywnego ruchu, zaopatrzoną w witki [56]. Zjawisko to może posłużyć za dogodny model badania wzajemnego oddziaływania komórek i mechanizmów tolerancji.

Wśród stułbiopławów i koralowców obserwowano różne typy zachowania w odpowiedzi na zetknięcie z obcymi organizmami: od unikania kontaktu po aktywną agresję z użyciem nowo powstałych ramion wyposażonych w komórki parzydełkowe [29]. Najwięcej uwagi poświęcono kolonijnym koralowcom formującym rafy [4, 29, 31–33, 72]. Poszczególne gałęzie tej samej kolonii mogą zlewać się ze sobą, lecz różne kolonie danego gatunku lub gatunków odmiennych zawsze oddzielone są korytarzami wodnymi [29]. By zbadać podłoże tego zjawiska, wymuszano w sposób podobny do przeszczepów, ścisły kontakt tkanek allogenicznych, należących do kolonii tego samego gatunku, lub obcogatunkowych — ksenogenicznych. Zależnie od stopnia pokrewieństwa partnerów obserwowano reakcje o różnym nasileniu: 1. unikanie kontaktu, czyli brak fuzji sąsiadujących tkanek allogenicznych, 2. łagodna niezgodność allo- i ksenogeniczna, polegająca na powolnym obumieraniu zlanych początkowo komórek granicznych i pojawieniu się między nimi warstwy cementu, 3. ostra ksenogeniczna reakcja agresyjna. Ten ostatni mechanizm polega na obumarciu polipów granicznych jednego z partnerów w ciągu kilku dni po zabiegu [33]. Wbrew oczekiwaniom, badania *in vitro* wykazały, że nie dochodzi tu do zabijania polipów jednej kolonii przez ksenogeniczne komórki lub ich produkty, lecz mamy do czynienia z wywołaniem intrygujących reakcji „samobójczych” wśród komórek jednego z partnerów [90].

Rafotwórczy koralowiec, *Montipora verrucosa*, poddany zabiegom transplantacyjnym, ujawnił krótkotrwałą pamięć i specyfikę reakcji na bodźce allogeniczne [29, 31, 72]. Medialny czas przeżycia przeszczepów uczulających wyniósł 22,0 dnia, a wtórnych tylko 11,6 dnia. Kolonie uczulone wykazały natomiast szeroki zakres reakcji na przeszczepy testowe, pochodzące od innych dawców niż uprzednio. Część przeszczepów testowych ulegała szybkiemu niszczeniu, a część wykazała długi, typowo

chroniczny czas przeżycia. Przemawia to za polimorfizmem omawianego gatunku pod względem antygenów zgodności tkankowej.

W mezoglei niektórych jamochłonów mieszczą się komórki o właściwościach żernych, jednak ich udział w reakcjach obronnych nie został jeszcze zbadany [53].

3.3 PIERŚCIENICE (ANNELIDA)

Bardzo dogodnym materiałem do badań reakcji obronnych i ich podłoża komórkowego są skąposzczety (*Oligochaeta*). Dwie niezależne grupy badaczy wykazały pamięć i swoistość reakcji transplantacyjnych u przedstawicieli rodziny *Lumbricidae* [15]. Kontrolne autoprzyszczepy, czyli fragmenty ściany ciała (wora skórno-mięśniowego) dżdżownic przyjmują się trwale. Przeszczepy allogeniczne niszczone są wolniej niż ksenogeniczne. Przeszczepy wtórne z reguły przeżywają znacznie krócej od uczulających. Pamięć immunologiczna jest swoista, gdyż czas przeżycia przeszczepu testowego (od niezależnego dawcy) nie ulega wpływowi uprzedniej immunizacji [42].

W obrębie przeszczepów wykazano obecność celomocytów biorcy, co świadczy o ich udziale w procesie gojenia rany i niszczenia obcej tkanki [51]. Bezspornym dowodem przemawiającym za zaangażowaniem tych komórek w reakcji odpornościowej jest przeniesienie przez nie stanu uczulenia ze zwierzęcia immunizowanego na osobnika, który nie zetknął się z danym antygenem. Pobranie celomocytów z jamy ciała dżdżownicy A uczulonej na antygeny dawcy B i wstrzyknięcie tych komórek osobnikowi C powoduje, że zwierzę to odrzuca przeszczep od dawcy B z szybkością charakterystyczną dla reakcji wtórnej [42].

Pomimo braku powszechnie przyjętej nomenklatury i klasyfikacji celomocytów pierścienic, badacze zgodni są na ogół co do istnienia dwóch odrębnych kategorii tych komórek, różniących się morfologią, funkcją i pochodzeniem [25]. Łatwe do wyróżnienia są pełniące funkcje troficzne komórki chloragocytarne. Drugą linię stanowią celomocyty fagocyтуjące, wśród których wyróżniono amebocyty zasadochłonne, kwasochłonne i obojętnochłonne [76, 78]. Przynajmniej część z tych komórek bierze udział w reakcjach odpornościowych [76, 78].

Celomocyty dżdżownic reagują na bodźce chemotaktyczne wędrując ze zróżnicowaną szybkością w kierunku homogenatów tkankowych innych skąposzczetów i stawonogów [55]. Korelacja wyników obserwacji morfologicznych i testów immunologicznych sugeruje, że amebocyty zasadochłonne można uważać za komórki odpowiadające limfocytom kręgowców, natomiast amebocyty obojętnochłonne odpowiadałyby granulocytom i makrofagom tych zwierząt [76]. Komórki zasadochłonne, podobnie jak limfocyty T człowieka, spontanicznie tworzą rozetki z ery-

trocytami barana [91], reagują wzmożoną syntezą DNA na bodźce allo- i ksenogeniczne *in vitro* [77, 78], ich obecność stwierdzono też w obrębie przeszczepów obcogatunkowych [51]. Komórki te reagują podziałami mitotycznymi na PHA [92], Con A [79], lecz i na LPS [78], wykazują więc cechy zarówno limfocytów T, jak i B, jednak nie wytwarzają drobin przypominających przeciwciała kręgowców. Odpowiedź tych komórek na PHA wymaga obecności amebocytów neutrofilnych, przylegających do szkła [92], co przypomina współdziałanie makrofagów w wywoływaniu stymulacji limfocytów kręgowców [71, 80].

Za podobieństwem komórek neutrofilnych do granulocytów i makrofagów zwierząt kręgowych przemawia gromadzenie się ich w miejscach zranień, oraz na granicy auto-, allo- i ksenoprzeszczepów, co odpowiadałoby niespecyficznym stanom zapalnym w organizmie kręgowców [2]. Świadczy o tym również wzrost syntezy DNA w tych komórkach pod wpływem bodźców niespecyficznym [77, 78].

Korelując wiadomości o właściwościach komórek zaangażowanych w mechanizmy obronne dżdżownic (*Lumbricus*) z badaniami morfologicznymi nad losami przeszczepów u tych zwierząt [51] uzyskujemy obraz przypominający reakcje transplantacyjne kręgowców. Wykonano doświadczenie, gdzie grupę kontrolną stanowiły dżdżownice zranione lub wyposażone w autoprzeszczepy, a grupę doświadczalną zwierzęta z ksenoprzeszczepami od *Eisenia fetida*. Bezpośrednio po zabiegu w obu grupach pojawiają się w miejscu uszkodzenia tkanek celomocyty granuliczne, odpowiadające granulocytom i makrofagom kręgowców. Ich migrację w kierunku zranienia należy wiązać z chemotaktycznym działaniem produktów rozpadu komórek, a ich rola polega na pożeraniu tkanek uszkodzonych lub martwych [51]. W przypadku zranienia i autoprzeszczepu prowadzi to do zabliznienia rany. W ksenoprzeszczepach natomiast fagocytoza nasila się, obejmując nawet zdolne do życia włókna mięśniowe, elementy tkanki łącznej oraz nabłonek, w wyniku czego następuje całkowite zniszczenie obcej tkanki. Na tym etapie we wnętrzu ksenoprzeszczepu obserwowano również komórki podobne do limfocytów odpowiedzialne zapewne za rozpoznanie obcości tkanki ksenogenicznej [51].

Przeгляд ten dowodzi, że reakcje obronne skąposzczetów w pełni odpowiadają kryteriom pozwalającym uznać je za odporność.

3.4 STAWONOGI (ARTHROPODA)

Stawonogi, zwierzęta o zewnętrznym szkielecie kutikularnym, są najliczniejszym typem w królestwie zwierząt. Badania ich mechanizmów obronnych ograniczyły się dotychczas do skorupiaków wyższych (*Malacostraca*), owadów (*Insecta*), oraz przedstawiciela reliktovej grupy ostro-

gonów (*Xiphosura*) — skrzypłocza (*Limulus polyphemus*). W typie stawonogów wykryto zarówno mechanizmy obronne komórkowe, czyli fagocytozę lub tworzenie guzów i kapsuł, jak i humoralne. Za reakcje komórkowe odpowiedzialne są niektóre z hemocytów — komórek otwartego systemu krwionośnego tych zwierząt [46]. W hemolimfie owadów fagocytującymi komórkami są plazmatocyty [75, 76], a niekiedy granulocyty [1, 63], natomiast u skorupiaków — amebocyty [89]. Fagocytozę w organizmach skorupiaków usprawniają odmienne od przeciwciał czynniki opsonizujące [17, 83]. Być może analogiczną funkcję pełnią u owadów substancje rozpoznawcze, uwalniane przez granulocyty [75].

W zjawisku fagocytozy w organizmach owadów uczestniczą obok krążących hemocytów, również ich komórki macierzyste, zwane retikularnymi, zlokalizowane w części korowej narządów krwiotwórczych [34, 102]. Ostatnio wykazano, że w organizmie szarańczy wędrownej [35], *Locusta migratoria*, część komórek retikularnych ginęła po sfagocytowaniu wprowadzonych eksperymentalnie bakterii patogennych, co indukowało intensywną proliferację sąsiednich komórek tego samego typu. W efekcie zwiększała się liczba krążących hemocytów. Trzecia funkcja komórek retikularnych polega na wytwarzaniu i uwalnianiu białkowych czynników antybakteryjnych, czego morfologicznym odzwierciedleniem jest silny rozwój siateczki śródplazmatycznej ziarnistej w tych komórkach [35].

Fagocytozie podlegają elementy niewielkie, np. wirusy i bakterie. W odpowiedzi na duże dawki tych patogenów dochodzi do ich uwięzienia w obrębie guzów utworzonych z granulocytów i plazmatocytów [73–75]. Większe organizmy pasożytnicze, np. nicienie, podlegają z kolei inkapsulacji. Otoczenie kapsułą jest również odpowiedzią na wprowadzone przez eksperymentatora do jamy ciała stawonoga fragmenty obcych tkanek — odpowiedniki przeszczepów skórnych stosowanych w innych typach zwierząt [47]. W pierwszym etapie inkapsulacji w jamie ciała owadów granulocyty w zetknięciu z obcym ciałem uwalniają ze swych ziarnistości tzw. czynniki rozpoznające, które chemotaktycznie przyciągają plazmatocyty [75]. Po pewnym czasie, zależnym od rodzaju wprowadzonego elementu, tworzy się wokół niego wielowarstwowa kapsuła utworzona z plazmatocytów [5, 75, 82].

Ostatnio wykazano specyfikę tego procesu. Kapsuła formuje się już w ciągu pierwszej doby po wprowadzeniu fragmentów tkanek ksenogenicznych [47]. Reakcja na komórki allogeniczne przebiega znacznie wolniej [8]. Szczegółowe badania prowadzono na larwach pasożytniczej błonkówki *Pimpla* [8]. W ich jamie ciała umieszczano jaja izogeniczne, od osobników tego samego szczepu laboratoryjnego, allogeniczne lub ksenogeniczne. Grubość kapsuł zależała bardzo wyraźnie od

stopnia pokrewieństwa genetycznego [8]. Nie przeprowadzono jeszcze doświadczeń testujących istnienie pamięci immunologicznej w tego typu reakcjach.

Pamięć i specyfikę wykazano natomiast w odpowiedzi karaczana (*Periplaneta americana*) na jady pszczół [39]. Dawka uczulająca najskuteczniej chroni zwierzę przed dawką śmiertelną, jeżeli drugie zetknięcie z antygenem następuje dopiero po upływie dwóch tygodni. Przy powtórnym wprowadzeniu antygeny maksymalny poziom czynników humoralnych jest wyższy i osiągnany szybciej niż przy dawce uczulającej, co przypomina dynamikę pojawiania się przeciwciał w organizmie kręgowców (ryc. 2). Wielokrotnie udokumentowano ponadto istnienie u stawonogów nieswoistych czynników bakteriologicznych, pojawiających się natychmiast po podaniu antygeny i szybko zanikających z płynów ustrojowych [54].

Liczne badania immunologiczne dotyczą skorupiaków dziesięcionogich (*Decapoda*), gdyż należy tu szereg gatunków o znaczeniu gospodarczym [81]. Wśród homarów szerzy się śmiertelna epizoocja, zwana gaffkemią, powodowana przez bakterie *Pediococcus homari* [41, 84]. Wprowadzenie do organizmu skorupiak (*Panulirus interruptus*) bakterii ze szczepu niezdolnego uodparnia zwierzęta na dawkę śmiertelną. Pamięć wykazano również u innego gatunku dziesięcionoga, kraba (*Carcinus*) w odpowiedzi na wstrzyknięcie bakteriofaga T₁. Po powtórny wprowadzeniu tego faga, usunięcie go z organizmu nastąpiło trzykrotnie szybciej [83]. Proces ten ma prawdopodobnie podłoże komórkowe [83]. Dużą specyfikę reakcji komórkowej w odpowiedzi na wprowadzenie do hemolimfy różnego typu obcych białek wykazano w organizmie krewetki [85].

Szereg prac poświęcono humoralnemu czynnikowi, limulinie, wyizolowanej z hemolimfy skrzypłocza (*Limulus polyphemus*) [13, 66, 95, 96]. Doszukiwano się biochemicznego podobieństwa tego białka z łańcuchami lekkimi przeciwciał kręgowców [54], jednak przeważa opinia o pokrewieństwie limuliny z lektynami roślin i innych zwierząt [95, 96].

3.5 MIĘCZAKI (*MOLLUSCA*)

Z dotychczasowych danych wynika, że głównym mechanizmem obronnym mięczaków jest fagocytoza z udziałem opsonin oraz inkapsulacja [53, 88]. Sfagocytowany materiał może ulec wewnątrzkomórkowemu strawieniu przez enzymy lityczne komórek żernych [23], lecz niekiedy fagocyty obciążone materiałem obcym są usuwane z organizmu poprzez przewody wyprowadzające układu rozrodczego [20] lub wydostają się na zewnątrz między komórkami wory skórno-mięśniowego [10].

Reakcje obronne mięczaków najlepiej są zbadane w gromadzie

małż (*Lamellibranchiata*) i ślimaków (*Gastropoda*). Komórkami żernymi małż są granulocyty [10, 27]. Funkcja ta u słodkowodnych ślimaków przypada amebocytom, stanowiącym u tych zwierząt populację komórek zróżnicowanych morfologicznie i funkcjonalnie [86]. Są one wyposażone w receptorowe drobiny powierzchniowe współdziałające z opsoninami osocza [88]. Podobne czynniki rozpoznawcze wykryto u chitona z prymitywnej gromady płytkonośnych — *Polyplacophora* [18].

Proces inkapsulacji szczegółowo zbadano w organizmie błotniarki stawowej *Lymnaea stagnalis* [87]. Amebocyty ślimaka otaczają obce ciało tworząc wielowarstwową kapsułę. Po pewnym czasie komórki brzeżne różnicują się w fibroblasty wytwarzające włókna kolagenowe, na skutek czego formuje się łącznotkankowa otoczka zewnętrzna. Zamknięty w kapsule materiał niebiologiczny pozostaje nie zmieniony, natomiast uwięzione w ten sposób tkanki obcogatunkowe (przeszczepy ksenogeniczne) zostają sfagocytowane przez sąsiadujące z nimi amebocyty strefy wewnętrznej kapsuły. Wokół fragmentów tkanek auto- i allogenicznych wprowadzonych do jamy ciała, amebocyty gromadzą się jedynie przejściowo i fagocytują tylko komórki uszkodzone [87]. Inne badania przemawiają jednak za możliwością rozpoznawania przez mięczaki obcości również tkanek allogenicznych [29].

W organizmie ostrygi, *Crassostrea*, wywołano reakcję odpornościową na wprowadzenie bakteriofaga T₂. Powtórna dawka antygeny eliminowana była szybciej od uczulającej. Reakcja ta nie wykazywała jednak dużej specyfiki, gdyż immunizowanie ostryg fagami pokrewnymi powodowało również nieco przyspieszoną eliminację podanego następnie bakteriofaga T₂ [53]. Specyfikę reakcji wykazano natomiast w odpowiedzi ślimaków na organizmy pasożytnicze [29].

W hemolimfie mięczaków występuje szereg czynników humoralnych, m.in. hemaglutynin, wykazujących różny stopień specyfiki odpowiedzi na eksperymentalnie wprowadzone erytrocyty kręgowców [53]. Ostatnio z płynów ustrojowych małży, *Tridacna maxima*, wyizolowano i poddano intensywnym badaniom lektynę zwaną tridakniną [93].

3.6 SZKARŁUPNIE (ECHINODERMATA)

Szkarłupnie są dość niezwykłą grupą morskich organizmów, wyróżniających się wśród tkankowców wtórnie promienistą symetrią ciała. Ich rozwój embrionalny wskazuje na wyodrębnienie się z linii prowadzącej do strunowców; stanowią więc szczególnie cenny materiał do badań filogenetycznych, m.in. układu odpornościowego (ryc. 3).

Dowiedziano ostatnio, że opisywany od dawna tajemniczy narząd osiowy tych zwierząt jest organem limfatycznym, sterującym reakcjami odpornościowymi [48–50, 76]. Morfologicznie jest to gąbczasty twór po-

przetykany włóknami mięśniowymi i łącznotkankowymi. Zaobserwowano w nim sznury komórek przypominające ultrastrukturalnie limfocyty i makrofagi [48]. Badania *in vitro* potwierdziły że część z nich (podobnie do makrofagów) przylega do szkła, a część jest pozbawiona tej właściwości [50].

Wśród limfocytów narządu osiowego rozgwiezdy, *Asterias rubens*, wyróżniono z kolei dwie populacje, odpowiadające limfocytom T i B kręgowców [48, 49]. Limfocyty T rozgwiezdy, wyposażone w receptory dla Con A, wstrzyknięte śródskórnym myszom, wywoływały w miejscu podania pojawienie się nowych kapilar krwionośnych (angiogenezę). Komórki takie podane zarodkom kurcząt wywoływały powiększenie śledzion tych ptaków, co jest wykładnikiem tzw. reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi. Oba testy są rutynowo stosowanymi wyznacznikami limfocytów T kręgowców [48–50]. Drugi typ limfocytów rozgwiezdy reagował na mitogenne działanie LPS, lecz nie udało się wyizolować z płynów ustrojowych tych zwierząt drobin przypominających przeciwciała. Zatem homologia tych komórek z limfocytami B kręgowców jest mniej wyraźna [48].

Angiogenezę nie wywoływały celomocyty rozgwiezdy [50], mimo że morfologicznie wyróżnia się wśród nich elementy podobne do limfocytów i makrofagów [50, 76]. Można zatem przypuszczać, że celomocyty i komórki narządu osiowego stanowią niezależne linie rozwojowe. Bardziej prawdopodobne wydaje się jednak założenie istnienia migracji komórek z organu limfatycznego do miejsc zagrożenia [48]. Limfocyty i makrofagi obserwowano bowiem we wnętrzu przeszczepów powierzchniowych tkanek szkarłupni [38, 40, 48].

Badania reakcji transplantacyjnych prowadzono u przedstawicieli trzech gromad *Echinodermata*: jeżowców (*Echinoidea*) [12], rozgwiezd (*Asteroidea*) [38, 40] oraz strzykw (*Holothurioides*) [38].

Jeżowce z gatunku *Lytechinus pictus* niszczą przeszczepy z szybkością zależną od stopnia genetycznego pokrewieństwa między dawcą a biorcą. Średni czas przeżycia tkanek allogenicznych u biorców ze szczepu laboratoryjnego od dawców złowionych w naturze wyniósł tylko 30 dni, a fragmenty ściany ciała wymieniane między osobnikami kojarzonymi trzykrotnie „brat × siostra” przeżyły średnio 70 dni. Krótki czas przeżycia drugich przeszczepów od tych samych dawców (12 dni) dowodzi istnienia pamięci immunologicznej [12].

Średni czas przeżycia przeszczepów uczulających wyniósł u rozgwiezdy, *Dermasteris imbricatus*, aż 213 dni, drugich od tych samych dawców 44,2 dnia, a trzecich tylko 8 dni. Alloprzeszczepy testowe były żywotne znacznie dłużej od wtórnych i trzecich, co dowodzi specyfiki reakcji u tego gatunku [40].

3.7 OSŁONICE (TUNICATA)

Do tego typu spokrewnionego z kręgowcami należą zwierzęta wyłącznie morskie, w większości kolonijne, prowadzące wolny lub osiadły tryb życia. Ich rozwój zarodkowy, sposób powstawania struny grzebietowej i układu nerwowego pozwala zaliczać je do strunowców.

Tkanka krwiotwórcza dorosłych osłonice mieści się w ścianie przełyku, wokół przewodu pokarmowego i w ścianie ciała [22, 76]. Ma charakter rozproszony lub formuje grupki limfatyczne, które można traktować jako homologi grasicy i śledziony [76]. Ultrastrukturalne badania prowadzone u zachwy, *Ciona intestinalis*, wykazały, że centralną część grudek zajmują komórki niezróżnicowane, intensywnie dzielące się, określane jako hemocytoblasty. Na obwodzie znajdowano komórki będące na różnych etapach różnicowania w poszczególne elementy morfotyczne krwi, wśród których występują limfocyty i grupa komórek fagocytujących [22].

Limfocyty osłonice są wrażliwe na promieniowanie X, na mitogenne działania PHA, formują spontanicznie rozetki z erytrocytami barana. Znajduje się je również we wnętrzu niszczonych alloprzeszczepów. Cechy te przemawiają za ich homologią z limfocytami kręgowców [76].

Odporność transplantacyjną badano wszechstronnie [7, 57–61] w kilku rodzajach kolonijnych zachw (*Ascidacea*). Klony osobników identycznych genetycznie, np. z rodzaju *Botryllus*, mieszczą się w obrębie wspólnej zewnętrznej osłonki zwanej tuniką, formując wspólny system naczyniowy. Oderwane części takiej kolonii mogą żyć samodzielnie, jednak ich wzajemny kontakt prowadzi do odrzucenia „przeszczepu” lub zespolenia kolonii. Wynik kontaktu kolonii odmienych zależy natomiast od stopnia pokrewieństwa genetycznego zwierząt i polega na unikaniu kontaktu, odrzucenia „przeszczepu” lub fuzji [7, 58–61].

W kilku niezależnych cyklach doświadczeń wykazano, że rozpoznawanie allogeniczne osłonice uwarunkowane jest obecnością białek powierzchniowych kodowanych w obrębie jednego rejonu genetycznego o wysokim polimorfizmie, co przypomina rejon kodujący antygeny transplantacyjne zwierząt kręgowych. Jednak w przeciwieństwie do kręgowców — zgodność dawcy i biorcy pod względem tylko jednego z białek kodowanych przez ten rejon wystarcza do wystąpienia fuzji kolonii zachw. Warunkiem odrzucenia przeszczepu allogenicznego tych osłonice jest odmiennosc obu białek pełniących funkcje antygenów transplantacyjnych [7, 53, 58–61].

Dotychczasowe dane świadczą zatem o swoistości mechanizmów transplantacyjnych osłonice, brak natomiast doświadczeń prowadzonych pod kątem wykazania istnienia reakcji typu wtórnego.

Pamięć immunologiczną *Tunicata* wykazano natomiast w odniesieniu do reakcji inkapsulacji [53].

4. HOMOLOGIA CZY ANALOGIA?

Jak wynika z przytoczonego przeglądu, organizmy zwierzęce reagują na struktury obce w sposób bardzo zróżnicowany: od tolerowania wewnątrzkomórkowych symbiontów, np. glonów w komórkach jamochłonów, poprzez unikanie kontaktu, np. w naturalnych koloniach osiadłych gąbek, koralowców czy osłonnic, aż po aktywne niszczenie elementów obcych drogą fagocytozy czy inkapsulacji, często z udziałem czynników humoralnych. Powszechnie stosowanym zabiegiem doświadczalnym jest przeszczepianie, czy też wszczepianie do jamy ciała, fragmentów tkanek allogenicznych lub ksenogenicznych. Ich niszczenie u *Protostomia* i *Deuterostomia* przebiega z udziałem wyspecjalizowanych komórek, natomiast u jamochłonów same komórki przeszczepu przejawiają tendencje „samobójcze”.

Zdolność wzajemnego rozpoznawania komórek wiąże się z wyposażeniem ich błon w białkowe wyznaczniki indywidualności [16, 19, 42–45, 69]. Przypuszczalnie pragen kodujący te białka stopniowo ewoluował osiągając u kręgowców postać głównego rejonu zgodności tkankowej, MHC [36, 42, 44, 68, 69]. Równolegle zmieniały się zapewne receptory antygenów, lecz obraz ich ewolucji jest jak dotąd mniej czytelny [19, 54]. U bezkręgowców funkcje te pełnią prawdopodobnie głównie lektyny [11], natomiast dopiero u kręgowców dodatkowo pojawiły się wysoce specyficzne receptory o charakterze immunoglobulin [52, 54]. Kodujące je fragmenty DNA przypuszczalnie wywodzą się z prageny zgodności tkankowej [19, 54].

W całym królestwie zwierząt, począwszy od gąbek i koralowców, wykazano oprócz mechanizmów obronnych nieswoistych występowanie reakcji odpornościowych o różnym stopniu specyfiki i różnym okresie trwania pamięci immunologicznej. Warto zatem zastanowić się, czy genetycznie uwarunkowana zdolność rozróżniania i „zapamiętywania” napotkanych czynników antygenowych może podlegać działaniu doboru naturalnego.

Cechy te zapewne nie przynoszą korzyści niewielkim organizmom krótko żyjącym o prostym planie budowy, charakteryzującym się ponadto dużą rozrodnością. Cenne są natomiast niezwykle dla zwierząt dużych, długo żyjących, o niewielkiej liczbie potomstwa. W takich organizmach, w skomplikowanych procesach morfogenezy łatwo dochodzi do mutacji mogących wywołać proces nowotworowy. Długowieczne zwierzęta często narażone są na wielokrotne zetknięcie z takim samym

czynnikiem patogennym, a straty osobników nie są wyrównywane dużą rozrodczością [16, 64]. Cechy te przejawiają się u wszystkich kręgowców oraz niektórych zwierząt bezkręgowych, zatem dobór naturalny faworyzujący pamięć immunologiczną i swoistość reakcji odpornościowych działał zapewne na różnych etapach ewolucji.

Następnie należałoby zastanowić się, czy reakcje odpornościowe obserwowane w królestwie zwierząt są względem siebie homologiczne czy analogiczne; innymi słowy, czy są odziedziczone po wspólnych przodkach, czy pojawiły się niezależnie. Aby odpowiedzieć na to pytanie, należy rozpatrzyć komórkowe podłoże zjawisk odpornościowych.

Najwyższy stopień organizacji komórek zaangażowanych w reakcje odpornościowe obserwuje się u kręgowców, u których współpraca limfocytów T i B oraz makrofagów i wolnych przeciwciał warunkuje utrzymanie immunologicznej homeostazy ustroju [80, 98]. Ogólnie akceptowany jest pogląd, że u wszystkich zwierząt występują komórki żerne homologiczne do makrofagów [45, 76, 98]. Przeważa natomiast przekonanie, że homologi limfocytów kręgowców występują jedynie u osłonic [76] bądź też osłonic i szkarłupni [15, 101]. Podobne morfologicznie i funkcjonalnie komórki pierścienic uważa się jedynie za analogiczne do limfocytów kręgowców, ze względu na luźne pokrewieństwo tych zwierząt i brak doniesień o występowaniu tego typu komórek u jamochłonów i gąbek [15, 101]. Podkreślić należy, że w przeszczepach pierścienic i zwierząt wtóroustych pojawia się charakterystyczny naciek złożony z limfocytów i komórek żernych, a reakcje transplantacyjne gąbek i koralowców przebiegają odmiennie, bez udziału takich komórek.

Bardzo niepełne dotychczasowe dane o reakcjach odpornościowych zwierząt bezkręgowych skorelowane z powszechnie akceptowanym (choć nie jedynym) obrazem ewolucji świata zwierzęcego (ryc. 3), pozwalają przypuszczać, że specyficzne reakcje obronne z komponentą pamięci immunologicznej rozwinęły się niezależnie w liniach prowadzących do współczesnych gąbek, jamochłonów, bezkręgowców pierwoustych i zwierząt wtóroustych. Należy oczekiwać, że dalsze badania zweryfikują tę hipotezę.

Praca została częściowo sfinansowana z problemu MR.II.6(3.0.2) „Filogeneza odporności transplantacyjnej”.

LITERATURA

- [1] AKAI H., SATO S., Surface and internal ultrastructure of hemocytes of some insects, [w:] Insect Hemocytes, red. A. P. Gupta, Cambridge Univ. Press, 129–154, 1979.
- [2] BAINTON D. F., The cells of inflammation: a general view, [w:] Handbook

- of Inflammation, vol. 2, red. L. E. Glynn, J. C. Houck, G. Weissmann, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1-25, 1980.
- [3] BERRILL N. J., The Origin of Vertebrates, Oxford Univ. Press, London 1955.
- [4] BIGGER C. H., RUNYAN R., An in situ demonstration of self-recognition in gorgonians, *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 591-598, 1979.
- [5] BREHÉLIN M., HOFFMANN J. A., MATZ G., PORTE A., Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha*, *Cell Tiss. Res.*, **160**: 283-289, 1975.
- [6] BURNET F. M., The Integrity of the Body, Harvard Univ. Press, Cambridge 1963.
- [7] BURNET F. M., „Self-recognition” in colonial marine forms and flowering plants in relation to the evolution of immunity, *Nature*, **232**: 230-235, 1971.
- [8] CARTON Y., Isogenic, allogenic, and xenogenic transplants in an insect species, *Transplantation*, **21**: 17-22, 1976.
- [9] CHENEY D. P., Hard tissue tumors of scleractinian corals, [w:] *Immunologic Phylogeny*, red. W. H. Hildemann, A. A. Benedict, Plenum Press, New York i London, 77-100, 1975.
- [10] CHENG T. C., GUIDA V. G., Hemocytes of *Bulinus truncatus rohlfsi* (*Mollusca: Gactropoda*), *J. Invert. Pathology*, **35**: 158-167, 1980.
- [11] CHORNEY M. J., CHENG T. C., Discrimination of self and non-self in invertebrates, [w:] *Contemporary Topics in Immunobiology*, Vol. 9, red. J. J. Marchalonis, N. Cohen, 37-54, 1980.
- [12] COFFARO K. A., HINEGARDNER R. T., Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*, *Science*, **197**: 1389-1390, 1977.
- [13] COHEN E., Report on the symposium on biomedical applications of *Limulus polyphemus* (horseshoe crab), *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 365-371, 1979.
- [14] COOPER E. L., Characteristic of cell-mediated immunity and memory of annelids, [w:] *Immunologic Phylogeny*, red. W. H. Hildemann, A. A. Benedict, Plenum Press, New York i London, 127-136, 1975.
- [15] COOPER E. L., The earthworm coelomocytes a mediator of cellular immunity, [w:] *Phylogeny of Thymus and Bone-Marrow — Bursa Cells*, red. R. K. Wright, E. L. Cooper, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 9-18, 1976.
- [16] COOPER E. L., L'évolution de l'immunité, *La Recherche*, **10**: 824-833, 1979.
- [17] CORNICK J. W., STEWART J. E., Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts, and associated agglutinin activity, *J. Invert. Pathology*, **31**: 194-203, 1978.
- [18] CRICHTON R., LAFFERTY K. J., The discrimination capacity of phagocytic cells in the chiton (*Liolophura gaimardi*), [w:] *Immunologic Phylogeny*, red. W. H. Hildemann, A. A. Benedict, Plenum Press, New York i London, 89-101, 1975.
- [19] CUNNINGHAM B. A., The structure and function of histomonpatibility antigens, *Sci. Amer.* **1977**: 96-107, 1977.
- [20] CURTIS S. K., COWDEN R. R., Responsiveness of the slug (*Limax maximus*) to injection of fluorescein- and rhodamine-conjugated immunogens. *Develop. Comp. Immunol.*, **2**: 727-733, 1978.
- [21] De SUTTER D., Van de VYWER G., Isolation and recognition properties of some definite sponge cell types, *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 389-397, 1979.
- [22] ERMAK T. H., The hematogenic tissue of tunicates, [w:] *Phylogeny of*

- Thymus and Bone Marrow — Bursa Cells, red. R. K. Wright, E. L. Cooper, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 45–56, 1976.
- [23] FOLEY D. A., CHENG T. C., Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis, *J. Invert. Pathology*, **29**: 321–325, 1977.
- [24] FONTAINE A. R., LAMBERT P., The fine structure of the leucocytes of the holothurian, *Cucumaria miniata*, *Canadian J. Zool.*, **55**: 1530–1544, 1977.
- [25] RFIEDMAN M. M., WEISS L., An electron microscopic study of hemoglobin synthesis in the marine annelid, *Amphitrite ornata* (Polychaeta: Terebellidae), *J. Morphol.*, **164**: 121–138, 1980.
- [26] GRABDA E. (red.), *Zoologia*, tom I: Bezkręgowce, PWN, Warszawa 1972.
- [27] GRYGOŃ B., Nowe badania nad morfologią i funkcją hemolimfy małży (*Bivalvia*), *Przegląd Zool.*, **23**: 313–320, 1979.
- [28] HILDEMANN W. H., Phylogeny of transplantation reactivity, [w:] *Transplantation Antigens*, red. B. D. Kahan, R. A. Reisfeld, Acad. Press, New York i London, 3–74, 1972.
- [29] HILDEMANN W. H., BIGGER C. H., JOHNSTON I. S., Histoincompatibility reactions and allogeneic polymorphism among invertebrates, *Transplantation Proc.*, **11**: 1136–1142, 1979.
- [30] HILDEMANN W. H., BIGGER C. H., JOHNSTON I. S., JOKIEL P. L., Characteristics of transplantation immunity in the sponge, *Callyspongia diffusa*, *Transplantation*, **30**: 362–367, 1980.
- [31] HILDEMANN W. H., JOKIEL P. L., BIGGER C. H., JOHNSTON I. S., Allogeneic polymorphism and alloimmune memory in the coral, *Montipora verrucosa*, *Transplantation*, **30**: 297–301, 1980.
- [32] HILDEMANN W. H., LINTHICUM D. S., VANN D. C., Transplantation and immunocompatibility reactions among reef-building corals, *Immunogenetics*, **2**: 269–284, 1975.
- [33] HILDEMANN W. H., LINTHICUM D. S., VANN D. C., Immunoincompatibility reactions in corals (*Coelenterata*), [w:] *Immunologic Phylogeny*, red. W. H. Hildemann, A. A. Benedict, Plenum Press, New York i London, 105–114, 1975.
- [34] HOFFMANN J. A., Les organes hémopoïétiques de deux insectes orthoptères: *Locusta migratoria* et *Gryllus bimaculatus*, *Z. Zellforsch.*, **106**: 451–472, 1970.
- [35] HOFFMANN J. A., ZACHARY D., HOFFMANN D., BREHÉLIN M., PORTE A., Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects, [w:] *Insect Hemocytes*, red. A. P. Gupta, Cambridge Univ. Press, 29–66, 1979.
- [36] JONKER M., BALNER H., The major histocompatibility complex: a key to a better understanding of evolution, *Transplantation Proc.*, **12**: 575–581, 1980.
- [37] JURA C., Typ: przedstrunowce — *Protochordata*, [w:] *Zoologia. Przedstrunowce i strunowce*, red. Z. Grodziński, PWN, Warszawa, 11–30, 1979.
- [38] KARP R. D., Specific immunoreactivity in echinoderms, [w:] *Phylogeny of Thymus and Bone Marrow — Bursa Cells*, red. R. K. Wright, E. L. Cooper, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 37–44, 1976.
- [39] KARP R. D., RHEINS L. A., Induction of specific humoral immunity to soluble proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*) II. Nature of the secondary response, *Develop. Comp. Immunol.*, **4**: 629–640, 1980.

- [40] KARP R. D., HILDEMANN W. H., Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasteria imbricata*, *Transplantation*, **22**: 434–439, 1976.
- [41] KELLOG S., STEENBERGEN J. F., SCHAPIRO H. C., Isolation of *Pedio-coccus homari*, etiological agent of gaffkemia in lobsters, from a California estuary, *Aquaculture*, **3**: 409–413, 1974.
- [42] KLEIN J., Evolution and function of the major histocompatibility system: facts and speculations, [w:] *The Major Histocompatibility System in Man and Animals*, red. Götze D., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 339–378, 1977.
- [43] KLEIN J., Allograft reaction: atavism or immunological tour de force?, [w:] *Cell Lineage, Stem Cells and Cell Determination* red. Le Douarin N., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 241–250, 1979.
- [44] KLEIN J., The major histocompatibility complex of the mouse, *Science*, **203**: 516–521, 1979.
- [45] KOLB H., On the phylogenetic origin of the immune system A hypothesis, *Develop. Compar. Immunol.*, **1**: 193–206, 1977.
- [46] KSIAŹKIEWICZ M., Hemocyty owadów: powstawanie i ultrastruktura, *Przeł. Zool.*, (w druku).
- [47] LACKIE A. M., Cellular recognition of foreign-ness in two insect species, the American cockroach and the desert locust, *Immunology*, **36**: 909–914, 1979.
- [48] LECLERC M., BRILLOUET C., LUQUET G., The starfish axial organ an ancestral lymphoid organ, *Develop. Compar. Immunol.*, **4**: 605–615, 1980.
- [49] LECLERC M., REDZINIĄK G., PANIJEL J., EL LABABIDI M., Reaction induced in vertebrates by invertebrate cell suspensions I/Specific effects of sea star axial organ cells injection, *Develop. Compar. Immunol.*, **1**: 299–310, 1977.
- [50] LECLERC M., REDZINIĄK G., PANIJEL J., EL LABABIDI M., Reaction induced in vertebrates by invertebrate cell suspension II/Non adherent axial organ cells as effector cells, *Develop. Compar. Immunol.*, **1**: 311–320, 1977.
- [51] LINTHICUM D. S., MARKS D. H., STEIN E. A., COOPER E. L., Graft rejection in earthworms: an electron microscopic study, *Europ. J Immunol.*, **7**: 871–876, 1977.
- [52] LITMAN G. W., KEHOE M. J., The phylogenetic origins of immunoglobulin structure, [w:] *Immunoglobulins*, red. Litman G. W., Good R. A., Plenum Medical Book Company, New York and London, 205–228, 1978.
- [53] MANNING M. J., TURNER R. J., *Comparative Immunobiology*, Blackie, Glasgow and London 1976.
- [54] MARCHALONIS J. J., *Immunity in Evolution*, E. Arnold Ltd., London 1977.
- [55] MARKS D. H., STEIN E. A., COOPER E. L., Chemotactic attraction of *Lumbricus terrestris* coelomocytes to foreign tissue, *Develop. Compar. Immunol.*, **3**: 277–285, 1979.
- [56] MERCER E. H., SUNGH A. P., Endosymbiosis and cellular tolerance in the hawaiian soft coral *Sarcothelia edmondsoni* Verrill, [w:] *Immunologic Phylogeny*, red. Hildemann W. H., Benedict A. A. Plenum Press, New York and London, 69–76, 1975.
- [57] MILANESI C., BURIGHEL P., ZANIOLO G., SABBADIN A., The structure and fate of the test cuticle during the fusion-nonfusion reaction in colonies of *Botryllus schlosseri* (*Tunicata*), *Boll. Zool.*, **45**: 83–86, 1978.

- [58] MUKAI H., Experimental alteration of fusibility in compound ascidians, *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **13**: 51–73, 1967.
- [59] MUKAI H., WATANABE H., On the occurrence of colony specificity in some compound ascidians, *Biol. Bull.*, **147**: 411–421, 1974.
- [60] MUKAI H., WATANABE H., Distribution of fusion incompatibility types in natural populations of the compound ascidian, *Botryllus primigenus*, *Proc. Japan Acad.*, **51**: 44–47, 1975.
- [61] MUKAI H., WATANABE H., Fusibility of colonies in natural populations of the compound ascidian, *Botrylloides violaceus*, *Proc. Japan Acad.*, **51**: 48–50, 1975.
- [62] MÜLLER W. E., KURELEC B., ZAHN R. K., MÜLLER I., VAITH P., UHLENBRUCK G., Aggregation of sponge cells, Function of a lectin in its homologous biological system. *J. Biol. Chem.*, **254**: 7479–7481, 1979.
- [63] NEUWIRTH M., The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), *J. Morph.*, **139**: 105–124, 1973.
- [64] NICHOLLS E. M., The evolution of the immune system, *Med. Hypotheses*, **5**: 225–237, 1979.
- [65] NICOLSON G. L., The interactions of lectins with animal cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **39**: 90–190, 1974.
- [66] PISTOLE T. G., Broad-spectrum bacterial agglutinating activity in the serum of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, *Develop. Compar. Immunol.*, **2**: 65–76, 1978.
- [67] PŁYTYCZ B., Filogeneza układu odpornościowego kręgowców, *Postępy Biol. Kom.*, **7**: 233–265, 1980.
- [68] PŁYTYCZ B., The MHC: analyzing allograft rejection patterns in urodele and anurian amphibians. *Develop. Compar. Immunol.*, **5**: 5–14, 1981.
- [69] PŁYTYCZ B., Filogeneza odporności transplantacyjnej kręgowców, *Przegl. Zool.*, **25**: 15–26, 1981.
- [70] PŁYTYCZ B., MAKIEL K., SKOWROŃSKA A., ROSZAK A., Rejection of skin allografts in two geographically distant populations of *Triturus vulgaris* (L) and *T. cristatus* (Laurenti), *Bull. Acad. Pol. Sci., ser Biol.*, **26**: 431–439, 1978.
- [71] PTAK W., *Podstawy immunologii*, PZWL, Warszawa 1976.
- [72] RAISON R. L., HULL C. J., HILDEMANN W. H., Allogeneic graft rejection in *Montipora verrucosa*, a reef — building coral, [w:] *Phylogeny of Thymus and Bone Marrow — Bursa Cells*, red. Wright R. K., Cooper E. L., North/Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 3–8, 1976.
- [73] RATCLIFFE N. A., GAGEN S. J., Cellular defence reactions of insect hemocytes in vivo: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae, *J. Invertebr. Pathol.*, **28**: 373–382, 1976.
- [74] RATCLIFFE N. A., GAGEN S. J., Studies on in vivo cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*, *Tissue Cell*, **9**: 73–85, 1977.
- [75] RATCLIFFE N. A., ROWLEY A. F., Role of hemocytes in defence against biological agents, [w:] *Insect Hemocytes*, red. Gupta A. P., Cambridge University Press, 331–414, 1979.
- [76] RATCLIFFE N. M., ROWLEY A. F., A comparative synopsis of the structure and function of blood cells of insects and other invertebrates, *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 189–222, 1979.
- [77] ROCH P., Leucocyte DNA-synthesis in grafted lumbricids: an approach to

- study histocompatibility in invertebrates, *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 417-428, 1979.
- [78] ROCH P., Analyses in vitro du role des leucocytes au cours des réponses immunitaires chez un invertébré: Le Lombricien *Eisenia fetida*, Thèse de doctorat, Bordeaux 1, 648, 1980.
- [79] ROCH P., VALEMBOIS P., Evidence for concanavalin A-receptors and their redistribution on lumbricid leucocytes, *Develop. Comp. Immunol.*, **2**: 51-64, 1978.
- [80] ROITT I., *Essential immunology*, Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne 1980.
- [81] ROMER A. S., PARSON T. S., *The Vertebrate Body*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 1978.
- [82] SATO S., AKAI H., SAWADA H., An ultrastructural study of capsule formation by *Bombyx hemocytes*, *Annot. Zool. Jpn.*, **49**: 177-188, 1976.
- [83] SCHAPIRO H. C., Immunity in decapod crustaceans, *Amer. Zool.*, **15**: 13-19, 1975.
- [84] SCHAPIRO H. C., MATHEWSON J. H., STEENBERGEN J. F., KELLOGG S., INGRAM C., NIERENGARTEN G., RABIN H., Gaffkemia in the California spiny lobster, *Panulirus interruptus*: infection and immunization, *Aquaculture*, **3**: 403-408, 1974.
- [85] SLOAN B., YOCUM C., CLEM L. W., Recognition of self from non-self in crustaceans, *Nature*, **258**: 521-523, 1975.
- [86] SMINIA T., BARENDSSEN L., A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus*, *J. Morph.*, **165**: 31-39, 1980.
- [87] SMINIA T., BORGHART-REINDERS E., Van de LINDE A. W., Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*, An electron microscopic and autoradiographic study, *Cell Tiss. Res.*, **153**: 307-326, 1974.
- [88] SMINIA T., Van der KNAPP W. P. W., EDELENBOSCH P., The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 37-44, 1979.
- [89] STERN SHEIN D. J., BURTON P. R., Light and electron microscopic studies of crayfish hemocytes, *J. Morph.*, **165**: 67-83, 1980.
- [90] THEODOR J. L., CARRIERE J., Direct evidence of heterolysis of gorgonian target cells, [w:] *Immunologic Phylogeny*, red. Hildemann W. H., Benedict A. A., Plenum Press, New York and London, 101-104, 1975.
- [91] TOUPIN J., LAMOUREUX G., Coelomocytes of earthworms: the T-cell-like rosette, *Cell. Immunol.*, **26**: 127-132, 1976.
- [92] TOUPIN J., LAMOUREUX G., Coelomocytes of earthworms: phytohemagglutinin (PHA) responsiveness, [w:] *Phylogeny of Thymus and Bone Marrow — Bursa Cells*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 19-26, 1976.
- [93] UHLENBRUCK G., STEINHAUSEN G., Tridacnins: symbiosis-profit or defence-purpose?, *Develop. Comp. Immunol.*, **1**: 183-192, 1977.
- [94] VAITH P., MULLER W. E. G., UHLENBRUCK G., On the role of D-glucuronic acid in the aggregation of cells from marine sponge *Geodia cydonium*, *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 259-275, 1979.
- [95] VAITH P., UHLENBRUCK G., HOLTZ G., Anti-glucuronyl activity of

- Limulus polyphemus* agglutinin, [w:] Protides of Biological Fluids, red. H. Peeters, Pergamon Press, Oxford i New York, 455–458, 1979.
- [96] VAITH P., UHLENBRUCK G., MÜLLER W. E. G., COHEN E., Reactivity of *Limulus polyphemus* hemolymph with D-glucuronic acid containing glycosubstances, [w:] Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*), red. E. Cohen, A. R. Liss Inc., New York, 579–587, 1979.
- [97] VAITH P., UHLENBRUCK G., MÜLLER W. E. G., HOLTZ G., Sponge aggregation factor and sponge hemagglutinin: possible relationships between two different molecules, *Develop. Comp. Immunol.*, **3**: 399–416, 1979.
- [98] VAREGIO L., LANDOLFO S., GIOVARELLI M., FARNI G., The macrophage as the social interconnection within the immune system, *Develop. Comp. Immunol.*, **4**: 11–19, 1980.
- [99] WARR G. W., On T cells in invertebrates, *Develop. Comp. Immunol.*, **2**: 555–558, 1978.
- [100] WARR G. W., MARCHALONIS J. J., Specific immune recognition by lymphocytes: an evolutionary perspective, *Quart. Rev. Biol.*, **53**: 225–241, 1978.
- [101] WRIGHT R. K., Phylogenetic origin of the vertebrate lymphocyte and lymphoid tissue, [w:] Phylogeny of Thymus and Bone Marrow — Bursa Cells, red. R. K. Wright, E. L. Cooper, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 57–70, 1976.
- [102] ZACHARY D., HOFFMAN J. A., The haemocytes of *Callifora erythrocephala* (Meig.) (*Diptera*), *Z. Zellforsch.*, **141**: 55–73, 1973.

Otrzymano: 22 maja 1981.

Przyjęto: 30 listopada 1981.

Adres autorek: ul. M. Karasia 6, 30-060 Kraków.

ZASTOSOWANIE ANALIZY DYSKRYMINACYJNEJ W BADANIACH MORFOMETRYCZNYCH KOMÓREK

DISCRIMINATION ANALYSIS APPLIED IN MORPHOMETRIC STUDY OF CELLS

Wojciech Marek BARAN

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej,
Warszawa

Streszczenie. W artykule omówiono jedną ze statystycznych analiz wielu zmiennych, tj. analizę dyskryminacyjną. Jest to metoda, którą można stosować w przypadku porównywania wielu grup badanych o dużej liczbie zmiennych parametrów. W podanym przykładzie dotyczącym badań morfometrycznych komórek metoda ta pozwoliła na wyznaczenie zespołów cech najbardziej różniących rozpatrywane grupy.

Summary. The paper discusses a multivariate statistical analysis, that is discrimination analysis. This method can be used when many groups are examined with a large number of variable parameters. In the here presented example of morphometric study of cells this method allows to establish sets of characters which show the widest differences between the studied groups.

1. WPROWADZENIE

W analizie morfometrycznej materiału biologicznego coraz częściej stosuje się metody statystyczne, które warunkują obiektywną ocenę obserwowanych zjawisk, eliminują subiektywizm i pozwalają na określenie stopnia homogenności badanych próbek.

W danym układzie doświadczeń wybór właściwej metody statystycznej jest bardzo istotnym czynnikiem pozwalającym na uzyskanie prawidłowej oceny. Szczególne trudności w wyborze właściwej metody analizy statystycznej występują wówczas, kiedy doświadczenie obejmuje liczne grupy scharakteryzowane na podstawie wielu parametrów, z których każdy może mieć różne wartości. W takim przypadku godną polecenia jest rzadko stosowana metoda statystyczna zwana analizą dyskryminacyjną. Pozwala ona na porównanie ze sobą wielu (g) grup złożonych z n_g elementów, które cechuje m parametrów (zmiennych). Analiza ta ma za zadanie uzyskanie jak najlepszego rozdzielenia tych grup, tj. znalezienia takich zmiennych,

które najbardziej różnią je pomiędzy sobą, a także określenie przynależności elementu o m parametrach do danej grupy.

Ze względu na konieczność jednoczesnego operowania dużą liczbą danych i złożoność obliczeń, w rozwiązywaniu tego typu problemów wskazane jest korzystanie z elektronicznej techniki obliczeniowej [8].

2. PODSTAWOWE ZAŁOŻENIA MATEMATYCZNE ANALIZY DYSKRYMINACYJNEJ

Warunkiem, jaki musi być spełniony przy posługiwaniu się analizą dyskryminacyjną jest normalność rozkładu wszystkich badanych zmiennych. Niektórzy jednak autorzy, np. [4], opisują metody statystyczne bardzo podobne do analizy dyskryminacyjnej, które stosuje się dla zmiennych zero-jedynkowych.

Analizę dyskryminacyjną przeprowadza się w następujących etapach:

A. Wstępna analiza korelacyjna, w której obliczane są:

- średnie i macierze dyspersji będące podstawą do dalszej analizy dyskryminacyjnej,
- współzależności pomiędzy zmiennymi (korelacja).

B. Test istotności różnic pomiędzy grupami mający na celu sprawdzenie niejednorodności badanej populacji (w przypadku populacji jednorodnej dalszej analizy nie przeprowadza się).

C. Znalezienie liniowych z założenia funkcji dyskryminacyjnych.

D. Klasyfikacja, która na podstawie określonego kryterium pozwala na zakwalifikowanie nowego obiektu do jednej z grup przez pomiar tych samych zmiennych.

2.1. WSTĘPNA ANALIZA KORELACYJNA

W interpretacji geometrycznej dany element o m cechach jest punktem w przestrzeni m -wymiarowej [1]. Każda jego współrzędna jest wynikiem jednego z m testów przeprowadzonych w celu określenia cech elementów. Toteż k -ty element można opisać za pomocą wektora:

$$\mathbf{x}'_k = [x_{k1}, x_{k2}, \dots, x_{km}]. \quad (1)$$

Dla każdej grupy badanych elementów należy określić jej „środek ciężkości”, którego współrzędnymi będą średnie arytmetyczne z grupy wyników kolejnych m testów:

$$\bar{\mathbf{x}}' = [\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_m].$$

W podobny sposób należy określić „środek ciężkości” dla całego doświadczenia, tj. wszystkich grup łącznie, obliczając odpowiednie średnie ze wszystkich N elementów ($N = \sum_{k=1}^g n_k$). W dalszym tekście pojęcie „środka ciężkości” będzie często zastępowane pojęciem średniej.

W celu określenia rozrzutów wszystkich zmiennych, jak i znalezienia związków pomiędzy nimi tworzy się grupowe macierze dyspersji o wyrazach S_{ij} :

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^{n_g} x_{ki} x_{kj} - \frac{\sum_{k=1}^{n_g} x_{ki} \sum_{k=1}^{n_g} x_{kj}}{n_g}}{n_g - 1}, \quad i, j = 1, 2, \dots, m. \quad (2)$$

Wyrazy diagonalne (na przekątnej) S_{ii} macierzy są estymatorami wariancji [7], a pierwiastki kwadratowe z nich estymatorami odchyłeń standardowych kolejnych zmiennych:

$$SD_i = \sqrt{S_{ii}}. \quad (3)$$

Wyrazy pozadiagonalne S_{ij} ($i \neq j$) są estymatorami kowariancji [7] poszczególnych par zmiennych i określają stopień współzależności statystycznej między nimi.

Najczęściej jednak w celu scharakteryzowania wzajemnego związku pomiędzy parami zmiennych wprowadza się parametr zwany współczynnikiem korelacji:

$$r_{ij} = \frac{S_{ij}}{SD_i SD_j}, \quad i, j = 1, 2, \dots, m. \quad (4)$$

Współczynnik korelacji w porównaniu z kowariancją ma tę zaletę, że jest wielkością bezwymiarową o wartości ograniczonej zawsze do przedziału $\langle -1, +1 \rangle$. Dla pary zmiennych niezależnych jest on równy 0.

Należy pamiętać, że z zerowania się współczynnika korelacji nie można wnosić o niezależności zmiennych. Z kolei wartości r_{ij} równe ± 1 otrzymuje się dla liniowej zależności pomiędzy zmiennymi. Współczynniki korelacji dla wszystkich par zmiennych w danej grupie można ułożyć w grupową macierz korelacji (\hat{R}_{ij}). W analogiczny sposób znajduje się macierz dyspersji \hat{D} i korelacji R dla całej próbki, tj. wszystkich grup w danym doświadczeniu.

2. 2. TEST ISTOTNOŚCI RÓŻNIC POMIĘDZY GRUPAMI

Przed przystąpieniem do właściwej analizy dyskryminacyjnej należy sprawdzić, czy dokonany wstępnie podział na grupy nie jest przypadkowy, tzn. czy nie zostały one wyodrębnione z populacji jednorodnej. W statystyce sprowadza się to do postawienia pewnej hipotezy [7] i przetestowania jej. W opisywanej tu analizie brzmieć będzie ona następująco: „W przypadku jednorodnej populacji (z której wyodrębniono grupy) zachodzi równość „środków ciężkości” grup [5]”.

W celu przetestowania tej hipotezy wprowadza się dwie macierze \hat{T} i \hat{W} , których elementy zdefiniowane są następująco:

$$T_{ij} = \sum_{n=1}^N (x_{in} - \bar{x}_i)(x_{jn} - \bar{x}_j), \quad (5)$$

$$W_{ij} = \sum_{k=1}^g \left(\sum_{n=1}^{n_g} (x_{ikn} - \bar{x}_{ik})(x_{jkn} - \bar{x}_{jk}) \right), \quad i, j = 1, \dots, m. \quad (6)$$

Macierz \hat{T} reprezentuje sumy kwadratów i iloczynów mieszanych odchyłeń od „środka ciężkości” całej próbki dla wszystkich N elementów.

Macierz \hat{W} jest sumą grupowych macierzy \hat{W}_k , z których każda reprezentuje sumy kwadratów i iloczynów mieszanych odchyłeń od grupowego „środka ciężkości” dla wszystkich elementów grupy:

$$\hat{W} = \sum_{k=1}^g \hat{W}_k. \quad (7)$$

Stosunek wyznaczników macierzy \hat{W} i \hat{T} nosi nazwę „lambdy Wilksa”:

$$\Lambda = \frac{|\hat{W}|}{|\hat{T}|}, \quad 0 < \Lambda \leq 1. \quad (8)$$

Wielkość ta jest miarą jednorodności próbki i przyjmuje wartości bliskie 0 w przypadku populacji niejednorodnej, a bliskie 1 dla jednorodnej.

Wprowadzając parametry pomocnicze:

$$s = \sqrt{(m^2q^2 - 4):(m^2 + q^2 - 5)}, \quad q = g - 1, \quad (9)$$

$$k = n - (m + q + 1):2, \quad n = N - 1, \quad (10)$$

$$\lambda = -(mq - 2):4, \quad (11)$$

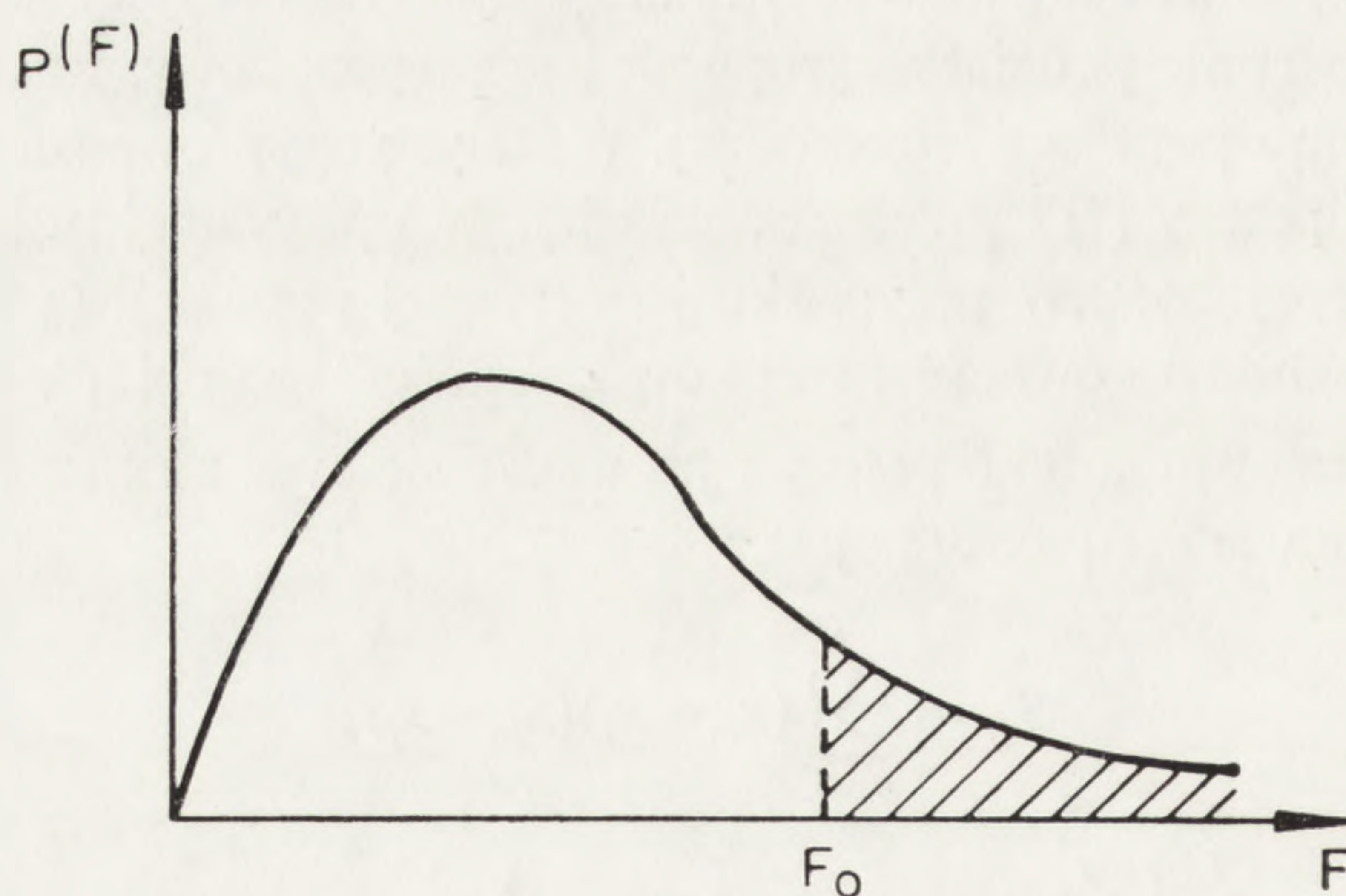
$$r = mq:2, \quad (12)$$

$$y = \Lambda^{1/s}, \quad (13)$$

gdzie znaczenie m , n i g określone zostało wcześniej, otrzymujemy zmienną

$$F_{ks+2\lambda}^{2r} = \left(\frac{1-y}{y} \right) \left(\frac{ks+2\lambda}{2r} \right) = F_{f_1}^{f_2} \quad (14)$$

mającą zgodnie z [2] i [3] rozkład F Snedecora o stopniach swobody $f_1 = 2r$ i $f_2 = ks + 2\lambda$. Opisuje ona stopień zróżnicowania grup (zależność od Λ). Dla grup



Ryc. 1. Krzywa gęstości prawdopodobieństwa zmiennej losowej F

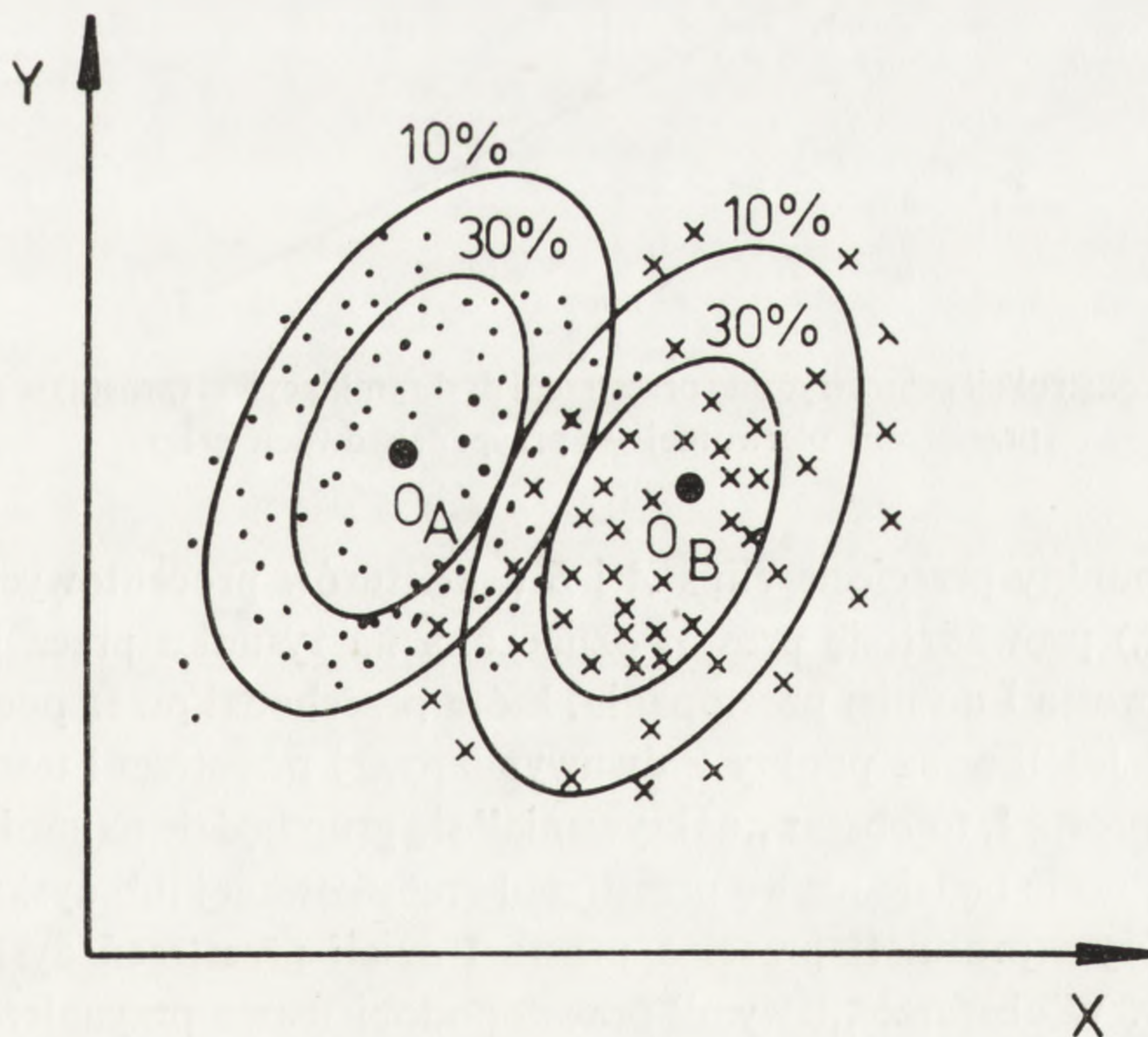
nieznacznie różniących się przyjmuje ona małe wartości, a dla zdecydowanie różnych — duże. Zmienna F jest zmienną losową i jej wartość zależy od sposobu tworzenia grup. W danym przypadku wartość ta będzie równa F_0 . Interesujące jest prawdopodobieństwo otrzymania na drodze losowego wyboru wartości zmiennej F większych od F_0 , czyli prawdopodobieństwo otrzymania jeszcze większych różnic pomiędzy grupami (ryc. 1). Prawdopodobieństwo to wyraża się wzorem o postaci

$$p(F > F_0) = \int_{F_0}^{+\infty} p(F) dF. \quad (15)$$

Gdy F_0 jest wielkością małą, prawdopodobieństwo to osiąga duże wartości (bliskie 1). Twierdzi się wówczas, że różnice pomiędzy grupami powstały na drodze losowej — postawiona hipoteza zostaje przyjęta. Gdy F_0 jest wielkością dużą, prawdopodobieństwo otrzymania $F > F_0$ jest niewielkie. Można więc stwierdzić, że różnice pomiędzy grupami są istotne i nieprzypadkowe — hipoteza zostaje odrzucona.

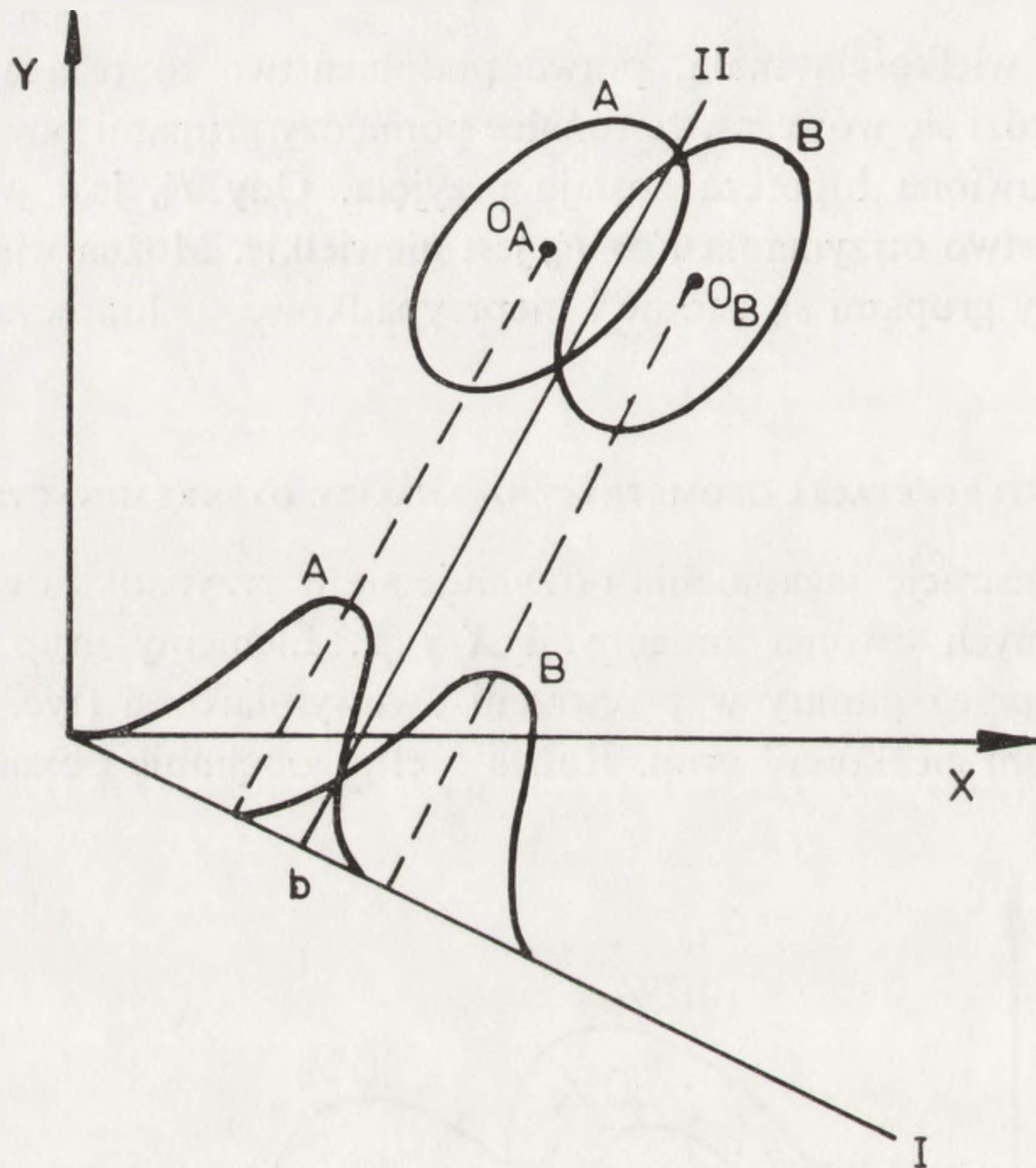
2.3. INTERPRETACJA GEOMETRYCZNA ANALIZY DYSKRYMINACYJNEJ

Poglądową ilustrację zagadnienia otrzymuje się w przypadku dwóch grup A i B scharakteryzowanych dwoma zmiennymi X i Y . Elementy grup będą wówczas reprezentowane przez punkty w przestrzeni dwuwymiarowej (ryc. 2). Punkty O_A i O_B są „środkami ciężkości” grup. Każda z elips obejmuje obszar, poza którym



Ryc. 2. Przykładowy układ elementów dwóch grup (A, B) w przestrzeni dwuwymiarowej z uwzględnieniem „konturów procentowych”

zawiera się np. 10% elementów danej grupy. Elipsa taka nosi nazwę „konturu procentowego”. Tylko w nielicznych przypadkach dochodzi do dobrego rozdzielania obu grup przez jedną ze zmiennych, tzn. że obszar pokrywania się grup, zrzutowany na jedną z osi (X lub Y) będzie najmniejszy z możliwych. W ogólnym przypadku należy szukać przestrzeni, w której dochodzi do najlepszego rozdzielania się grup. W przypadku dwóch grup i dwóch zmiennych będzie to prosta (z założenia). Jej konstrukcję geometryczną ilustruje ryc. 3.



Ryc. 3. Ilustracja konstrukcji geometrycznej przestrzeni dyskryminacyjnej (prosta) w dwuwymiarowej przestrzeni pierwotnej — przypadek dwóch grup

Przez dwa punkty przecięcia elips A i B („konturów procentowych” — w tym przypadku 10%) prowadzi się prostą, oznaczoną na rysunku przez II. Następnie konstruuje się prostą I do niej prostopadłą, która przechodzi przez początek układu współrzędnych. Jeżeli teraz punkty z dwuwymiarowej przestrzeni testowej zostaną zrzutowane na prostą I, to obszar „nakrywania” się grup będzie najmniejszy z możliwych. Prosta ta nosić będzie nazwę przestrzeni zredukowanej lub dyskryminacyjnej. Punkt b , w którym prosta II przecina prostą I dzieli przestrzeń dyskryminacyjną na dwa obszary. W obszarze „lewym” prawdopodobieństwo przynależności punktu do grupy A jest znacznie większe niż do grupy B , w obszarze „prawym” — odwrotnie.

2.4. FORMALIZM ALGEBRAICZNY ANALIZY DYSKRYMINACYJNEJ

Odwzorowanie przestrzeni zmiennych pierwotnych na przestrzeń dyskryminacyjną nosi nazwę funkcji dyskryminacyjnej. W przytoczonym przykładzie występowała jedna taka funkcja będąca kombinacją liniową zmiennych pierwotnych X, Y . Zagadnienie to można rozszerzyć na większą liczbę grup i zmiennych (g -grup i m -zmiennych). Wzrasta wówczas wymiar przestrzeni dyskryminacyjnej, gdyż jest on określony przez minimum z liczb $g-1$ i m [5]. Liczba funkcji dyskryminacyjnych, będących również kombinacjami liniowych zmiennych pierwotnych, jest równa wymiarowi przestrzeni zredukowanej. Należy znaleźć jawną postać tych funkcji. W tym celu wprowadza się macierz \hat{A} zdefiniowaną jako $\hat{A} = \hat{T} - \hat{W}$ (\hat{T} i \hat{W} określone przez (5) i (6)). Jej wyrazy mają postać

$$a_{ij} = \sum_{k=1}^g n_g (\bar{x}_{ik} - \bar{x}_i)(\bar{x}_{jk} - \bar{x}_j). \quad (16)$$

Macierz ta reprezentuje międzygrupowe iloczyny mieszane odchyleń „środków” grup od „środków ciężkości” całej próbki. Najlepsze rozdzielenie grup uzyskuje się znajdując przestrzeń, w której odległości „środków” grup od „środków ciężkości” całej próbki będą możliwie największe w porównaniu z odległościami elementów danej grupy od jej „środków ciężkości”. Odpowiada to zmaksymalizowaniu ilorazu form kwadratowych:

$$\frac{\mathbf{v}' \hat{A} \mathbf{v}}{\mathbf{v}' \hat{W} \mathbf{v}} = \lambda \quad (\mathbf{v}' - \text{transpozycja wektora } \mathbf{v}). \quad (17)$$

Iloraz ten jest liczbą. Należy więc znaleźć wszystkie możliwe wektory \mathbf{v} (ozn. \mathbf{v}_i), którym odpowiadające λ_i są maksymalne:

$$\lambda_i = \frac{\mathbf{v}_i' \hat{A} \mathbf{v}_i}{\mathbf{v}_i' \hat{W} \mathbf{v}_i}, \quad i = 1, \dots, r, \quad (18)$$

$$r = \min(g-1, m).$$

Prowadzi to do równania macierzowego:

$$(\hat{W}^{-1} \hat{A} - \lambda \hat{I}) \mathbf{v} = 0. \quad (19)$$

λ_i są wartościami własnymi macierzy $\hat{W}^{-1} \hat{A}$, a wektory \mathbf{v}_i — wektorami własnymi. Każdy z wektorów \mathbf{v}_i reprezentuje jedną funkcję dyskryminacyjną. Współrzędne tych wektorów są współczynnikami kombinacji liniowych zmiennych pierwotnych w tych funkcjach. Procentowy udział wartości własnych w śladzie macierzy $\hat{W}^{-1} \hat{A}$ wyraża wzór o postaci

$$100 \cdot \left(\frac{\lambda_i}{\sum_{i=1}^r \lambda_i} \right), \quad (20)$$

który określa wkład określającej jej funkcji dyskryminacyjnej w rozdzielenie grup.

Za pomocą wartości własnych macierzy $\hat{W}^{-1}\hat{A}$ określa się również „lambdę Wilksa” (8), która wówczas ma postać

$$\Lambda = \prod_{i=1}^r \left[\frac{1}{(1+\lambda_i)} \right]. \quad (21)$$

Aby przeanalizować wkład kolejnych zmiennych w funkcjach dyskryminacyjnych, tworzy się tzw. wektory wyskalowane (v_i^{skal}). Powstają one przez pomnożenie kolejnych j współrzędnych wektorów własnych (v_{ij}) przez pierwiastki kwadratowe z odpowiadających tym samym zmiennym wyrazów na diagonalu macierzy \hat{W}_i (w_{jj}):

$$V_{ij}^{\text{skal}} = v_{ij} \cdot \sqrt{w_{jj}}, \quad \begin{array}{l} i = 1, \dots, r, \\ j - \text{współrzędna}, \\ j = 1, \dots, m. \end{array} \quad (22)$$

W celu uzyskania ilustracji graficznej rozdzielenia grup transponuje się grupowe „środki ciężkości” oraz macierze dyspersji z przestrzeni pierwotnej do zredukowanej. Współrzędne tych „środków” w nowej przestrzeni otrzymuje się przez podziałanie kolejnymi funkcjami dyskryminacyjnymi na średnie grupowe z przestrzeni pierwotnej. W notacji macierzowej [6] można to zapisać następująco:

$$\hat{C}_{(r,g)} = \hat{V}'_{(r,m)} \hat{M}_{(m,g)}, \quad \hat{V}'_{(r,m)} = \hat{V}_{(m,r)}^T, \quad (23)$$

gdzie $\hat{V}_{(m,r)}$ jest macierzą wektorów własnych ustawionych w kolumnach, $\hat{M}_{(m,g)}$ — macierzą średnich grupowych w przestrzeni pierwotnej, ustawionych w kolumnach, $\hat{C}_{(r,g)}$ zaś macierzą grupowych „środków ciężkości” w przestrzeni zredukowanej, ustawionych w kolumnach.

Grupowe macierze dyspersji otrzymuje się według wzoru o postaci

$$\hat{D}\hat{D}_{g(r,r)} = \hat{V}'_{(r,m)} \hat{D}_{g(m,m)} \hat{V}_{(m,r)}, \quad (24)$$

gdzie $\hat{D}\hat{D}_{g(r,r)}$ jest grupową macierzą dyspersji w przestrzeni zredukowanej, $\hat{D}_{g(m,m)}$ zaś grupową macierzą dyspersji w przestrzeni pierwotnej.

2. 5. KLASYFIKACJA

Problem określenia przynależności grupowej nowego obiektu (komórki) o m cechach sprowadza się do zanalizowania prawdopodobieństw g hipotez dotyczących zaklasyfikowania obiektu do każdej z grup. Zapisać to można symbolem

$$P(H_j/\mathbf{x}_i), \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, N, \\ j = 1, \dots, g. \end{array} \quad (25)$$

Symbol ten oznacza prawdopodobieństwo przynależności do j -tej grupy (j -ta hipoteza) obiektu określonego wektorem \mathbf{x}_i . Zadaniem klasyfikacji jest wybór dla

tego obiektu hipotezy najbardziej prawdopodobnej. Rozmiar wprowadzonego uprzednio „konturu procentowego” (różne wartości wyrażone w %) określa się formą kwadratową

$$\chi_g^2 = \mathbf{x}'_i \hat{D}_g \mathbf{x}_i, \quad (26)$$

gdzie

$$\mathbf{x}'_i = [x_{1i} - \bar{x}_1, x_{2i} - \bar{x}_2, \dots] \quad i = 1, \dots, m.$$

Pojęcie „konturu procentowego” ma sens dla dowolnego wymiaru przestrzeni m .

W celu określenia przynależności grupowej danego obiektu, oblicza się dla niego g wartości χ_g^2 bazując odpowiednio na średniej i macierzy dyspersji każdej z g -grup. Prawdopodobieństwo zaklasyfikowania badanego obiektu do każdej z grup określa się wzorem Bayesa [5],

$$P(H_j/\mathbf{x}_i) = \frac{\frac{P_j}{|\hat{D}_j|^{1/2}} e^{-\chi_j^2/2}}{\sum_k \frac{P_k}{|\hat{D}_k|^{1/2}} e^{-\chi_k^2/2}}, \quad k = 1, 2, \dots, j, \dots, g, \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (27)$$

gdzie p_j (p_k) jest prawdopodobieństwem a priori odzwierciedlającym względną częstość występowania elementu grupy j przy losowym wyborze ze zmieszanej populacji.

Kryterium klasyfikacyjne formułuje się następująco: punkt jest zaklasyfikowany do tej grupy, dla której prawdopodobieństwo $P(H_j/\mathbf{x}_i)$ jest najwyższe.

3. PRZYKŁAD ZASTOSOWANIA ANALIZY DYSKRYMINACYJNEJ W BADANIACH KOMÓREK

Celem ukazania przydatności powyższej metody w badaniach komórki dokonano obliczeń dla populacji komórek, w skład której wchodziły trzy grupy (ozn. I, II, III). Wybrano pięć cech charakteryzujących każdą z komórek, a mianowicie: 1. objętość jądra, 2. objętość jąderka, 3. objętość mitochondriów, 4. objętość lizosomów, 5. objętość aparatu Golgiego. Wielkości te były zmiennymi w przeprowadzonej analizie dyskryminacyjnej.

3.1. WSTĘPNA ANALIZA KORELACYJNA

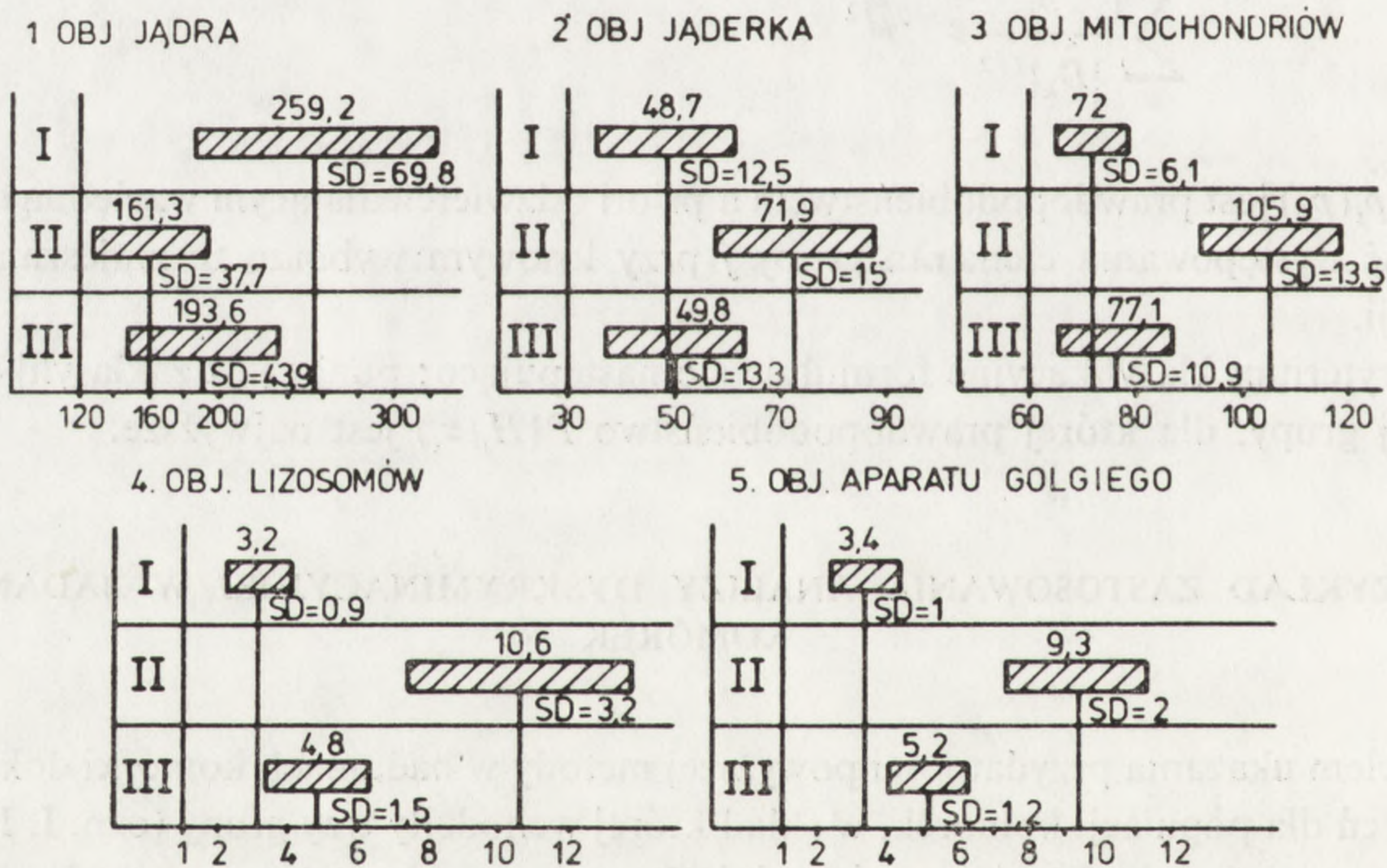
Wartości średnie zmiennych pierwotnych oraz odchylenia standardowe dla poszczególnych grup i dla całej próbki zamieszczono w tab. 1. Wyniki graficznie przedstawiono na ryc. 4. Analiza grupowych macierzy korelacji oraz macierzy kore-

lacji dla całej próbki nie wykazała istnienia znamiennej korelacji dla każdej z par zmiennych.

TABELA 1

Wartości średnie i odchylenia standardowe dla poszczególnych grup i całej próbki w przestrzeni pierwotnej

| Wyszczególnienie | Grupa I | | Grupa II | | Grupa III | | Cała próbka | |
|---------------------------|---------|------|----------|------|-----------|------|-------------|------|
| | średnie | S.D. | średnie | S.D. | średnie | S.D. | średnie | S.D. |
| Objętość jądra | 259,2 | 69,8 | 161,3 | 37,7 | 193,6 | 43,9 | 204,7 | 49,7 |
| Objętość jąderka | 48,7 | 12,5 | 71,9 | 14,9 | 49,8 | 13,3 | 56,8 | 17,9 |
| Objętość mitochondriów | 72,0 | 6,1 | 105,9 | 13,5 | 77,1 | 10,8 | 85,0 | 15,9 |
| Objętość lizosomów | 3,16 | 0,89 | 10,57 | 3,24 | 4,84 | 1,49 | 6,19 | 3,82 |
| Objętość aparatu Golgiego | 3,42 | 1,02 | 9,26 | 2,07 | 5,15 | 1,17 | 5,94 | 2,01 |



Ryc. 4. Współrzędne grupowych „środków ciężkości” i odchylenia standardowe zmiennych w przestrzeni pierwotnej

3.2. ANALIZA DYSKRYMINACYJNA

Przeprowadzenie testu hipotezy o jednorodności populacji wykazało, że różnice pomiędzy grupami są istotne i nieprzypadkowe. Dalsze obliczenia zostały przeprowadzone według schematu przedstawionego w punkcie 2.4. Otrzymano następujące wyniki:

— wartości własne macierzy $\hat{W}^{-1}\hat{A}$: $\lambda_1 = 3,702$, $\lambda_2 = 0,105$,

- ślad macierzy $\hat{W}^{-1}\hat{A}$: $TR = 3,807$,
- procentowy udział wartości własnych w śladzie: $\lambda_1(97,3\%)$, $\lambda_2(2,7\%)$.

Przestrzeń zredukowana jest przestrzenią dwuwymiarową, co można było przewidzieć na podstawie ilości grup i zmiennych. Funkcje dyskryminacyjne (wektory własne macierzy $\hat{W}^{-1}\hat{A}$) przedstawiały się jak w tabeli 2.

TABELA 2

Funkcje dyskryminacyjne $D1$,
 $D2$ (wektory własne macierzy
 $\hat{W}^{-1}\hat{A}$)

| Zmienna | $D1$ | $D2$ |
|---------|--------|--------|
| 1 | -0,137 | -0,153 |
| 2 | -0,052 | -0,105 |
| 3 | 0,013 | -0,141 |
| 4 | -0,406 | -0,516 |
| 5 | -0,902 | 0,824 |

TABELA 3

Wektory wyskalowane $W1$, $W2$

| Zmienna | $W1$ | $W2$ |
|---------|----------|----------|
| 1 | -24,566* | -27,519 |
| 2 | -10,934 | -22,383 |
| 3 | 8,183 | -91,685* |
| 4 | -15,054 | -19,176 |
| 5 | -22,473* | 20,520 |

* Współrzędne odpowiadające zmiennym mającym największy wkład w rozdzielenie grup

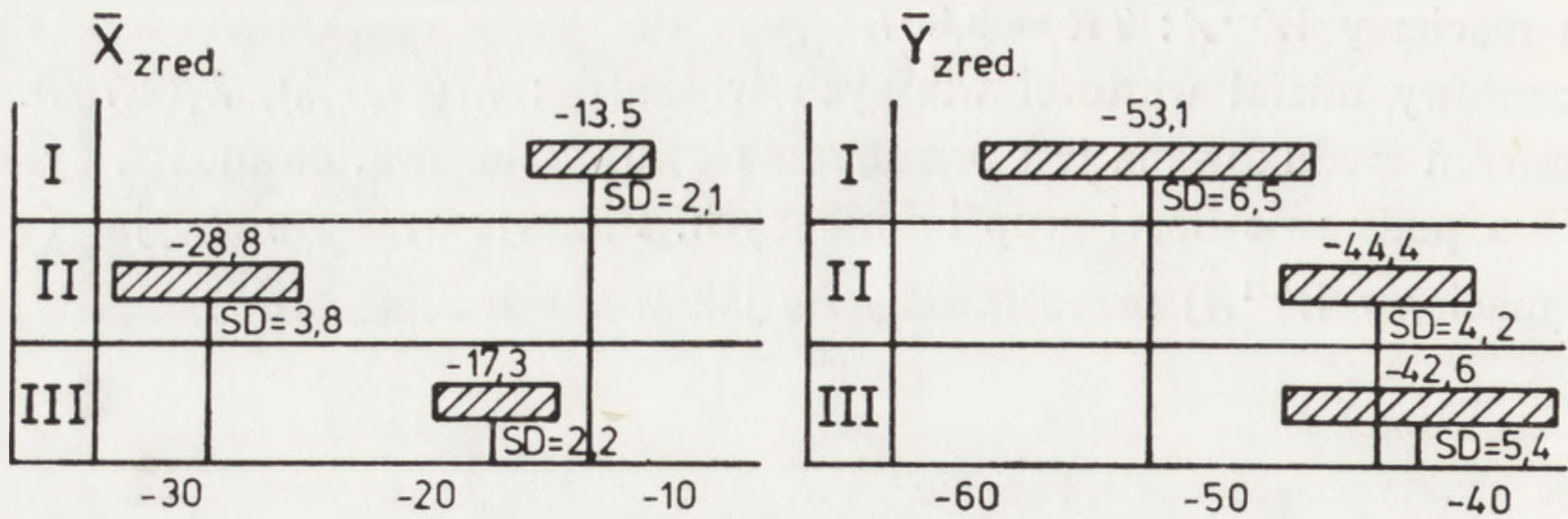
Funkcja dyskryminacyjna $D1$ odpowiada wartości własnej λ_1 , funkcja $D2$ — wartości własnej λ_2 . W tabeli 3 przedstawiono wektory wyskalowane (patrz (22)). W obu przypadkach, celem skrócenia zapisu, nazwy zmiennych zastąpiono ich numerami, zachowując kolejność ustaloną wcześniej.

TABELA 4

Grupowe „środki ciężkości” i odchylenia standardowe w przestrzeni zredukowanej

| Wyszczególnienie | I | II | III |
|------------------|---------|---------|---------|
| \bar{X}_{zred} | -13,457 | -28,801 | -17,273 |
| S.D. | 2,061 | 3,979 | 2,205 |
| \bar{Y}_{zred} | -53,135 | -44,411 | -42,644 |
| S.D. | 6,517 | 4,240 | 5,435 |

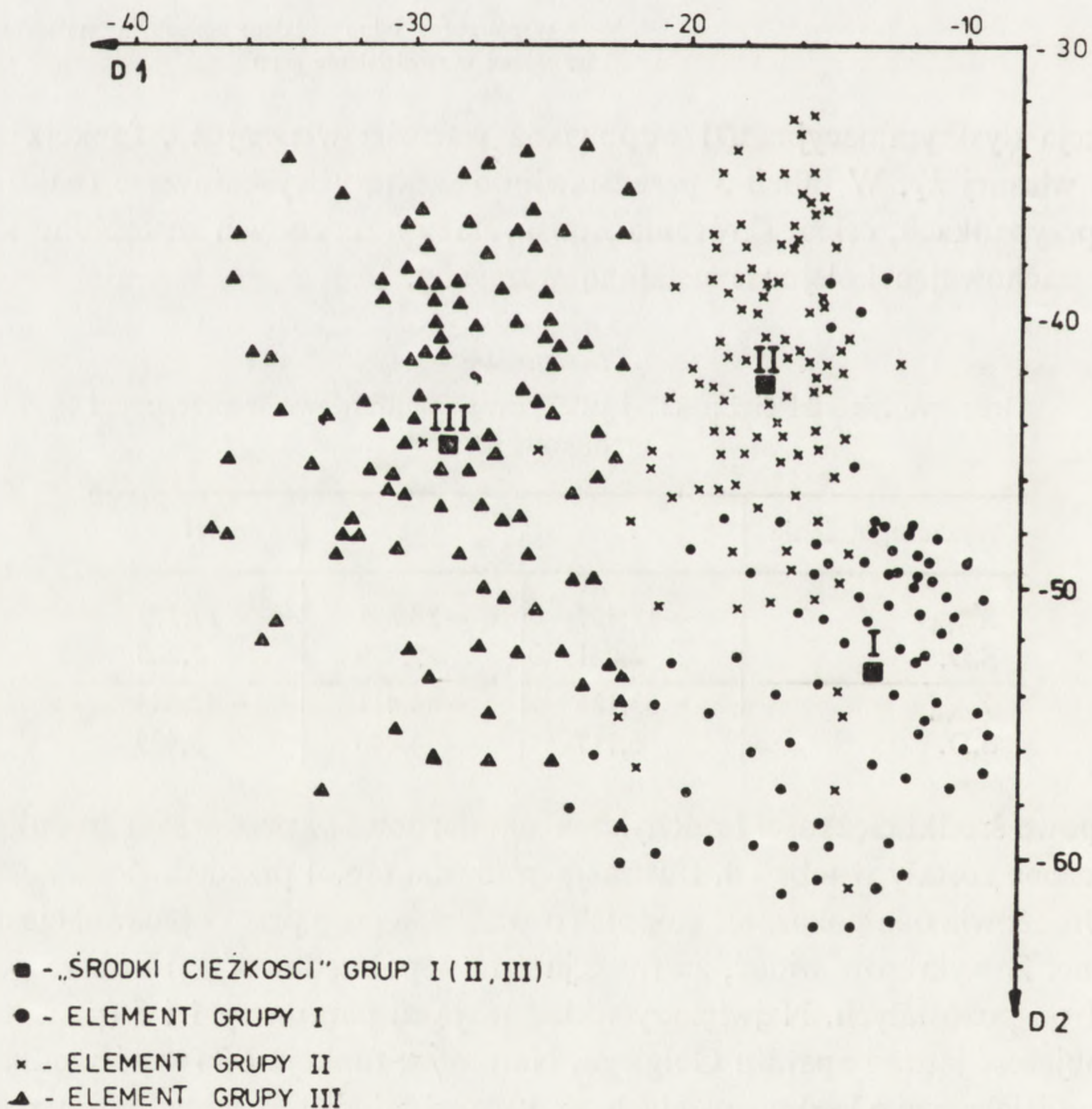
Grupowe środki ciężkości i odchylenia standardowe w przestrzeni zredukowanej zamieszczone zostały w tabeli 4. Ilustracja graficzna tab. 4 przedstawiona została na ryc. 5. Umożliwia ona pokazanie stopnia rozdzielenia grup przez obie funkcje dyskryminacyjne. Z wykresów widać, że funkcja $D1$ (współrzędna X_{zred}) dobrze oddziela grupę II od pozostałych. Największy wkład mają tu parametry 1 i 5 (patrz tab. 3), a więc objętość jądra i aparatu Golgiego. Natomiast funkcja $D2$ (współrzędna Y_{zred}) dobrze oddziela grupę I od pozostałych, przy czym największy wkład ma tu parametr 3, czyli objętość mitochondriów.



Ryc. 5. Współrzędne grupowych „środków ciężkości” i odchylenia standardowe zmiennych w przestrzeni zredukowanej

3.3. KLASYFIKACJA

Klasyfikacja przeprowadzona została dla wszystkich komórek. Obliczono współrzędne każdej z nich w przestrzeni zredukowanej. (ryc. 6). Prawidłową klasyfikację uzyskano dla 92,2% ogólnej liczby komórek. Jest to wynik dobry i potwierdzający słuszność metody.



Ryc. 6. Układ elementów grup I, II i III w przestrzeni zredukowanej

Z przedstawionego opisu wynika, że analiza dyskryminacyjna jest metodą pozwalającą na przeprowadzenie nowoczesnego porównania ze sobą wielu grup doświadczalnych scharakteryzowanych licznymi zmiennymi parametrami. Należy sądzić, że metoda ta powinna znaleźć szerokie zastosowanie zarówno w badaniach doświadczalnych, jak i klinicznych.

LITERATURA

- [1] ANDERSON T. W., An introduction to multivariate statistical analysis, John Wiley and Sons, New York 1958.
- [2] BENDAT J. S., PIERSOL A. G., Metody analizy i pomiaru sygnałów losowych, PWN, Warszawa 1976.
- [3] BRANDT S., Metody statystyczne i obliczeniowe analizy danych, PWN, Warszawa 1976, 106–120.
- [4] BYCHOWSKI M. S., WISZNIEWSKI A. A., Kibernetyczne systemy w medycynie, Izd. „Nauka”, Moskwa 1971, 168–225.
- [5] COOLEY W. W., LOHNES P. R., Multivariate procedures for the behavioral sciences, John Wiley and Sons, New York 1962.
- [6] OKTABA W., NIEDOKOS E., Matematyka i postawy statystyki matematycznej, PWN, Warszawa 1971, 111–126.
- [7] STRZAŁKOWSKI A., ŚLIŻYŃSKI A., Matematyczne metody opracowania wyników pomiarów, PWN, Warszawa 1973, 167–170.
- [8] VELDMAN D. J., Fortran Programming for the behavioral sciences, Molt, Rinehart and Winston, New York 1967.

Otrzymano: 1 czerwca 1981.

Przyjęto: 8 marca 1982.

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

Le premier chapitre est consacré à l'étude de la structure des groupes...

- (1) Soit G un groupe fini...
- (2) Soit H un sous-groupe...
- (3) Soit K un sous-groupe...
- (4) Soit L un sous-groupe...
- (5) Soit M un sous-groupe...
- (6) Soit N un sous-groupe...
- (7) Soit O un sous-groupe...
- (8) Soit P un sous-groupe...
- (9) Soit Q un sous-groupe...
- (10) Soit R un sous-groupe...
- (11) Soit S un sous-groupe...
- (12) Soit T un sous-groupe...
- (13) Soit U un sous-groupe...
- (14) Soit V un sous-groupe...
- (15) Soit W un sous-groupe...
- (16) Soit X un sous-groupe...
- (17) Soit Y un sous-groupe...
- (18) Soit Z un sous-groupe...
- (19) Soit A un sous-groupe...
- (20) Soit B un sous-groupe...
- (21) Soit C un sous-groupe...
- (22) Soit D un sous-groupe...
- (23) Soit E un sous-groupe...
- (24) Soit F un sous-groupe...
- (25) Soit G un sous-groupe...
- (26) Soit H un sous-groupe...
- (27) Soit I un sous-groupe...
- (28) Soit J un sous-groupe...
- (29) Soit K un sous-groupe...
- (30) Soit L un sous-groupe...
- (31) Soit M un sous-groupe...
- (32) Soit N un sous-groupe...
- (33) Soit O un sous-groupe...
- (34) Soit P un sous-groupe...
- (35) Soit Q un sous-groupe...
- (36) Soit R un sous-groupe...
- (37) Soit S un sous-groupe...
- (38) Soit T un sous-groupe...
- (39) Soit U un sous-groupe...
- (40) Soit V un sous-groupe...
- (41) Soit W un sous-groupe...
- (42) Soit X un sous-groupe...
- (43) Soit Y un sous-groupe...
- (44) Soit Z un sous-groupe...
- (45) Soit A un sous-groupe...
- (46) Soit B un sous-groupe...
- (47) Soit C un sous-groupe...
- (48) Soit D un sous-groupe...
- (49) Soit E un sous-groupe...
- (50) Soit F un sous-groupe...
- (51) Soit G un sous-groupe...
- (52) Soit H un sous-groupe...
- (53) Soit I un sous-groupe...
- (54) Soit J un sous-groupe...
- (55) Soit K un sous-groupe...
- (56) Soit L un sous-groupe...
- (57) Soit M un sous-groupe...
- (58) Soit N un sous-groupe...
- (59) Soit O un sous-groupe...
- (60) Soit P un sous-groupe...
- (61) Soit Q un sous-groupe...
- (62) Soit R un sous-groupe...
- (63) Soit S un sous-groupe...
- (64) Soit T un sous-groupe...
- (65) Soit U un sous-groupe...
- (66) Soit V un sous-groupe...
- (67) Soit W un sous-groupe...
- (68) Soit X un sous-groupe...
- (69) Soit Y un sous-groupe...
- (70) Soit Z un sous-groupe...
- (71) Soit A un sous-groupe...
- (72) Soit B un sous-groupe...
- (73) Soit C un sous-groupe...
- (74) Soit D un sous-groupe...
- (75) Soit E un sous-groupe...
- (76) Soit F un sous-groupe...
- (77) Soit G un sous-groupe...
- (78) Soit H un sous-groupe...
- (79) Soit I un sous-groupe...
- (80) Soit J un sous-groupe...
- (81) Soit K un sous-groupe...
- (82) Soit L un sous-groupe...
- (83) Soit M un sous-groupe...
- (84) Soit N un sous-groupe...
- (85) Soit O un sous-groupe...
- (86) Soit P un sous-groupe...
- (87) Soit Q un sous-groupe...
- (88) Soit R un sous-groupe...
- (89) Soit S un sous-groupe...
- (90) Soit T un sous-groupe...
- (91) Soit U un sous-groupe...
- (92) Soit V un sous-groupe...
- (93) Soit W un sous-groupe...
- (94) Soit X un sous-groupe...
- (95) Soit Y un sous-groupe...
- (96) Soit Z un sous-groupe...
- (97) Soit A un sous-groupe...
- (98) Soit B un sous-groupe...
- (99) Soit C un sous-groupe...
- (100) Soit D un sous-groupe...

On a vu que...

Il est facile de voir que...

KOMÓRKI KĘPKOWE NABŁONKA PRZEWODU POKARMOWEGO *

THE TUFT CELLS OF THE GASTROINTESTINAL EPITHELIUM

Jan LAMPRECHT i Jan ROWIŃSKI

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna
w Warszawie

Streszczenie. Komórki kępkowe są stałym, lecz niezbyt licznym składnikiem nabłonka przewodu pokarmowego. Ich odrębność czynnościową, do dziś nie poznana, sugerują charakterystyczne cechy budowy ultrastrukturalnej: liczne kręte jamki komórkowe, kępka dużych mikrokosmków oraz obficie rozbudowany system filamentów i pęcherzyków cytoplazmatycznych. Pierwszy opis tych komórek powstał w 1928 r., lecz dopiero w ostatnich latach dokładnie poznano budowę komórek kępkowych. W artykule autorzy przytaczają własne spostrzeżenia dotyczące różnicowania komórek kępkowych nabłonka jelitowego myszy.

Summary. Tuft cells are a constant although not very numerous component of the gastrointestinal epithelium. Their functional distinctness although still not known, is suggested by the characteristic features of their ultrastructure. These are the numerous, tortous coveolae, a tuft of big microvilli, unusually well developed bundles of filaments and numerous cytoplasmic vesicles. The first description of these cells appeared in 1928, but only in recent years the structure of tuft cells has become thoroughly known. In this article the authors refer to their own observations concerning the differentiation of tuft cells in the intestinal epithelium of mice.

Najbardziej wewnętrzną warstwą błony śluzowej żołądka i jelit, stykającą się bezpośrednio z treścią pokarmową, jest jednowarstwowy nabłonek walcowaty. Nabłonek poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego zawiera typy komórek nie występujące w innych częściach tego układu, a także typy wspólne dla kilku lub wszystkich odcinków

* Artykuł został napisany w związku z wykonywaniem prac finansowanych z Programu Rządowego PR-6, temat 2108, oraz z Problemu Międzyresortowego PAN, temat II.1.6.8.

przewodu pokarmowego. Dla przykładu, główną masę nabłonka jelita cienkiego stanowią komórki o funkcji resorpcyjnej zwane komórkami nabłonkowymi jelita z rąbkem prążkowanym. Obok nich występują mniej liczne rodzaje komórek, jak: komórki jelitowe kubkowe występujące w jelicie cienkim i grubym, komórki enteroendokrynowe występujące w żołądku, jelicie cienkim i grubym oraz komórki Panetha występujące w nabłonku jelita cienkiego. W wyniku badań ultrastrukturalnych nabłonka przewodu pokarmowego wyróżniono w nim nowe, bardzo nieliczne, morfologicznie odrębne od wymienionych typy komórek nabłonkowych, a wśród nich tzw. komórki kępkowe. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie obserwacji dotyczących budowy komórek kępkowych, a także hipotez dotyczących ich czynności.

NAZEWNICTWO

Pierwszy opis komórek będących przedmiotem niniejszego opracowania został ogłoszony przez Chlapkova [1] w 1928 r., który nadał im nazwę „Büschelzelle”. Odpowiednikiem angielskim tej nazwy jest termin „tuft cell” [7], a w języku polskim „komórka kępkowa” [12]. Jest to nazwa opisowa, podkreślająca jedną z charakterystycznych cech budowy tych komórek, którą jest obecność w szczytowej części komórki „kępki” mikrokosmków wyraźnie większych niż mikrokosmki innych komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego.

Opis Chlapkova przez wiele lat był nie zauważany przez histologów. Komórki kępkowe były wielokrotnie odkrywane przez innych badaczy, rozmaicie nazywane i dlatego występują w piśmiennictwie pod różnymi nazwami, jak: komórki kępkowe [1, 7, 12, 13, 18, 27], komórki pędzelkowe (ang. brush cells) [14–17, 21], komórki wielopęcherzykowe (ang. multivesicular cells) [26], komórki z jamkami (ang. caveolated cells) [11, 19], bezzianiste komórki jasne (ang. agranular light cells) [22], wydzielnicze komórki walcowate (ang. secretory columnar cells) [25], komórki niezróżnicowane (ang. undifferentiated cells) [9] i niedojrzałe komórki pośrednie (ang. immature intermediate cells) [10]. Nazwy te są odzwierciedleniem bądź niektórych cech budowy komórek, bądź podkreślają ich domniemaną czynność. Nazwa „komórki kępkowe” wydaje się nam najwłaściwsza, ponieważ: (a) odnosi się do najbardziej charakterystycznej cechy budowy komórki, (b) nie opiera się na nie dowiedzionych hipotezach dotyczących czynności omawianych komórek, (c) została użyta przez odkrywcę tych komórek, (d) jest nazwą w ostatnich latach często używaną.

Polskie Mianownictwo Histologiczne [30] nie uwzględnia żadnej z wymienionych nazw opisywanej komórki.

WYSTĘPOWANIE KOMÓREK KĘPKOWYCH

Dotychczas stwierdzono występowanie komórek kępkowych w nabłonkach układu pokarmowego i układu oddechowego kilku gatunków ssaków. Występują one w nabłonku błony śluzowej wszystkich odcinków jelita cienkiego [1, 6–8, 11–13, 18, 19, 27], jelita grubego [15, 17, 19, 26], w nabłonku dna oraz w części odźwiernikowej żołądka [3, 5–9, 19, 29], w nabłonku pęcherzyka żółciowego i przewodu żółciowego wspólnego [6, 14, 15, 22] oraz w nabłonku przewodu trzustkowego i w pęcherzykach trzustki [6]. Poza układem pokarmowym komórki kępkowe występują w nabłonku dna oraz w części odźwiernikowej żołądka [3, 5–9, 19, 29],

Komórki kępkowe stwierdzono u myszy [8, 12–15, 19, 22, 16, 28], szczura [6, 7, 9, 15, 17, 27, 29], królika [1], kota [1], psa [1, 5, 9], jelenia wirginijskiego [11] i człowieka [9, 18]. Szczególnie liczne występowanie komórek kępkowych (20% populacji komórek nabłonkowych) obserwowano w nabłonku błony śluzowej żołądka szczura, na pograniczu części gruczołowej i części pokrytej nabłonkiem wielowarstwowym płaskim (bezgruczołowej) [7, 29]. Dość licznie występują komórki kępkowe w końcowym odcinku jelita grubego [17, 19, 26, 28].

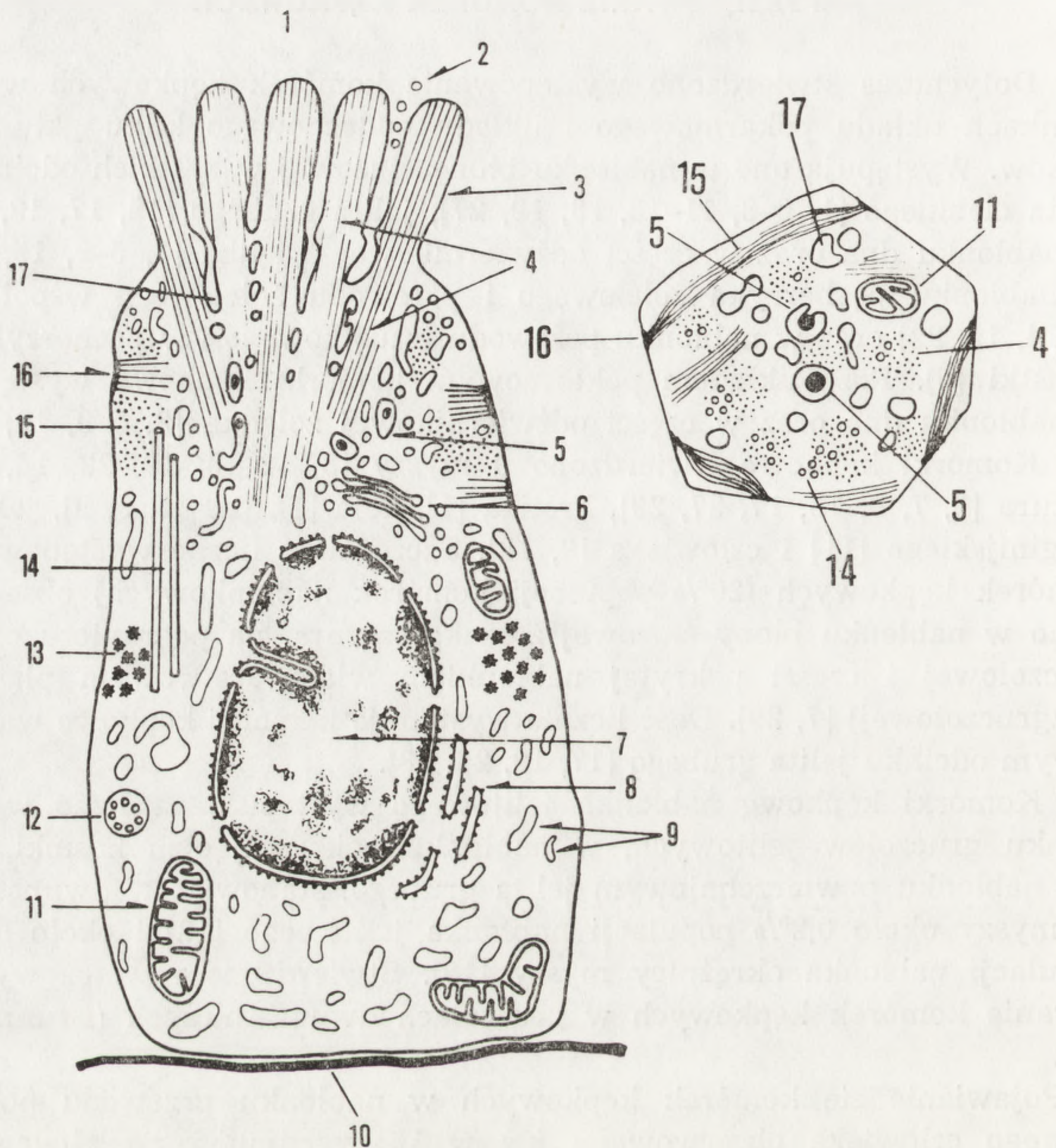
Komórki kępkowe nabłonka jelitowego występują zarówno w nabłonku gruczołów jelitowych, w nabłonku pokrywającym kosmki, jak i w nabłonku powierzchniowym jelita grubego, stanowiąc w dwunastnicy myszy około 0,2% populacji nabłonka jelitowego [12] i około 0,5% populacji nabłonka okrężnicy myszy [19]. Stwierdzono również występowanie komórek kępkowych w gruczołach dwunastniczych (Brunnera) [11].

Pojawianie się komórek kępkowych w nabłonku przewodu pokarmowego człowieka obserwowano już w 16 tygodniu życia płodowego [18]. W życiu pozapłodowym komórki kępkowe, według unitarystycznej teorii pochodzenia komórek nabłonka jelitowego, wywodzą się ze wspólnego prekursora wszystkich komórek nabłonka jelitowego [2].

Jak wykazano w doświadczeniach z użyciem ^3H -tymidyny, komórki kępkowe nie posiadają zdolności proliferacji [29], a czas migracji tych komórek od dna krypty do strefy złuszczenia nabłonka wynosi około 8 dni (w jelicie grubym dorosłych myszy) [28].

OGÓLNY OPIS BUDOWY KOMÓREK KĘPKOWYCH NABLONKA JELITOWEGO

Komórki kępkowe (ryc. 1) są komórkami nabłonkowymi o kształcie walcowatym. Ich podstawa jest nieco szersza niż część szczytowa. Zajmują całą wysokość nabłonka jelitowego, tzn. swoją podstawą opierają się o błonę podstawową nabłonka, a ich część szczytowa sięga do światła



Ryc. 1. Schemat komórki kępkowej nabłonka jelitowego, opracowany na podstawie [7, 12, 19, 26], w przekroju wzdłuż długiej osi komórki (lewa strona ryciny) oraz w przekroju poprzecznym przez część nadjądrową cytoplazmy (prawa strona ryciny) 1 — światło jelita, 2 — pęcherzyki towarzyszące mikrokosmkom, 3 — mikrokosmki tworzące kępkę, 4 — pęczki filamentów prostych, 5 — ziarenka śródpęcherzykowe, 6 — aparat Golgiego, 7 — jądro komórkowe, 8 — siateczka śródplazmatyczna ziarnista, 9 — wakuole, 10 — błona podstawna, 11 — mitochondrium, 12 — ciało wielopęcherzykowe, 13 — ziarenka glikogenowe, 14 — mikrotubule, 15 — pęczki filamentów okrężnych, 16 — desmosom, 17 — jamki komórkowe

jelita. W przypodstawnej lub środkowej części komórki znajduje się pęcherzykowate jądro komórkowe o rozproszonej chromatynie. Niekiedy przekroje jąder tych komórek wykazują obecność licznych wpukleń błony jądrowej [9]. Szczytowa część komórki ukształtowana jest w długie i szerokie mikrokosmki, co ułatwia identyfikację komórek kępkowych zarówno w cienkich skrawkach jelita oglądanych przez mikroskop świetlny (ryc. 5), jak i w obrazach z mikroskopu elektronowego (ryc. 2).

Z sąsiednimi komórkami nabłonkowymi komórki kępkowe połączone są desmosomami.

Jak dotąd nie znany jest żaden specyficzny rodzaj barwienia, który ułatwiałby rozpoznawanie komórek kępkowych, trudnych do odnalezienia w konwencjonalnych preparatach histologicznych ze względu na ich małą liczebność.

MIKROKOSMKI

Mikrokosmki komórek kępkowych, szczególnie wyraźnie widoczne w obrazach skaningowego mikroskopu elektronowego [7], tworzą „kępkę” od której pochodzi nazwa komórek. Występują one na szczytowym biegunie komórki skierowanym do światła przewodu pokarmowego (ryc. 1 i 2). Końce mikrokosmków wyraźnie górują ponad poziomem mikrokosmków innych komórek nabłonkowych, sąsiadujących z komórkami kępkowymi.

Mikrokosmki komórek kępkowych są większe niż mikrokosmki komórek resorpcyjnych jelita. Silva [26] oraz Nabeyama i Leblond [19] szacują, że mikrokosmki komórek kępkowych nabłonka jelita myszy są około dwukrotnie dłuższe i dwukrotnie grubsze niż mikrokosmki komórek resorpcyjnych. Średnie wymiary mikrokosmków komórek kępkowych żołądka szczura wynoszą: długość 1,16 μm , szerokość 0,22 μm [7]. W komórkach kępkowych 16-tygodniowych płodów ludzkich, które wykazują szereg typowych cech ultrastrukturalnych, wymiary mikrokosmków są podobne do wymiarów mikrokosmków innych komórek nabłonkowych [18]. Isomäki [7] liczył mikrokosmki komórek kępkowych żołądka szczura na elektronogramach skaningowego mikroskopu elektronowego, uzyskując wartość średnią 91 mikrokosmków na komórkę, a Hammond [5] w żołądku psa ocenia ich liczbę na 10–13 na przekrój komórki wzdłuż jej długiej osi. Odpowiednich danych liczbowych dla komórek kępkowych jelita nie znaleźliśmy w piśmiennictwie. Mikrokosmki komórek kępkowych jelita cienkiego i grubego są wyraźnie dłuższe niż mikrokosmki tych komórek występujących w nabłonku żołądka [5, 19].

Do zewnętrznej blaszki błony komórkowej tworzącej mikrokosmki przylega warstwa glikokaliks [7, 18, 29], lecz mniej wyraźna niż w innych komórkach nabłonkowych żołądka [29]. Moxey i Trier [18] podają, że błona komórkowa w obrębie mikrokosmków komórek kępkowych jelita płodowego ma większą gęstość elektronową niż błona mikrokosmków komórek resorpcyjnych.

W obszarze mikrokosmków stwierdzono metodami histochemicznymi

obecność fosfatazy zasadowej oraz słabą reakcją na fosfatazę kwaśną [7]. Obszar mikrokosmków barwi się także w metodzie PAS [19].

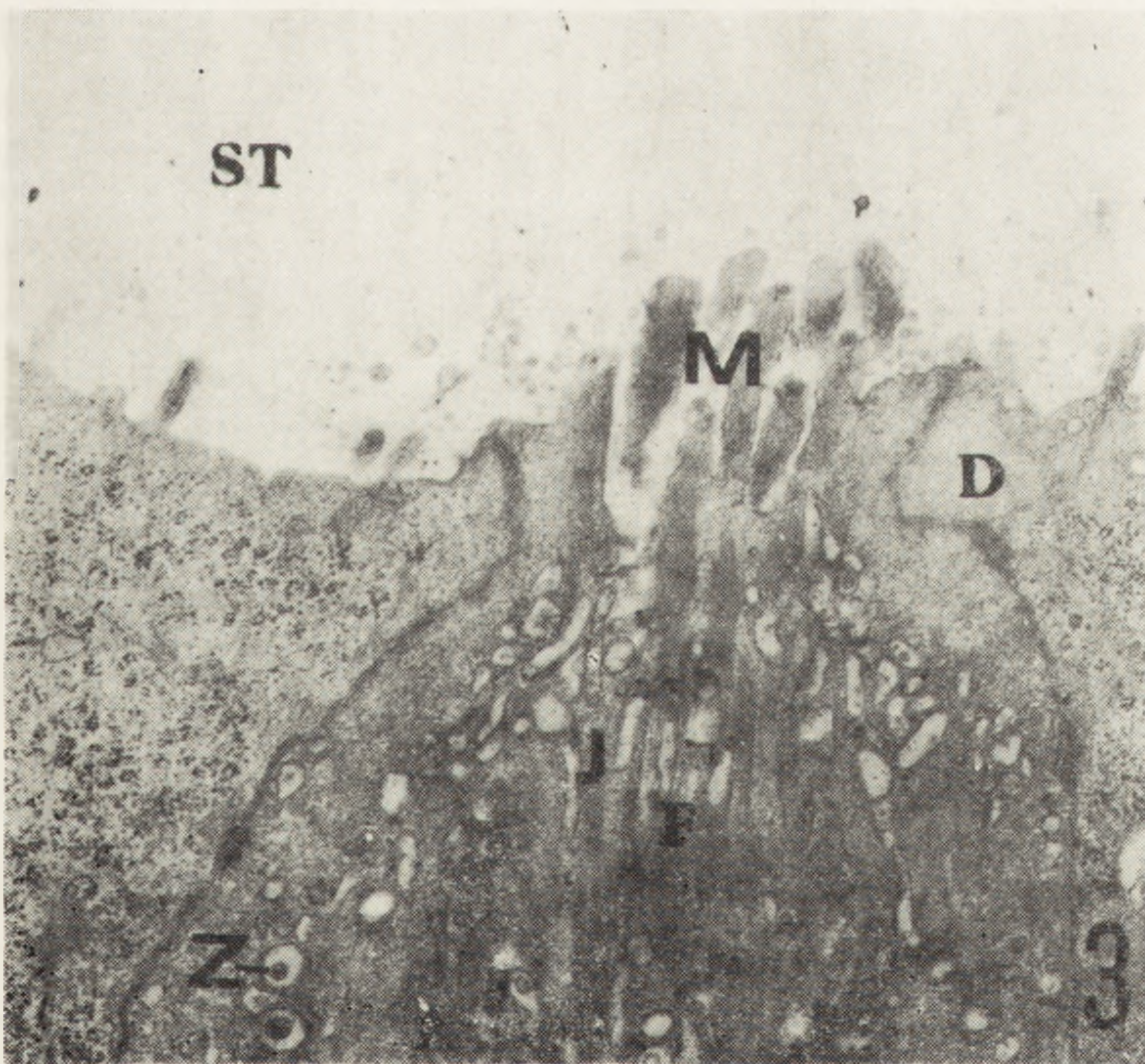
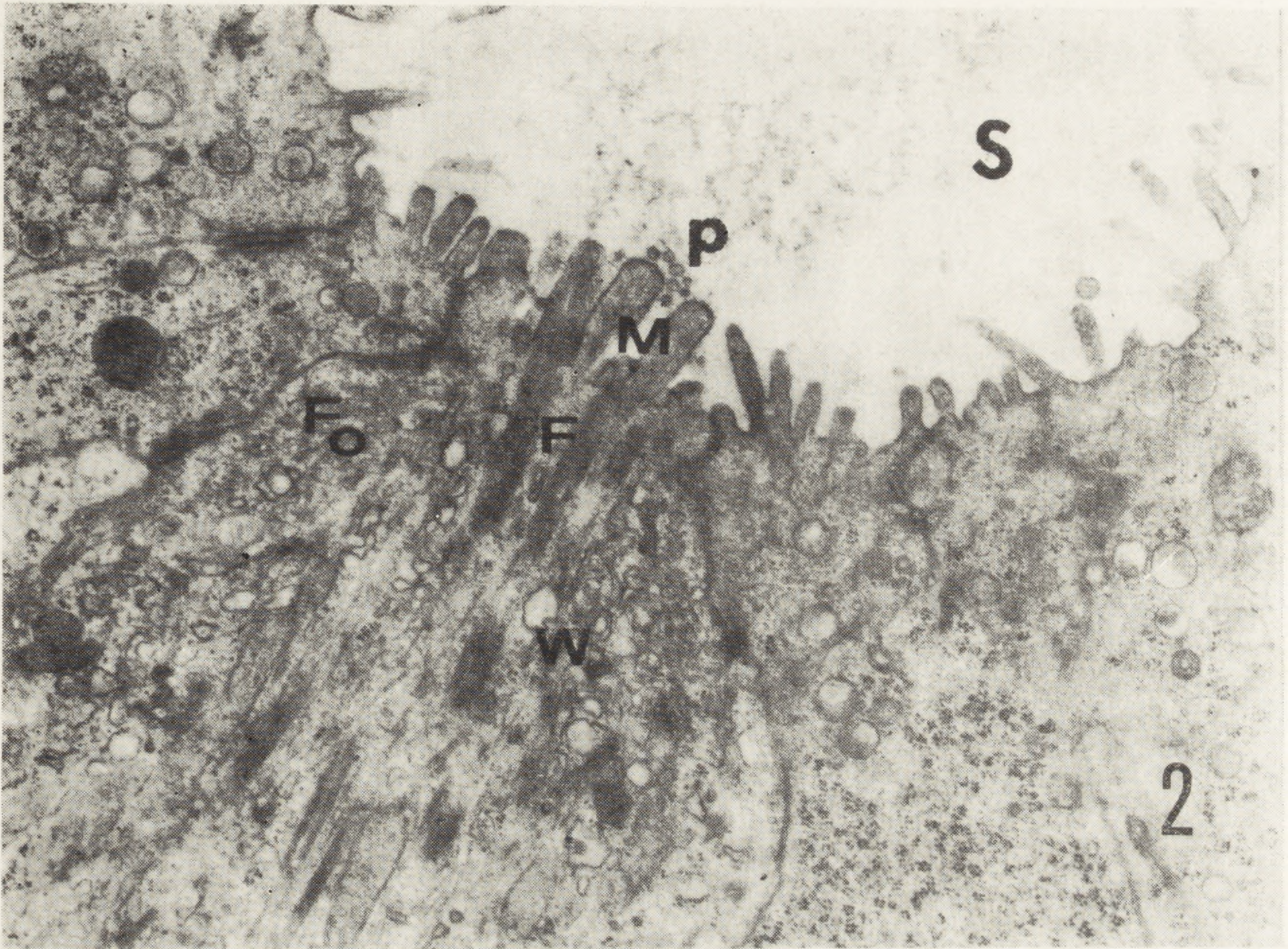
Do wewnętrznej blaszki błony komórkowej mikrokosmków przytwierdzone są filamenty o średnicy 7,5 nm tworząc ich rdzeń [7]. Po między pęczkami filamentów, wzdłuż osi mikrokosmków obserwuje się także mikrotubule, które są znacznie mniej liczne niż filamenty [19].

Między mikrokosmkami i w pobliżu ich szczytów w świetle przewodu pokarmowego zaobserwowano obecność małych pęcherzyków o średnicy około 100 nm (ryc. 2) [12, 19, 26]. Pęcherzyki te są podobne do pęcherzyków występujących w zagłębieniach szczytowej części komórek kępkowych. Nabeyama i Leblond [19] sądzą, że stanowią one wydzielinę komórek kępkowych, choć nie można wykluczyć możliwości, że są one wynikiem fragmentacji mikrokosmków.

FILAMENTY I MIKROFILAMENTY

Pęczki filamentów (ryc. 1–4) są jedną z najbardziej charakterystycznych cech ultrastrukturalnych komórek kępkowych. Nabeyama i Leblond [19] wyróżniają w komórkach kępkowych: (a) filamenty proste o średnicy 7,5 nm i długości do 5 μ m występujące w pęczkach po około 60 filamentów i przebiegające od szczytu mikrokosmków do okolicy ponadjądrowej, (b) filamenty okrężne o średnicy 9,5 nm o przebiegu nieco falistym, prostopadłym do długiej osi komórki, występujące w obszarze szczytu komórki, wzdłuż bocznych błon komórkowych, oraz (c) mikrofilamenty o średnicy około 5 nm, występujące w pobliżu połączeń międzykomórkowych. Filamenty proste zdążają z obszaru mikrokosmków na kilka mikrometrów w głąb komórki, do okolicy przyjądrowej (ryc. 2–4) [7, 12, 19, 26]. Zaobserwowano, że filamenty mikrokosmków są połączone między sobą za pośrednictwem poprzecznych włókienek o średnicy 2,2 nm [7]. Liczbę filamentów o średnicy 7,5 nm w jednym mikrokosmku komórki kępkowej szczura oszacowano na 250 [7], a w komórkach kępkowych myszy stwierdzono kilka pęczków filamentów po około 60 filamentów w pęczku [19].

Komórki kępkowe w odróżnieniu od komórek resorpcyjnych nie zawierają tzw. siateczki granicznej (ang. terminal web), która w tych ostatnich komórkach występuje w szczytowej części cytoplazmy poniżej obszaru mikrokosmków i stanowi zakotwiczenie filamentów przebiegających wewnątrz mikrokosmków. Szczytowa część komórek kępkowych zawiera natomiast gęstą sieć filamentów okrężnych (ryc. 1, 2 i 4). Na przekrojach przechodzących równoległe do długiej osi komórki filamenty te są widoczne w postaci gęsto upakowanych punkcików, leżących

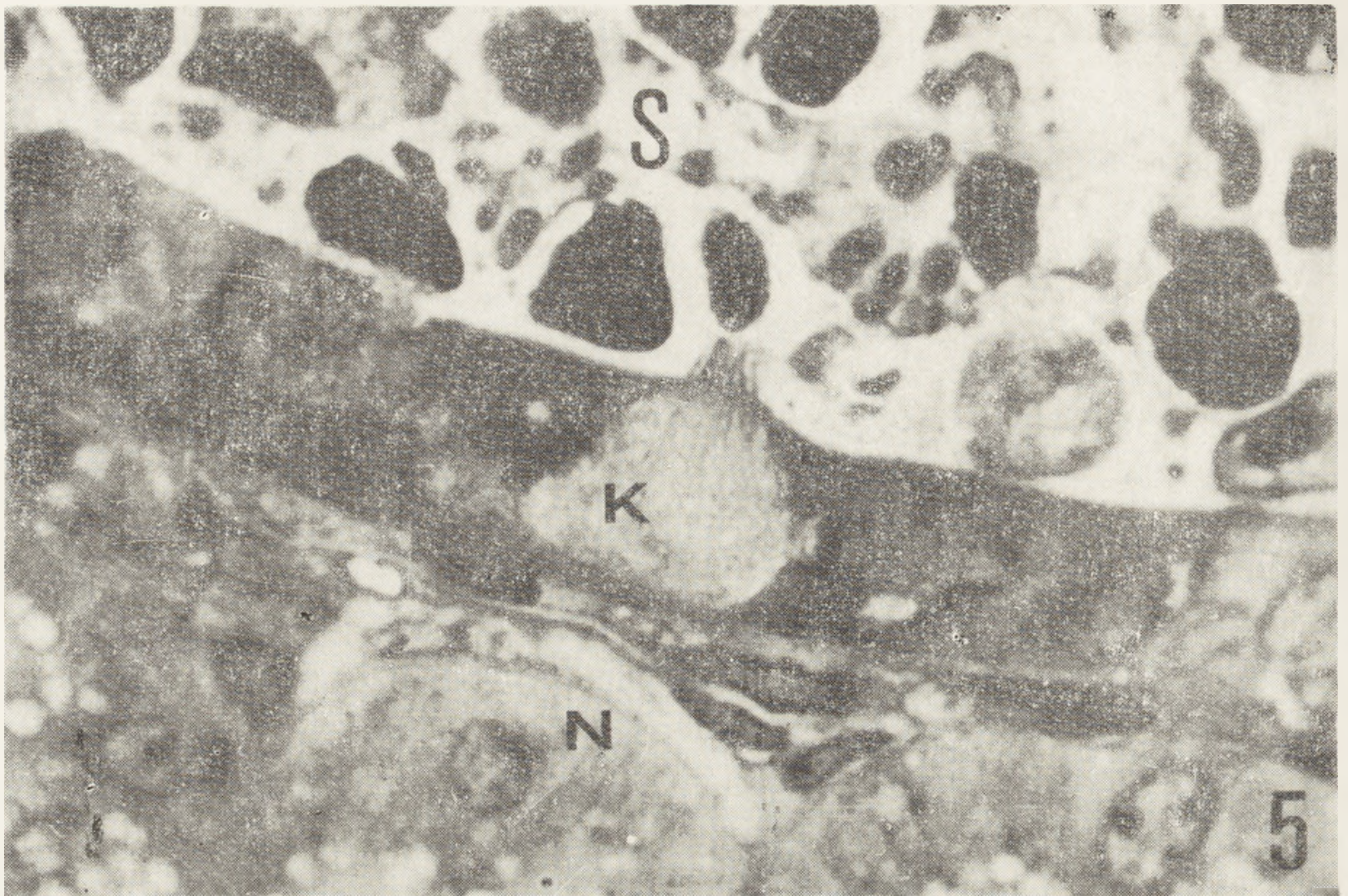


Ryc. 2. Fragment komórki kępkowej nabłonka dwunastnicy myszy *in situ*. $\times 14\ 000$

Ryc. 3. Szczytowy biegun komórki kępkowej, w nabłonku torbieli wytworzonej w miejscu przeszczepienia fragmentu jelita cienkiego myszy. $\times 15\ 000$

Ryc. 4. Fragment cytoplazmy komórki kępkowej jelita myszy, w przeszczepie pod torebkę nerki. $\times 21\ 000$

S — światło jelita, ST — światło torbieli, M — mikrokosmki, P — pęcherzyki towarzyszące mikrokosmkom, F — filamenty proste, F₀ — filamenty okrężne, W — wakuole, J — jamki komórkowe, D — desmosom, Z — ziarenka śródpęcherzykowe
(Lamprecht — zdjęcia nie publikowane)



Ryc. 5. Komórka kępkowa w nabłonku torbieli powstałej w miejscu przeszczepienia fragmentu jelita cienkiego myszy pod torebkę nerki syngenicznego biorcy. Zdjęcie skrawka półcienkiego w mikroskopie optycznym. $\times 3600$

Ryc. 6. Komórka kępkowa w nabłonku torbieli w przeszczepie jelita cienkiego myszy. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego. $\times 8700$

S — światło torbieli, K — komórka kępkowa, N — kanaliki nerkowe, M — mikrokosmki komórki kępkowej, W — wakuole, G — aparat Golgiego, C — ciała wielopęcherzykowe (Lamprecht — zdjęcia nie publikowane)

zwykle w pobliżu błony komórkowej (ryc. 4). Na przekrojach prostopadłych do długiej osi komórki można prześledzić ich przebieg od jednego do drugiego demosomu.

Budowa chemiczna filamentów i mikrofilamentów komórek kępkowych nie została dotychczas określona.

JAMKI KOMÓRKOWE

W szczytowej części komórki obserwuje się jamki komórkowe, tj. zagłębienia błony komórkowej rozpoczynające się u nasady mikrokosmków i biegnące w głąb cytoplazmy równoległe do pęczków filamentów prostych (ryc. 1 i 3). Jest to tak charakterystyczna cecha tego typu komórek, że Nabeyama i Leblond [19] nazywają je „caveolated cells” (komórki jamkowe).

W skrawkach seryjnych obserwowano [19] jamki komórkowe mające postać wydłużonych, krętych woreczków otwierających się do światła przewodu pokarmowego u nasady mikrokosmków wąskim ujściem o średnicy około 50 nm. Biegną one między pęczkami filamentów i mikrotubul. Zarówno w jamkach, jak i leżących w ich pobliżu wydłużonych pęcherzykach, występują kuliste twory o średnicy około 11 nm. Czasami mają one postać polipa połączonego nóżką z błoną tworzącą jamkę lub wakuolę (ryc. 1 i 3). Twory te zwane ziarenkami wewnątrzpęcherzykowymi (intravesicular granules) [26] lub kuleczkami (spheres) [19] otoczone są gładką błoną i mają umiarkowaną gęstość elektronową. Silva [26] oraz Nabeyama i Leblond [19] przypuszczają, że stanowią one wydzielinę komórek kępkowych.

Nie obserwowano jamek komórkowych w komórkach płodów ludzkich [18].

MITOCHONDRIA

Mitochondria komórek kępkowych nie są rozłożone równomiernie w cytoplazmie: znacznie mniejszą liczbę lub całkowity brak mitochondriów obserwuje się w szczytowej części komórki [26]. Najliczniej występują w cytoplazmie nad- i okołojądrowej, gdzie ich przekroje przyjmują często kształt okrągły lub owalny. Nieliczne obserwowane mitochondria części szczytowej cytoplazmy komórek kępkowych mają kształt wydłużony o długiej osi ułożonej równoległe do pęczków filamentów prostych. Budowa ultrastrukturalna mitochondriów jest typowa, brak jest w nich natomiast ziarenek mitochondrialnych, a ich macierz wykazuje mierną gęstość elektronową [7, 9, 19].

APARAT GOLGIEGO

Aparat Golgiego komórek kępkowych (ryc. 1 i 6) występuje najczęściej w postaci kilku diktiosomów ułożonych w okolicy nad- i okołojądrowej. Typowe elementy aparatu Golgiego, tzn. spłaszczone cysterny, małe pęcherzyki o nieznacznej gęstości elektronowej oraz wakuole, są miernie rozwinięte. Nie obserwuje się w okolicy diktiosomów typowych ziaren wydzielniczych [7, 9, 19].

LIZOSOMY

Obserwowano zarówno lizosomy pierwotne o średnicy około 360 nm i jednorodnej, elektronowo gęstej zawartości, jak również różne formy auto- i heterofagosomów oraz ciałek resztkowych [7]. Zwykle w przekroju komórki występuje 2–5 pierwotnych lizosomów w pobliżu aparatu Golgiego oraz w obszarze cytoplazmy szczytowej i nadjądrowej.

WAKUOLE CYTOPLAZMATYCZNE

Uderzającą cechą ultrastrukturalną komórek kępkowych jest obecność dużej liczby przekrojów pęcherzyków i kanalików o rozmaitych kształtach i wielkości, występujących we wszystkich obszarach cytoplazmy. Twory te są najczęściej otoczone błonami gładkimi, a ich wnętrze jest elektronowo jasne [7, 12]. Dzięki badaniom skrawków seryjnych zaobserwowano, że w części szczytowej komórek kępkowych, a także w ich cytoplazmie wokółjądrowej, obok okrągłych i owalnych przekrojów jamek komórkowych, występują okrągłe przekroje wakuoli cytoplazmatycznych o średnicy do 400 nm oraz wydłużone przekroje kanalików o średnicy około 50 nm (ryc. 2–4 i 6). Stosując stereoskopową analizę grubych skrawków za pomocą mikroskopu elektronowego przekonano się, że między wakuolami a kanalikami istnieją połączenia, dzięki którym obydwa rodzaje tworów cytoplazmatycznych tworzą skomplikowany, połączony system zwany systemem kanalikowo-pęcherzykowym [29]. Peroksydaza chrzanowa [20], a także lantan [29] podawane dojelitowo przenikały do jamek komórkowych, lecz nie obserwowano ich obecności w systemie kanalikowo-pęcherzykowym. Na tej podstawie oraz wyników badania skrawków seryjnych wnioskowano, że wakuole i kanaliki cytoplazmatyczne nie są poprzecznymi przekrojami jamek komórkowych i że nie mają poprzez nie połączeń ze światłem przewodu pokarmowego [29].

INNE ORGANELLE CYTOPLAZMATYCZNE

Siateczka śródplazmatyczna ziarnista komórek kępkowych jest słabo rozbudowana; obserwuje się liczne wolne rybosomy. W cytoplazmie komórek oprócz wymienionych już struktur obserwowano: mikrociałka o średnicy około 200 nm [7], ciała wielopęcherzykowe (ryc. 6) o średnicy około 290 nm [7, 9], centriole [9] oraz ziarenka glikogenu.

KOMÓRKI KĘPKOWE W SYNGENICZNYCH, HETEROTOPOWYCH PRZESZCZEPACH JELITA CIENKIEGO

Przeszczepienie małego fragmentu jelita cienkiego myszy pod torebkę nerki w obrębie szczepu wsobnego (syngeniczny przeszczep heterotopowy) prowadzi do wytworzenia małej torbieli wysłanej nabłonkiem jelitowym [12, 13, 23, 24]. Ten układ doświadczalny może służyć do badania wpływu zarówno czynników lokalnych (mikrośrodowisko), jak i ogólnoustrojowych (np. unerwienie) na różnicowanie komórek nabłonka jelitowego, w tym także komórek kępkowych.

Zbadano histologicznie, przy użyciu techniki mikroskopu świetlnego i elektronowego, przeszczepy jelita cienkiego dorosłych myszy i wykazano obecność typowych komórek kępkowych w nabłonku wyściełającym torbiele, powstałe w miejscu przeszczepienia [12, 13]. Budowę komórek kępkowych w przeszczepach jelita cienkiego przedstawiono na ryc. 3–6. Budowa ta nie odbiega od budowy komórek kępkowych w jelicie *in situ*. Komórki kępkowe w przeszczepach zawierają wszystkie typowe dla tego rodzaju komórek struktury, tj. duże mikrokosmki, jamki komórkowe, liczne wakuole oraz pęczki filamentów i mikrotubule. W obszarach nabłonka płaskiego, występującego w niektórych okolicach przeszczepów, komórki kępkowe są spłaszczone (ryc. 5 i 6), co różni je od komórek kępkowych nabłonka jelitowego *in situ*.

Mikrokosmki komórek kępkowych w nabłonku przeszczepów są widoczne wyraźniej (ryc. 3, 5 i 6) niż w nabłonku jelitowym *in situ* (ryc. 2). Wynika to z faktu, że komórki resorpcyjne jelita nie podlegają pełnemu różnicowaniu w warunkach sygenicznego, heterotopowego przeszczepu. Ich mikrokosmki są krótsze, mniej regularne i mniej liczne niż w jelicie *in situ*, stąd na ich tle duże mikrokosmki komórek kępkowych widoczne są szczególnie wyraźnie.

Odsetek komórek kępkowych w nabłonku przeszczepów był niski, podobnie jak w jelicie *in situ* [12]. Wynosił on odpowiednio: 0,02% ± 0,05% w przeszczepach 4 dniowych, 0,19% ± 0,05% w przeszczepach 30 dniowych i 0,06% ± 0,04% w przeszczepach 90 dniowych, w porównaniu z wartością 0,16% ± 0,10% w jelicie cienkim myszy *in situ*.

Z przytoczonych wyżej własnych obserwacji wyciągnęliśmy następujące wnioski:

1. Na różnicowanie komórek kępkowych nabłonka jelita cienkiego dorosłych myszy nie wpływa zmiana mikrośrodowiska nabłonka jelitowego, wywołana zabiegiem przeszczepienia. Oznacza to, że dla różnicowania komórek kępkowych *in vivo* nie jest niezbędny bezpośredni kontakt nabłonka jelitowego z treścią pokarmową jelita, sokiem żołądkowym, sokiem trzustkowym ani z żółcią.

2. Różnicowanie komórek kępkowych podlega przynajmniej częściowo innym mechanizmom regulacyjnym niż różnicowanie komórek resorpcyjnych jelita, które w warunkach przeszczepu nie uległy pełnemu zróżnicowaniu morfologicznemu.

PRZYPUSZCZENIA DOTYCZĄCE CZYNNOSCI KOMÓREK KĘPKOWYCH

Komórki kępkowe stanowią wyraźnie wyodrębniony, nieproliferujący, wysoce zróżnicowany typ komórkowy w populacji nabłonka przewodu pokarmowego, co pozwala nam odrzucić dawną sugestię [9], iż komórki te stanowią nie zróżnicowane elementy nabłonka.

Wydaje się, że komórki kępkowe nie pełnią roli wydzielniczej zarówno egzo-, jak i endokrynowej, bo mają słabo rozwinięty układ cystern siateczki śródplazmatycznej ziarnistej oraz brak w ich cytoplazmie ziaren wydzielniczych, szczególnie w obszarze sąsiadującym z aparatem Golgiego. Jednakże zdaniem niektórych autorów [19] obecność w bezpośrednim sąsiedztwie mikrokosmków komórek kępkowych, charakterystycznych małych pęcherzyków, może sugerować udział komórek kępkowych w tworzeniu bliżej nie sprecyzowanych enzymów soku żołądkowo-jelitowego.

Cechy budowy ultrastrukturalnej nie wykluczają udziału tych komórek w procesie wchłaniania. Biorąc taką możliwość pod uwagę, ich szczególną budowę oraz niewielką liczbę można podejrzewać raczej udział w absorpcji szczególnego składnika chyme. Ze względu na obecność licznych pęcherzyków i jamek, a także rozbudowany system filamentów przypisuje się komórkom kępkowym cechę szybkiego i masywnego przepływu błon z bieguna szczytowego do cytoplazmy, co określono mianem ciągłej pinocytozy [6, 29].

Bardziej prawdopodobna jednakże wydaje się być hipoteza o roli receptorowej komórek kępkowych. Sugestie te wydają się być usprawiedliwione obecnością dużych mikrokosmków, głębokich jamek komórkowych, a także (w nabłonku tchawicy) zakończeń nerwowych bogatych w pęcherzyki synaptyczne w pobliżu bocznych błon komórkowych komórek kępkowych [16]. Przypisanie takiej roli komórkom kępkowym

tłumaczyłoby także ich obecność w nabłonkach przewodów żółciowych, trzustkowych oraz tchawicy. Jeżeli komórki kępkowe istotnie spełniają rolę receptorową, nie mają one prawdopodobnie tego typu integracji z układem nerwowym, jak np. komórki receptorowe kubków smakowych. Opinia ta usprawiedliwiona jest faktem, że po przeszczepieniu — co wiąże się również z odnerwieniem jelita — komórki te nie ulegają degeneracji (obserwacje własne).

Zdaniem Spechta [27] komórki kępkowe są częścią bariery immunologicznej, przenosząc przeciwciała typu IgA z komórek plazmatycznych na powierzchnię błony śluzowej przewodu pokarmowego. Potwierdzeniem tego poglądu ma być obecność tych komórek w nabłonku błon śluzowych, które odpowiadają na stymulację antygenową, a także ich podobieństwo do komórek nabłonka jelita grubego [25] zawierających IgA.

Dalsze badania mogą wyjaśnić, czy któraś z przedstawionych hipotez jest prawdziwa.

LITERATURA

- [1] CHLOPKOW A., Einige neue Daten zur Frage von der Struktur der Schlussleisten und Becherzellen des Darmepithels bei Säugetieren, *Z. Zellforsch.*, **7**: 502, 1928. cyt. za Specht W., *Morphology of the intestinal wall* [w:] *Intestinal Permeation, Workshop conferences Hoechst, Vol. 4*, M. Kramer, F. Lauterbach, Excerpta Medica, 4-40, 1977.
- [2] CHENG H., LEBLOND C. P., Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types., *Am. J. Anat.*, **141**: 537-562, 1974.
- [3] CORPRON R. E., The ultrastructure of the gastric mucosa in normal and hypophysectomized rats., *Am. J. Anat.*, **118**: 53-90, 1966.
- [4] FERGUSON D. J., Structure of antral gastric mucose., *Surgery*, **65**: 280-291, 1969.
- [5] HAMMOND I. B., LADEUR L., Fibrillovesicular cells in the fundic glands of the canine stomach. Evidence of a new cell type, *Anat. Rec.*, **161**: 393-412, 1968.
- [6] ISOMAKI A. M., Electron microscopic observations on a special cell type in the gastro-intestinal epithelium of some laboratory animals., *Acta pathol. microbiol. Scand. (Suppl.)*, **154**: 115-118, 1962.
- [7] ISOMAKI A. M., A new cell type (tuft cell) in the gastrointestinal mucose of the rat., *Acta pathol. microbiol. Scand. (Suppl.)*, **240**: 1-35, 1973.
- [8] JÄRVI O. H., KEYRILÄINEN O., On the cellular structures of the epithelial invasions in the glandular stomach of mice caused by intramural application of 20-methylcholanthrene., *Acta pathol. microbiol. Scand. (Suppl.)*, **111**: 72-82, 1955.

- [9] JOHNSON F. R., YOUNG B. A., Undifferentiated cell in gastric muscosa, *J. Anat.*, **102**: 541-551, 1968.
- [10] KAYE G. I., FENOGLIO C. M., PASCAL R. R., LANE N., Comparative electron microscopic features of normal, hyperplastic and adenomatous human colonic epithelium variations in cellular structure relative to the process of epithelial differentiation., *Gastroenterology*, **64**: 926-945, 1973.
- [11] KRAUSE W. J., Caveolated cells observed in the duodenal glands of the white-tailed deer., *Experientia*, **36**: 341-342, 1980.
- [12] LAMPRECHT J., Morfologia oraz różnicowanie nabłonka dwunastnicy myszy w syngenicznym przeszczepie pod torebkę nerki — badania strukturalne i utrastrukturalne. Praca doktorska, C.M.K.P., Warszawa 1976.
- [13] LAMPRECHT J., KUCHARCZYK K., ROWIŃSKI J., Ultrastructural changes in duodenal epithelium of mice after isolation from the gastrointestinal tract by means of transplantation, *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, **21**: 69-70, 1976.
- [14] LUCIANO L., Die Feinstruktur der Gallenblase und der Gallengänge. I Das Epithel der Gallenblase der Maus., *Z. Zellforsch.*, **135**: 87-102, 1972.
- [15] LUCIANO L., Die Feinstruktur der Gallenblase und der Gallengänge. II. Das Epithel der extrahepatischen Gallengänge der Maus und der Ratte., *Z. Zellforsch.*, **135**: 103-114, 1972.
- [16] LUCIANO L., REALE E., RUSKA H., Über eine „chemorezeptive“ Sinneszelle in der Trachea der Ratte., *Z. Zellforsch.*, **85**: 350-375, 1968.
- [17] LUCIANO L., REALE E., RUSKA H., Über eine glykogenhaltige Bürstenzelle im Rectum der Ratte., *Z. Zellforsch.*, **91**: 153-158, 1968.
- [18] MOXEY P. C., TRIER J. S., Specialized cell types in the human fetal small intestine., *Anat. Rec.*, **191**: 269-286, 1978.
- [19] NABEYAMA A., LEBLOND C. P., „Caveolated cells“ characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastro-intestinal epithelia., *Am. J. Anat.*, **140**: 147-166, 1974.
- [20] OWEN R. L., Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: An ultrastructural study., *Gastroenterology*, **72**: 440-451, 1977.
- [21] RHODIN J., DALHAMN T., Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat., *Z. Zellforsch.*, **44**: 345-412, 1956.
- [22] RICHES D. J., Ultrastructural observations on the common bile duct epithelium of the rat., *J. Anat.*, **111**: 157-170, 1972.
- [23] ROWIŃSKI J., KAMIŃSKI M., Transplanted mucosa of the mouse intestine as a model for cell proliferation studies., *Gastroenterology*, **65**: 642-646, 1973.
- [24] ROWIŃSKI J., KUCHARCZYK K., BONIECKA T., The cell cycle in the small intestine transplanted beneath the kidney capsule in syngeneic mice., *Cell Tiss. Res.*, **177**: 141-144, 1977.
- [25] SCHOFIELD G. C., Columnar cells with secretory granules in the large intestine of the macaque (*Cynomolgus irus*)., *J. Anat.*, **106**: 1-14, 1970.
- [26] SILVA D. G., The fine structure of multivesicular cells with large microvilli in the epithelium of the mouse colon., *J. Ultrastructure Res.*, **16**: 693-705, 1966.
- [27] SPECHT W., Morphology of the intestinal wall., [w:] Intestinal Permeation, Workshop conference Hoechst, Vol. 4, M. Kramer, F. Lauterbach, Excerpta Medica, 4-40, 1977.
- [28] TSUBOUCHI S., LEBLOND C. P., Migration and turnover of enteroendocrine

and caveolated cells in the epithelium of the descending colon, as shown by radioautography after continuous infusion of ^3H -thymidine into mice., *Am. J. Anat.*, **156**: 431-452, 1979.

- [29] WATTEL W., GEUZE J. J., The cells of the rat gastric groove and cardia. An ultrastructural and carbohydrate histochemical study, with special reference to the fibrillovesicular cells., *Cell Tiss. Res.*, **186**: 375-391, 1978.
- [30] WAWRZY尼亚K M., *Polskie Mianownictwo Histologiczne.*, PZWL, Warszawa 1974.

Otrzymano: 3 stycznia 1982.

Przyjęto: 8 marca 1982.

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

The first part of the book is devoted to the history of the Polish people, from the early days of settlement in the region to the formation of the Polish state in 1025. The author describes the struggles of the Poles against the Vikings, the Magyars, and the Germans, and the role of the Polish church in the development of the state. The second part of the book is devoted to the history of the Polish people during the Middle Ages, from the reign of Bolesław I the Brave to the death of Casimir III the Great. The author describes the expansion of the Polish state, the role of the Polish church, and the struggles of the Polish people against the Germans and the Magyars. The third part of the book is devoted to the history of the Polish people during the Renaissance and the Baroque period, from the reign of Sigismund II Augustus to the death of John III Sobieski. The author describes the role of the Polish church, the struggles of the Polish people against the Germans and the Magyars, and the role of the Polish people in the defense of Europe against the Turks.

REGULACJA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ KOMÓREK NK *

REGULATION OF NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY

Tomasz SKÓRSKI i Maciej KAWALEC

Pracownia Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie. Omówiono budowę i mechanizm cytotoksycznego działania komórek NK (Natural Killer), wyodrębnionej subpopulacji limfocytów. Są one zdolne do spontanicznego niszczenia komórek nowotworowych. Niszczenie komórek docelowych składa się z dwu etapów: kontaktu komórki NK z komórką docelową oraz niszczenia komórki docelowej. Etap pierwszy wymaga istnienia na komórkach atakowanych odpowiednich „struktur docelowych” z którymi łączą się komórki NK za pomocą odpowiednich „jednostek rozpoznających” rozmieszczonych na ich powierzchni. Etap drugi odbywa się prawdopodobnie poprzez działanie odpowiedniej proteiny (proteiny) serynowej zawartej w komórkach NK. Interferon i interleukina 2 są czynnikami bezpośrednio aktywującymi działanie komórek NK. Liczne czynniki działają pośrednio poprzez indukcję interferonu. Omówiono także komórki i czynniki wpływające hamująco na aktywność komórek NK.

Summary. The structure and mechanism of the cytotoxic action of natural killer (NK) cells from an isolated lymphocyte subpopulation are discussed. These cells are capable of spontaneous cancer cell destruction. This selective destruction consists of two steps: contact of the NK cell with the target cell and destruction of the latter. The first step requires the existence on the cells to be attacked of appropriate “target structures” with which the NK cells come into contact by means of corresponding “recognition unit” distributed on their surface. The second step consists probably in the action of some serine proteinase (s) present in the NK cells. Interferon and interleukin 2 are factors activating directly NK cells. Numerous other factors act indirectly by interferon induction. Cells and factors with an inhibitory effect on NK cells are also discussed.

Kilka lat temu odkryto nową subpopulację cytotoksycznych limfocytów zwanych komórkami NK (Natural Killer). Nazwa pochodzi stąd, że mogą one zabijać inne komórki, głównie nowotworowe, bez uprzed-

* Praca finansowana przez Polską Akademię Nauk, PAN II.1.

niego uczulenia przeciw tym komórkom. Sądzić można, że są one jakby „pierwszą linią obrony” przeciw nowotworom.

W 1979 r. opublikowano w „Postęпах Biologii Komórki” artykuł dotyczący komórek NK [77]. W obecnym artykule główną uwagę zwrócono na mechanizmy regulujące aktywność tych komórek.

CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK NK

BUDOWA

Wielu autorów metodą eliminacji innych znanych populacji komórek charakteryzowało komórki NK jako małe lub średniej wielkości limfocyty [155, 159, 169]. Dokładniej jednak określano komórki NK wyodrębniając je po adsorpcji na komórkach docelowych i barwiąc metodą Giemsy [111, 177, 180]. Innym sposobem postępowania było rozdzielanie limfocytów w nieciągłym gradiencie Percollu [146, 176, 179], a następnie badanie przylegania komórek poszczególnych frakcji do komórek docelowych. Obiema metodami uzyskano zasadniczo zbieżne wyniki. Główną populacją, w której znajdowały się komórki NK były „duże ziarniste limfocyty” (large granular lymphocytes — LGL). Są to komórki średnie i duże z lekko nerkowatym jądrem, bladoniebieską cytoplazmą zawierającą azurofilne ziarenka o różnej gęstości. Należy zauważyć, że spośród wszystkich komórek o morfologii LGL tylko 10–30% może wiązać się z komórkami docelowymi [146]. Drugą, nie zawsze wyodrębnianą populacją, były „średnie limfocyty” (medium sized lymphocytes — MSL) z zasadochłonną cytoplazmą bez ziarenek. Na przykładzie komórek nowotworowych K 562 oraz fibroblastów płodowych jako komórek docelowych stwierdzono, że większość aktywności cytotoksycznej związana była z komórkami LGL.

CECHY POWIERZCHNI

W celu lepszego charakteryzowania komórek NK i porównania ich z innymi znanymi populacjami badano ich cechy powierzchniowe; wyniki zestawiono w tabeli 1.

W wielu pracach używając swoistej surowicy i dopełniacza stwierdzono, że część komórek NK u myszy może mieć na powierzchni antygen charakterystyczny dla limfocytów T-Thy-1 [67, 68, 90, 93, 99, 103, 139], w innych nie wykazano jego obecności [43, 61, 65, 192, 198]. Koo i wsp. [90] podali, że antygen Thy-1 znajduje się na powierzchni około 50% komórek NK. Być może na powierzchni komórek NK znajdują się nieliczne antygeny Thy-1 i z tego powodu nie zawsze są wykrywalne [66]. Na powierzchni komórek NK myszy wykryto również inne antygeny charakterystyczne dla limfocytów T: Qa/Qa-2,4,5 [90], Lyt-1 [90], antygen

TABELA 1

Porównanie cech powierzchni limfocytów T, B, monocytów i komórek NK

| Cecha | Komórki | | | |
|---------------------------------|---------------|------|----------|--------------------------------|
| | T | B | monocyty | NK |
| antygen Thy-1 | + | — | — | +(50%) |
| antygen Qa 1-5 | + | +/- | — | Qa 2 (50%) Qa 4,5 (80–100%) |
| antygen Lyt 1, 2, 3 | + | — | — | Lyt 1 (20%) |
| asialo GM1 | + | — | — | ++++ |
| antygen Ly-10.2 | + (pre-T) | — | — | + |
| antygen Ly 5 | + | — | — | + |
| receptor dla F _c IgG | — (większość) | ++++ | + | +/- |
| Ig | — | ++++ | — | — |
| antygen Ia | + (większość) | + | +/- | — |
| antygen Lyb-2 | — | + | — | — |
| receptor dla C3 | — | + | + | +/- |
| przyleganie do szkła | +/- | +/- | ++++ | — |
| antygen Mac-1 | — | — | + | + |
| antygen NK-1 | — | — | — | + |

glikosfingolipidowy AsGM₁ (ganglio-N-tetra-asialoceramid) [54, 80, 147, 201], Ly 10,2 [107], Ly 5 [16]. Z drugiej strony wykazano, że cytotoksyczne komórki NK można za pomocą monoklonalnych przeciwciał oddzielić od cytotoksycznych limfocytów T [203].

Przypuszcza się, że komórki NK są komórkami pre-T [64, 65]. Przemawiają za tym następujące spostrzeżenia:

1. obecność u myszy „nagich” (z wrodzonym brakiem grasicy) komórek o małej gęstości antygenu Thy-1 na powierzchni [97, 144] przy jednoczesnej wysokiej aktywności cytotoksycznej komórek NK [66, 67, 69, 82],

2. inkubacja mysich lub ludzkich limfocytów z hormonalnym preparatem grasicy powodującym różnicowanie i dojrzewanie limfocytów T prowadzi do zmniejszenia aktywności komórek NK [108].

Istnieją rozbieżności co do obecności receptora dla fragmentu Fc immunoglobulin (FcR) na powierzchni komórek NK. Jedni postulują jego obecność [4, 11, 28, 41, 63, 99, 113, 118, 185], inni zaprzeczają temu [11, 61, 99, 169, 198]. Można więc przypuszczać, że istnieją różne populacje komórek NK, z których niektóre mają taki receptor. Jak sugeruje Herberman i wsp. [64], obecność receptora jest uzależniona od stadium dojrzałości komórek NK (ryc. 3). Nie udało się wykryć na powierzchni komórek NK immunoglobulin [28, 61, 90, 113, 185, 192, 198], ludzkich antygenów Ia [124] ani mysich Lyb-2, charakterystycznych dla limfocytów B [90]. Komórki NK są populacją heterogenną pod względem

obecności receptora dla fragmentu składnika C3 dopełniacza [41, 67, 85, 125, 195].

Komórki NK są populacją nie przylegającą do szkła i nie posiadają zdolności do fagocytozy [61, 67, 68, 85, 169, 192]. Przeciwciała antymakrofagowe w obecności dopełniacza nie uszkodzają komórek NK [121]. Z drugiej strony za pomocą monoklonalnych przeciwciał znakowanych izotopem promieniotwórczym wykazano, że na powierzchni ludzkich komórek NK oraz monocytów znajduje się antygen charakterystyczny dla mysich komórek fagocytydujących (makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych) [3] zwany Mac-1.

Mysie komórki NK posiadają charakterystyczny tylko dla siebie antygen powierzchniowy zwany NK-1, którego obecność wykazano za pomocą swoistej surowicy [15, 48, 67, 90].

Na podstawie wymienionych danych trudno jest zaliczyć komórki NK do jednej z poznanych już populacji limfocytów.

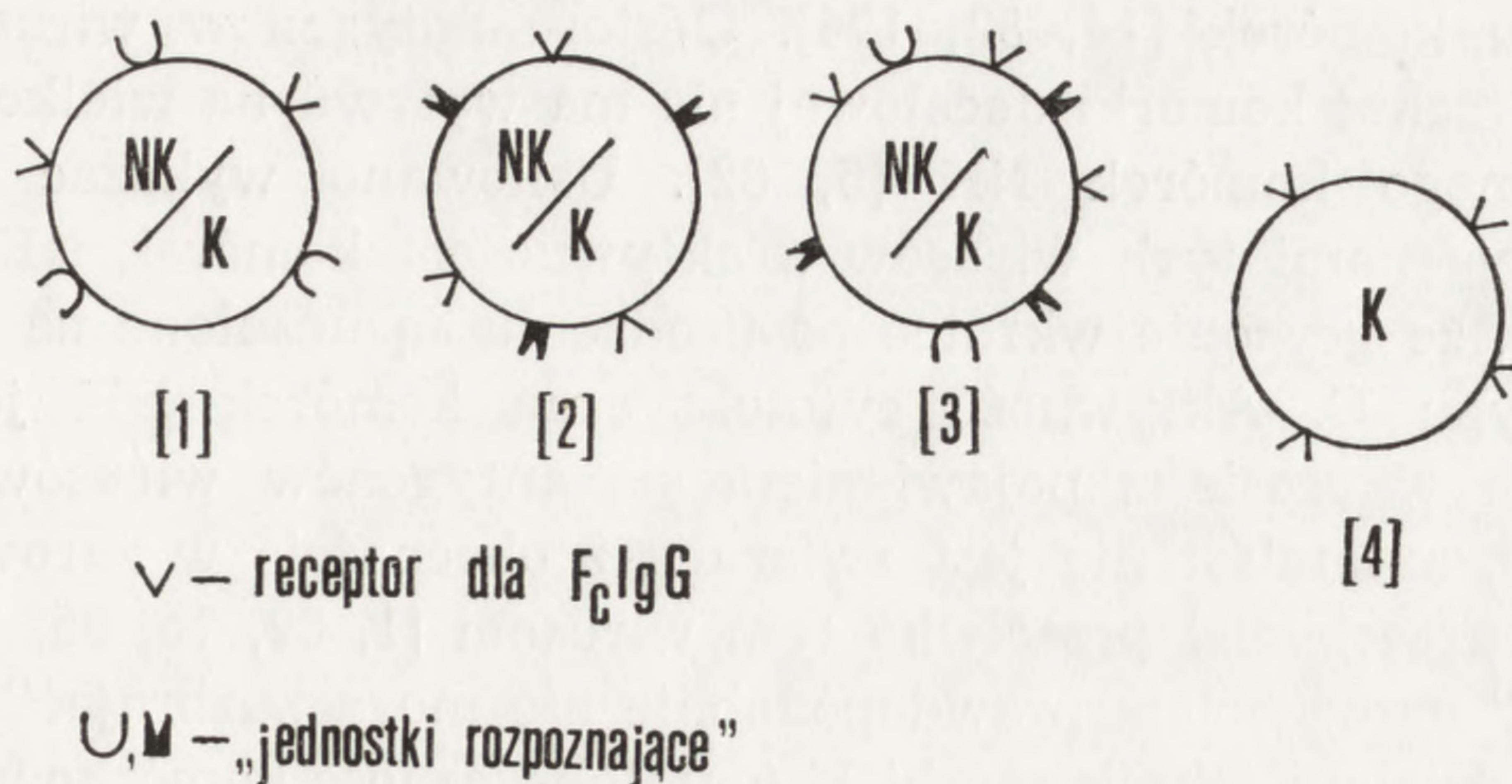
Mechanizm cytotoksycznego działania komórek NK, choć słabo poznany, można umownie podzielić na następujące etapy:

1. łączenie komórek NK z komórkami docelowymi, przy czym komórki NK posiadają na powierzchni strukturę („jednostkę rozpoznającą”) komplementarną do odpowiedniej struktury na komórce docelowej,
2. sam proces zabijania.

FUNKCJONALNE „JEDNOSTKI ROZPOZNAJĄCE” (RECOGNITION SITES) NA POWIERZCHNI KOMÓREK NK

Wydaje się, że struktura warunkująca wiązanie komórek docelowych przez komórki NK tzw. „jednostka rozpoznająca” jest białkiem, gdyż traktowanie papainą lub trypsyną komórek NK hamuje ich zdolność do wiązania komórek docelowych i powodowania lizy [65, 113, 155, 163, 169, 198]. Odtworzenie tych własności trwa w temperaturze 37°C 4–5 godzin, nie zachodzi w temp. 4°C lub w obecności cykloheksimidu (inhibitor translacji). Aby zaszła odnowa aktywności komórek NK, muszą więc istnieć warunki umożliwiające syntezę białek. Komórka NK może mieć jeden lub kilka typów „jednostek rozpoznających” o różnej specyficzności (ryc. 1) [32, 33, 78]. Ta specyficzność ogranicza aktywność cytotoksyczną pojedynczej komórki NK tylko do pewnych typów komórek docelowych.

Znanym zjawiskiem jest cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-ADCC) polegająca na tym, że komórka efektorowa posiadająca receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin (FcR) zabija komórkę docelową opłaszczoną przeciwciałami. Dlatego specjalną uwagę zwrócono na wykrywaną przez



Ryc. 1. Schemat przedstawiający komórki NK o różnej specyficzności, posiadające cechy komórek K oraz komórki K nie posiadającej cech NK (według [78])

1,2 — komórki posiadające „jednostki rozpoznające” o jednej specyficzności, a także jednocześnie receptory dla FcIgG; 3 — komórka posiadająca jednocześnie „jednostki rozpoznające” o dwu różnych specyficznościach i jednocześnie receptory dla FcIgG; 4 — komórka nie posiadająca „jednostek rozpoznających”, a jedynie receptory dla FcIgG

niektórych autorów obecność receptora dla Fc na powierzchni komórek NK, o czym już uprzednio wspomniano. Są dane sugerujące, że FcR nie jest receptorem odpowiedzialnym za działanie komórek NK. Kompleksy immunologiczne [198] oraz agregowane cząsteczki immunoglobuliny [67, 85] nie hamują aktywności cytotoksycznej komórek NK, mimo iż wiążąc się z FcR blokują ten receptor. Nie zmienia to faktu, że komórka NK, dzięki obecności na jej powierzchni receptorów dla FcR, może dodatkowo działać jako komórka K przejawiając aktywność cytotoksyczną zależną od przeciwciał (ryc. 1) [77].

STRUKTURY DOCELOWE (ANTYGENY) ROZPOZNAWANE PRZEZ KOMÓRKI NK

Usiłowano znaleźć wspólne cechy komórek atakowanych przez komórki NK. Można sądzić, że na powierzchni tych komórek istnieją struktury umożliwiające ich rozpoznanie umownie zwane „docelowymi”.

Większą uwagę poświęcono obecności wirusów typu C w komórkach docelowych. Stwierdzono metodą kompetycyjnej inhibicji lub testem adsorpcji do komórek docelowych, że komórki NK mają powinowactwo głównie do tych komórek nowotworowych, które produkują wirusy typu C lub posiadają ich antygeny na powierzchni [69, 116, 170, 191]. Z drugiej strony nie wszystkie takie komórki są zabijane, co można tłumaczyć gorszą dostępnością antygeny wirusowego na powierzchni komórki lub tym, że komórki NK wykazują inną jeszcze specyficzność

w zabijaniu komórek [14, 82, 196]. Gęstość antygenów wirusów typu C na powierzchni komórki docelowej nie ma wpływu na wielkość efektu cytotoksycznego komórek NK [5, 82]. Usiłowano wykazać korelację między antygenami tych wirusów a aktywnością komórek NK *in vivo*. Okazało się, że gryzonie wkrótce po urodzeniu są uczulone na antygeny wirusów typu C. Aktywność cytotoksyczna komórek NK jest ściśle skorelowana w czasie z pojawianiem się antygenów wirusów typu C w surowicy, natomiast nie jest związana z obecnością w surowicy „naturalnych” przeciwciał przeciwko tym wirusom [1, 69, 75, 95, 115, 170]. „Naturalne” przeciwciała prawdopodobnie nie mogą „uzbrajać” komórek NK aby te działały jako komórki K (cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał) [53]. Co do tego czy „naturalne” przeciwciała i komórki NK rozpoznają te same antygeny istnieją sprzeczne zdania [53, 62, 94].

Wielu badaczy próbowało bliżej charakteryzować antygeny(y) rozpoznawane przez komórki NK. Opisywano kilka różnych antygenów pochodzących od wirusów typu C, które mogą być strukturami docelowymi [69, 166], przy czym na powierzchni pojedynczej komórki może być kilka różnych struktur [135, 158]. Izolowano z komórek docelowych i rozdzielano w żelu poliakrylamidowym cząsteczki specyficznym łącznie się z odpowiednimi „jednostkami rozpoznającymi” na komórkach NK [158]. Są to białka błonowe połączone z resztami cukrowymi i mają ciężar cząsteczkowy 130 000, 160 000, 240 000. Stwierdzono, że te cząsteczki występują na powierzchni komórek, które są podatne na zabijanie przez komórki NK. Stwierdzono, że różnią się one od antygenów rozpoznawanych przez immunizowane w układzie allogenicznym limfocyty T. Supernatant z hodowli komórek docelowych może hamować cytotoksyczność komórek NK [204]. Efekt hamujący ustępuje po trawieniu supernatantu trypsyną, ale nie neuraminidazą. Prawdopodobnie komórki docelowe spontanicznie uwalniają „struktury docelowe” do środowiska. Badając powinowactwo do lektyn stwierdzono, że „struktury docelowe” są glikoproteidami o ciężarze cząsteczkowym 120 000–140 000. Zawierają one N-acetyl- β -D-glukozaminę i glukozę. Rolę cukrów w procesie cytotoksycznym komórek NK potwierdzają badania wykazujące, że D-mannoza blokuje cytotoksyczność komórek NK u myszy [173].

Ostatnio wykazano, że pewną rolę w rozpoznawaniu komórek docelowych ma obecny na ich powierzchni obojętny glikolipid (asialo GM₂, GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow | ceramide) [200]. Używając dwu podlinii mysiej białaczki L 5178 Y stwierdzono, że komórki NK zabijają tylko te komórki docelowe, które mają na swej powierzchni wspomniany glikolipid.

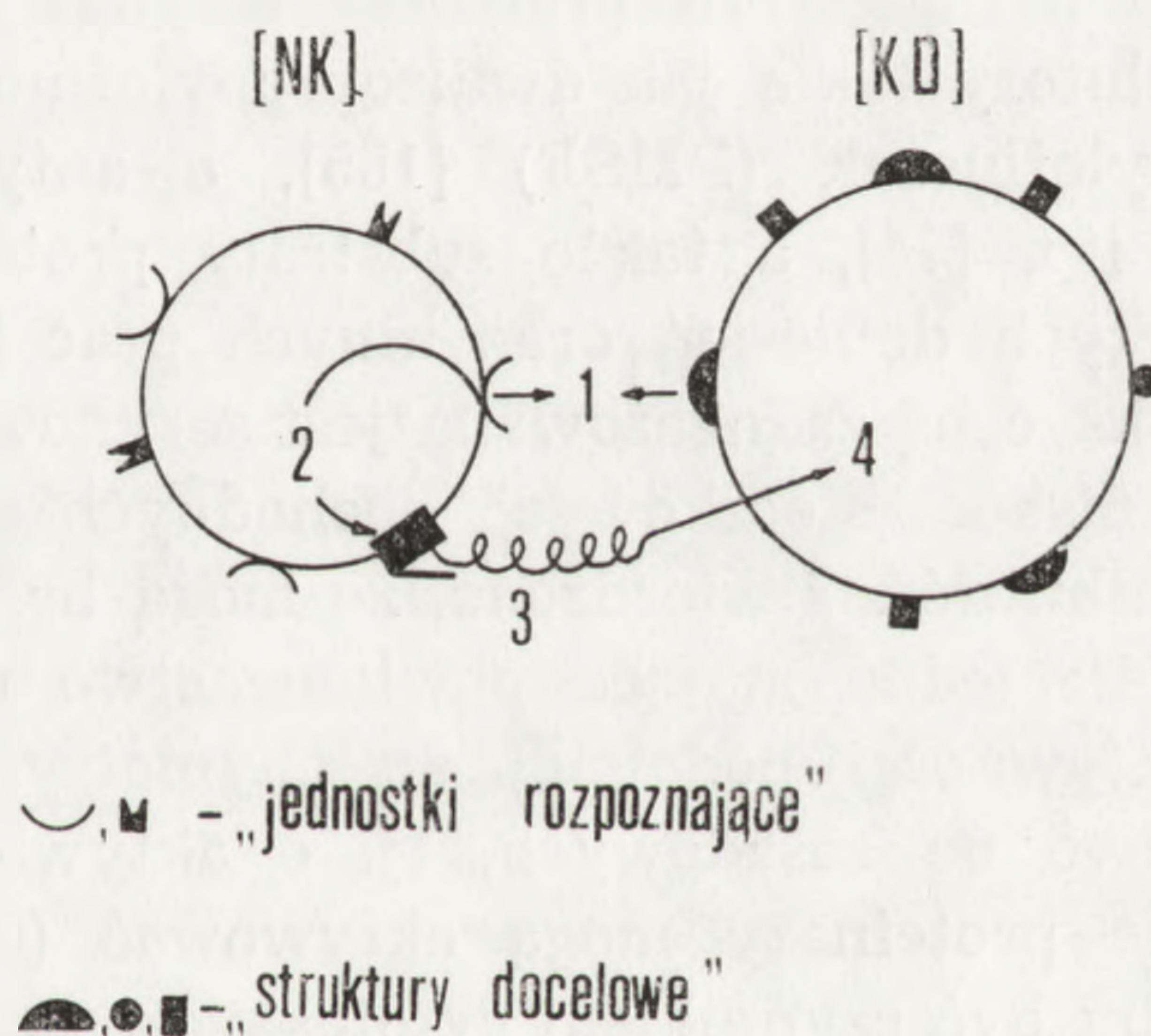
Na obecnym etapie badań wydaje się, że istnieją następujące typy komórek docelowych [27]:

1. komórki nie mające na swej powierzchni antygenów — „struktur docelowych” i w związku z tym niepodatne na zabijanie,
2. komórki mające na swej powierzchni „struktury docelowe” i w związku z tym zabijane lub mimo to nie zabijane.

Pod względem filogenezy „struktury docelowe” można podzielić na: nieewoluujące (stałe) i ewoluujące wraz z gatunkami [24].

MECHANIZM ZABIJANIA KOMÓRKI DOCELOWEJ PRZEZ KOMÓRKĘ NK

Jak już wspomniano, zjawiska doprowadzające do zabicia komórki docelowej przez komórkę NK są słabo poznane. Proces składa się z dwu niezależnych zjawisk: łączenia „jednostki rozpoznającej” — receptora komórki NK z antygenem — „strukturą docelową” komórki atakowanej oraz samego procesu lizy tej komórki [155] (ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający zjawiska prowadzące do zabicia komórki docelowej przez komórkę NK (według [155])

Proces składa się z dwu etapów: a — rozpoznania, co wymaga obecności na powierzchni komórki docelowej odpowiednich antygenów — „struktur docelowych” oraz na powierzchni komórki NK komplementarnych „jednostek rozpoznających” (1), b — lizy komórki docelowej. Ten drugi etap wymaga przekazania informacji o „rozpoznaniu” w obrębie komórki NK (2), wydzieleniu czynnika uszkodzającego (3), którym jest prawdopodobnie proteinaza (γ). Końcowym efektem jest liza samej komórki docelowej (4). Komórka efektorowa może mieć różnego rodzaju „jednostki rozpoznające”, a komórka docelowa różne „struktury docelowe”

Łączenie komórek docelowych przez komórki NK jest zależne od temperatury i osiąga maksimum po 20 minutach w temperaturze 37°C lub po 40 minutach w temp. 4°C . Jest ono hamowane przez EDTA, co sugeruje udział odpowiedniego stężenia jonów Ca^{+2} lub/i Mg^{+2} [53].

W dalszych badaniach okazało się, że odpowiednie stężenie jonów Ca^{+2} jest niezbędne, aby komórki NK podobnie jak immunizowane limfocyty T mogły połączyć się z komórkami docelowymi [119, 169, 170]. Jony Mg^{+2} potęgują działanie jonów Ca^{+2} .

Na elektronogramach można obserwować, że powierzchnia komórki NK jest pofałdowana w miejscu łączenia z komórką docelową, przy czym wypustki komórki docelowej wpuklają się do efektorowej [155].

Początek lizy następuje w 5–10 minut po łączeniu się komórek. Obserwuje się zależność od temperatury: liza nie zachodzi w temp. 15°C i jest zmniejszona do połowy w 20°C w stosunku do lizy zachodzącej w 37°C . Sugeruje się, że dla procesu lizy niezbędna jest obecność nienaruszonej struktury mikrotubul w komórce NK, ponieważ kolchicina hamuje ten proces nie wpływając na łączenie komórek. Postuluje się, że same zjawisko uszkodzenia komórki docelowej wymaga sprawnego procesu fosforylacji oksydatywnej ponieważ nie zachodzi w obecności takich inhibitorów jak azydek sodu (NaN_3) lub dwunitrofenol (DNP). Także aktywność proteiny lub proteinaz serynowych musi być zachowana, gdyż inhibitory takie jak dwuizopropylodifluorofosforan (DipF), fenylometylsulfofenylofluorek (PMSF) [155], α_1 -antytrypsyna, sojowy inhibitor trypsyny itp. [74], a także substraty proteinaz [75] hamują lizę. Na podstawie tych doniesień oraz innych prac [58] uważa się, że w aktywność cytotoksyczną zaangażowana jest serynowa proteinaza (proteiny). Używając niskocząsteczkowych pochodnych aminokwasów jako kompetycyjnych inhibitorów stwierdzono, że mogą być tu zaangażowane dwie proteiny [74]: jedna mająca powinowactwo do aromatycznych aminokwasów o aktywności podobnej do chymotrypsyny oraz druga mająca powinowactwo do zasadowych, tj. o aktywności podobnej do trypsyny. Być może proteiny mogą aktywować (uwalniać) błonowe lipazy, które mogłyby być czynnikiem cytotoksycznym [74]. Rozważa się także współdziałanie pewnych składników dopełniacza [34, 104].

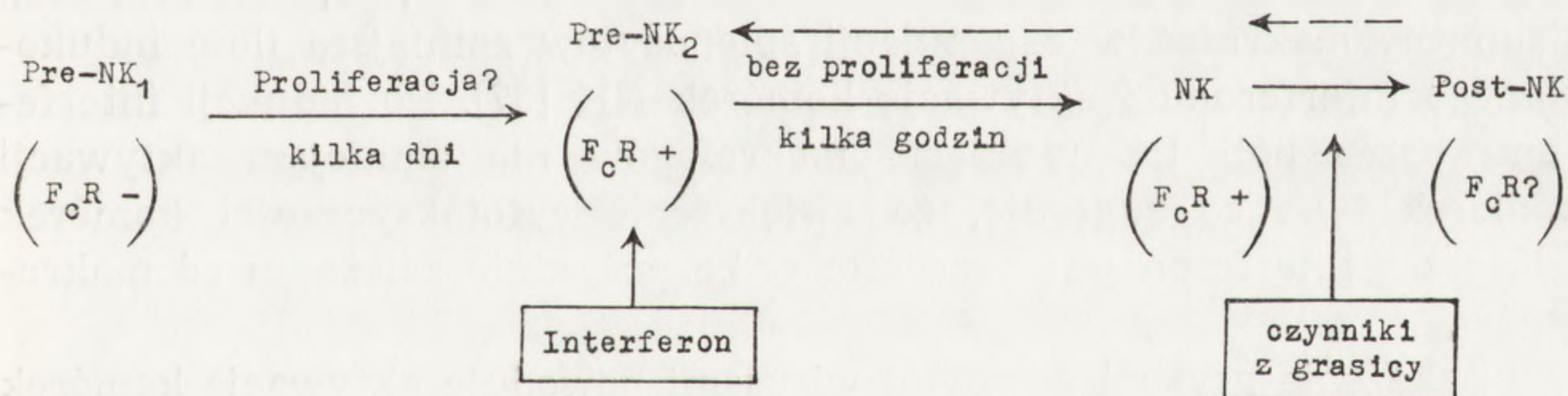
Wykazano, że nieimmunizowane limfocyty wielu szczepów myszy, w tym także myszy „nagich”, stymulowane przez fytohemaglutyninę lub konkanawalinę A wydzielają substancję toksyczną dla komórek zabijanych przez komórki NK [199]. Ma ona ciężar cząsteczkowy większy od 12 000, jest stabilna w -20°C , ulega inaktywacji w 100°C . Jej aktywność cytotoksyczna jest hamowana przez α -metylo-D-mannozyd, D-galaktozę lub N-acetylo-D-galaktozaminę. Być może komórki docelowe posiadają receptory dla tej substancji lub substancja ta jest związana z receptorem komórki efektorowej zdolnym do łączenia się z antygenem na komórce zabijanej. Ten drugi mechanizm byłby analogiczny do działania limfotoksyny ludzkiej [72].

Opisany mechanizm zabijania komórek docelowych jest charakterystyczny nie tylko dla komórek NK, ale także na przykład dla immunizowanych cytotoksycznych limfocytów T [6].

REGULACJA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ KOMÓREK NK

Jak już wcześniej wspomniano, komórki NK mają niejedolitą budowę, dlatego przypuszcza się, że podlegają procesom różnicowania. Badano czynniki wpływające na aktywność komórek NK i stwierdzono, że aktywność cytotoksyczna tych komórek jest zależna od wieku gospodarza. U myszy i szczurów spontaniczna aktywność cytotoksyczna komórek NK zależna jest od wieku zwierząt [20, 36, 68, 119] i prawdopodobnie od inwazji mikroorganizmów [23], gdyż myszy hodowane w warunkach wolnych od drobnoustrojów (pathogen-free mice) mają znikomą aktywność komórek NK. U myszy aktywność komórek NK pojawia się w 3–4 tygodniu życia i wygasa w 10–12 tygodniu.

Opisano istnienie prekursorów komórek NK (pre-NK), z których dopiero powstają dojrzałe komórki [78, 111, 117, 192]. Schemat dojrzewania przedstawia ryc. 3. Przypuszczalnie mechanizm dojrzewania pre-



Ryc. 3. Schemat dojrzewania i aktywacji komórek NK (według [111, 122]), FcR = = receptor dla fragmentu F_c immunoglobuliny

NK w NK jest niezależny od grasicy i limfocytów pomocniczych T (T-helper cells), bo myszy z usuniętą grasicą nie wykazują żadnych zaburzeń tego procesu [117].

Radioaktywny izotop strontu uszkadzając szpik obniża cytotoksyczność komórek NK [57]. Wydaje się więc, że szpik odgrywa ważną rolę w generacji komórek NK. Przeszczepy szpiku myszy z wysoką aktywnością komórek NK do myszy napromieniowanych przywracają im aktywność komórek NK [56].

CZYNNIKI ZWIĘKSZAJĄCE AKTYWNOŚĆ KOMÓREK NK

Najważniejszym wśród czynników stymulujących aktywność cytotoksyczną komórek NK wydaje się być interferon oraz różne czynniki, które go wyzwalają.

Bezpośrednie dodanie interferonu aktywuje cytotoksyczne komórki NK *in vitro* [2, 18, 79, 96, 138, 160, 184, 187], jak i *in vivo* [47, 52, 68, 119]. Stopień aktywacji jest proporcjonalny do ilości podanego interferonu [2]. Przypuszcza się, że interferon działa na komórki NK stymulując ich różnicowanie w aktywne formy oraz zwiększając już istniejącą spontaniczną aktywność komórek NK [10, 36, 190]. Działanie interferonu można zablokować przeciwciałami przeciw interferonowi [36, 47], a ponowne dodanie interferonu odwraca ten efekt.

Stwierdzono, że BCG, *Corynebacterium parvum*, *Streptococcus pyogenes*, endotoksyna, pyran i poli I:C mogą indukować aktywność cytotoksyczną komórek NK [7, 36, 37, 46, 68, 71, 99, 100, 102, 117, 119, 123, 136, 148, 168, 182, 194, 197, 198]. W przypadku *Corynebacterium parvum* istnieją doniesienia o stymulującym [119], jak i hamującym działaniu [162]. Efekt zależy od drogi podania [120] oraz czasu po podaniu — w pierwszych dniach następuje stymulacja, potem hamowanie [98]. Stymulacja cytotoksyczności komórek NK jest skorelowana w czasie z indukcją interferonu przez wymienione czynniki [30, 47, 86, 105, 111, 202]. Usunięcie makrofagów z populacji splenocytów zmniejsza ilość indukowanego interferonu i aktywację komórek NK [37]. Po indukcji interferonu przez poli I:C usunięcie makrofagów nie zmniejsza aktywacji komórek NK, co sugeruje, że zwiększenie cytotoksyczności komórek NK przez interferon jest procesem tylko pośrednio zależnym od makrofagów.

Zakażenie gryzoni pewnymi wirusami powoduje aktywację komórek NK [12, 68, 102, 106, 119, 149, 192, 194]. Efekt ten znów jest skorelowany w czasie ze znanym zjawiskiem indukcji interferonu przez wirusy [106, 149].

Sądzi się, że indukcja komórek NK przez komórki nowotworowe, zarazone wirusami lub *Mycoplasma ovale* prawdopodobnie odbywa się za pośrednictwem interferonu [8, 44, 68, 92, 138, 178].

Wirusy wywołują proliferację specyficznych klonów limfocytów B i T [114], aktywacji ulegają makrofagi i granulocyty [9, 109]. Odpowiedź humoralna i aktywacja makrofagów następuje po 4 dniach od zakażenia [9, 175], a odpowiedź limfocytów T po 5–6 dniach [26, 133, 206]. Aktywacja komórek NK występuje przed odpowiedzią limfocytów T [192].

Wydaje się, że poli I:C stymuluje do produkcji interferonu głównie makrofagi oraz fibroblasty [59], natomiast wirusy, konkanawalina A

(mitogen limfocytów T) i LPS (mitogen limfocytów B) stymulują głównie limfocyty [19].

Limfocyty po kontakcie z pewnymi komórkami np. nowotworowymi, zarażonymi wirusami, wydzielają obok różnych czynników (np. limfotoksyn, limfokin) [70, 79, 96, 130] także interferon [25, 160, 172, 185, 186]. Różne subpopulacje limfocytów mogą produkować interferon, w tym także komórki NK [110, 129]. Potwierdzono to za pomocą badań immunofluorescencyjnych przy użyciu przeciwciał przeciw interferonowi [10], a także przez obserwację że *Corynebacterium parvum* (induktor interferonu) aktywuje komórki NK *in vitro* bez pośrednictwa makrofagów i limfocytów B i T [145]. Kontakt komórek NK z komórkami nowotworowymi wystarcza do indukcji produkcji interferonu w komórkach NK [181].

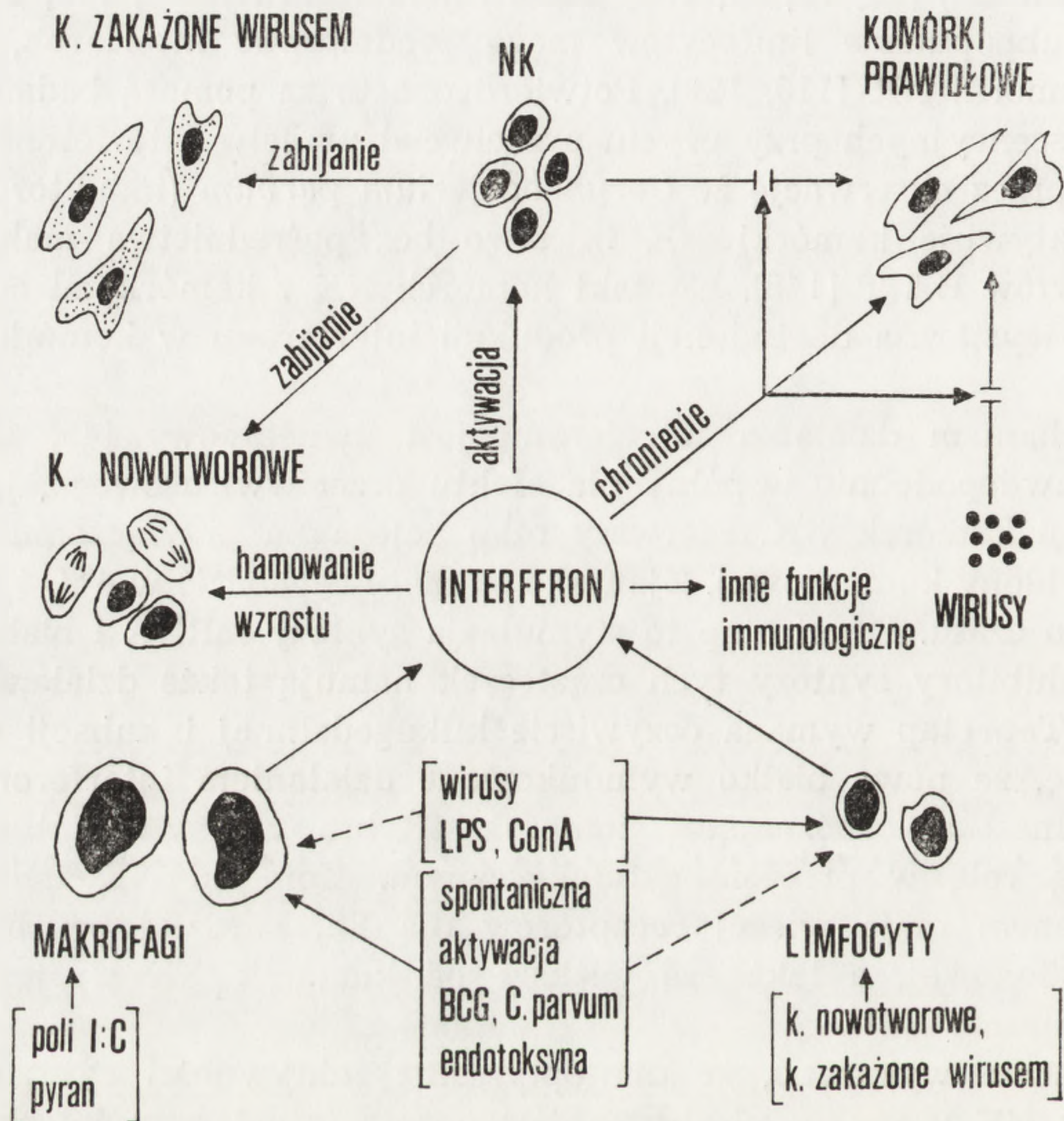
Mechanizm działania interferonu jest dwuetapowy [45, 122, 167, 188], prawdopodobnie wspólny dla efektu przeciwwirusowego, jak i dla aktywacji komórek NK. Pierwszy etap polega na przyłączeniu interferonu do błony komórkowej. Zjawisko to może zachodzić w 4 °C i wymaga krótkiego czasu. Drugi etap to stymulacja syntezy mRNA i białka, gdyż różne inhibitory syntezy tych cząsteczek hamują także działanie interferonu. Ten etap wymaga oczywiście kilkugodzinnej inkubacji w 37 °C. Sądzi się, że nowe białko wyindukowane działaniem interferonu może być „jednostką rozpoznającą” komórek NK lub w inny sposób odgrywa kluczową rolę w procesie cytotoksycznym. Komórki NK indukowane interferonem mają więcej receptorów dla Fc, bardziej przylegają do waty nylonowej, a także są większe od komórek NK występujących „spontanicznie” [81].

Ostatnio wykazano, że dla optymalnej aktywności cytotoksycznej komórek NK u myszy niezbędna jest oprócz interferonu interleukina-2 (T-cell growth factor) [91]. Wykazano, że interleukina-2 (IL-2) obok działania na proliferację limfocytów T indukuje cytotoksyczność komórek NK. Interferon zaś zwiększa zdolność wiązania IL-2 przez komórki. Przypuszcza się także, że IL-2 jest odpowiedzialna za zależną od limfocytów T aktywację komórek NK w mieszanej hodowli limfocytów.

Czynnikiem stymulującym dla komórek NK jest również „surowica nekrotyczna guza” (TNS — tumor necrosis serum) [20, 128]. TNS jest indukowana *in vivo* przez podanie zdrowej myszy BCG lub *Corynebacterium parvum*, a potem LPS [17]. Powoduje ona ostrą martwicę guza nowotworowego i w rezultacie regresję syngenicznego nowotworu u myszy [111]. TNS indukuje *in vitro* cytotoksyczne komórki NK [20]. Okazało się, że TNS zawiera interferon i być może jest on tu głównym czynnikiem aktywującym komórki NK [20].

Należy podkreślić, że interferon, a tym samym i czynniki stymulu-

jące jego wytwarzanie nie działa wybiórczo na stymulację komórek NK, a wielokierunkowo. Niektóre z elementów działania interferonu przedstawiono na ryc. 4.



Ryc. 4. Schemat działania interferonu (modyfikowane według [111]). Linie przerywane oznaczają sugerowane przez niektórych autorów kierunki działań

Limfocyty T w czasie hodowli z allogenicznymi komórkami limfoblastycznymi wydzielają czynnik (NAF-N-cell-activating factor) aktywujący komórki NK [89, 174]. NAF jest białkiem termolabilnym, a jego działanie jest gatunkowo specyficzne.

Ostatnio wykryto nowy czynnik aktywujący między innymi komórki NK — tuftsinę [134]. Jest to peptyd (Thr-Lys-Pro-Arg) posiadający własności adiuwantu immunologicznego. Tuftsina zwiększa *in vitro* cytotoksyczność komórek NK wobec komórek nowotworowych proporcjonalnie do dawki. Preinkubacja komórek docelowych z tuftsiną nie zwiększa ich podatności na zabijanie.

Na przykładzie szczurów wykazano, że cytotoksyczność populacji

komórek NK podlega dobowym wahaniom [42], podobnie jak wiele innych funkcji organizmu.

Badając poziom cyklicznych nukleotydów pokazano, że podwyższenie poziomu cAMP wpływa hamująco, a cGMP aktywująco na komórki NK [156]. Podobne zjawisko obserwuje się przy innych formach cytotoxyczności komórkowej.

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ZMNIEJSZENIE AKTYWNOŚCI KOMÓREK NK

Aktywność cytotoksyczna dojrzałych komórek NK jest hamowana czynnikami immunosupresyjnymi, takimi jak: cyklofosfamid, hydrokortyzon i promieniowanie jonizujące [35, 38, 73, 117, 127]. Natomiast komórki pre-NK₂, a także ich proces aktywacji przez interferon są niewrażliwe [64, 117] na wymienione czynniki. Glikokortykoidy (np. hydrokortyzon) mają krótkotrwały efekt limfolityczny [21], stąd uszkodzone komórki NK są szybko zastępowane przez nowe pochodzące z komórek pre-NK opornych na hydrokortyzon [117]. Duże dawki promieniowania jonizującego zmniejszają aktywność komórek NK [13, 126], natomiast małe działają odwrotnie [13]. Zdolność do wiązania komórek docelowych pozostaje nie zmieniona [126].

Obniżenie spontanicznej aktywności cytotoksycznej komórek NK jest powodowane także przez środek karcinogeny — uretan [50, 171], który podobnie jak cyklofosfamid, hydrokortyzon i promienie jonizujące działa na dojrzałe komórki NK, a nie uszkadza pre-NK.

Estry forbolu (czynniki będące promotorami rozwoju nowotworu) hamują cytotoxyczność komórek NK [50]. Własności tej nie mają analogi pozbawione własności promocji. Estry forbolu działają prawdopodobnie przez hamowanie produkcji interferonu. Opisane działanie estrów forbolu można zmniejszyć przez zastosowanie kwasu retinowego.

Estrogeny i hormony grasicy mogą zmniejszać cytotoxyczność komórek NK [99, 164, 165]. Wykazano, że 17 β -estradiol nie hamuje produkcji interferonu, ale blokuje jego działanie stymulujące na komórki NK [165]. Wydaje się, że estrogeny albo blokują dojrzewanie komórek pre-NK, albo zmniejszają ich ilość, nie są natomiast bezpośrednio toksyczne dla dojrzałych komórek NK.

Prostaglandyny E₁ i E₂ hamują aktywność komórek NK działając na nie bezpośrednio [39, 40]. Prostaglandyny produkowane być mogą także przez komórki nowotworowe, które w ten sposób chronią się przed atakiem komórek NK. Inhibitory syntezy prostaglandyn znoszą ten efekt.

Cytochalazyny i kolchicina, podobnie jak w przypadku innych komórek cytotoxycznych, hamują działanie komórek NK [60].

Surowica od nowo narodzonych myszy hamuje cytotoksyczność komórek NK *in vitro* [16]. Hamowanie jest największe w 4–7 dniu po urodzeniu i nie można go usunąć metodą adsorpcji do komórek docelowych. Czynnik zawarty w surowicy ma ciężar cząsteczkowy 70 000–80 000 daltonów.

Frakcja ludzkiej α -globuliny, „normalne białko immunosupresyjne” (NIP-normal immunosuppressive protein) hamuje działanie komórek NK i limfocytów T [51]. Podobne własności wykazuje toksyna przecinkowców cholery [49]. Wykazano, że surowica od myszy z nowotworem także zmniejsza *in vitro* cytotoksyczność komórek NK, jednak nie jest to skorelowane z ilością krążących kompleksów immunologicznych [112].

Obok opisanego wcześniej wpływu stymulacyjnego na komórki efektowe interferon zwiększa oporność komórek docelowych przeciw atakowi komórek NK [2, 183, 184, 193]. Efekt ten obserwuje się *in vivo* i *in vitro* głównie w przypadku komórek prawidłowych, choć komórki nowotworowe również są w pewnym stopniu chronione (protection). Warunkiem wystąpienia tego zjawiska jest obecność receptora dla interferonu na komórkach docelowych [193]. Przeciwciała przeciw interferonowi, a także inhibitory syntezy RNA lub białka zmniejszają efekt chronienia. Na podstawie badania adsorpcji komórek NK do komórek docelowych oraz mikroskopowych badań cytotoksyczności stwierdzono, że komórki NK wiążą się zarówno z komórkami docelowymi preinkubowanymi, jak i nie inkubowanymi z interferonem [183]. Chronienie osiąga maksimum po 8 godzinach inkubacji, przy czym okres kontaktu z interferonem może być krótki, rzędu 5 minut. Efekt znika po 60 godzinach [183]. Sugeruje się, że interferon działa na komórki docelowe przez zmiany w ilości kwasów sialowych związanych z glikolipidami błonowymi [193]. Chronienie nie występuje w przypadku cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał oraz cytotoksyczności komórek T [183].

KOMÓRKI HAMUJĄCE AKTYWNOŚĆ CYTOTOKSYCZNAŁ KOMÓREK NK

Cytotoksyczność komórek NK jest hamowana przez dwie różne populacje komórek, z których jedna jest zbliżona do makrofagów, a druga jest subpopulacją limfocytów.

Siarczan poligalaktanu (carrageenan) indukuje komórki supresorowe dla komórek NK *in vivo* i *in vitro* [16]. Podobne działanie *in vivo* ma hydrokortyzon [16]. Tak indukowane komórki supresorowe mają następujące własności: są niezależne od grasicy, gdyż występują u myszy „nagich”, są odporne na 2000 radów promieniowania gamma, ich działanie nie jest ograniczone przez główny kompleks zgodności tkankowej, przylegają do sefadeksu G-10 podczas filtracji na kolumnie. Na podsta-

wie tych własności nazwano je komórkami podobnymi do makrofagów. Komórki te jednak w przeciwieństwie do makrofagów nie przylegają do plastyku. Można je usuwać za pomocą opiłków żelaza i magnesu, co świadczy, że mają one zdolność fagocytozy. Stwierdzono, że również kopolimer pyranu może w podobny sposób indukować *in vivo* makrofagi supresorowe [143, 147, 162].

Inną populacją komórek hamującą aktywność NK są komórki nieadherencyjne [111, 162]. Występują one w populacji komórek śledziony myszy w wieku 8–14 dni lub myszy napromienionych. Komórki te podobnie jak makrofagi nie są post-graniczymi limfocytami T, są odporne na 2000 radów promieniowania gamma i nie są kontrolowane przez główny kompleks zgodności tkankowej, w odróżnieniu jednak od nich nie przylegają do sefadeksu G-10.

Sugeruje się, że nieadherencyjne komórki supresorowe mogą być niedojrzałymi komórkami NK (pre-NK), które mają receptory umożliwiające rozpoznanie i wiązanie komórki docelowej, ale nie są zdolne do zabijania [16]. Hamowanie mogłoby więc być swego rodzaju stanem równowagi między niedojrzałymi a dojrzałymi komórkami NK.

Ostatnio wyodrębniając z limfocytów subpopulacje zależnie od zdolności do wiązania różnych bakterii udało się wykazać, że pewne subpopulacje mają zdolność do hamowania aktywności komórek NK [29, 88].

KONTROLA GENETYCZNA AKTYWNOŚCI KOMÓREK NK

Aktywność cytotoksyczna komórek NK i produkcja interferonu pozostaje pod kontrolą genetyczną [31, 68, 83, 131, 150, 154, 157]. Wyhodowano szczep myszy zwany „beige”, który jest całkowicie pozbawiony aktywności komórek NK oraz cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (komórki K), podczas gdy inne formy cytotoksyczności komórkowej są nie zmienione [152]. Jest to uwarunkowane genem recesywnym autosomalnym i przejawia się brakiem zdolności komórek NK do lizy komórek docelowych, bo zdolność rozpoznawania i wiązania się z komórkami docelowymi wydaje się być nie zmieniona. Defekt występuje na poziomie prekursorów NK w szpiku, a interferon nie zwiększa cytotoksyczności [150]. Podobny gen występujący u ludzi powoduje objawy zwane zespołem Chediak-Higashi'ego [57, 88, 153].

Komórki NK mogą być stymulowane tymi samymi alloantygenami co cytotoksyczne limfocyty T (H-2K, H-2I-A, H-2D), co sugerowałoby, że aktywacja tych komórek jest pod wspólną kontrolą genetyczną [22]. Aktywność NK przejawiałaby się wcześniej. Kontrola genetyczna komórek NK przez układ H-2 odbywałaby się na tej samej zasadzie co kontrola limfocytów T przez geny Ir [205]. Podsumowując kontrola

genetyczna komórek NK realizowana byłaby głównie przez: 1. gen „beige”, 2. geny związane z układem H-2, 3. geny związane z interferonem.

PODSUMOWANIE

Organizm ma różne formy odpowiedzi na zagrożenie zewnętrzne. Niektóre z nich są stosunkowo dobrze poznane i charakteryzują się łatwo zauważalnym związkiem między pojawieniem się w organizmie obcej komórki czy substancji a rozwojem odpowiedzi organizmu, która tym samym skierowana jest wybiórczo tylko przeciw określonej obcej komórce czy substancji (swoista odpowiedź organizmu). W przypadku gdy takiej zależności nie można bezpośrednio zaobserwować mówi się o „naturalnej” odporności. Omówione w artykule komórki NK wykazują właśnie taką „naturalną” cytotoksyczność, co podkreślono między innymi w ich nazwie.

Istnieją pewne dowody, że komórkami docelowymi dla komórek NK są głównie (lub nawet wyłącznie) komórki zakażone wirusami typu C. Sugeruje to, że działanie komórek NK następuje na skutek uzyskania informacji o antygenach tych wirusów we wczesnym okresie rozwoju osobnika. Potem warunkuje to działanie komórek NK przeciw komórkom zakażonym wirusami C. Z drugiej strony własności komórek NK wyraźnie różnią się od cytotoksycznych limfocytów T. Tak więc działanie komórek NK wydaje się być nowo poznaną formą odpowiedzi immunologicznej.

LITERATURA

- [1] AOKI T., BOYSE E. A., OLD L. J., Occurrence of natural antibody to the G (Gross) leukemia antigen in mice, *Cancer Res.*, **26**: 1415–1419, 1966.
- [2] ATTALLAH A. M., FOLKS T., Interferon enhanced human natural killer and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity, *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, **60**: 377–382, 1979.
- [3] AULT K. A., SPRINGER T. A., Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal antibody (anti-Mac-1) with human monocytes and natural killer cells, *J. Immunol.*, **126**: 359–364, 1981.
- [4] BAKACS T., GERGELY P., KLEIN E., Characterisation of cytotoxic human lymphocyte subpopulations: the role of Fc-receptor-carrying cells, *Cell. Immunol.*, **32**: 317–328, 1977.
- [5] BECKER S., FENYÖ E. M., KLEIN E., The „natural killer” cell in the mouse does not require H-2 homology and is not directed against type or group-specific antigens of murine C-viral proteins, *Europ. J. Immunol.*, **6**: 882–885, 1976.

- [6] BERKE G., GABISON D., Energy requirements of the binding and lytic steps of T lymphocyte-mediated cytotoxicity of leukemia cells in vitro, *Eur. J. Immunol.*, 5: 671-675, 1975.
- [7] BICK P. H., MOLLER G., Rapid induction of cytotoxic killer cells following activation by complexes of synthetic poliribonucleotides, *Scand. J. Immunol.*, 6: 681, 1977.
- [8] BIRKE C., PETER H. H., LANGENBERG U., MÜLLER-HERMES W. J. P., PETERS J. H., HEITMANN J., LEIBOLD W., DALLÜGGE H., KRAPF E., KIRCHNER C., Mycoplasma contamination in human tumor cell lines: effect on interferon induction and susceptibility to natural killing, *J. Immunol.*, 127: 94-98, 1981.
- [9] BLANDEN R. V., MIMS C. A., Macrophage activation in mice infected with ectromelia or lymphocytic choriomeningitis viruses, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 51: 393-398, 1973.
- [10] BLOOM B. R., Interferons and the immune system, *Nature*, 284: 593-595, 1980.
- [11] BOLHUIS R. L. H., SCHUIT H. R. E., NOOYEN A. M., RONTELTAP C. P. M., Characterisation of natural killer (NK) cells and killer (K) cells in human blood: discrimination between NK and K cell activities, *Eur. J. Immunol.*, 8: 731-740, 1978.
- [12] BRO-JORGENSEN K., KNUDTZON S., Changes in hemopoiesis during the course of acute LCM virus infection in mice, *Blood*, 49: 47-57, 1977.
- [13] BROVALL C., SCHACTER B., Radiation sensitivity of human natural killer cell activity: control by X-linked genes, *J. Immunol.*, 126: 2236-2239, 1981.
- [14] BURTON R. C., GRALL D., WARNER N. L., Natural cytotoxicity of haemopoietic cell populations against murine lymphoid tumours, *Br. J. Cancer*, 37: 806-817, 1978.
- [15] BURTON R. C., WINN H. J., Studies on natural killer (NK) cells. I. NK cell specific antibodies in CE anti-CBA serum, *J. Immunol.*, 126: 1985-1989, 1981.
- [16] CANTOR H., KASAI M., SHEN F. W., LECLERC J. C., GLIMCHER L., Immunogenetic analysis of „natural killer” activity in the mouse, *Immunol. Rev.*, 44: 3-12, 1979.
- [17] CARSWELL E. A., OLD L. J., KASSEL R. L., GREEN S., FIORE N., WILLIAMSON B., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3666-3670, 1975.
- [18] CHERNYAKHOVSKAYA I. Y., SLAVINA E. G., SVET-MOLDAVSKY G. J., Antitumor effect of lymphoid cells activated by interferon, *Nature*, 228: 71-72, 1970.
- [19] CHUN M., FERNANDES G., HOFFMAN M. K., Mechanism of NK cell activation: relationship between Qa5⁺ NK cells and lymphocytes, *J. Immunol.*, 126: 331-334, 1981.
- [20] CHUN M., PASANEN V., HÄMMERLING U., HÄMMERLING G. F., HOFFMAN M. K., Tumor necrosis serum induces a serologically distinct population of NK cells, *J. Exp. Med.*, 150: 426-431, 1979.
- [21] CLAMAN H. N., Corticosteroids and lymphoid cells, *N. Engl. J. Med.*, 287: 388-391, 1972.
- [22] CLARK E. A., HOLLY L. D., Activation of natural killer (NK) cells in vivo with H-2 and non-H-2 alloantigens, *Immunogenetics*, 12: 221-235, 1981.
- [23] CLARK E. A., RUSSEL P. H., EGGHART M., HORTON M. A., Characte-

- ristics and genetic control of NK-cell-mediated cytotoxicity activated by naturally acquired infection in the mouse, *Int. J. Cancer*, **24**: 688-699, 1979.
- [24] CLARK E. A., STURGE J. C., Phylogeny of NK cell reactivity against human and nonhuman primate lymphoblastoid cell lines: evolving and conserved target antigens, *J. Immunol.*, **126**: 969-974, 1981.
- [25] COLE B. C., OVERALL J. C., Jr., LOMBARDI P. S., GLASGOW L. A., Induction of interferon in ovine and human lymphocyte cultures by mycoplasmas, *Infect. Immunol.*, **14**: 88-94, 1976.
- [26] COLE G. A., NATHANSON N., PRENDERGAST R. A., Requirement for C-bearing cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced central nervous system disease, *Nature*, **238**: 335-336, 1972.
- [27] COLLINS J. L., PATEK P. Q., COHN M., Tumorigenicity and lysis by natural killers, *J. Exp. Med.*, **153**: 89-106, 1981.
- [28] COOPER S. M., HIRSEN D. J., FRIOU G. J., Spontaneous cell-mediated cytotoxicity against Chang cells by nonadherent, non-thymus derived Fc receptor-bearing lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **32**: 135-145, 1977.
- [29] de BOER K. P., KLEINMAN R., TEODORESCU M., Identification and separation by bacterial adherence of human lymphocytes that suppress natural cytotoxicity, *J. Immunol.*, **126**: 276-281, 1981.
- [30] de CLERQ E., MERIGAN T. C., Stimulation or inhibition of interferon production depending on time of cycloheximide administration, *Virology*, **42**: 799-804, 1970.
- [31] de MAEYER E., de MAEYER-GUIGNARD J., BAILEY D. W., Effect of mouse genotype on interferon production. I. Lines congenic at the IF-1 locus, *Immunogenetics*, **1**: 438-443, 1975.
- [32] DENNERT G., Cloned lines of natural killer cells, *Nature*, **287**: 47-49, 1980.
- [33] DENNERT G., YOGESWARAN G., YAMAGATA S., Cloned cell lines with natural killer activity: specificity, function, and cell surface markers, *J. Exp. Med.*, **153**: 545-556, 1981.
- [34] DIERICH M. P., LANDEN B., Complement bridges between cells. Analysis of a possible cell-cell interaction mechanism, *J. Exp. Med.*, **146**: 1484-1499, 1977.
- [35] DJEU J. Y., HEINBAUGH J. A., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., Effect of immunosuppressive agents on mouse natural killer cells, *AACR Abstracts*; 237, 1978.
- [36] DJEU J. Y., HEINBAUGH J. A., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers, *J. Immunol.*, **122**: 175-181, 1979.
- [37] DJEU J. Y., HEINBAUGH J. A., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., Role of macrophages in the augmentation of mouse natural killer cell activity by poly I:C and interferon, *J. Immunol.*, **122**: 182-187, 1979.
- [38] DJEU J. Y., HEINBAUGH J. A., VIEIRA W., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., The effect of immunopharmacological agents on mouse natural cell-mediated cytotoxicity and on its augmentation by poly I:C, *Immunopharmacology*, **1**: 231-244, 1979.
- [39] DROLLER M. J., PERLMANN P., SCHNEIDER M. U., Enhancement of natural and antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity by drugs which inhibit prostaglandin production by tumor target cell, *Cell. Immunol.*, **39**: 154-164, 1978.

- [40] DROLLER M. J., SCHNEIDER M. U., PERLMANN P., A possible role of prostaglandins in the inhibition of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against tumor cells, *Cell. Immunol.*, **39**: 165-177, 1978.
- [41] EREMIN O., COOMBS R. R. A., PLUMB D., ASHBY J., Characterisation of the human natural killer (NK) cell in blood and lymphoid organs, *Int. J. Cancer*, **21**: 42-50, 1978.
- [42] FERNANDES G., CARANDENTE F., HALBERG E., HALBERG F., GOOD R. A., Circadian rhythm in activity of lympholytic natural killer cells from spleens of Fischer rats, *J. Immunol.*, **123**: 622-625, 1979.
- [43] FITZGERALD K. L., PONZIO N. M., Natural killer cell activity in reticulum cell sarcomas (RCS) of SJL/J mice, *Cell. Immunol.*, **43**: 185-191, 1979.
- [44] FORMAN J., BRITTON S., Heterogeneity of the effector cells in the cytotoxic reaction against allogeneic lymphoma cells, *J. Exp. Med.*, **137**: 369-386, 1973.
- [45] FRIEDMAN R. M., Antiviral activity of interferons, *Bacteriol. Rev.*, **41**: 543-567, 1977.
- [46] GIDLUND M., Natural killer cells: features and function, *Acta Universitatis Uppsaliensis*; 372, 1980.
- [47] GIDLUND M., ÖRN A., WIGZELL H., SENIK A., GRESSER I., Enhanced NK cell activity in mice infected with interferon and interferon inducers, *Nature*, **223**: 259-261, 1978.
- [48] GLIMCHER L., SHEN F. W., CANTOR H., Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell, *J. Exp. Med.*, **145**: 1-9, 1977.
- [49] GOLDFARB R. H., HERBERMAN R. B., Natural killer cell reactivity: regulatory interactions among phorbol ester, interferon, cholera toxin, and retinoic acid, *J. Immunol.*, **126**: 2129-2135, 1981.
- [50] GORELIK E., HERBERMAN R. B., Inhibition of the activity of mouse natural killer cells by urethan, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**: 543-548, 1981.
- [51] GOREN R., NELKEN D., The inhibitory effect of normal immunosuppressive protein on lymphocytes mediating natural killing activity, *Immunology*, **42**: 427-430, 1981.
- [52] GRESSER I., BOURALI C., LEVY J. P., FONTAINE-BROUTY-BOYE D., THOMAS M. T., Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **63**: 51-57, 1969.
- [53] GRÖNBERG A., HANSSON M., KIESSLING R., ANDERSSON B., KÄRRE K., RODER J. C., Demonstration of natural antibodies in normal rabbit serum with similar specificity pattern as mouse natural killer cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**: 1113-1119, 1980.
- [54] HABU S., FUKUI H., SHIMAMURA K., KASAI M., NAGAI Y., OKUMURA K., TAMAOKI N., In vivo effects of anti-asialo GM 1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice, *J. Immunol.*, **127**: 34-38, 1981.
- [55] HALIOTIS T., RODER J. C., KLEIN M., ORTALDO J. R., FAUCI A. S., Chediak-Higashi gene in humans. I. Impairment of natural-killer function, *J. Exp. Med.*, **151**: 1039-1048, 1980.
- [56] HALLER O., HANSSON M., KIESSLING R., WIGZELL H., Role of non-conventional natural killer cell resistance against syngeneic tumor cells in vivo, *Nature*, **270**: 609-611, 1977.

- [57] HALLER O., WIGZELL H., Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow-dependent, *J. Immunol.*, **118**: 1503-1506, 1977.
- [58] HATCHER V. B., OBERMAN M. S., LAZARUS G. S., GRAYZEL A. I., A cytotoxic proteinase isolated from human lymphocytes, *J. Immunol.*, **120**: 665-670, 1978.
- [59] HAVELL E. A., VILCEK J., Production of high-titered interferon in cultures of human diploid cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**: 476-484, 1972.
- [60] HENNEY C. S., TRACEY D., DURDIK J. M., KLIMPEL G., Natural killer cells: in vitro and in vivo, *Am. J. Pathol.*, **93**: 459-467, 1978.
- [61] HENNEY C. S., TRACEY D. E., WOLFE S. A., BCG-induced natural killer cells: immunotherapeutic implications, *Isr. J. Med. Sci.*, **14**: 75-88, 1978.
- [62] HERBERMAN R. B., AOKI T., NUNN M., Specificity of ⁵¹Cr-release cytotoxicity by lymphocytes immune to murine sarcoma virus, *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**: 1103-1111, 1974.
- [63] HERBERMAN R. B., BARTHAM S., HASKILL J. S., NUNN M., HOLDEN H. T., WEST W. H., Fc receptors on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells, *J. Immunol.*, **119**: 322-326, 1977.
- [64] HERBERMAN R. B., DJEU J. Y., KAY H. D., ORTALDO J. R., RICCARDI C., BONNARD G. D., HOLDEN H. T., FAGNANI R., SANTONI A., Puccetti, Natural killer cells: characteristics and regulation of activity, *Immunol. Rev.*, **44**: 43-70, 1979.
- [65] HERBERMAN R. B., HOLDEN H. T., Natural cell mediated immunity, *Adv. Cancer Res.*, **27**: 305-377, 1978.
- [66] HERBERMAN R. B., NUNN M. E., HOLDEN H. T., Low density of Thy-1 antigen on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells, *J. Immunol.*, **121**: 304-309, 1978.
- [67] HERBERMAN R. B., NUNN M. E., HOLDEN H. T., LAVRIN D. H., Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allpgeneic tumors. II. Characterisation of effector cells, *Int. J. Cancer*, **16**: 230-239, 1975.
- [68] HERBERMAN R. B., NUNN M. E., HOLDEN H. T., STAAL S., DJEU J. Y., Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic cells, *Int. J. Cancer*, **19**: 555-564, 1977.
- [69] HERBERMAN R. B., NUNN M. E., LAVRIN D. H., Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity, *Int. J. Cancer*, **16**: 216-229, 1975.
- [70] HERON I., BERG K., CANTELL K., Regulatory effect of interferon on T cells in vitro, *J. Immunol.*, **117**: 1370-1373, 1976.
- [71] HIRT H. M., BECKER H., KIRCHNER H., Induction of interefron production in mouse spleen cell cultures by *Corynebacterium parvum*, *Cell. Immunol.*, **38**: 168-175, 1978.
- [72] HISERODT J. C., YAMAMOTO R. S., GRANGER G. A., The human TL system. IV. Studies on the large MW LT complex class: association of these molecules with specific antigen binding receptor(s) in vitro, *Cell. Immunol.*, **41**: 380-396, 1978.
- [73] HOCHMAN P. S., CUDKOWICZ G., Different sensitivities to hydrocortisone of natural killer cell activity and hybrid resistance to parental marrow grafts, *J. Immunol.*, **119**: 2013-2015, 1977.
- [74] HUDIG D., HAVERTY T., FULCHER C., REDELMAN D., MENDELSON

- J., Inhibition of human natural cytotoxicity by macromolecular antiproteases, *J. Immunol.*, **126**: 1569–1574, 1981.
- [75] HUDIG D., REDELMAN D., MENDELSON J., Inhibition of natural cytotoxicity by proteinase substrates, *Fed. Proc.*, **39**: 359, 1980.
- [76] IHLE J. N., YURCONIC M. Jr., HANNA M. G., Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus, *J. Exp. Med.*, **138**: 194–208, 1973.
- [77] JAKÓBISIAK M., Naturalna cytotoxiczność komórkowa, *Post. Biol. Kom.*, **6**: 79–97, 1979.
- [78] JENSEN P. J., KOREN H. S., Heterogeneity within the population of NK and K cells, *J. Immunol.*, **124**: 395–398, 1980.
- [79] KANRA G. Y., VESIKARI T., Cytotoxic activity against rubella-infected cells in the supernatants of human lymphocyte cultures stimulated by rubella virus, *Clin. Exp. Immunol.*, **19**: 17–32, 1975.
- [80] KASAI M., IWAMORI M., NAGAI Y., OKUMURA K., TADA T., A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 175–180, 1980.
- [81] KIESSLING R., ERIKSSON E., HALLENBECK L. A., WELSH R. M., A comparative analysis of the cell surface properties of activated vs endogenous mouse natural killer cells, *J. Immunol.*, **125**: 1551–1557, 1980.
- [82] KIESSLING R., HALLER O., FENYŐ E. M., STEINITZ M., KLEIN G., Mouse natural killer (NK) cell activity against human cell lines is not influenced by superinfection of the target cell with xenotropic murine C-type virus, *Int. J. Cancer*, **21**: 460–465, 1978.
- [83] KIESSLING R., KLEIN E., WIGZELL H., Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype, *Eur. J. Immunol.*, **5**: 112–117, 1975.
- [84] KIESSLING R., KLEIN E., PROSS H., WIGZELL H., Natural killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characterisation of the killer cell, *Eur. J. Immunol.*, **5**: 117–121, 1975.
- [85] KIESSLING R., PETRANYI G., KÄRRE K., JONDAL M., TRACEY D., WIGZELL H., Killer cells: a functional comparison between natural, immune T-cell and antibody-dependent in vitro systems, *J. Exp. Med.*, **143**: 772–780, 1976.
- [86] KIRCHNER H., HIRT H. M., BECKER H., MUNK K., Production of an antiviral factor by murine spleen cells after treatment with *Corynebacterium parvum*, *Cell. Immunol.*, **31**: 172–176, 1977.
- [87] KLEIN M., RODER J. C., HALIOTIS T., KOREC S., JETT J. R., HERBERMAN R. B., KATZ P., FAUCI A. S., Chediak-Higashi gene in humans. II. The selectivity of the defect in natural-killer and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function, *J. Exp. Med.*, **150**: 1049–1058, 1980.
- [88] KLEINMAN R., de BOER K. P., TEODORESCU M., Isolation of human spontaneous killer lymphocytes by bacterial adherence, *Clin. Exp. Immunol.*, **39**: 510–518, 1980.
- [89] KOIDE Y., TAKASUGI M., Regulation of natural cell-mediated cytotoxicity by soluble products from mixed cultures, *Fed. Proc.*, **37**: 1273, 1978.
- [90] KOO G. C., JACOBSON J. B., HAMMERLING G. J., HAMMERLING U., Antigenic profile of murine natural killer cells, *J. Immunol.*, **125**: 1003–1006, 1980.

- [91] KURIBAYASHI K., GRILLS S., KERN D. E., HENNEY C. S., Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity, *J. Immunol.*, **126**: 2321-2327, 1981.
- [92] LAMON E. W., SKURZAK H. M., KLEIN E., The lymphocyte response to a primary viral neoplasm (MSV) through its entire course in Balb/c mice, *Int. J. Cancer*, **10**: 581-588, 1972.
- [93] LATTIME E. C., PECORARO G. A., STUTMAN O., Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice. III. A comparison of effector cell antigenic phenotype and target cell recognition structures with those of NK cells, *J. Immunol.*, **126**: 2011-2014, 1981.
- [94] LECLERC J. C., GOMARD E., LEVY J. P., Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornavirus. I. Kinetics and specificity of the immune response in murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors and transplanted lymphomas, *Int. J. Cancer*, **10**: 589-601, 1972.
- [95] LEE J. C., IHLE J. N., Characterisation of the blastogenic and cytotoxic responses of normal mice to ecotropic C-type viral gp 71, *J. Immunol.*, **118**: 928-934, 1977.
- [96] LINDAHL P., LEARY P., GRESSER I., Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 721-725, 1972.
- [97] LOOR F., ROELANTS G. E., High frequency of T lineage lymphocytes in nude mouse spleen, *Nature*, **251**: 229-230, 1974.
- [98] LOTZOVA E., McCREDIE K. B., Induction of suppressor cells with *Corynebacterium parvum*, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **19**: 52, 1978.
- [99] LOTZOVA E., McCREDIE K. B., Natural killer cells in mice and man and their possible biological significance, *Cancer Immunol. Immunother.*, **4**: 215-221, 1978.
- [100] LOTZOVA E., SAVARY C. A., Possible involvement of natural killer cells in bone marrow graft rejection, *Biomedicine*, **27**: 341-344, 1977.
- [101] MacDONALD H. R., Early detection of potentially lethal events in T cell-mediated cytolysis, *Eur. J. Immunol.*, **5**: 251-254, 1975.
- [102] MacFARLAN R. I., BURNS W. H., WHITE D. O., Two cytotoxic cells in peritoneal cavity of virus-infected mice: antibody-dependent macrophages and nonspecific killer cells, *J. Immunol.*, **119**: 1569-1574, 1977.
- [103] MATTES M. J., SHARROW S. O., HERBERMAN R. B., HOLDEN H. T., Identification and separation of Thy-1 positive mouse spleen cell cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol.*, **123**: 2851-2860, 1979.
- [104] MAYER M., Mechanism of cytolysis by lymphocytes: a comparison with complement, *J. Immunol.*, **119**: 1195-1203, 1977.
- [105] MERIGAN T. C., Induction of circulating interferon by synthetic anionic polymers of known composition, *Nature*, **214**: 416-417, 1967.
- [106] MERIGAN T. C., OLDSTONE M. B. A., WELSH R. M., Interferon production during lymphocytic choriomeningitis virus infection of nude and normal mice, *Nature*, **268**, 67-68, 1977.
- [107] MERUELO D., PAOLINO A., FLIEGER N., DWORKIN J., Definition of a new T lymphocyte cell surface antigen Ly 10.2, *Fed. Proc.*, **39**: 800, 1980.
- [108] MILLER H. C., SCHMIEGE S. K., RULE A., Production of functional T cells after treatment of bone marrow with thymic factor, *J. Immunol.*, **111**: 1005-1009, 1973.

- [109] MIMS C. A., Aspects of the pathogenesis of virus diseases, *Bacteriol. Rev.*, **28**: 30-71, 1964.
- [110] MINATO N., REID L., CANTOR H., LENGYEL P., BLOOM B. R., Mode of regulation of natural killer cell activity by interferon, *J. Exp. Med.*, **152**: 124-137, 1980.
- [111] MOORE M. A. S., SHAH R., GREEN S., Serum hematopoietic inhibitors and tumor necrosis factor, [w:] *Natural and Induced Cell-Mediated Cytotoxicity*, red. G. Riethmuller P. Wernet, G. Cudkowicz, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco 1979, 199-207.
- [112] NAIR P. M. N., FERNANDES G., ONOE K., DAY N. K., GOOD R. A., Inhibition of effector cell functions in natural killer cell activity (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in mice by normal and cancer sera, *Int. J. Cancer*, **25**: 667-677, 1980.
- [113] NELSON D. L., BUNDY B. M., STROBER W., Spontaneous cell-mediated cytotoxicity by human peripheral blood lymphocytes in vitro, *J. Immunol.*, **119**: 1401-1405, 1977.
- [114] NOTKINS A. L., MERGENHAGEN S. E., HOWARD R. J., Effects of virus infections on the function of the immune system, *Ann. Rev. Microbiol.*, **24**: 525-538, 1970.
- [115] NOWINSKY R. C., KAEHLER S. L., Antibody to leukemia virus: widespread occurrence in inbred mice, *Science*, **185**: 869-871, 1974.
- [116] NUNN M. E., DJEU J. Y., GLASER M., LAVRIN D. H., HERBERMAN R. B., Natural cytotoxic reactivity of rat lymphocytes against syngeneic Gross virus-induced lymphoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**: 393-399, 1976.
- [117] OEHLER J. R., HERBERMAN R. B., Natural cell-mediated cytotoxicity in rats. III. Effects of immunopharmacologic treatments on natural reactivity and on reactivity augmented by polyinosinic-polycytidylic acid, *Int. J. Cancer*, **21**: 221-229, 1978.
- [118] OEHLER J. R., LINDSAY L. R., NUNN M. E., HERBERMAN R. B., Natural cell-mediated cytotoxicity in rats. I. Tissue and strain distribution and demonstration of a membrane receptor for the Fc portion of IgG, *Int. J. Cancer*, **21**: 204-209, 1978.
- [119] OEHLER J. R., LINDSAY L. R., NUNN M. E., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., Natural cell-mediated cytotoxicity in the rats. II. In vivo augmentation of NK-cell activity, *Int. J. Cancer*, **21**: 210-220, 1978.
- [120] OJO E., HALLER O., KIMURA A., WIGZELL H., An analysis of conditions allowing *Corynebacterium parvum* to cause either augmentation or inhibition of natural killer cell activity against tumor cells in mice, *Int. J. Cancer*, **21**: 444-452, 1978.
- [121] OJO E., WIGZELL H., *Corynebacterium parvum* induced peritoneal exudate cells with rapid cytolytic activity against tumor cells are nonphagocytic cells with characteristics of natural killer cells, *Scand. J. Immunol.*, **8**: 215-222, 1978.
- [122] ORTALDO J. R., PHILLIPS W., WASSERMAN K., HERBERMAN R. B., Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and interferon-boosted human natural killer cell activity, *J. Immunol.*, **125**: 1839-1844, 1980.
- [123] OSHIMI K., KANO S., TAKAKU F., OKUMURA K., Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432, *J. Natl. Cancer Inst.* **65**: 1265-1269, 1980.
- [124] OZER H., STRELKAUSKAS A. J., CALLERY R. T., SCHLOSSMAN S. F.,

- The functional dissection of human peripheral null cells with respect to antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killing, *Eur. J. Immunol.*, **9**: 112-118, 1979.
- [125] PAPE G. R., TROYE R. M., PERLMANN P., Characterisation of cytolytic effector cells in peripheral blood of healthy individuals and cancer patients. II. Cytotoxicity to allogeneic or autochthonous tumor cells in tissue culture, *J. Immunol.*, **118**: 1925-1929, 1977.
- [126] PARKINSON D. R., BRIGHTMAN R. P., WAKSAL S. D., Altered natural killer cell biology in C57B1/6 mice after leukemogenic splitdose irradiation, *J. Immunol.*, **126**: 1460-1464, 1981.
- [127] PARRILLO J. E., FAUCI A. S., Spontaneous versus antibody-dependent cytotoxicity, *Clin. Exp. Immunol.*, **31**: 116-125, 1978.
- [128] PASANEN V. J., In vitro enhancement of natural cytotoxicity by tumour necrosis serum, *Scand. J. Immunol.*, **10**: 281-284, 1979.
- [129] PETER H. H., DALLÜGGE H., ZAWATZKY R., EULER S., LEIBOLD W., KIRCHNER H., Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, *Herpes simplex* virus, and *Corynebacterium parvum*, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 547-555, 1980.
- [130] PETER H. H., EIFE R. F., KALDEN J. R., Spontaneous cytotoxicity (SCMC) of normal human lymphocytes against a human melanoma cell line: a phenomenon due to a lymphotoxin-like mediator, *J. Immunol.*, **116**: 342-348, 1976.
- [131] PETRANYI G. G., KIESSLING R., KLEIN G., Genetic control of natural killer lymphocytes in the mouse, *Immunogenetics*, **2**: 53-61, 1975.
- [132] PETRANYI G. G., KIESSLING R., POVEY S., KLEIN G., HERZENBERG L., WIGZELL H., The genetic control of natural killer cell activity and its association with in vitro resistance against a Moloney lymphoma isograft, *Immunogenetics*, **3**: 15-28, 1976.
- [133] PFIZENMAIER K., TROSTMANN H., RÖLLINGHOFF M., WAGNER H., Cell mediated immunity in lymphocytic choriomeningitis. I. The specificity of cytotoxic T lymphocytes, *Z. Immunitätsforsch.*, **151**: 224-236, 1976.
- [134] PHILIPS J. H., BABCOCK G. F., NISHIOKA K., Tuftsin: a naturally occurring immunopotentiating factor. I. In vitro enhancement of murine natural cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol.*, **126**: 915-921, 1981.
- [135] PHILLIPS W. H., ORTALDO J. R., HERBERMAN R. B., Selective depletion of human natural killer cells on monolayers of target cells, *J. Immunol.*, **125**: 2322-2327, 1980.
- [136] PIOCH Y., GERBER M., SERROU B., Natural killer-like activity induced in spleen by ip injection of BCG, *Cancer Immunol. Immunother.*, **7**: 181-184, 1979.
- [137] PITHA P. M., VENGRIS V. E., REYNOLDS F. H., The role of cell membrane in the antiviral effect of interferon, *J. Supramol. Struct.*, **4**: 467-474, 1976.
- [138] POLLACK S., NELSON K., Early appearance of a lymphoid arming factor and cytotoxic lymph-node cells after tumor induction, *Int. J. Cancer*, **14**: 522-529, 1974.
- [139] POLLACK S. B., TAM M. R., NOWINSKI R. C., EMMONS S. L., Presence of T cell-associated surface antigens on murine NK cells, *J. Immunol.*, **123**: 1818-1821, 1979.
- [140] PORZSOLT F., MILLER R. G., PHILLIPS R. A., Possible anti-tumor memory response in melanoma patients, *Scand. J. Immunol.*, **6**: 738, 1977.
- [141] PROSS H. F., BAINES M. G., JONDAL M., Spontaneous human lymphocyte-

- mediated cytotoxicity against tumor target cells. II. Is the complement receptor necessarily present on the killer cells, *Int. J. Cancer*, **20**: 353-358, 1977.
- [142] PROSS H. F., JONDAL M., Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **21**: 226-235, 1975.
- [143] PUCETTI P., SANTONI A., RICCARDI C., HOLDEN H. T., HERBERMAN R. B., Activation of mouse macrophages by pyran copolymer and role in augmentation of natural killer activity, *Int. J. Cancer*, **24**: 819-825, 1979.
- [144] RAFF M. C., WORTIS H. H., Thymus dependence of \emptyset -bearing cells in the peripheral lymphoid tissues of mice, *Immunol.*, **18**: 931-942, 1970.
- [145] REYNOLDS C. W., HERBERMAN R. B., In vitro augmentation of rat natural killer (NK) cell activity, *J. Immunol.*, **126**: 1581-1585, 1981.
- [146] REYNOLDS C. W., TIMONEN T., HERBERMAN R. B., Natural killer (NK) cell activity in the rat. I. Isolation and characterisation of the effector cells, *J. Immunol.*, **127**: 282-287, 1981.
- [147] RICCARDI C., BARLOZZARI T., SANTONI A., HERBERMAN R. B., CESARINI C., Transfer to cyclophosphamide-treated mice of natural killer (NK) cells and in vivo natural reactivity against tumors, *J. Immunol.*, **126**: 1284-1289, 1981.
- [148] RIETHMÜLLER G., WERNET P., CUDKOWICZ G., Natural and induced cell-mediated cytotoxicity: effector and regulatory mechanisms, Academic Press, New York, London 1979.
- [149] RIVIERE Y., GRESSER I., GUILLON J. C., TOVEY M. G., Inhibition by antiinterferon serum of lymphocytic choriomeningitis virus disease in suckling mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2135-2139, 1977.
- [150] RODER J. C., The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermined impairment in natural killer cell function, *J. Immunol.*, **123**: 2168-2173, 1979.
- [151] RODER J. C., AHRLUND-RICHTER L., JONDAL M., Target-effector interaction in the human and murine natural killer system: specificity and xenogeneic reactivity of the solubilized natural killer-target structure complex and its loss in a somatic cell hybrid, *J. Exp. Med.*, **150**: 471-481, 1979.
- [152] RODER J. C., DUWE A., The "beige" mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function, *Nature*, **278**: 451-453, 1979.
- [153] RODER J. C., HALIOTIS T., KLEIN M., KOREC S., JETT J. R., ORTALDO J., HERBERMAN R. B., KATZ P., FAUCI A. S., A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells, *Nature*, **284**: 553-555, 1980.
- [154] RODER J. C., HALIOTIS T., KLEIN M., KOREC S., JETT J. R., ORTALDO J., HERBERMAN R. B., KATZ P., FAUCI A. S., A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells, *Nature*, **284**: 553-555, 1980.
- [155] RODER J. C., KIESSLING R., BIBERFELD P., ANDERSSON B., Target-effector interaction in the natural killer (NK) cell system. II. The isolation of NK cells and studies on the mechanism of killing, *J. Immunol.*, **121**: 2509-2517, 1978.
- [156] RODER J. C., KLEIN M., Target-effector interaction in the natural killer cell system, *J. Immunol.*, **123**: 2785-2790, 1979.
- [157] RODER J. C., LOHMANN-MATTHES M. L., DOMZIG W., WIGZELL H., The beige mutation in the mouse. II. Selectivity of the natural killer (NK) cell defect, *J. Immunol.*, **123**: 2174-2181, 1979.
- [158] RODER J. C., ROSEN A., FENYÖ E. M., TROY F. A., Target-effector

- interaction in the natural killer cell system: isolation of target structures, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 1405-1409, 1979.
- [159] SAKSELA E., IMIR T., MÄKELÄ O., Spontaneous, augmentable cell-mediated cytotoxicity with limited target cell specificity in human blood, Eur. J. Immunol., 7: 126-130, 1977.
- [160] SANTOLI D., TRINCHIERI G., KOPROWSKI H., Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans, J. Immunol., 121: 532-537, 1978.
- [161] SANTONI A., RICCARDI C., BARLOZZARI T., HERBERMAN R. B., Inhibition as well as augmentation of mouse NK activity by pyran copolymer and adriamycin, [w:] Natural-Cell Mediated Immunity Against Tumors, red. R. B. Herberman, Academic Press, New York 1980, 753.
- [162] SAVARY C. A., LOTZOVA E., Suppression of natural killer cytotoxicity by splenocytes from *Corynebacterium parvum*-injected, bone marrow-tolerant, and infant mice, J. Immunol., 120: 239-243, 1978.
- [163] SCHEINER O., WIEDERMANN G., RUMPOLD H., STEINER R., KRAFT D., STEMBERGER H., Modulation of NK and K cell activity by trypsin treatment of effector cells, Immunobiol., 157: 343-357, 1980.
- [164] SEAMAN W., GINDHART T., BLACKMAN M., LOEB J., ROUBINIAN J., GREENSPAN J., TALAL N., Chronic estrogen administration reduces natural killing in mice, Fed. Proc., 37: 1273, 1978.
- [165] SEAMAN W. E., MERIGAN T. C., TALAL N., Natural killing in estrogen-treated mice responds poorly to poly I:C despite normal stimulation of circulating interferon, J. Immunol., 123: 2903-2905, 1979.
- [166] SENDO F., AOKI T., BOYSE E. A., BUAFO C. K., Natural occurrence of lymphocytes showing cytotoxic activity to Balb/c radiation-induced leukemia RL σ 1 cells, J. Natl. Cancer Inst., 55: 603-609, 1975.
- [167] SENIK A., KOLB J. P., ÖRN A., GIDLUND M., Study of the mechanism for in vitro activation of mouse NK cells by interferon, Scand. J. Immunol., 12: 51-60, 1980.
- [168] SHARMA B., TUBERGEN D. G., MINDEN P., BRUNDA M. J., In vitro immunisation against human tumor cells with bacterial extracts, Nature, 267: 845-847, 1977.
- [169] SHELLAM G. R., Gross-virus-induced lymphoma in the rat. V. Natural cytotoxic cells are non-T cells, Int. J. Cancer, 19: 225-235, 1977.
- [170] SHELLAM G. R., HOGG N., Gross-virus-induced lymphoma in the rat. IV. Cytotoxic cells in normal rats, Int. J. Cancer, 19: 212-224, 1977.
- [171] SHIMKIN M., STONER G., Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassay, Adv. Cancer Res., 21: 1-58, 1975.
- [172] SOKHEY J., SOLOVLEV A. I., VASILIEVA V. I., Induction of interferon in mice and cell cultures by *Mycoplasma pneumoniae*, Acta Virol., 21: 485-490, 1977.
- [173] STUTMAN O., DIEN P., WISUN R. E., LATTIME E. C., Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice: blocking of cytotoxicity by D-mannose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 2895-2898, 1980.
- [174] TAKASUGI M., KOIDE Y., TAKASUGI J., AKIRA D., OPELZ G., Histocompatibility and natural cell-mediated cytotoxicity, Transplant. Proc., 9: 1323-1333, 1979.
- [175] THEOFILOPOULOS A. N., WILSON C. B., BOKISH V. A., DIXON F. J., Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II. Use of Raji cells to detect circulation immune complexes in animal and human sera, J. Exp. Med., 140: 1230-1244, 1974.

- [176] TIMONEN T., ORTALDO J. R., HERBERMAN R. B., Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells, *J. Exp. Med.*, **153**: 569-582, 1981.
- [177] TIMONEN T., RANKI A., SAKSELA E., HÄYRY P., Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterisation of the effector cells, *Cell. Immunol.*, **48**: 121-132, 1979.
- [178] TIMONEN T., SAKSELA E., Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. I. General characteristics of the cytotoxic activity, *Cell. Immunol.*, **33**: 340-352, 1977.
- [179] TIMONEN T., SAKSELA E., Isolation of human natural killer cells by density gradient centrifugation, *J. Immunol. Meth.*, **36**: 285-292, 1980.
- [180] TIMONEN T., SAKSELA E., RANKI A., HÄYRY P., Fractionation, morphological, and functional characterisation of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets, *Cell. Immunol.*, **48**: 133-148, 1979.
- [181] TIMONEN T., SAKSELA E., VIRTAMEN I., CANTELL K., Natural killer cells are responsible for the interferon production induced in human lymphocytes by tumor cell contact, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 422-427, 1980.
- [182] TRACEY D. E., WOLFE S. A., DURDIK J. M., HENNEY C. S., BCG-induced murine effector cells. I. Cytolytic activity in peritoneal exudates: an early response to BCG, *J. Immunol.*, **119**: 1145-1151, 1977.
- [183] TRINCHIERI G., GRANATO D., PERUSSIA B., Interferon-induced resistance of fibroblasts to cytotoxicity mediated by natural killer cells: specificity and mechanism, *J. Immunol.*, **126**: 335-340, 1981.
- [184] TRINCHIERI G., SANTOLI D., Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis, *J. Exp. Med.*, **147**: 1314-1333, 1978.
- [185] TRINCHIERI G., SANTOLI D., DEE R. R., KNOWLES B. B., Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells: identification of the anti-viral activity as interferon and characterisation of the human effector lymphocyte subpopulation, *J. Exp. Med.*, **147**: 1299-1313, 1978.
- [186] TRINCHIERI G., SANTOLI D., KNOWLES B. B., Tumour cell lines induce interferon in human lymphocytes, *Nature*, **270**: 611-613, 1977.
- [187] TRINCHIERI G., SANTOLI D., KOPROWSKI H., Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans: role of interferon and immunoglobulins, *J. Immunol.*, **121**: 1849-1855, 1978.
- [188] VENGRIS V. E., STOLLER B. D., PITHA P. M., Interferon externalisation by producing cell before induction of antiviral state, *Virology*, **65**: 410-417, 1975.
- [189] VESSELLA R. L., GORMUS B. J., LANGE P. H., KAPLAN M. E., Heterogeneity among human lymphocyte effector cells mediating spontaneous lymphocyte-mediated cytotoxicity, *Int. J. Cancer*, **21**: 594-603, 1978.
- [190] VIGNAUX F., GRESSER I., Differential effects of interferon on the expression of H-2K, H-2D and Ia antigens on mouse lymphocytes, *J. Immunol.*, **118**: 721-723, 1977.
- [191] WARNER N. L., WOODRUFF M. F. A., BURTON R. C., Inhibition of the growth of lymphoid tumours in syngeneic athymic (nude) mice, *Int. J. Cancer*, **20**: 146-155, 1977.
- [192] WELSH R. M., Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis

- gitis virus infection of mice. I. Characterisation of natural killer cell induction, *J. Exp. Med.*, **148**: 163-181, 1978.
- [193] WELSH R. M., KARRE K., HANSSON M., KUNKEL L. A., KIESSLING R., W., Interferon-mediated protection of normal and tumor target cells against lysis by mouse natural killer cells, *J. Immunol.*, **126**: 219-225, 1981.
- [194] WELSH R. M., ZINKERNAGEL R. M., Heterospecific cytotoxic cell activity induced during the first three days of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice, *Nature*, **268**: 646-648, 1977.
- [195] WEST W. H., CANNON G. B., KAY H. D., BONNARD G. D., HERBERMAN R. B., Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterisation of effector cells, *J. Immunol.*, **118**: 355-361, 1977.
- [196] WESTON P. A., JENSEN P. J., LEVY N. L., KOREN H. S., Spontaneous cytotoxicity against virus-infected cells: relationship to NK against uninfected cell lines and to ADCC, *J. Immunol.*, **126**: 1220-1224, 1981.
- [197] WOLFE S. A., TRACEY D. E., HENNEY C. S., Induction of "natural" killer cells by BCG, *Nature*, **262**: 584-586, 1976.
- [198] WOLFE S. A., TRACEY D. E., HENNEY C. S., BCG-induced murine effector cells. II. Characterisation of natural killer cells in peritoneal exudates, *J. Immunol.*, **119**: 1152-1158, 1977.
- [199] WRIGHT S. C., BONAVIDA B., Selective lysis of NK-sensitive target cells by a soluble mediator released from murine spleen cells and human peripheral blood lymphocytes, *J. Immunol.*, **126**: 1516-1521, 1981.
- [200] YOUNG W. W., DURDIK J. M., URDAL D., HAKOMORI S., HENNEY C. S., Glycolipid expression in lymphoma cell variants: chemical quantity, immunological reactivity, and correlations with susceptibility to NK cells, *J. Immunol.*, **126**: 1-6, 1981.
- [201] YOUNG W. W., HAKOMORI S. I., DURDIK J. M., HENNEY C. S., Identification of ganglio-N-tetraosylceramide as a new cell surface marker for murine natural killer (NK) cells, *J. Immunol.*, **124**: 199-201, 1980.
- [202] YOUNGNER J. S., Influence of protein synthesis inhibitors on interferon formation in mice. II. Comparison of effects of glutarimide antibiotics and tenuazonic acid, *Virology*, **40**: 335-343, 1970.
- [203] ZARLING J. M., KUNG P. C., Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes, *Nature*, **288**: 394-396, 1980.
- [204] ZAUNDERS J., WERKMEISTER J., MCCARTHY W. H., HERSEY P., Characterisation of antigens recognized by natural killer cells in cell-culture supernatants, *Br. J. Cancer*, **43**: 5-12, 1981.
- [205] ZINKERNAGEL R. M., ALTHAGE A., COOPER S., KREEB G., KLEIN P. A., SEFTON B., FLAHERTY L., STIMPFLING J., SHEFFLER D., KLEIN J., Ir-genes in H-2 regulate generation of anti-viral cytotoxic T cells. Mapping to K or D and dominance of unresponsiveness, *J. Exp. Med.*, **148**: 592-606, 1978.
- [206] ZINKERNAGEL R. M., DOHERTY P. C., Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogeneic system, *Nature*, **248**: 701-702, 1974.

Otrzymano: 6 stycznia 1982.

Przyjęto: 8 marca 1982.

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

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 200,— półrocznie zł 100,—

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

- do dnia 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland are available through the local press distributors or directly through the Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| L. KORDYLEWSKI, Struktura komórek mięśni gładkich | 347 |
| H. STRZELECKA-GOŁASZEWSKA, Reagowanie miozy- ny z aktyną w mięśniu gładkim | 373 |
| A. HINEK, Miocyty naczyniowe — komórki wieloczyn- nościowe | 401 |
| B. PŁYTYCZ i M. KSIAŻKIEWICZ, Ewolucja odporno- ści | 421 |
| W. M. BARAN, Zastosowanie analizy dyskryminacyjnej w badaniach morfometrycznych komórek | 447 |
| J. LAMPRECHT i J. ROWIŃSKI, Komórki kępkowe na- błonka przewodu pokarmowego | 461 |
| T. SKÓRSKI i M. KAWALEC, Regulacja aktywności cytotoksycznej komórek NK | 475 |