

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

**TOM 10-NR 1
1983 (1-64)**

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 536 + 94 egz. Ark. wyd. 5,5. Ark. druk. 4,25 + 3/8 wkl. kred. Papier druk. sat. III kl.
80 g. 70 × 100 cm. Oddano do składania w październiku 1982 r. Podpisano do druku w marcu
1983 r. Druk ukończono w marcu 1983 r. Zam. 1327/82

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

BUDOWA I CZYNNOŚĆ TKANKI TŁUSZCZOWEJ BRUNATNEJ

STRUCTURE AND FUNCTION OF BROWN ADIPOSE TISSUE

Krzysztof K. BROŻYŃSKI, Bogumił L. KMIEĆ

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biologiczno-Morfologiczny Akademii
Medycznej w Łodzi

Streszczenie. Na podstawie badań własnych i przeglądu piśmiennictwa przedstawiono poglądy na temat budowy i czynności tkanki tłuszczowej brunatnej u różnych gatunków ssaków, w tym także u człowieka. Podano jej charakterystykę morfologiczną, histochemiczną i biochemiczną. Omówiono mechanizmy metaboliczne procesu wytwarzania ciepła w komórkach tkanki tłuszczowej brunatnej. Zwrócono uwagę na ewentualną regulacyjną czynność tkanki tłuszczowej brunatnej w odniesieniu do procesów termogenezy w organizmie ssaków. Podano również poglądy dotyczące jej czynności dokrewnej.

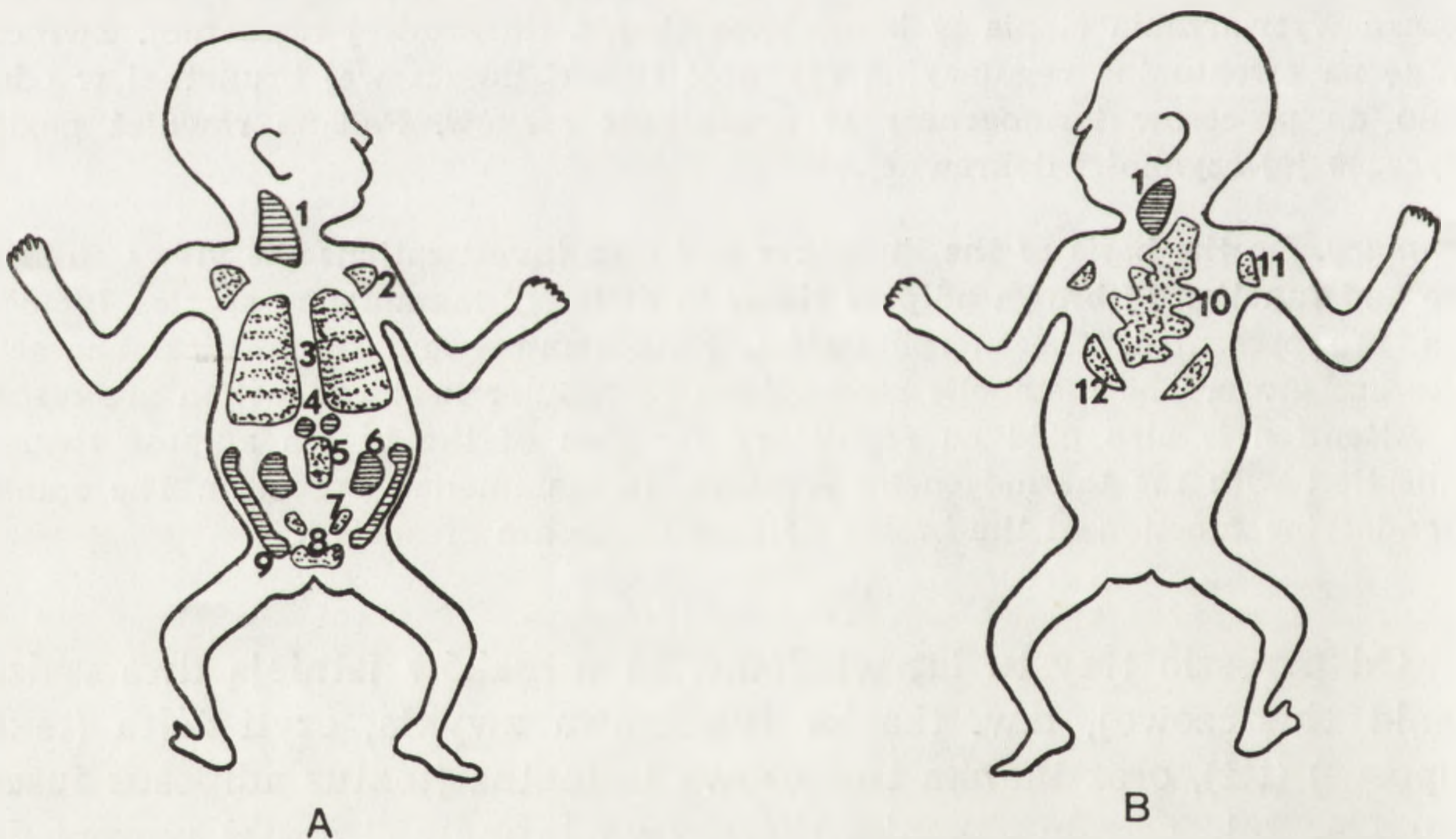
Summary. On the basis of the literature and own investigations the views on structure and function of brown adipose tissue in different mammalian species, including man, are presented. The morphological, histochemical and biochemical characteristics are given. The metabolic mechanisms of cellular heat production are discussed. Attention is also paid on regulatory function of the brown adipose tissue in connection with the thermogenetic processes in mammalian organism. The opinions on endocrine function of the brown adipose tissue are presented.

Od przeszło trzystu lat wiadomo, że u ssaków istnieją dwa rodzaje tkanki tłuszczowej, tzw. tkanka tłuszczowa zwykła, czyli żółta (*textus adiposus*) (ttż), oraz tkanka tłuszczowa brunatna (*textus adiposus fuscus*) (ttb) [24, 96]. Termin „tkanka tłuszczowa brunatna” został wprowadzony dopiero przez Hammara w 1895 r. (według [59]). Od tego też czasu ttb była obiektem wielu badań anatomicznych, histologicznych, biochemicznych i fizjologicznych, które wyjaśniły wiele zagadnień dotyczących jej występowania, budowy, metabolizmu i roli w organizmie. Niniejsza praca jest próbą syntetycznego ujęcia aktualnych poglądów na ten temat opartą na badaniach własnych oraz przeglądzie piśmiennictwa.

WYSTĘPOWANIE I ROZMIESZCZENIE TTB

Tkanka tłuszczowa brunatna, zwana inaczej gruczołem międzyłopatkowym, gruczołem tłuszczowym lub gruczołem snu zimowego, występuje u około 50 gatunków ssaków [68]. Szczególnie obficie występuje ona w organizmach zwierząt zapadających w sen zimowy, tj. podlegających tzw. fizjologicznej hibernacji (np. jeż, świstak) pozwoliło to przedstawić hipotezę o jej udziale w termogenezie [9, 27, 41, 43, 81]. Ttb występuje ponadto u różnych gryzoni nie zapadających w sen zimowy (mysz, szczur, chomik syryjski, świnka morska, królik), a także u owcy, bydła domowego, u małp i u człowieka [18, 30, 43, 59, 60, 94, 95]. Warto odnotować fakt, że chomik syryjski, który w środowisku naturalnym podlega fizjologicznej hibernacji, w warunkach laboratoryjnych nie zapada w sen zimowy. Może więc być ciekawym obiektem do badań nad tkanką tłuszczową brunatną.

Tkanka tłuszczowa brunatna rozproszona jest niemal w całym organizmie ssaka, przy czym występuje głównie poza narządami wewnętrznymi. Spotyka się ją także w niektórych narządach wewnętrznych, np. w tarczycy u jeża [42]. Można więc na podstawie dotychczasowych badań



Ryc. 1. Rozmieszczenie tkanki tłuszczowej brunatnej u płodu ludzkiego według Merklina [55]

A — strona brzuszna, B — strona grzbietowa, powierzchnie zakreskowane — tkanka tłuszczowa brunatna z przewagą komórek wielowakuolarnych, powierzchnie kropkowane — ttb z komórkami wielowakuolarnymi i pęcherzykowymi, 1 — szyjna, 2 — pachowa, 3 — międzyżebrowa, 4 — śródpiersiowa, 5 — brzuszna, 6 — okołonerkowa, 7 — podbrzuszna, 8 — łonowa, 9 — nadbiodrowa, 10 — międzyłopatkowa, 11 — naramienna, 12 — grzbietowa boczna

podać wspólny dla wszystkich gatunków zwierząt ogólny schemat rozmieszczenia ttb w organizmie. Największe skupienie tej tkanki występuje w okolicy międzyłopatkowej, stąd też najczęściej spotykana w piśmiennictwie jej nazwa — międzyłopatkowa tkanka tłuszczowa brunatna [33, 54, 100]. Znacznie mniejsze pokłady ttb znajdują się w okolicy nerek i nadnerczy, w śródpiersiu, w okolicy szyi, w sąsiedztwie dużych pni naczyniowych (okolice aorty, tętnic biodrowych, podobojczykowych, szyjnych) i wielu innych miejscach [43, 55, 59, 95] (ryc. 1).

Tkanka tłuszczowa brunatna stanowi do 6% ciężaru ciała zwierzęcia [27].

Ttb znajdowano u człowieka przede wszystkim w okresie płodowym i w pierwszych latach życia pozapłodowego [59, 60]. Szczegółowe badania morfologiczne dowiodły występowania ttb również w późniejszych okresach życia osobniczego [18, 30, 55, 94, 95]. Zwracają uwagę znaczne rozbieżności w ocenie częstości występowania u ludzi: np. według Tanumy i wsp. [94, 95] ttb jest obecna u 74% osobników, według Feyrtera [18] — u 35%, a zdaniem Heatona [30] — u 94%. Różnice te wynikają prawdopodobnie ze stosowania odmiennych i mniej bądź bardziej dokładnych technik badawczych.

CHARAKTERYSTYKA MORFOLOGICZNA I BIOCHEMICZNA TTB

Tkanka tłuszczowa brunatna ma niemal identyczną budowę u wszystkich badanych gatunków ssaków [1, 7, 18, 30, 43, 55, 59, 67, 95, 97]. Jej jednostką morfologiczną jest zrazik. Poszczególne zraziki oddzielone są pasmami tkanki łącznej. Wnętrze zrazika wypełniają komórki otoczone skąpą liczbą włókien tkanki łącznej, w której leżą naczynia krwionośne i liczne włókna nerwowe [7, 17].

Klasyfikację cytologiczną ttb różnych gatunków ssaków podali: Wegener — 1951 [97], Karolewicz — 1953 [43], Pawlikowski — 1955 [59], Aherne i Hull — 1966 [1], Heaton — 1972 [30], Feyrter — 1973 [18], Tanuma i wsp. — 1976 [95] oraz Brzeziński i wsp. — 1981 [7]. Brak do chwili obecnej jednolitego mianownictwa komórek ttb. Wiadomo, że głównymi i typowymi komórkami ttb opisywanymi przez wszystkich autorów są komórki wielowakuolarne (wielopęcherzykowe). Są to wielokątne bądź owalne komórki zawierające w swej cytoplazmie liczne wakuole o średnicy kilku mikronów (np. u szczura o średnicy około 4 μm) [7]. Ich jądra komórkowe na przekroju okrągłe bądź owalne położone są najczęściej w środku komórki, a niekiedy tylko w pobliżu błony komórkowej i oddzielone od niej szeregiem drobnych wakuol. Jądro zawiera wyraźny zrąb chromatynowy oraz jedno bądź dwa jąderka. Ponadto moż-

na wyodrębnić także inne rodzaje komórek w zależności od gatunku zwierzęcia. I tak np. Brzeziński i wsp. [7] w ttb szczura białego opisali oprócz komórek wielowakuolarnych, komórki wielkowodniczki, komórki pęcherzykowe zbliżone cechami morfologicznymi do komórek tż oraz pojedyncze komórki, na przekroju wielokątne, z jednym bądź dwoma jądrami komórkowymi i cytoplazmą wybarwiającą się intensywnie eozyną lub fuksyną kwaśną (rys. 2). Pawlikowski opisał te ostatnie komórki również w ttb noworodków płci męskiej i nazwał je komórkami fuksynochłonnymi [59].

Co się tyczy charakterystyki morfologicznej komórek ttb człowieka, to Pawlikowski wyróżnił tutaj cztery typy: 1. tzw. komórki niezróżnicowane o małej średnicy i barwnikoopornej cytoplazmie, odpowiadające prawdopodobnie lipoblastom, 2. komórki o wybitnie fuksynochłonnej cytoplazmie, 3. komórki wielowakuolarne oraz 4. zwykłe komórki tłuszczowe [59]. Natomiast Tanuma i wsp. [95] wyodrębnili aż sześć rodzajów komórek, stosując jako kryterium średnicę komórek i ich wakuol tłuszczowych.

W mikroskopie elektronowym typowe komórki ttb, tj. komórki wielowakuolarne, charakteryzują się, podobnie jak w mikroskopie świetlnym (ryc. 3, 3a), licznymi kroplami lipidowymi otoczonymi gładką siateczką śródplazmatyczną w postaci kanałów i wakuol. Pomędzy nimi rozrzucone są mitochondria o średnicy 0,5–1 μm z dobrze rozwiniętymi grzebieniami oraz lizosomy [70, 81] (ryc. 4, 4a). Spotyka się również pojedyncze lub ułożone w grupy peroksysomy, których liczba wzrasta w czasie adaptacji zwierząt do niskiej temperatury otoczenia [61].

W ttb szczura wykazano aktywność enzymów cyklu Krebsa, łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej, beta-oksydacji kwasów tłuszczowych, lipogenezy, glikolizy, glukoneogenezy i metabolizmu sterydów [4, 7, 27, 28, 71, 86–88]. Szczególnie wysoką aktywnością charakteryzują się m. in. dehydrogenaza bursztynianowa, oksydaza cytochromowa, fosfataza kwaśna, fosfataza zasadowa, monoaminooksydaza oraz kinazy białkowe zależne od cAMP i cGMP [81, 84, 85, 87, 88].

Na uwagę zasługuje fakt, że w ttb szczura, myszy, chomika syryjskiego, świnki morskiej i człowieka znaleziono związki chemiczne o budowie sterydowej [7, 46, 51, 64–66, 69, 93]. Wśród nich, w badaniach biochemicznych i histochemicznych, udało się zidentyfikować kortykosterydy [65, 69, 79] i androgeny [46, 93].

Komórki ttb charakteryzują się szczególnie wysoką zawartością cytochromów, około 280 $\mu\text{g/g}$ tkanki, które to substancje nadają jej makroskopowo brunatną barwę [81].

Tkanka tłuszczowa brunatna jest bardzo dobrze unaczyniona; każ-

da komórka kontaktuje się z naczyniem włosowatym typu trzewnego [17, 40]. Stwierdzono, że w czasie ekspozycji szczurów na zimno przepływa przez ttb około 25% krwi rzutu skurczowego serca [81]. Poza bogatym unaczynieniem, charakterystyczną cechą ttb jest swoiste unerwienie współczulne [10, 12, 13, 98]. Derry i wsp. [12] wykazali z pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, że ttb posiada dwojakie unerwienie adrenergiczne. Pierwsze stanowią włókna zazwojowe neuronów współczulnych dla naczyń krwionośnych. Drugie to tzw. zwoje własne wraz z ich aksonami zazwojowymi unerwiającymi każdą komórkę. Warto tu przypomnieć, że tkanka tłuszczowa żółta posiada tylko włókna adrenergiczne dla naczyń krwionośnych.

Z badań porównawczych wynika, że cechy morfologiczne ttb zmieniają się wraz z rozwojem osobniczym [27, 59, 81, 95, 94]. Okazuje się, że ttb u człowieka jest najlepiej rozwinięta w okresie okołoporodowym i wraz z wiekiem przekształca się w zwykłą tkankę tłuszczową, tj. żółtą [59, 94, 95]. Wskutek tego zraziki, które u noworodków i niemowląt zbudowane są głównie z komórek wielowakuolarnych (wielopęcherzykowych), u dzieci składają się ze środkowego pola zawierającego komórki ttb i z warstwy obwodowej komórek tkanki tłuszczowej żółtej [95]. Według Tanumy i wsp. [95] zjawisko przekształcania się komórek ttb w komórki tkanki tłuszczowej żółtej występuje w trzeciej dekadzie życia człowieka. Pawlikowski uważa, że transformacja ttb w ttż odbywa się na zasadzie stopniowego przekształcania się komórek ttb według następującego schematu: komórki niezróżnicowane → komórki fuksynochłonne → komórki wielopęcherzykowe → komórki pęcherzykowe [59].

Zjawisko zanikania ttb po okresie okołoporodowym opisano również u innych gatunków ssaków, m. in. u owcy [23] i u bydła domowego [2]. Karolewicz [43] opisał przechodzenie ttb w ttż w cyklu rocznym u jeża. Sidman w 1956 r. sformułował tezę o możliwości transformacji komórek tłuszczowych brunatnych w żółte *in vitro* [83]. Również Dyer [14] w kilkudniowych hodowlach ttb znajdował komórki o cechach zbliżonych do żółtych lipocytów. Późniejsze badania wykazały, że 11-dniowa hodowla tkankowa ttb szczura białego zawiera komórki submikroskopowo niemal identyczne z komórkami pęcherzykowymi tkanki tłuszczowej żółtej [15]. Transformacja komórek ttb w komórki ttż polega na łączeniu się drobnych wakuol tłuszczowych w jedną dużą wakuolę, zdolną do zepchnięcia jądra komórkowego na obwód cytoplazmy, rozrastaniu się siateczki śródplazmatycznej i na zmianach w wyglądzie mitochondriów [14, 15]. Nie wiele wiadomo na temat wpływu różnych czynników na różnicowanie komórek ttb w kierunku ttż. Stwierdzono jedynie, że insulina nie ma wpływu na przebieg tego procesu [14, 15, 53, 83].

TKANKA TŁUSZCZOWA BRUNATNA A TERMOGENEZA

Główna rola fizjologiczna ttb polega na wytwarzaniu ciepła celem ogrzania organizmu w procesie tzw. niedrzeniowej termogenezy [9, 22, 33, 34, 41, 56, 81, 89, 90]. Koncepcję o roli ttb w procesach wytwarzania ciepła sformułował jako pierwszy Smith w 1961 r. [89]. Zanim przedstawimy główne jej założenia, pragniemy podać kilka uwag na temat procesu termogenezy w ogóle. Otóż zgodnie z poglądem Jansky'ego wytwarzanie ciepła u ssaków można podzielić na dwa rodzaje: nie związane z termoregulacją i związane z termoregulacją [39]. Pierwszy rodzaj nie zależy od temperatury otoczenia i nie ma związku z ochroną organizmu przed działaniem niskich temperatur (podstawowa przemiana materii, wysiłek mięśniowy itp). Drugi rodzaj związany jest ściśle z termoregulacją, tzn. jest wysoce swoistą odpowiedzią organizmu na niską temperaturę otoczenia. Wyróżnia się tutaj tzw. termogenezę drzeniową (skurcze mięśni szkieletowych) oraz termogenezę niedrzeniową, czyli proces wytwarzania ciepła nie związany z czynnością skurczową mięśni.

Tak więc energia cieplna, która powstaje w organizmie przy wystawieniu na niską temperaturę, może pochodzić z czynności mięśni i z termogenezy niedrzeniowej. Procentowy udział tych dwóch typów termogenezy w ogólnej ilości wytworzonego ciepła zależy od różnych czynników, takich jak masa ciała, temperatura ciała, temperatura otoczenia itp. [31].

W termogenezie niedrzeniowej uczestniczą głównie dwa narządy — mięśnie poprzecznie prążkowane i tkanka tłuszczowa brunatna. Ze względu na dużą masę, głównym miejscem wytwarzania ciepła tą drogą są u większości zwierząt mięśnie szkieletowe, chociaż np. u noworodków królika ttb spełnia w tym względzie znacznie większą rolę [36].

Termogeneza niedrzeniowa jest ze zrozumiałych względów nasiloną zwłaszcza u noworodków ssaków, w tym także u człowieka oraz zwierząt podlegających fizjologicznej hibernacji [27, 36, 81, 90]. Udział ttb w wytwarzaniu ciepła tą drogą u zwierząt dorosłych adaptowanych do niskiej temperatury jest mniejszy [3, 36]. Wynika to z przejęcia tej funkcji przez kurczące się mięśnie, tj. wytwarzanie ciepła w procesie tzw. termogenezy drzeniowej.

MORFOLOGICZNE WYKŁADNIKI NIEDRZENIOWEJ TERMOGENEZY W TTB

Specjalizacja ttb w procesie wytwarzania ciepła znalazła swoje potwierdzenie m. in. w jej budowie morfologicznej. Bogate unaczynienie i unerwienie współczulne dwojakiego rodzaju oraz liczne połączenia międzykomórkowe stwarzają dogodne warunki do szybkiego wyzwolania ciepła [27]. Ponadto, jak już wspominaliśmy, typowe komórki ttb mają licz-

ne krople lipidowe i mitochondria. Krople lipidowe są magazynem trójglicerydów, które pod wpływem lipaz ulegają hydrolizie do kwasów tłuszczowych, czyli substratu oddechowego, a w mitochondriach zachodzą procesy ich utleniania w wyniku czego powstaje energia cieplna.

Pod wpływem działania zimna na organizm zwierzęcia, w ttb obserwuje się zmiany pod postacią rozszerzenia naczyń krwionośnych włosowatych i zaniku tłuszczu w jej komórkach [81]. W komórkach ttb szczurów adaptowanych do zimna stwierdzono zwiększenie się liczby mitochondriów z gęsto upakowanymi grzebieniami oraz zwiększenie się ich rozmiarów [92]. Wykazano także wzrost liczby peroksosomów, co jest zrozumiałe w świetle doniesień o możliwości prowadzenia przez te organelle beta-oksydacji kwasów tłuszczowych [45, 61].

MECHANIZM KONTROLI NIEDRZENIOWEJ TERMOGENEZY W TTB

Pobudzenie ttb do wytwarzania ciepła odbywa się na drodze nerwo-hormonalnej [9, 21, 27, 35, 58, 81]. Obniżona temperatura otoczenia odbierana jest przez termoreceptory skóry. Stąd informacja o zmianie stanu środowiska zewnętrznego dociera do podwzgórza drogą nerwową, gdzie znajduje się ośrodek termoregulacji. Podwzgórze, za pośrednictwem części współczulnej układu autonomicznego, powoduje wydzielanie noradrenaliny na zakończeniach włókien zazwojowych zwojów własnych ttb. Tak prawdopodobnie przedstawia się klasyczna droga regulacji termogenezy niedrzeniowej w organizmie ssaka [5, 27]. Noradrenalina jest głównym i podstawowym hormonem stymulującym komórki tłuszczowe brunatne do wytwarzania ciepła *in vitro* i *in vivo* [9, 19, 34, 57, 58].

Wykazano również, że glukagon i kortykotropina (ACTH) mogą działać synergistycznie z katecholaminami, aktywując lipolizę w komórkach ttb u młodych szczurów adaptowanych do zimna [26, 47]. Istnieją prawdopodobnie gatunkowe różnice w sposobie zapoczątkowania fizjologicznej odpowiedzi ttb w zakresie wytwarzania ciepła. Wykazano bowiem, że u zwierząt zapadających w sen zimowy, np. u jeża, uruchomienie niedrzeniowej termogenezy w czasie wybudzania z hibernacji podlega głównie kontroli katecholamin, natomiast w czasie adaptacji do zimna — kontrolowana jest głównie przez kortykosterydy (dezoksykortykosteron) [54, 99, 100]. Mechanizm termogenetycznego działania tego sterydu nie jest znany, chociaż wydaje się, że chodzi tutaj o tzw. „przyzwalający efekt” działania hormonów sterydowych w odniesieniu do katecholamin [27].

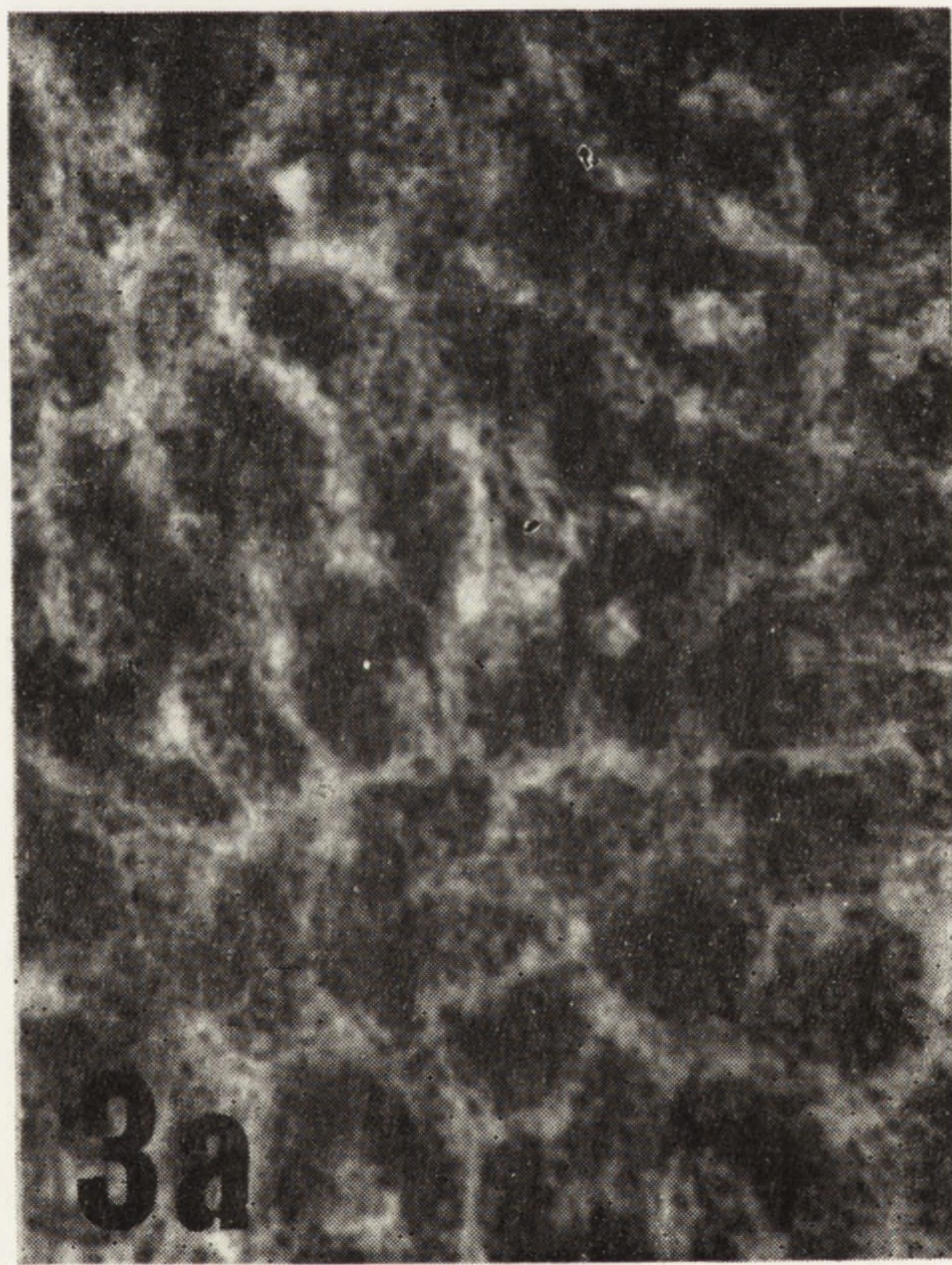
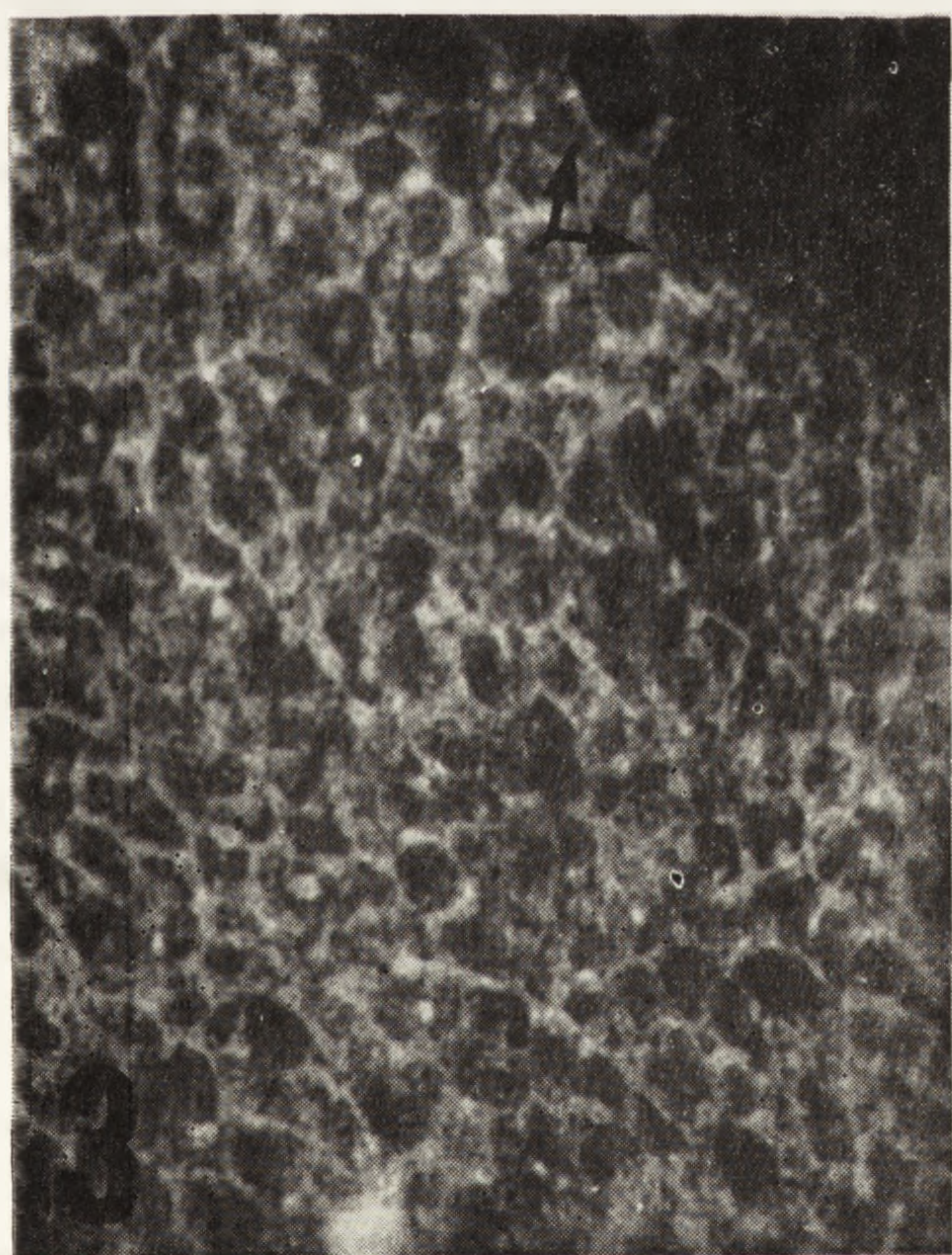
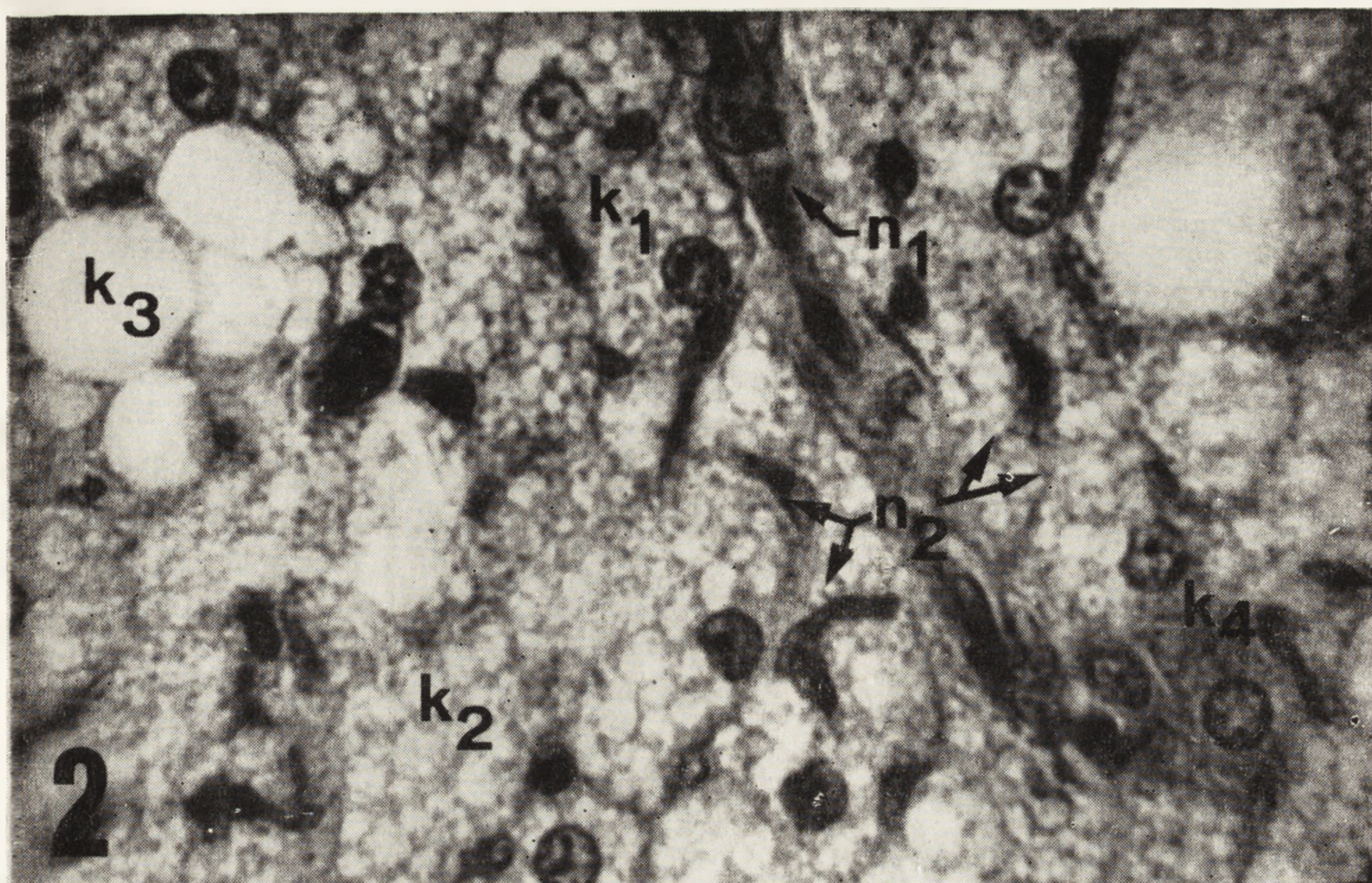
Interesujące są dane dotyczące udziału hormonów tarczycy w procesach niedrzeniowej termogenezy w ttb. Doświadczalnie wykazano, że niedobór tych hormonów, tyroksyny i trójjodotyroniny, w organizmie młodych szczurów upośledza z jednej strony przebieg lipolizy i oddychania komórkowego w odpowiedzi na noradrenalinę, a z drugiej — powoduje

magazynowanie tłuszczu w komórkach ttb [32]. Stan hipotyreozy u młodych i dorosłych szczurów pociąga za sobą obniżenie stężenia noradrenaliny w ttb, a hipertyreozę — jego zwiększenie [25, 44]. Przypuszcza się więc, że hormony tarczycy mogą również regulować niedrzeniową termogenezę w komórkach ttb poprzez ich wpływ na metabolizm katecholamin [73].

BIOCHEMICZNY MECHANIZM NIEDRZENIOWEJ TERMOGENEZY W KOMÓRKACH TTB

Znane są aktualnie dwie hipotezy próbujące wyjaśnić mechanizm wytwarzania ciepła na poziomie komórkowym. Pierwsza z nich, zaproponowana przez Nichollsa, opiera się na wielu obserwacjach, z których wynika, że izolowane z ttb mitochondria charakteryzują się „rozprężeniem energetycznym”, tzn. nie wykazują zdolności syntetyzowania ATP kosztem energii transportu elektronów w łańcuchu oddechowym [9, 56]. Umożliwia to pełną zamianę energii utleniania na ciepło. Koncepcja ta zyskała w świetle najnowszych badań bardzo mocne podstawy. Zanim jednak przedstawimy jej główne założenia, przypomnijmy pokrótce mechanizm fosforylacji oksydacyjnej w świetle teorii chemiosmotycznej Mitchella [37]. Otóż równoważniki redukcyjne, czyli zredukowane koenzymy dehydrogenaz (głównie $\text{NADH} + \text{H}^+$), powstałe przede wszystkim w wyniku cyklu Krebsa czy beta-oksydacji kwasów tłuszczowych, ale i innych procesów katabolicznych, uruchamiają łańcuch oddechowy. W trakcie łańcucha oddechowego następuje translokacja protonów z matriks mitochondrialnej, wytwarzając tym samym gradient elektrochemiczny jonów H^+ po obu stronach błony. Gradient ten można uważać za pierwotną formę akumulacji energii wydzielonej w łańcuchu oddechowym. Synteza ATP katalizowana przez kompleks enzymatyczny ATP może zachodzić tylko wówczas, gdy jednocześnie następuje przemieszczenie protonów do matriks, a jonów OH^- w kierunku przeciwnym. Inaczej mówiąc, ATP powstaje kosztem energii zmagazynowanej pod postacią gradientu elektrochemicznego, głównie jonów H^+ , po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej.

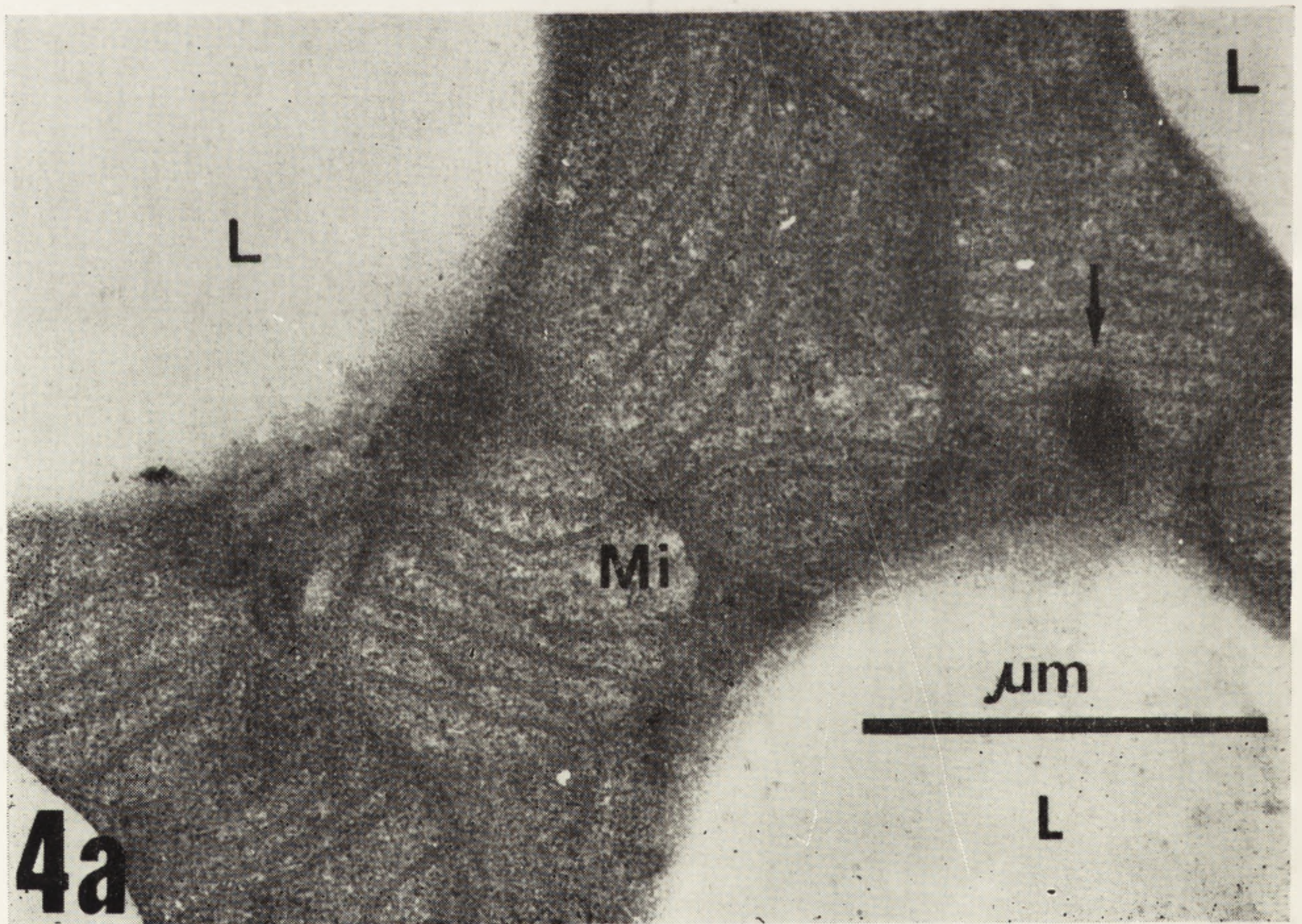
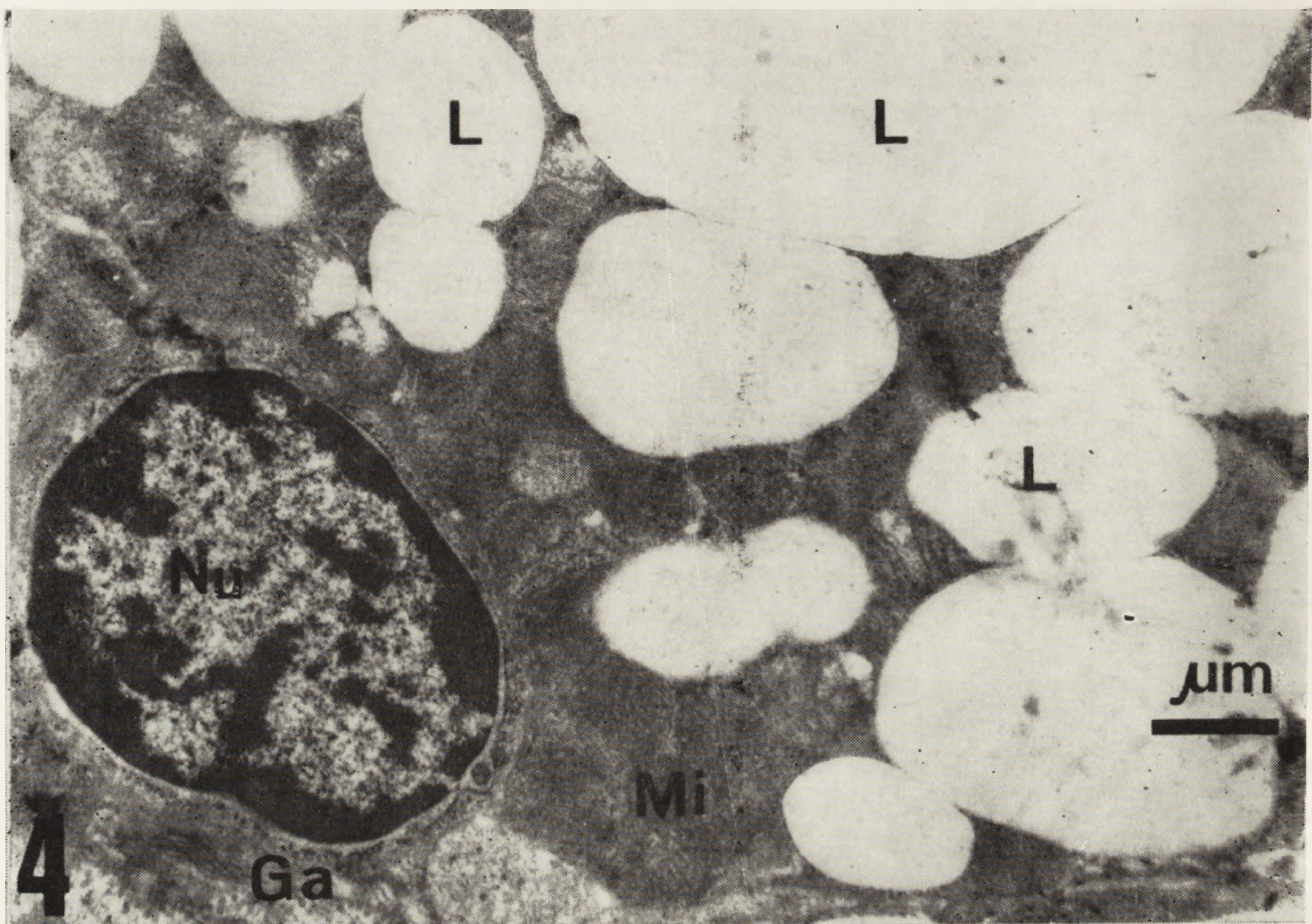
Jak już wspominaliśmy, główną i swoistą cechą mitochondriów ttb jest niski stopień sprzężenia oddychania z oksydacyjną fosforylacją [9]. Według Nichollsa zjawisko to związane jest z obecnością alternatywnej, tzw. „krótkiej”, drogi transportu protonów do wnętrza mitochondrium, przebiegającej z pominięciem syntetazy ATP (której podjednostka F_0 jest w istocie kanałem dla protonów) [57]. Zaobserwowano, że dwu- i trójfosforany nukleozydów purynowych, a zwłaszcza GDP, działając na mitochondria ttb *in vitro* hamują tę dodatkową drogę przenoszenia protonów do matriks. Tym samym podczas łańcucha oddechowego tworzy się i utrzymuje gradient stężeń protonów warunkujący działanie ATP syn-



Ryc. 2. Typowe utkanie zrazika tkanki tłuszczowej brunatnej szczura białego. Widoczne cztery rodzaje komórek: komórki wielowakuolarne (k_1), komórki wielowodniczkowe (k_2), komórki pęcherzykowe (k_3) i komórka wybarwiona intensywnie fuksyną kwaśną (k_4), naczynie krwionośne małe (n_1) oraz naczynia krwionośne włosowate (n_2). Barwienie metodą Massona; pow. około $250\times$

Ryc. 3. Intensywna i bardzo intensywna sudanochłonność komórek tkanki tłuszczowej brunatnej szczura białego. Widoczne komórki pęcherzykowe (strzałki). Barwienie Sudanem czarnym B metodą Lisona; pow. około $100\times$

Ryc. 3a. Jak na ryc. 3; pow. około $160\times$



Ryc. 4. Ultrastruktura typowej komórki tkanki tłuszczowej brunatnej szczura białego; pow. 12 000 \times

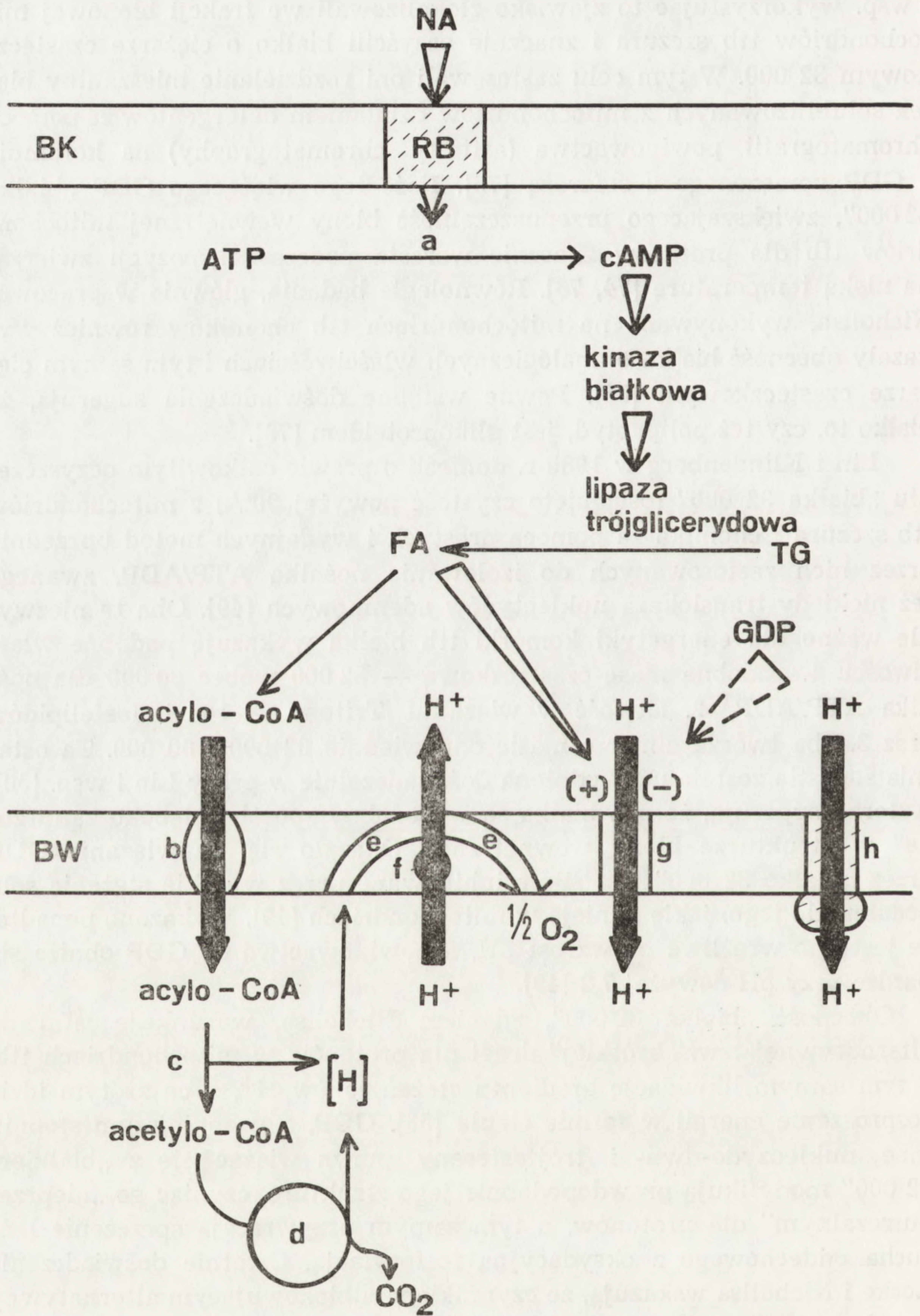
Ryc. 4a. Fragment komórki tkanki tłuszczowej brunatnej szczura białego; pow. 39 000 \times

Nu — jądro komórkowe, Ga — strefa Golgiego, L — krople lipidowe, Mi — mitochondria, strzałka — ziarnisty obszar w mitochondrium o dużej gęstości elektronowej

tetazy, a przez to wyłączający intensywną termogenezę [56]. Ricquier i wsp. wykorzystując to zjawisko zlokalizowali we frakcji błonowej mitochondriów ttb szczura i znacznie oczyścili białko o ciężarze cząsteczkowym 32 000. W tym celu zastosowali oni rozdzielanie mieszaniny białek solubilizowanych z mitochondriów działaniem detergentów za pomocą chromatografii powinowactwa (affinity chromatography) na kolumnie z GDP sprzężonego z sefarozą [75]. Ilość tego wiążącego GDP „białka 32 000”, zwiększającego przepuszczalność błony wewnętrznej mitochondriów ttb dla protonów znacznie wzrasta podczas ekspozycji zwierząt na niską temperaturę [74, 76]. Równoległe badania, głównie w pracowni Nichollsa, wykonywane na mitochondriach ttb chomików również wykazały obecność białka o analogicznych właściwościach i tym samym ciężarze cząsteczkowym [56]. Pewne wstępne doświadczenia sugerują, że białko to, czy też polipeptyd, jest glikoproteidem [75].

Lin i Klingenberg w 1980 r. donieśli o prawie całkowitym oczyszczeniu „białka 32 000” (osiągnięto czystość powyżej 90%) z mitochondriów ttb szczura i chomika za pomocą prostych i wydajnych metod uprzednio przez nich zastosowanych do izolowania nośnika ATP/ADP, zwanego też niekiedy translokazą nukleotydów adeninowych [49]. Oba te niezwykle ważne dla energetyki komórki ttb białka wykazują podobne właściwości: 1. podobną masę cząsteczkową — 32 000 wobec 30 000 dla nośnika ATP/ADP, 2. łatwość w wiązaniu Tritonu X-100 i fosfolipidów oraz 3. oba tworzą dimer o masie odpowiednio 62 000 i 60 000. Ta ostatnia sugestia została udowodniona doświadczalnie w pracy Lin i wsp. [50]. Autorzy sugerują, że oba białka są w podobny sposób „głęboko zanurzone” w strukturze błony wewnętrznej. Okazało się, że wiązanie GDP przez „białko 32 000” jest silnie inhibowane przez wysokie stężenie soli, podobne do tego, jakie istnieje w mitochondriach [49]. Wykazano ponadto, że jest ono wrażliwe na wzrost pH, a powinowactwo do GDP obniża się bardzo przy pH powyżej 7,2 [49].

Obecność „białka 32 000”, zdaniem Nichollsa, warunkuje istnienie alternatywnej tzw. „krótkiej” drogi dla protonów w mitochondriach ttb, a tym samym likwidację gradientu stężeń jonów H^+ , a co za tym idzie rozproszenie energii w formie ciepła [56]. GDP, a w mniejszym stopniu inne nukleozydo-dwu- i trójfosforany puryn wiążąc się z „białkiem 32 000” modyfikują prawdopodobnie jego strukturę, czyniąc go „nieprzepuszczalnym” dla protonów, a tym samym przywracają sprzężenie łańcucha oddechowego z oksydacyjną fosforylacją. Ostatnie doświadczenie Locke i Nichollsa wskazują, że czynnikiem odblokowującym alternatywny kanał protonowy na „białku 32 000” są endogenne kwasy tłuszczowe w formie nieaktywowanej [52]. Wiadomo więc, że kwasy tłuszczowe działając przeciwnie do GDP na alternatywny kanał protonowy

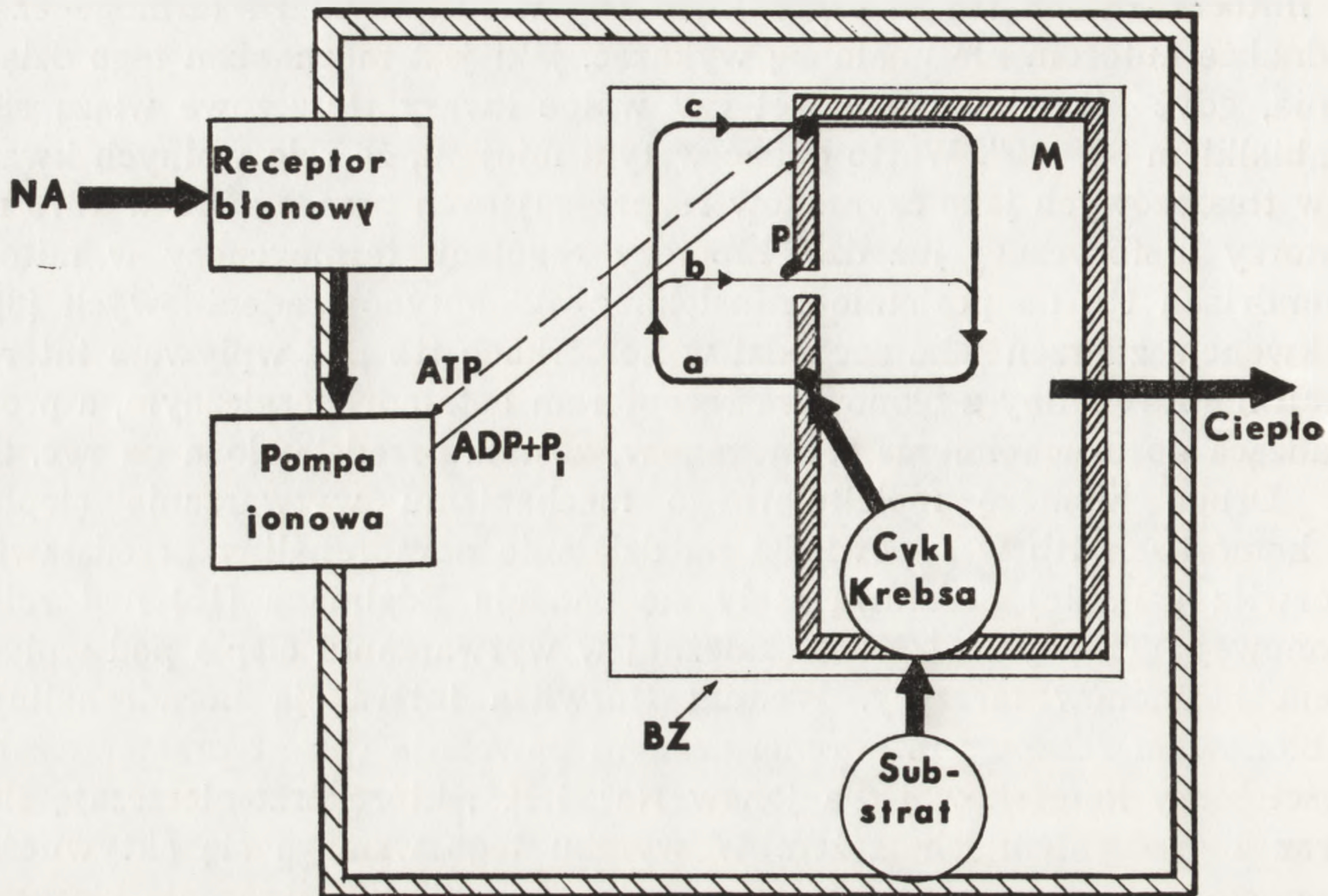


w mitochondriach ttb są czynnikiem odpowiedzialnym za termogenezę, jednakże autorom nie udało się wykazać, jaki jest mechanizm tego działania, gdyż nie wiadomo nawet czy wolne kwasy tłuszczowe wiążą się z „białkiem 32 000”. Warto dodać w tym miejscu, że rolę wolnych kwasów tłuszczowych jako czynników rozprzegających przedstawili w 1973 r. autorzy historycznej już dziś hipotezy regulacji termogenezy w mitochondriach ttb na poziomie translokazy nukleotydów adeninowych [8]. Sekwencja zdarzeń jaka zachodzi w komórkach ttb pod wpływem interakcji noradrenaliny z błonowym receptorem beta-adrenergicznym, a prowadząca do uruchomienia termogenezy, została przedstawiona na ryc. 5.

Drugą hipotezę molekularnego mechanizmu wytwarzania ciepła w komórkach ttb w odpowiedzi na działanie noradrenaliny przedstawił Horwitz [35]. Jej podstawą stały się badania Edelmana [16] nad rolą błonowej ATP-azy Na^+/K^+ — zależnej w wytwarzaniu ciepła pod wpływem hormonów tarczycy. Według Horwitza interakcja noradrenaliny z błonowym receptorem adrenergicznym powoduje wzrost przepuszczalności błony komórkowej dla jonów Na^+ i K^+ , które przemieszczają się wraz z gradientem ich stężeń. W wyniku tego wzmagają się aktywność błonowej pompy sodowo-potasowej, która dąży do przywrócenia pierwotnej koncentracji jonów po obu stronach błony komórkowej. Działanie pompy Na^+/K^+ jest możliwe dzięki aktywności jej ATP-azy, która drogą hydrolizy ATP do ADP dostarcza energię potrzebną do aktywnego transportu jonów. W ten sposób powstaje „wewnątrzkomórkowy sygnał” do wzmożonej syntezy ATP, dla której substratem są w tym przypadku kwasy tłuszczowe zawarte w trójglicerydach kropel lipidowych. W zależności od tego, czy mitochondria komórek ttb aktywowanej fizjologicznie działaniem noradrenaliny są faktycznie „sprężone”, „luźno sprężone” czy

Ryc. 5. Schemat wytwarzania ciepła w komórce tłuszczowej brunatnej w odpowiedzi na noradrenalinę według koncepcji Nichollsa. Opis w tekście

jasna strzałka — aktywacja, jasna strzałka przerywana — blokowanie, \leftarrow — reakcja chemiczna, \leftarrow — transport przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, BK — błona komórkowa, BW — błona wewnętrzna mitochondrium, NA — noradrenalina, RB — receptor błonowy, TG — trójglicerydy, FA — wolne kwasy tłuszczowe, GDP — symbolizuje dwu- i trójfosforanowe nukleozydy purynowe, [H] — równoważniki redukcyjne, a — adenylocyklaza, b — układ transacylaz karnitynowych przenoszący reszty acylowe przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, c — beta-oksydacja kwasów tłuszczowych, d — cykl Krebsa, e — łańcuch oddechowy — ujęcie graficzne nawiązuje do faktu, że poszczególne kompleksy łańcucha oddechowego są wyeksponowane na zewnętrzną lub wewnętrzną powierzchnię wewnętrznej błony mitochondrialnej, f — zależna od łańcucha oddechowego translokacja protonów z matriks, czyli pompa protonowa wytwarzająca gradient H^+ , g — tzw. alternatywna „krótka” droga przenoszenia protonów do matriks, czyli kanał utworzony przez „białko 32 000”, który jest blokowany przez GDP i inne nukleotydy purynowe (—), a prawdopodobnie „otwierany” przez wolne kwasy tłuszczowe (+), h — synteza ATP zależna od gradientu H^+ , czyli tzw. wektorialna ATP-aza mitochondrialna



Ryc. 6. Hipotetyczny mechanizm działania błonowej pompy Na^+/K^+ stymulowanej przez noradrenalinę na szybkość fosforylacji oksydacyjnej i wytwarzanie ciepła w komórce ttb według Horwitza [35]. Opis w tekście

NA — noradrenalina, M — matriks mitochondrialna, BZ — zewnętrzna błona mitochondrialna, P — białko regulujące przenoszenie protonów krótką drogą alternatywną, a — łańcuch oddechowy, b — alternatywna „krótka” droga przenoszenia protonów do matriks niezależna od fosforylacji oksydacyjnej, c — synteza ATP przenosząca protony do matriks

całkowicie „rozprężone energetycznie, autor proponuje trzy modele wytwarzania ciepła, z których najbardziej prawdopodobny wydaje się model mitochondriów „sprężonych” (ryc. 6).

Koncepcja ta próbuje wytłumaczyć wytwarzanie dużych ilości energii cieplnej przez istnienie procesów intensywnie zużywających ATP powstający w mitochondriach. W modelu tym ATP-aza pompy jonowej zabezpiecza szybką hydrolizę ATP, czyli odpowiednio dużą ilość ADP koniecznego do oksydacyjnej fosforylacji, zwiększając w ten sposób szybkość utleniania substratów i wytwarzania ciepła [26].

TKANKA TŁUSZCZOWA BRUNATNA JAKO REGULATOR TERMOGENEZY

Smith i Roberts wykazali istnienie połączeń anatomicznych pomiędzy naczyniami krwionośnymi międzyłopatkowej tkanki tłuszczowej brunatnej i żyłami rdzenia kręgowego [91]. Dzięki obecności anastomoz między układem żył szyjnych i międzyłopatkowych ttb a żyłami splotu kręgowego wewnętrznego istnieje możliwość przepływu ciepła z tkanki do

rdzenia kręgowego. Spostrzeżenie to stało się podstawą do sformułowania hipotezy o regulacyjnej roli międzyłopatkowej tkanki tłuszczowej brunatnej w odniesieniu do termogenezy drzeniowej w mięśniach szkieletowych [6]. Według tej hipotezy ttb wytwarza ciepło w odpowiedzi na niską temperaturę otoczenia. Krew o podwyższonej temperaturze płynie z żył międzyłopatkowych m. in. do żył splotu kręgowego wewnętrznego, sąsiadujących z metamerami rdzenia kręgowego C₆-Th₂, na powierzchni których zlokalizowane są termodetektory. Stąd sygnały wysyłane są do ośrodka termoregulacji w podwzgórzu, kontrolującego dalsze wytwarzanie energii cieplnej w ttb. Jeżeli ilość ciepła powstającego w ttb jest za mała w stosunku do potrzeb, nie dochodzi do pobudzenia termodetektorów, sygnały nie docierają do podwzgórza i uruchomiona zostaje termogeneza drzeniowa w mięśniach szkieletowych.

Z kolei Hayward i Davies [29], na podstawie własnych badań, wysunęli przypuszczenie, że ttb myszy może odgrywać rolę mediatora dla reakcji termogenetycznych innych tkanek, ale za pośrednictwem mechanizmu humoralnego [29]. Komórki ttb miałyby wydzielać jakiś czynnik lub czynniki, które regulowałyby wytwarzanie ciepła w innych tkankach. Są jednak obserwacje wskazujące na minimalny wpływ doświadczonego wyłączenia czynności międzyłopatkowej tkanki tłuszczowej brunatnej za pomocą hibernektomii na ilość wytwarzanego ciepła pod wpływem noradrenaliny u ssaków adaptowanych do zimna [20].

TKANKA TŁUSZCZOWA BRUNATNA JAKO NARZĄD DOKREWNY

Cramer [11] jako pierwszy zasugerował, że tkanka tłuszczowa brunatna może być gruczołem wewnątrzwydzielniczym. Poparciem dla tej tezy stały się klasyczne już dzisiaj badania Fawcetta z 1949 r. [17]. Mianowicie wykazał on, że usunięcie przysadki mózgowej bądź adenektomia powodują u szczura m. in. zanik lipidów w komórkach ttb i że zmiany te cofają się po podaniu egzogennych hormonów kory nadnerczy bądź kortykotropiny.

Na podstawie obrazów morfologicznych i zachowania się niektórych odczynów histochemicznych i histoenzymatycznych można wnosić o czynności dokrewnej ttb [7, 80]. Między innymi stwierdzono, że w pierwszych dniach regeneracji nadnerczy po ich obustronnej enukleacji u szczura białego, a więc po wypadnięciu czynności kory nadnerczy, pojawiają się morfologiczne i morfochemiczne wykładniki pobudzenia ttb świadczące prawdopodobnie o syntezie i wydzielaniu przez nią kortykosterydów [7].

Różni autorzy posługując się metodami biochemicznymi i histochemicznymi wykryli obecność hormonów z grupy kortykosterydów w ko-

mórkach ttb szczura białego [7, 62, 69, 79], myszy [65], chomika [51, 65] i świnki morskiej [63]. Stwierdzono ponadto w ttb znaczne ilości androgenów [46, 93]. Z badań tych wynika, że tkanka tłuszczowa brunatna zawiera hormony sterydowe. Dyskusyjna jest jednak kwestia ewentualnej ich syntezy w ttb. Linck i Petrovic [51], na podstawie własnych badań, wykazali, że ttb chomika syryjskiego nie jest zdolna do syntezy kortyzolu, kortyzonu, kortykosteronu, dezoksykortykosteronu czy też aldosteronu, ale może syntetyzować reszty octanowe, cholesterol i bliżej nie znany związek sterydowy, który, ich zdaniem, powstaje drogą syntezy z kwasu mewalonowego. Z kolei Zizine i wsp. [101] wykazali powstawanie radioaktywnego dezoksykortykosteronu ze znakowanego ^{14}C -4-progesteronu w obecności skrawków ttb. Na podstawie tych badań wydaje się, że ttb nie jest wyposażona w układy enzymatyczne konieczne do syntezy sterydów de novo, ale nie można jednocześnie wykluczyć, że jest ona zdolna przekształcać związki pośrednie syntetyzowane w innych gruczołach dokrewnych, np. w korze nadnerczy lub gonadach.

Selye [82], a potem Ptak [64] wykazali, że w fazie reakcji alarmowej zespołu ogólnego przystosowania (GAS) ttb odpowiada w sposób podobny do kory nadnerczy zarówno pod wpływem głodu, jak i stresu zimna, gwałtownie uwalniając duże ilości kortykosterydów. Zaobserwowano jednocześnie zjawisko hipertrofii ttb w chorobie Addisona, czyli w stanie znacznej niedomogi kory nadnerczy [67]. Wykazano również, że zmiany morfochemiczne zachodzące w międzyłopatkowej tkance tłuszczowej brunatnej szczura białego w przebiegu regeneracji nadnerczy po ich enukleacji, a więc po „wypadnięciu” czynności kory nadnerczy, świadczą o syntezie i wydzielaniu przez nią hormonów sterydowych [7]. Spostrzeżenia te mogą wskazywać, że tkanka tłuszczowa brunatna pełni rolę gruczołu dokrewnego, a przynajmniej gruczołu pomocniczego w stosunku do kory nadnerczy [7, 69, 80]. Przejmowanie tej funkcji dokrewnej kory nadnerczy odbywa się przede wszystkim w stanach jej „wyczerpania” czynnościowego (uszkodzenia), a jest problematyczne w warunkach fizjologicznych.

Pawlikowski opierając się na badaniach nad tkanką tłuszczową brunatną u niemowląt, wysunął jeszcze inną hipotezę dotyczącą jej czynności dokrewnej. Otóż, jeżeli ttb rzeczywiście zawiera androgeny, to istnieje możliwość, że przejmuje ona czynność strefy przejściowej nadnerczy zaraz po urodzeniu, czyli że pełni funkcję ochronną w stosunku do estrogenów i gonadotropin pochodzenia matczynego [59].

Spornym zagadnieniem jest w dalszym ciągu kontrola czynności dokrewnej ttb. Jak już wspominaliśmy, Fawcett udowodnił wpływ hormonów przysadki mózgowej, nadnerczy i tarczycy na tę tkankę. Późniejsze obszerne badania nad wpływem adrenalektomii [17, 79], enukleacji nad-

nerczy [7], kastracji [80] oraz podawania niektórych hormonów, takich jak kortykotropina [77, 79], follitropina [78, 80], choriogonotropina [78, 80] i hydrokortyzon [79] na ttb szczurów białych wykazały, że jej czynność dokrewna znajduje się pod kontrolą hormonów gonotropowych i/bądź kortykotropiny [77, 80]. Kontrola gonotropowa wydaje się bardziej prawdopodobna, bowiem jeśli ttb ma spełnić rolę gruczołu wspomagającego czynność kory nadnerczy, to jest zrozumiałe, że powinna ona podlegać innym mechanizmom regulacyjnym niż nadnercza [80].

W związku z tym, że udowodniono udział egzogennych katecholamin w regulacji czynności ttb związanej z wytwarzaniem ciepła, pojawił się problem ewentualnego udziału katecholamin pochodzenia nadnerczowego w bezpośredniej regulacji czynności dokrewnej ttb. Na podstawie własnych badań wysunęliśmy hipotezę, że pobudzenie czynności dokrewnej ttb uwarunkowane jest wyłączeniem czynności układu adrenalno-współczulnego [7].

Pełne wyjaśnienie mechanizmów regulujących wewnątrzwydzielniczą czynność ttb pozwoli zapewne lepiej zrozumieć jej podwójną rolę fizjologiczną w organizmie ssaków, polegającą na wytwarzaniu ciepła w procesie niedrzeniowej termogenezy i na wydzielaniu hormonów sterydowych.

UWAGI KOŃCOWE

Okazuje się jednak, że ttb posiada jeszcze inne, mniej znane właściwości. Wykazano na przykład, że homogenat ttb noworodków i zwierząt adaptowanych do zimna wykazuje aktywność immunodepresyjną, szczególnie w odniesieniu do odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego [38]. Być może właściwość ta związana jest z jej czynnością dokrewną, tj. z działaniem hormonów sterydowych zawartych w ttb na układ immunologiczny.

Tkanka tłuszczowa brunatna może być także przyczyną rzadko spotykanego łagodnego nowotworu o nazwie hibernoma [48]. Dotychczas opisano w piśmiennictwie światowym niewiele ponad 40 przypadków tego guza u ludzi. Najczęstszym jego umiejscowieniem jest okolica międyłopatkowa, pachowa i szyjna, a utkanie histologiczne przypomina budową normalną tkankę tłuszczową brunatną [48].

W podsumowaniu należy stwierdzić, że:

1. Tkanka tłuszczowa brunatna jest narządem uczestniczącym w tzw. niedrzeniowej termogenezie u małych ssaków oraz u zwierząt podlegających fizjologicznej hibernacji.

2. Wytwarzanie ciepła w komórkach tłuszczowych brunatnych znajduje się pod kontrolą układu współczulnego.

3. Biochemiczny mechanizm niedrzeniowej termogenezy w komórkach ttb polega prawdopodobnie na tzw. „rozprężeniu energetycznym” jej mitochondriów.

4. Ttb może spełniać rolę gruczołu dokrewnego i/bądź wspomagającego czynność kory nadnerczy w przypadku jej niedomogi bądź uszkodzenia.

5. Pomimo tego, że ttb spełnia zupełnie inną rolę fizjologiczną u ssaków niż ttż, jej komórki mogą w pewnych warunkach ulegać transformacji w zwykłe komórki tłuszczowe pęcherzykowe.

6. Tkanka tłuszczowa brunatna posiada bliżej nie wyjaśnione właściwości immunodepresyjne, szczególnie w odniesieniu do odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego.

LITERATURA

- [1] AHERNE W., HULL D., Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant, *J. Pathol. Bacteriol.*, **91**: 223–234, 1966.
- [2] ALEXANDER G., BENNETT J. W., GEMMEL R. T., Brown adipose tissue in the newborn calf, *J. Physiol.*, **224**: 223–234, 1975.
- [3] ALEXANDER G., WILLIAMS D., Shivering and non-shivering thermogenesis during summit metabolism in young lambs, *J. Physiol. (London)*, **198**: 251–276, 1968.
- [4] BEHRENS W. A., DEPOCAS F., Dopamine beta-hydroxylase and cytochrome oxidase activities in brown adipose tissue of newborn rats following sympathectomy with 6-hydroxydopamine, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55**: 695–699, 1977.
- [5] BRÜCK K., Non-shivering thermogenesis and brown adipose tissue in relation to age and their integration in the thermo-regulatory system, [w:] *Brown adipose tissue*, red. O. Lindberg, New York, Elsevier, 1970, 115–154.
- [6] BRÜCK K., WÜNNENBERG W., Beziehung zwischen Thermogenese in „braunen” Fettgewebe Temperatur im cervicalen Anteil des Vertebralhanals und Kaltezittern, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **290**: 167–183, 1966.
- [7] BRZEZIŃSKI W., BROŻYŃSKI K., KMIEĆ B., FORTAK W., Morphochemical Study of Brown Adipose Tissue During Adrenal Gland Regeneration in the White Rat, *Folia Hist. Cytochem.*, **19**: 149–159, 1981.
- [8] CHRISTIANSEN E. N., DRAHOTA Z., DUSZYŃSKI J., WOJTCZAK L., Transport of adenine nucleotides in mitochondria from the brown adipose tissue, *Eur. J. Biochem.*, **34**: 506–512, 1973.
- [9] CHRISTIANSEN E. N., WOJTCZAK L., Regulacja metabolizmu energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej, *Post. Biochem.*, **23**: 495–521, 1977.
- [10] COTTLE M. K. W., COTTLE W. H., Adrenergic fibres in brown fat of cold-acclimated rats, *J. Histochem. Cytochem.*, **18**: 116–119, 1970.
- [11] CRAMER W., On glandular adipose tissue and its relation to other endocrine glands and to the vitamine problem, *Brit. J. Exp. Path.*, **1**: 184–196, 1920.

- [12] DERRY D. M., SCHONBAUM E., STEINER G., Two sympathetic nerve supplies to brown adipose tissue of the rat, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **47**: 57-63, 1969.
- [13] DERRY D. M., DANIEL H., Sympathetic nerve development in the brown adipose tissue of the rat, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **48**: 160-168, 1970.
- [14] DYER R. F., Morphological features of brown adipose cell maturation in vivo and in vitro, *Am. J. Anat.*, **123**: 255-290, 1968.
- [15] DYER H., PIRIE B. J. S., The growth in vitro of newborn rat brown and white adipose tissue, *J. Anat.*, **125**: 519-525, 1978.
- [16] EDELMAN J. S., Thyroid thermogenesis, *N. Engl. J. Med.*, **290**: 1303-1308, 1974.
- [17] FAWCETT D. W., CHESTER-JONES J., The effect of hypophysectomy, adrenalectomy and of thiouracil feeding on the cytology of brown adipose tissue, *Endocrinol.*, **48**: 609-621, 1949.
- [18] FEYRTER F., Ein adrenolipoides Syndrom. Normonologie und Pathologie des braunen Fettgewebes des Menschen, [w:] Normale und pathologische Anatomie. Heft 27, red. Bargmann-Doerr, Georg Thieme Verlag., Stuttgart, 1973.
- [19] FINK S. A., WILLIAMS J. A., Adrenergic receptors mediating depolarization in brown adipose tissue, *Am. J. Physiol.* **231**: 700-706, 1976.
- [20] FOSTER D. O., Evidence against a mediatory role of brown adipose tissue in the calorogenic response of cold-acclimated rats to noradrenaline, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **52**: 1051-1062, 1974.
- [21] FOSTER D. O., FRYDMAN M. L., USHER J. R., Non-shivering thermogenesis in the rat. I. The relation between drug-induced changes in thermogenesis and changes in the concentration of plasma cyclic AMP, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **55**: 52-64, 1977.
- [22] FOSTER D. O., FRYDMAN M. L., Non-shivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**: 110-122, 1978.
- [23] GEMMELL R. T., BELL A. W., ALEXANDER G., Morphology of adipose cells in lambs at birth and during subsequent transition from brown to white adipose tissue in cold and warm conditions, *Am. J. Anat.*, **133**: 143-164, 1972.
- [24] GESNER C., *Medici Tigurini Historiae Animalium Liber II qui est de Quadrupedibus Viviparis (de Mure Alpino)*, 840-843, 1551.
- [25] GRIPOIS D., KLEIN C., VALENS M., Influence of hypo- and hyperthyroidism on noradrenaline metabolism in brown adipose tissue of the developing rats, *Biol. Neonate*, **37**: 53-59, 1980.
- [26] HAHN P., Response of brown and white adipose tissue to lipolytic agents in the rat during development, *Pediat. Res.*, **5**: 126-130, 1971.
- [27] HAHN P., NOVAK M., Development of brown and white adipose tissue, *J. Lipid Res.*, **16**: 79-91, 1975.
- [28] HAHN P., SECCOMBE D., KIRBY L., GIRARD J., ASSAN R., Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and fatty acid synthetase in brown fat of suckling rats, *Endocrinol.*, **103**: 1417-1427, 1978.
- [29] HAYWARD J. S., DAVIES P. F., Evidence for the mediatory role of brown adipose tissue during nonshivering thermogenesis in the cold-acclimated mouse, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **50**: 168-170: 1972.
- [30] HEATON J. M., The distribution of brown adipose tissue in the human, *J. Anat.*, **112**: 35-39, 1972.
- [31] HELDMAIER G., Relationship between nonshivering thermogenesis and body

- size, [w:] Non-shivering thermogenesis, red. L. Jansky, Sweets and Zeitlinger, Amsterdam, 73-81, 1971.
- [32] HEMON P., Some aspects of fat metabolism in the brown adipose tissue of normal and hypothyroid rats during early postnatal development, *Biol. Neonate*, **28**: 241-255, 1976.
- [33] HIMMS-HAGEN J., Interscapular location of brown adipose tissue: role in noradrenaline-induced calorogenesis in cold-acclimated rats., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **52**: 225-229, 1974.
- [34] HIMMS-HAGEN J., Cellular thermogenesis, *Ann. Rev. Physiol.*, **38**: 315-351, 1976.
- [35] HORWITZ B. A., Cellular events underlying catecholamine-induced thermogenesis: cation transport in brown adipocytes., *Fed. Proc.* **38**: 2170-2176, 1979.
- [36] HULL D., SEGAL M. M., The contribution of brown adipose tissue to heat production in the newborn rabbit, *J. Physiol. (London)*, **181**: 449-457, 1965.
- [37] JAGOW G., ENGEL W. D., Structure and Function of the Energy-Converting System of Mitochondria, *Angewandte Chemie*, **19**: 659-675, 1980.
- [38] JANKOVIC B. D., POPESKOVIC L., JANEZIC A., LIKIC M., Brown adipose tissue: effect on immune reaction in the rat, *Die Naturwissenschaften*, **61**: 36, 1974.
- [39] JANSKY L., Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance, *Biol. Rev.*, **48**: 85-132, 1973.
- [40] JASIŃSKI A., KILARSKI W., Ultrastruktura naczyń włosowatych kręgowców; morfologiczne podstawy mikrokrazenia i przepuszczalności, *Post. Biol. Kom.*, **3**: 393-505, 1976.
- [41] JOEL C. D., The physiological role of brown adipose tissue [w:] *Handbook of Physiology*, ed. Jr. American Physiological Society, Baltimore, 59-85, 1965.
- [42] JONEK J., Tkanka tłuszczowa w tarczycy jeży w cyklu rocznym, *Folia Morph. (Warsz.)*, **8**: 251-256, 1957.
- [43] KAROLEWICZ L., Tkanka tłuszczowa brunatna u jeża, *Folia Morph. (Warsz.)*, **3**: 49-58, 1953.
- [44] KENNEDY D. R., HAMMOND R. P., HAMOLSKY N. W., Thyroid cold acclimation influences on norepinephrine metabolism in brown fat, *Am. J. Physiol.*, **232**: E 565-E 569, 1977.
- [45] KRAMAR R., HÜTTINGER M., GMEINER B., GOLDENBERG H., Beta-oxidation in peroxisomes of brown adipose tissue, *Biochim. Biophys. Acta*, **531**: 353-356, 1978.
- [46] KRUTZSCH P. K., WELLS W. W., Androgenic activity in the interscapular brown adipose tissue of the male hibernating bat (*Myotis lucifugus*), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**: 578-589, 1960.
- [47] KUROSHIMA T., OHNO T., DOI K., In vivo lipolytic action of glucagon in brown adipose tissue of warm-acclimatized and cold-acclimatized rats, *Experientia*, **33**: 240-242, 1977.
- [48] LAWSON W., BILLER H. F., Cervical hibernoma, *Laryngoscope*, **86**: 1258-1267, 1976.
- [49] LIN C. S., KLINGENBERG M., Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria, *FEBS Lett.*, **113**: 299-303, 1980.
- [50] LIN C. S., HACKENBERG H., KLINGENBERG E. M., The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study, *FEBS Lett.*, **113**: 304-306, 1980.
- [51] LINCK G., PETROVIC A., Does brown adipose tissue of the european hamster (*Cricetus cricetus*) store and synthesize corticosteroids. The isolation of

- a corticosteroid-like compound, *Arch. Sci. Physiol.*, **26**: 85-100, 1972.
- [52] LOCKE R. M., NICHOLLS D. G., A re-evaluation of the role of acids in the physiological regulation of the proton conductance of brown adipose tissue mitochondria, *FEBS Lett.*, **135**: 249-252, 1981.
- [53] MASTERS E. M., Monolayer cultures of brown fat cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **119**: 44-46, 1965.
- [54] MERKER G., WÜNNENBERG W., BRÜCK, K., Effect of hormones on thermoregulatory heat production in hibernators, *Isr. J. Med. Sci.*, **12**: 1115-1117, 1976.
- [55] MERKLIN R. J., Growth and Distribution of Human Fetal Brown Fat, *Anat. Record*, **178**: 637-646, 1974.
- [56] NICHOLLS D. G., Brown adipose tissue mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **549**: 1-29, 1979.
- [57] NICHOLLS D. G., Cellular mechanism in brown fat thermogenesis mitochondria, *Experientia*, **33**: 1130-1131, 1977.
- [58] NICHOLLS D. G., Hormonal control of brown adipose tissue metabolism, *Biochem. Soc. Trans.*, **5**: 908-912, 1977.
- [59] PAWLIKOWSKI T., Tkanka tłuszczowa brunatna u człowieka, *Folia Morph. (Warsz.)*, **6**: 209-216, 1955.
- [60] PAWLIKOWSKI T., Gruczoły dokrewne u dziecka, *Endokr. Pol.*, **13**: 467-485, 1962.
- [61] PAVELKA M., GOLDENBERG H., HÜTTINGER M., KRAMAR R., Enzymic and morphological studies on catalase positive particles from brown fat of cold adapted rats, *Histochem.*, **50**: 47-55, 1976.
- [62] PTAK W., Badania chromatograficzne hormonów sterydowych występujących w tkance tłuszczowej brunatnej, *Endokr. Pol.*, **13**: 111-122, 1962.
- [63] PTAK W., The influence of extracts of the brown and yellow adipose tissue of the rat and guinea pig on the storage of glycogen in the liver of albino mice, *Folia Biol.*, **10**: 125-130, 1962.
- [64] PTAK W., The effect of stress on the steroid hormone content in the brown adipose tissue of the rat, *Folia Biol.*, **10**: 131-135, 1962.
- [65] PTAK W., Chromatographic assay of steroid hormones present in the brown adipose tissue of the rat, *Folia Biol.*, **11**: 347-352, 1963.
- [66] PTAK W., The influence of age on the content of steroid compounds in the brown adipose tissue of the rat, *Folia Biol.*, **12**: 246-259, 1964.
- [67] PTAK W., Hibernektomia — operacyjne usunięcie brunatnej tkanki tłuszczowej, *Zwierzęta Lab.*, **1**: 119-130, 1964.
- [68] RASMUSSEN A. T., The so-called hibernating gland, *J. Morphol.*, **38**: 147-205, 1923.
- [69] RATSIMAMANGA A. R., RAHANDRAHA T., NIGEON-DUREIL M., RABINOWICZ M., Presence de l'hormone de survie „type surrenalien” dans le graisse interscapulaire du rat surrenaloprive, *J. Physiol.* **50**: 479-483, 1958.
- [70] RECHARDT L., HERVONEN H., Electron microscopic localisation of adenylate cyclase activity of white and brown adipose tissue of the rat and chicken, *Histochem.*, **50**: 57-64, 1976.
- [71] RESHEF L., HANSON R. W., The isolation of catecholamines and adrenal corticosteroids in the induction of phosphopyruvate carboxylase in rat liver and adipose tissue, *J. Biochem.*, **127**: 809-818, 1972.
- [72] REVEL J. P., YEC A. G., HUDSPETH A. J., Gap junctions between electronically coupled cells in tissue culture and in brown fat, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 2924-2927, 1971.

- [73] RICQUIER D., MORY G., HEMON P., Effects of chronic treatments upon the brown adipose tissue of young rats, *Pflügers Arch.*, **362**: 241–246, 1976.
- [74] RICQUIER D., KADER J-C., Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **73**: 577–583, 1976.
- [75] RICQUIER D., GERVAIS C., KADER J-C., HEMON P., Partial purification by guanosine-5-diphosphatase-agarose affinity chromatography of the 32000 molecular weight polypeptide from mitochondria of brown adipose tissue, *FEBS Lett.*, **101**: 35–38, 1979.
- [76] RICQUIER D., MORY G., HEMON P., Changes induced by cold adaptation in the brown adipose tissue from several species of rodents with special reference to the mitochondrial components, *Can. J. Biochem.*, **57**: 1262–1266, 1979.
- [77] ROMER T. E., Badania nad wpływem gonadotropin i ACTH na morfologię i niektóre odczyny histochemiczne tkanki tłuszczowej brunatnej u szczura białego. Praca doktorska, Łódź, 1964.
- [78] ROMER T. E., Wpływ FSH i HCG na obraz morfologiczny tkanki tłuszczowej brunatnej u szczurów, *Endokr. Pol.*, **15**: 643–649, 1964.
- [79] ROMER T. E., Wpływ podawania ACTH, hydrokortyzonu oraz usunięcia nadnerczy na morfologię i niektóre odczyny histochemiczne tkanki tłuszczowej brunatnej u szczura białego. *Endokr. Pol.*, **16**: 387–406, 1965.
- [80] ROMER T. E., Wpływ gonadotropin na kortykosterydy i niektóre odczyny histochemiczne w tkance tłuszczowej brunatnej szczura białego, *Endokr. Pol.*, **17**: 297–305, 1966.
- [81] SCHENK H., FRANKE H., HEIM T., Structure and function of brown adipose tissue, *Acta Histochem., Suppl. Band 19*: 195–208, 1977.
- [82] SELYE H., TIMIRAS P. S., Participation of „brown fat” tissue in alarm reaction, *Nature*, **164**: 745, 1949.
- [83] SIDMAN R. L., Histogenesis of brown adipose tissue in vivo and in organ culture, *Anat. Record.*, **124**: 581–601, 1956.
- [84] SKALA J. P., DRUMMOND G. I., HAHN P., A protein kinase inhibitor in brown adipose tissue of developing rats, *J. Biochem.*, **138**: 195–199, 1974.
- [85] SKALA J. P., HAHN P., Effects of single cortisone injections on brown adipose tissue of developing rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **49**: 501–507, 1971.
- [86] SKALA J. P., KNIGHT B. L., Protein kinase in brown adipose tissue of developing rats: substrate specificities, separation and changes in activity during development, *Can. J. Biochem.*, **56**: 869–874, 1978.
- [87] SKALA J. P., KNIGHT B. L., c-GMP and c-GMP-dependent protein kinase in brown adipose tissue of developing rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **582**: 122–131, 1979.
- [88] SKALA J. P., LINDBERG O., Monoamine oxidase and cytochrome oxidase activities in brown adipose tissue of the rat during development, *Int. J. Biochem.*, **1**: 513–522, 1970.
- [89] SMITH R. E., Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat, *Physiologist.*, **4**: 113, 1961.
- [90] SMITH R. E., HORWITZ B. A., Brown adipose tissue and thermogenesis, *Physiol. Rev.*, **49**: 330–425, 1969.
cold-acclimated rats, *Am. J. Physiol.*, **206**: 143–148, 1964.
cold-acclimated rats, *Am. J. Physiol.*, **206**: 143–148, 1964.
- [92] SUTER E. R., The fine structure of brown adipose tissue. I. Cold induced changes in the rat, *J. Ultrastruct. Res.*, **26**: 216–241, 1969.

- [93] SWEET J. E., HOSKINS W. H., Androgen in woodchuck hibernating gland, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **45**: 60–68, 1940.
- [94] TANUMA Y., YAMAMOTO M., ITO T., YOKOCHI Ch., The occurrence of brown adipose tissue in perirenal fat in Japanese, *Arch. Histol. Jap.*, **38**: 43–70, 1975.
- [95] TANUMA Y., OHATA M., ITO T., YOKOCHI Ch., Possible function of human brown adipose tissue as suggested by observation on perirenal brown fats from necropsy cases of variable age groups, *Arch. Histol. Jap.*, **39**: 117–145, 1976.
- [96] VELSCH G. H., *Anatome Muris Alpini*, *Ephemerid. Acad. Nat. Cur. Ann. I*, Dec. 1, Obs., **160**: 338–339, 1970.
- [97] WEGENER F., Braunes Lipom und braunes Fettgewebe des Menschen, *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.*, **111**: 252–266, 1951.
- [98] WIRSEN C., HAMBERGER B., Catecholamines in brown fat, *Nature*, **214**: 625–626, 1967.
- [99] WÜNNENBERG W., MERKER G., BRÜCK K., Do corticosteroids control heat production in hibernators?, *Pflügers Arch.*, **352**: 11–16, 1974.
- [100] WÜNNENBERG W., MERKER G., Control of non-shivering thermogenesis in a hibernator [w:] *Effector of thermogenesis*, red. L. Girardier and Seydoux, Birkhauser Verlag, Basel, Stuttgart, 1978.
- [101] ZIZINE L., Action in vitro de la graisse interscapulaire de rat sur la 4^{14}C -progesterone, *C. R. Acad. Sci.*, **246**: 1091–1094, 1958.

Ostatnio ukazała się publikacja:

J. NEDERGAARD, O. LIRDBERG, The brown fat cell, *Int. Rev. Cytol.*, **74**: 187–286, 1982.

Nadesłano: 11 stycznia 1982 r.

Przyjęto: 3 czerwca 1982.

Adres autorów: ul. Narutowicza 60, 90–136 Łódź.

KOMUNIKAT

Komisja do Spraw Wydawnictw Komitetu Cytobiologii PAN zamierza publikować corocznie bibliografię prac autorów polskich z zakresu biologii komórki. Obecnie przystępujemy do zebrania informacji o publikacjach doświadczalnych, przeglądowych i książkowych wydanych z datą 1983 r.

Spisy publikacji należy sporządzać według wzoru cytowania w „Postęпах Biologii Komórki”, grupując osobno prace doświadczalne, przeglądowe i książkowe (komunikatów i doniesień zjazdowych nie uwzględniamy). Prosimy o podanie placówki, w której wykonana została praca.

Informacje bibliograficzne prosimy nadesłać pod adresem:

Doc. dr hab. Jerzy Warchol
Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury,
Akademia Medyczna w Poznaniu,
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

w terminie do 31 marca 1984 r.

Sekretarz Komitetu Cytobiologii
Dr hab. Jerzy Sikora

ENDOCYTOZA ADSORPCYJNA I RECEPTOSOMY

ADSORPTIVE ENDOCYTOSIS AND RECEPTOSOMES

Aleksander HINEK

Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie
i Pracownia Cytofizjologii CMKP w Warszawie *

Streszczenie. Pobieranie różnorodnych substancji z otoczenia przez komórki oraz ich śródkomórkowy transport określa się terminem endocytozy. Obecnie rozróżnia się dwa rodzaje endocytozy. Pobieraniu płynów fizjologicznych i substancji w nich rozpuszczalnych, które po wewnątrzkomórkowym strawieniu przez enzymy lizosomowe są źródłem elementarnych składników do syntez komórkowych, służy tzw. endocytoza płynnej fazy. Drugi rodzaj endocytozy to endocytoza adsorpcyjna. Proces ten dotyczy głównie makrocząsteczek, takich jak: hormony białkowe, czynniki wzrostowe, niektóre enzymy, a także toksyny bakteryjne i cząstki wirusów. Makrocząsteczki takie są w pierwszym etapie adsorbowane na specyficznych ruchomych receptorach zlokalizowanych na powierzchni komórki, a następnie receptory i przyłączone do nich ligandy przemieszczają się w płaszczyźnie błony i są agregowane w charakterystycznych dołkach błony komórkowej opłaszczonych białkiem klatryną. Agregaty kompleksów ligand—receptor są następnie wnoszone do wnętrza komórki w pęcherzykach zwanych receptosomami. Receptosomy, unikając połączenia z lizosomami, przenoszą swą zawartość do aparatu Golgiego, skąd następuje prawdopodobnie przeniesienie części czynnych biologicznie ligandów do innych organelli komórkowych. Rozłożenie ligandów przez enzymy lizosomowe następuje dopiero po kilkudziesięciu minutach, co sugeruje, że substancje te przebywając przez długi czas w komórce mogą odgrywać ważną rolę w regulacji jej szlaków metabolicznych. Endocytoza adsorpcyjna jest ważnym ogniwem w procesie obiegu i recyrkulacji jednostek błoniastych w komórce oraz reguluje stężenie receptorów powierzchniowych dla wielu hormonów, czynników wzrostowych i innych substancji czynnych biologicznie.

Summary. Endocytosis is a process that regulates the uptake and transport of different substances into and through cells. Two major types of endocytosis have been distinguished. Physiological fluids and solutes being the main sources of elementary components for cellular synthesis are taken up by so called fluid phase endocytosis. It is established that cells contain also the other specific internaliza-

* Częściowo finansowane z programu MR II. 1

tion pathway called adsorptive endocytosis, that carries hormones as well as some proteins and viruses from the cell surface to the cell interior. Initially such ligands bind to the mobile receptors randomly distributed on the cell surface. Next endocytosis of receptor—ligand complexes is mediated through their clustering in certain regions on the cell surface — clathrin coated pits. Following this clustering event the complexes ligand—receptor are internalized into a noncoated intracellular vesicles- the receptosomes, which selectively avoid fusion with lysosomes and move toward the Golgi region of the cell by saltatory motion. It seems that some of the ligands may be send later to other cellular organelles. It is believed that adsorptive endocytosis play important role in the regulation of cellular metabolic pathways and in the turnover and recirculation of plasma membrane constituents including receptors for many hormones, growth factors and other biologicaly active substances.

Sprawny przebieg szlaków metabolicznych warunkujących prawidłowe funkcje komórek zależy od wielu egzo- i endogennych substancji, które komórki pobierają z otoczenia. Włączanie takich substancji do komórki w formie otoczonych błoną pęcherzyków i wakuoli nosi nazwę endocytozy [8]. Substancje pobrane w ten sposób przez komórkę mogą być przez nią wykorzystywane całkowicie, częściowo lub mogą być przenoszone przez jej cytoplazmę tranzytem. W procesie endocytozy do komórki włączane są również pewne hormony, czynniki wzrostowe, enzymy oraz szereg innych substancji mogących mieć wpływ na określone przemiany metaboliczne komórki [8, 14, 30, 31, 33, 44].

Endocytoza nie jest jednak procesem jednorodnym. Włączanie i wewnątrzkomórkowy transport różnych substancji odbywa się dzięki istnieniu zróżnicowanych mechanizmów, których sprawne działanie zależy od poszczególnych elementów cytoszkieletu oraz prawidłowego obiegu jednostek błoniastych biorących udział w wytwarzaniu pęcherzyków endocytarnych [30, 43, 44, 50, 51, 63].

FAGOCYTOZA

Włączanie do komórki stałych cząstek, takich jak: bakterie, fragmenty rozpadłych komórek, elementy substancji międzykomórkowej czy duże cząstki egzogenne, określa się terminem fagocytozy. Największą zdolnością do fagocytozy odznaczają się komórki należące do układu makro- i mikro-fagów, ale proces ten dotyczy również innych komórek takich jak fibroblasty, komórki śródbłonna, komórki siateczki, miocyty gładkie czy chondrocyty [8]. Włączanie stałych cząstek do wnętrza komórki odbywa się dzięki fałdowaniu i wpuklaniu okolic błony komórkowej, do których przylegały obecne w środowisku cząstki, lub dzięki aktywnemu otaczaniu tych cząstek przez pseudopodia i wypustki błony

komórkowej. Po połączeniu ze sobą brzeźnych fragmentów takich wpukleń błony komórkowej wytwarzają się wakuole, których średnica wynosi zwykle kilkaset nanometrów, ale w niektórych komórkach może dochodzić do kilku mikrometrów. Wakuole te zwane fagosomami otoczone są pojedynczą błoną, a w ich świetle widoczny jest często sfagocytowany materiał. Fagosomy zwykle szybko łączą się z lizosomami pierwotnymi tworząc fagolizosomy, we wnętrzu których można wykryć histochemicznie obecność kwaśnych hydrolaz. Jeżeli sfagocytowany materiał nie zostanie do końca rozłożony, widoczne są tzw. ciała resztkowe [8, 43, 44, 55].

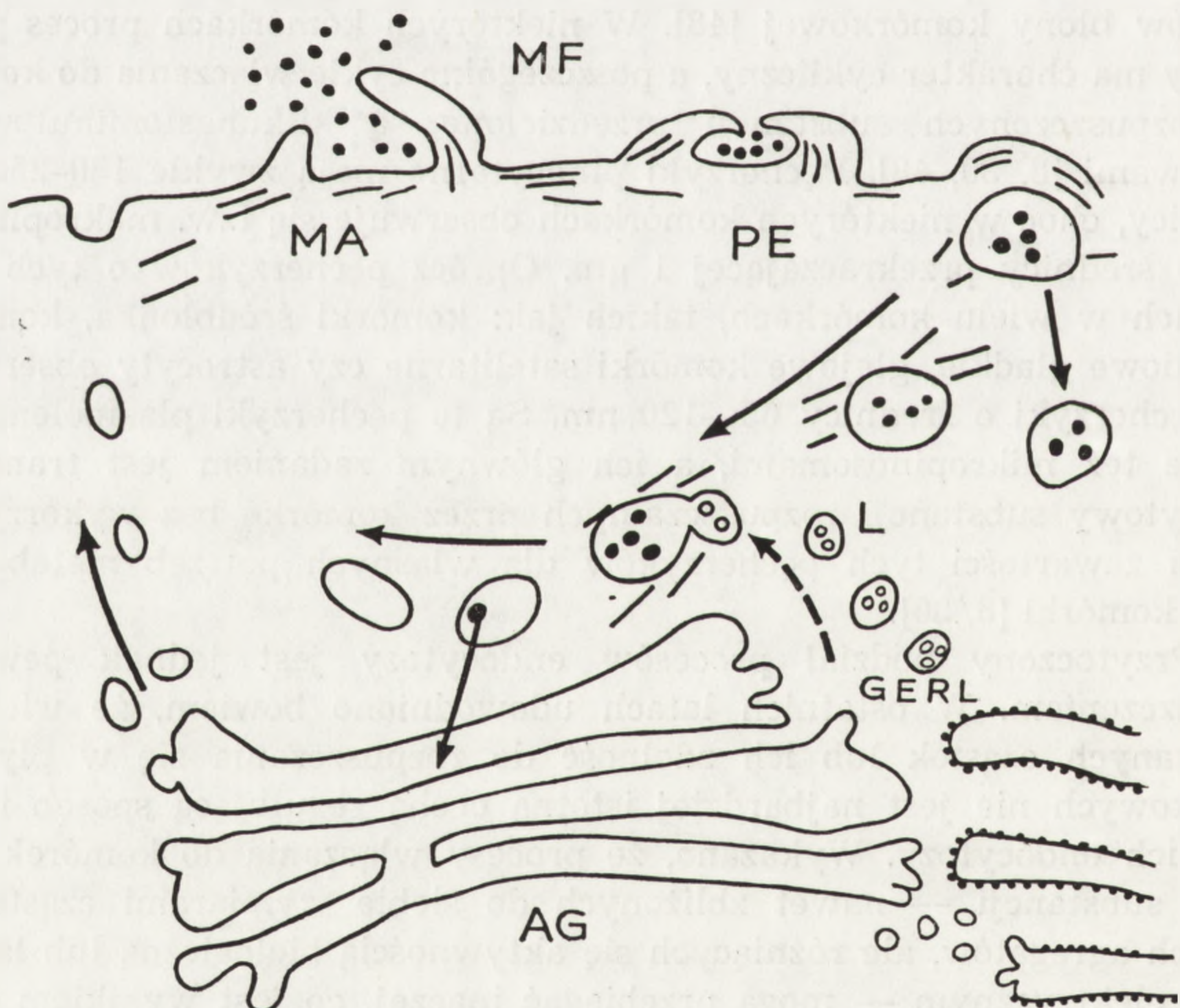
PINOCYTOZA

Włączanie substancji rozpuszczalnych w płynach fizjologicznych określa się terminem pinocytozy. Formowanie się pęcherzyków pinocytarnych — pinosomów odbywa się, podobnie jak to ma miejsce w przypadku fagocytozy, przez odsznurowywanie się fałdowań i wpukleń fragmentów błony komórkowej [48]. W niektórych komórkach proces pinocytozy ma charakter cykliczny, a poszczególne cykle włączania do komórki rozpuszczonych substancji przedzielone są kilkunastominutowymi przerwami [8, 30, 48]. Pęcherzyki pinocytarne mają zwykle 150–250 nm średnicy, choć w niektórych komórkach obserwuje się tzw. makropinosomy o średnicy przekraczającej 1 μm . Oprócz pęcherzyków o tych wymiarach w wielu komórkach, takich jak: komórki śródbłonna, komórki mięśniowe gładkie, glejowe komórki satelitarne czy astrocyty obserwuje się pęcherzyki o średnicy 65—120 nm. Są to pęcherzyki plazmolemalne, zwane też mikropinosomami, a ich głównym zadaniem jest transport tranzytowy substancji rozpuszczalnych przez komórkę bez wykorzystywania zawartości tych pęcherzyków dla własnych potrzeb metabolicznych komórki [8, 30].

Przytoczony podział procesów endocytozy jest jednak pewnym uproszczeniem. W ostatnich latach udowodniono bowiem, że wielkość włączanych cząstek lub ich zdolność do rozpuszczania się w płynach tkankowych nie jest najbardziej istotną cechą regulującą sposób i stopień ich endocytozy. Wykazano, że procesy włączania do komórek różnych substancji — nawet zbliżonych do siebie wymiarami cząsteczek lub ich agregatów, ale różniących się aktywnością biologiczną lub ładunkiem elektrycznym — mogą przebiegać inaczej, co jest wynikiem działania odrębnych mechanizmów komórkowych [30, 50–52]. Dlatego w większości nowych opracowań procesy endocytozy dzieli się na tzw. endocytozę płynnej fazy (fluid phase endocytosis) i endocytozę adsorpcyjną (adsorptive endocytosis).

ENDOCYTOZA PŁYNNEJ FAZY

Takim terminem określa się włączanie do komórek substancji o charakterze anionowym lub obojętnych elektrycznie w środowisku fizjologicznym. W badaniach mikroskopowo-elektronowych wykazano, że obojętne elektrycznie markery egzogenne, takie jak: peroksydaza chrzastowa (HRP), czy natywna ferrytyna, zaraz po zetknięciu się z powierzchnią błony komórkowej są otaczane przez mikrofałdy i pseudopodia błony komórkowej, a następnie wcielane do wnętrza komórki. Wydaje się, że endocytoza takich substancji odbywa się przez sfałdowanie przypadkowych obszarów błony komórkowej, w pobliżu których doszło do lokalnego zagęszczenia cząsteczek określonych substancji [15, 16, 52]. Cząsteczki obojętnych elektrycznie markerów można po ich endocytozie uwidocznnić w pęcherzykach otoczonych pojedynczą błoną. Pęcherzyki takie już po kilku minutach przebywania w komórce łączą się zwykle z lizosomami, gdzie następuje strawienie ich zawartości, a tylko nieliczne



Ryc. 1. Endocytoza płynnej fazy. Powstawanie pęcherzyków endocytarnych i ich droga śródkomórkowa; MF — mikrofałdy błony komórkowej, MA — mikrofilamenty aktynowe, PE — pęcherzyk endocytarny, L — lizosom, AG — aparat Golgiego

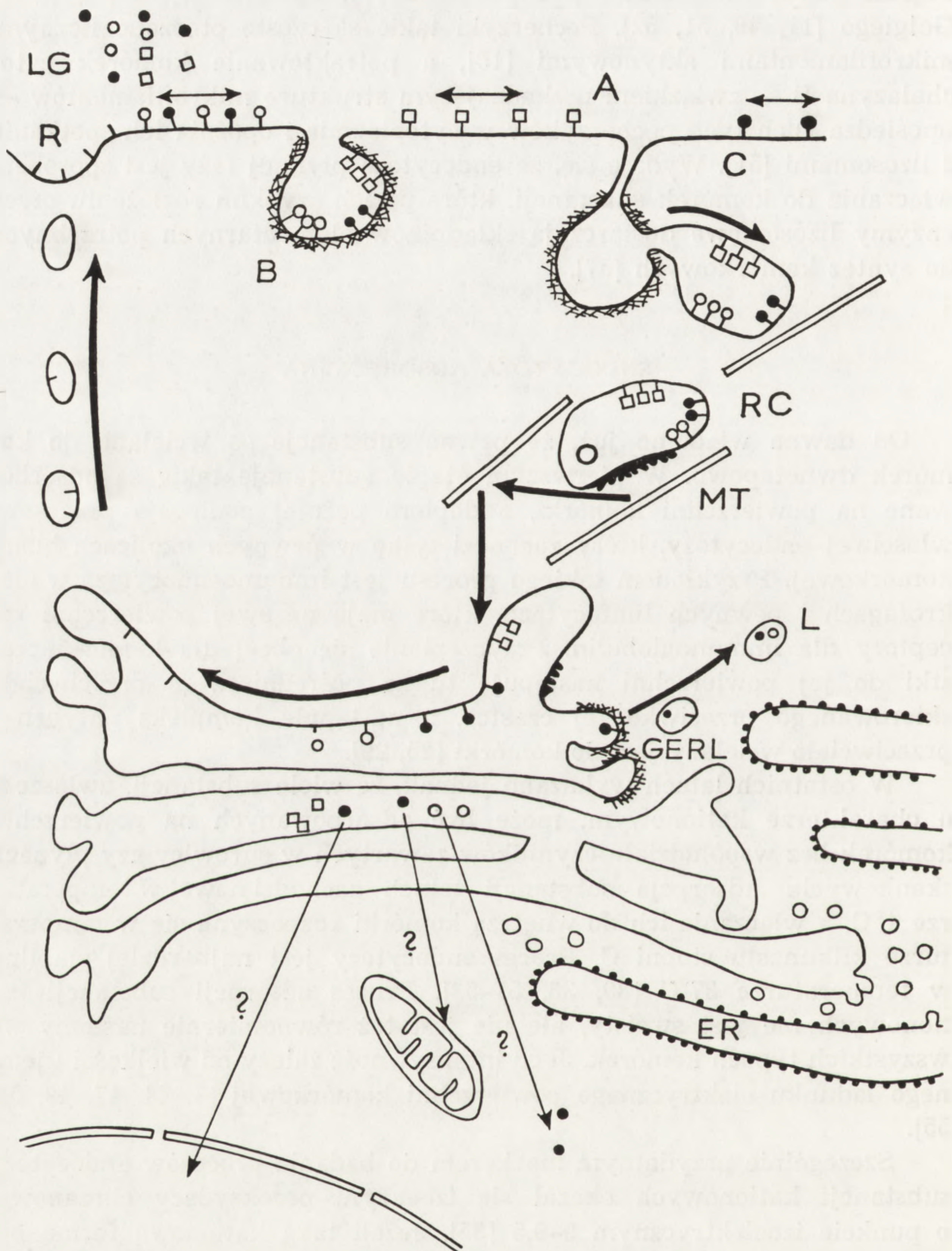
cząstki markerowe można wykryć później w cysternach-*trans* aparatu Golgiego [11, 49, 51, 52]. Pęcherzyki takie są często otoczone licznymi mikrofilamentami aktynowymi [10], a potraktowanie komórek cytochalazyną B — związkami uszkadzającym strukturę mikrofilamentów — upośledza ruch tych pęcherzyków w cytoplazmie i opóźnia ich spotkanie z lizosomami [51]. Wydaje się, że endocytoza płynnej fazy jest sposobem włączania do komórek substancji, które po ich szybkim rozłożeniu przez enzymy lizosomowe dostarczają składników elementarnych potrzebnych do syntez komórkowych [57].

ENDOCYTOZA ADSORPCYJNA

Od dawna wiadomo już, że pewne substancje są wcielane do komórek dwuetapowo. W pierwszym etapie substancje takie są adsorbowane na powierzchni komórki, a dopiero później podlegają procesowi właściwej endocytozy, który zachodzi tylko w pewnych okolicach błony komórkowej. Przykładem takiego procesu jest immunoendocytoza w makrofagach i pewnych limfocytach, które mają na swej powierzchni receptory dla immunoglobulin. Przyczepianie się obcej dla komórki cząstki do jej powierzchni następuje tu za pośrednictwem przeciwciała skierowanego przeciwko tej cząstce, a następnie kompleks antygen—przeciwciało wcielany jest do komórki [25, 29].

W ostatnich latach wykazano jednak, że wiele substancji, zwłaszcza o charakterze kationowym, może być adsorbowanych na powierzchni komórek bez współdziałania czynników zawartych w surowicy czy płynach tkankowych. Adsorpcja substancji takich zachodzi nawet w temperaturze 4°C, a włączanie ich do wnętrza komórki rozpoczyna się w temperaturze kilkunastu stopni C. Proces endocytozy jest najbardziej stabilny w temperaturze 37°C [30, 36, 51–53]. Proces adsorpcji substancji kationowych nie jest swoisty, ale nie jest też równomiernie nasilony we wszystkich typach komórek. Jego intensywność zależy od wielkości ujemnego ładunku elektrycznego powierzchni komórkowej [7, 24, 47, 49, 53, 55].

Szczególnie przydatnym markerem do badania procesów endocytozy substancji kationowych okazał się izoenzym peroksydazy chrzanowej o punkcie izoelektrycznym 9–9,5 [35]. Jeżeli taką kationową formę peroksydazy (k-HRP) doda się do zawiesiny makrofagów, to — w przeciwieństwie do obojętnych elektrycznie cząstek tego enzymu — zostaje ona najpierw dość równomiernie zaadsorbowana na powierzchni komórek, a dopiero później pojawia się w pęcherzykach, które nie łączą się z lizosomami, a swą zawartość przenoszą do cystern aparatu Golgiego [50].



Ryc. 2. Endocytoza adsorpcyjna. Formowanie się receptosomów, ich droga śródkomórkowa i recyrkulacja błon; A — ruchome receptory powierzchniowe z zaadsorbowanymi ligandami, B — agregacja kompleksów ligandów z receptorami w dołkach opłaszczonych klatryną, C — formowanie się receptosomów, LG — ligandy, R — receptory, RC — receptosom, MT — mikrotubule, L — lizosom, ER — siateczka śródplazmatyczna

Podobne obrazy mikroskopowo-elektronowe uzyskano po podaniu do zawiesiny komórek kationizowanej ferrytyny czy czerwieni rutenowej [52, 62].

MECHANIZM WIĄZANIA SIĘ LIGANDÓW Z POWIERZCHNIĄ BŁONY KOMÓRKOWEJ

Na podstawie doświadczeń wykazujących różnice w wiązaniu obojętnych elektrycznie i kationizowanych markerów przypuszczano, że również kationowy charakter wielu wielkocząsteczkowych substancji czynnych biologicznie, takich jak: somatomedyna, nerwowy czynnik wzrostowy — NGF, płytkowy czynnik wzrostowy — PDGF, nabłonkowy czynnik wzrostowy — EGF, toksyny cholery i *Pseudomonas* oraz niektóre wirusy, ułatwia im adsorpcję na ujemnie naładowanej powierzchni komórkowej. Po wykazaniu jednak, że substancje te łączą się tylko z pewnymi typami komórek, założono, że są one adsorbowane na swoistych receptorach powierzchniowych obecnych tylko w pewnych komórkach. Receptory takie wyizolowano i określono ich charakter chemiczny [1, 4, 12, 13, 17, 30, 40]. Wcześniej jeszcze udowodniono, że adsorpcja hormonów białkowych — insuliny, kortykotropiny, glukagonu, gonadotropin, tyreotropiny — ma charakter swoisty i odbywa się tylko na tych komórkach, które na swej błonie komórkowej mają miejsca receptorowe [2, 5, 6, 41, 42]. Receptory dla wspomnianych czynników wzrostowych, toksyn i hormonów mają charakter lipoproteidów, glikoproteidów i glikolipoproteidów [24, 45]. Stopień adsorpcji tych ligandów na powierzchni komórek można bowiem modyfikować przez działanie fosfolipazami A₁, A₂ i C, detergentami, filipiną czy neuraminidazą.

Metodami radioimmunologicznymi wykazano, że receptory dla wielu wielkocząsteczkowych substancji białkowych czynnych biologicznie występują również we wnętrzu komórek, w cytoplazmie, na błonach siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i gładkiej, w mitochondriach, w otoczce jądrowej i w aparacie Golgiego (według [45]), co sugerowało, że same receptory powierzchniowe lub w kompleksach z zaadsorbowanymi na nich ligandami mogą wnikać do wnętrza komórki. Wyjaśnieniu mechanizmów włączania wielkocząsteczkowych białek czynnych biologicznie do wnętrza komórek poświęcono w ostatnich latach wiele prac [30, 31, 40, 41, 44, 56, 61].

Willingham i Pastan [58] — inkubując komórki z różnymi czynnymi biologicznie ligandami znakowanymi fluorochromami i obserwując je przy użyciu mikroskopu laserowego ze specjalnym telewizyjnym wzmacniaczem i magnetowidem (Video Intensification Microscopy — VIM) — wykazali, że ligandy te, podobnie jak wspomniany kationowy marker percksydaza, przyłączały się do bardzo wielu miejsc na powierzchni komórkowej, co powodowało w pierwszym etapie dyfuzyjną fluorescencję,

tym intensywniejszą, im więcej receptorów dla danego ligandu zawierała powierzchnia określonej komórki [58, 60]. Bardzo wygodnym ligandem, którego często używano w tego typu badaniach, jest alfa₂-makroglobulina (α_2M), do której można przyłączyć 15–20 cząsteczek rodaminy bez upośledzenia funkcji wiązania tego białka z komórką [30, 59, 60]. Cząsteczki innych białkowych ligandów przyłączają mniej cząsteczek fluorochromu, co powoduje ich słabsze świecenie. Ilościowe określenie stopnia wiązania tego białka z komórkami było możliwe po podaniu znakowanej jodem J^{125} α_2M . Wykazano np., że fibroblasty zawierają dwie klasy receptorów o różnej stałej powinowactwa do α_2M , które mogą przyłączyć $1,5 \times 10^6$ cząsteczek tego ligandu na minutę [9, 30, 31].

Jeżeli komórki, na powierzchni których w temp. 4°C zaadsorbowane zostały cząsteczki ligandu, przeniesie się do temp. 37°C, to — już po kilku minutach — obserwuje się przesuwanie fluoryzujących ligandów w płaszczyźnie błony komórkowej i ich punktowe zagęszczanie. W miarę upływu czasu obserwuje się następnie stopniowe znikanie fluorescencji z powierzchni komórki i pojawianie się jej w centralnej części cytoplazmy [30, 60]. Można było ustalić, że w temp. 23°C ruchliwość kompleksów ligand—receptor w płaszczyźnie błony komórkowej, gdy ligandami była insulina, α_2M , nabłonkowy czynnik wzrostowy — EGF i trójjodotyronina, wynosi $3-9 \times 10^{-10}$ cm²/s, a więc jest taka sama jak ruchliwość białek integralnych zanurzonych w lipidach błony komórkowej [26, 30, 41].

Na podstawie równoległych obserwacji komórek za pomocą VIM oraz obserwacji mikroskopem elektronowym materiału utrwalonego w różnych okresach od rozpoczęcia inkubacji z ligandami ustalono, że obserwowane w VIM miejsca punktowego zagęszczenia fluoryzujących ligandów odpowiadają pewnym okolicom błony komórkowej mającym gęste elektronowo opłaszczenia od strony cytoplazmy [36, 60]. W oddzielnych badaniach wykazano, że za opłaszczenia tych okolic błony komórkowej odpowiedzialne jest białko o ciężarze cząsteczkowym 185 000 zwane klatryną [32, 33, 64].

Jeżeli do środowiska zawierającego komórki poda się jednocześnie kilka różnych ligandów znakowanych różnymi substancjami fluoryzującymi, np. α_2M znakowaną fluoresceiną i EGF znakowany rodaminą, można zauważyć krótkotrwałą różnobarwną dyfuzyjną fluorescencję powierzchni komórkowej, co odpowiada adsorpcji ligandów na receptorach. Następnie obserwuje się mieszane świecenie skupiające się w określonych punktach błony komórkowej, co świadczy, że kompleksy różnych ligandów z właściwymi dla nich receptorami zostają przesuwane do tych samych miejsc, w których zostaną następnie włączone do komórki. Stwierdzono więc, że nie ma specyficznych miejsc internalizacji dla po-

szczególnych kompleksów ligand—receptor, a istnieją wspólne „furtki” do wnętrza komórek, którymi są opłaszczone klatryną okolice błony komórkowej [3, 14, 23, 26, 41, 65]. Ustalono następnie, że te same pęcherzyki endocytarne znajdujące się już we wnętrzu komórek mogą zawierać jednocześnie kilka różnych ligandów. W procesie endocytozy adsorpcyjnej tylko etap adsorpcji wydaje się być specyficzny i zależeć od obecności, rozmieszczenia i ilości swoistych receptorów dla poszczególnych ligandów. Drugi etap, internalizacji i transportu śródkomórkowego, wydaje się być pozbawiony cech specyficzności i może być wspólny dla wielu białkowych substancji czynnych biologicznie.

MORFOLOGIA I FUNKCJA REJONÓW OPŁASZCZONYCH KLATRYNĄ

Zanim zwrócono uwagę na opłaszczone gęstą elektronową klatryną rejony błony komórkowej opisywano w wielu komórkach występowanie tzw. pęcherzyków opłaszczonych (coated vesicles) [23, 32, 33, 65]. Opisywano je tuż pod błoną komórkową oraz w okolicy aparatu Golgiego, a w komórkach nerwowych także w kolbkach synaptycznych [8]. W ostatnich latach zebrano więcej wiadomości na temat charakteru i roli tych struktur. Wykazano, że struktury te są zaangażowane w procesach endocytozy, procesie recyrkulacji błon oraz w procesie formowania lizosomów pierwotnych [30, 31, 62, 63]. Opłaszczone pęcherzyki to struktury o średnicy około 150 nm otoczone pojedynczą błoną, która otoczona jest jak koszykiem splatającymi się gęsto ze sobą beleczkowymi tworami zbudowanymi z pięcio- i sześciokątnych agregatów klatryny [19, 30, 32, 58, 62, 64, 65].

Willingham i wsp. [58, 64] wykazali, że struktury te nie są jednak sensu stricto pęcherzykami, ale że można tu raczej mówić o opłaszczonych klatryną dołkach (coated pits) w błonie komórkowej. Takie dołki mogą wnikać dość głęboko w obręb cytoplazmy, ale pozostają połączone z powierzchnią komórki za pomocą długiej szyjki. Obserwowane więc pod powierzchnią komórki opłaszczone klatryną pęcherzyki wydają się być stycznymi przekrojami tych uszypułowanych wpukleń błony komórkowej. Wykazano, że pojedyncza komórka (fibroblast) ma około 1000 dołków opłaszczonych klatryną [30]. Na rolę tych struktur w procesie endocytozy wskazuje również fakt, że właśnie w ich świetle gromadzą się wirusy przed wniknięciem do komórki [9, 18, 30, 63]. W opłaszczonych klatryną dołkach lokalizowano również agregaty znakowanych ferrytyną lipoproteidów LDL, α_2 M, EGF, toksyny pseudomonas i beta-glikozydazy [12, 30, 58, 60], a badania ze znakowanymi hormonami — insuliną, trój-jodotyroniną, LH i gonadotropiną łożyskową — potwierdziły te obserwacje [24, 45, 62, 63]. Przyjęta dziś teoria zakłada więc, że opłaszczone klatryną dołki są miejscami zagęszczania kompleksów ligand—receptor

oraz miejscami wnikania tych kompleksów do komórki. Następnym etapem badań dotyczących tego problemu było poszukiwanie mechanizmu działającego w czasie agregacji kompleksów ligand—receptor w opłaszczonych dołkach. Stwierdzono wtedy, że dodanie do środowiska, w którym inkubowano badane komórki z różnymi ligandami, związku z grupy poliamin — dansylkadaweryny hamowało formowanie się agregatów receptorów z ligandami. Dansylkadaweryna nie hamowała jednak poprzedzającej agregację adsorpcji takich ligandów jak: insulina, LDL, α_2M i trójiodotyronina na swoistych receptorach powierzchniowych. Dansylkadaweryna jako analog lizyny jest kompetycyjnym inhibitorem transglutaminazy — enzymu, który katalizuje powstawanie mostków izopeptydowych $R-NH-CO-R$ pomiędzy grupami ϵ -aminowymi lizyny i grupami karboksylowymi kwasu glutaminowego. Powstanie mostków izopeptydowych pomiędzy cząsteczkami różnych białek zawierających te aminokwasy może powodować ich agregację. Powstała więc koncepcja, że formowanie się agregatów kompleksów ligand — receptor w opłaszczonych klatryną dołkach odbywa się dzięki działaniu obecnego tam enzymu transglutaminazy. Zahamowanie tworzenia się takich agregatów i znaczne zmniejszenie stopnia endocytozy wielu białkowych ligandów i cząstek wirusów obserwowano również po inkubacji komórek z innymi analogami lizyny i glutaminy, takimi jak: bacitracina, amantadina, riamantadina, które są również inhibitorami transglutaminazy [9, 12, 27, 31, 43]. Fakt, że dla zahamowania tworzenia agregatów i endocytozy EGF trzeba było zastosować znacznie większe stężenie dansylkadaweryny niż w przypadku innych wspomnianych ligandów, a podanie bacitracyny nie hamowało zagęszczania i endocytozy EGF i LDL wydaje się wskazywać na znaczne możliwości regulowania stopnia endocytozy różnych białek w zależności od ilości lizyn i glutamin obecnych w ich cząsteczkach [27, 30, 31]. Wykazano ponadto, że dansylkadaweryna blokuje 20 razy silniej zagęszczenie i endocytozę cząstek takich wirusów, jak wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), wirus mięsaka Rousa i Semliki forest wirus niż znany lek przeciwwirusowy riamantadina, przez co dansylkadaweryna może być w przyszłości rozpatrywana jako lek przeciwwirusowy [18, 30, 63].

Opłaszczone klatryną dołki występują również w cysternach *trans* aparatu Golgiego. Są one mniejsze od dołków opisywanych na powierzchni komórki. Ich średnica wynosi zwykle 60–70 nm [30, 58, 64]. W obrębie tych opłaszczonych dołków wpuklających się w obręb cytoplazmy wykazano histochemicznie obecność kilku enzymów lizosomowych [38]. Sugeruje się, że na wewnętrznej powierzchni cystern aparatu Golgiego należących do GERL obecne są receptory wiążące nowo syntetyzowane enzymy lizosomowe oraz że takie kompleksy receptor—enzym mogą

być przesuwane w płaszczyźnie błon do opłaszczonych klatryną dołków będących miejscem ich opakowania i wysyłki w kierunku cytoplazmy podstawowej. Jako czynnik wiążący te enzymy do błony wymienia się fosforan mannozy [8, 46]. Używając gęstych elektronowo markerów wykazano, że w obrębie tych samych dołków grupują się cząsteczki enzymu lizosomowego beta-galaktozydazy oraz uprzednio włączonego do komórki NGF [30]. Wyjaśnia to mechanizm w jakim degradowane mogą być cząsteczki niektórych ligandów włączanych do komórki na drodze endocytozy adsorpcyjnej i przenoszonych bezpośrednio do aparatu Golgiego. W obrębie dołków opłaszczonych klatryną występujących na błonach aparatu Golgiego nie obserwuje się jednak białek, które komórka produkuje na eksport. Są one widoczne tylko w świetle cystern oraz w niektórych pęcherzykach sekrecyjnych oddzielających się od części *trans* tego organellum komórkowego.

RECEPTOSOMY

Badania w mikroskopie elektronowym przy użyciu ligandów znakowanych różnymi nieprzenikliwymi dla elektronów substancjami pozwoliły ustalić dalszą drogę włączanych do komórki kompleksów ligand—receptor [58]. Znakowana koloidalnym złotem α_2M , którą dodawano do zawiesiny komórek inkubowanych z wirusem stomatitis była zagęszczona w tych samych co cząstki wirusa dołkach opłaszczonych klatryną, a po 30 min inkubacji oba te ligandy były widoczne już w pęcherzykach wewnątrz komórki [30]. Pęcherzyki te miały średnicę 250–400 nm, były otoczone pojedynczą błoną, która na jednym z biegunów pęcherzyka wykazywała blaszkowate gęste elektronowo zgrubienie. Struktury takie nazwano receptosomami. W świetle większości receptosomów widoczny był jeszcze dodatkowy pęcherzyk o średnicy 60 nm [30, 61, 62]. Receptosomy opisano w wielu typach komórek, a w ich świetle wykazano obecność różnych znakowanych ligandów pobieranych na drodze endocytozy adsorpcyjnej po ich uprzednim przyłączeniu się do swoistych receptorów powierzchniowych [26, 31, 51, 52, 59, 61, 62, 65].

Elektronogramy cytoplazmy różnych typów komórek wykazywały zawsze bliskie sąsiedztwo receptosomów i mikrotubul, co sugeruje udział tych komponentów cytoszkieletu w transporcie receptosomów poprzez cytoplazmę. Do niedawna zakładano, że receptosomy powstają przez oderwanie się od powierzchni komórkowej opłaszczonych klatryną dołków, które tracą swój płaszcz klatrynowy, a uwolniona klatryna wraca i przyczepia się do nowo formujących się dołków w błonie komórkowej [32]. Obecnie sądzi się, że opłaszczone dołki są stałą strukturą powierzchniową komórek i nie odrywają się one od ich powierzchni. Za taką interpretacją przemawiają obrazy mikroskopowe uzyskane po znakowaniu komórek

peroksydazą, gdzie udało się wykazać na seryjnych skrawkach obecność długich szypułek łączących wpuklające się w obręb cytoplazmy dołki klatrynowe z powierzchnią komórek [61, 62]. Następnie wykazano, że podanie przeciwciał znakowanych fluorochromem przeciwko klatrynie powodowało świecenie tylko zwróconej do cytoplazmy powierzchni dołków oraz że połączenie klatryny z przeciwciałem antyklatrynowym nie hamowało endocytozy [54]. Przemawia to więc również na korzyść twierdzenia, że dołki klatrynowe są stałą strukturą powierzchniową, a nie są formowane w czasie endocytozy. Formowanie się receptorów odbywa się prawdopodobnie przez pączkowanie błony komórkowej na dnie opłaszczonych klatryną dołków powierzchniowych. Beleczki klatrynowe tworzą siatkę oplatającą dołek powierzchniowy, zabezpieczającą go przed zapadnięciem się, ale przez oczka tej siatki może następować wpuklanie się błony komórkowej w obręb cytoplazmy, co doprowadza do formowania się receptosomów. Uwypuklenie się błony dołka, do której przyczepione są agregaty kompleksów ligand—receptor może następować również na granicy opłaszczonego klatryną dołka i łączącej go z powierzchnią komórkową szypułki. Proces uwypuklania się błony komórkowej doprowadzający do formowania się receptosomów jest procesem energochłonnym, hamowanym przez inhibitory ATP-azy [62]. Uwypuklenie takie, powstające przez pętle rusztowania klatrynowego, przypominać może powstawanie baniek mydlanych na pętli drucianej, a odbywać może się na skutek ciągłego powiększania się powierzchni błony komórkowej pod wpływem dołączania się coraz to nowych jednostek — nowo syntetyzowanych lub recyrkulujących. Salisbury i wsp. [39] sugerują jednak, że za samo odsznurowywanie się uwypuklonych już receptosomów odpowiedzialne są zgromadzone pod błoną komórkową mikrofilamenty aktynowe, które reagując z miozyną powodują naprzemienne napinanie i rozkurcz tych fragmentów błony komórkowej, które wytwarzają szypułę receptosomu. Aktywacji procesu reagowania aktyny z miozyną ma sprzyjać wysokie stężenie kalmoduliny, która — po związaniu napływającego do komórki wapnia — aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny.

SRÓDKOMÓRKOWA DROGA RECEPTOSOMÓW I RECYRKULACJA BŁON

Śródkomórkową drogę receptosomów obserwowano za pomocą VIM, po włączeniu do nich znakowanych fluorochromami ligandów. Struktury te po oderwaniu się od powierzchni błony komórkowej przesuwały się ruchami zygzakowatymi lub tanecznymi (saltatory motion), a po 20–30 min zostają włączone w obręb aparatu Golgiego. Taka droga receptosomów została potwierdzona w badaniach mikroskopowo-elektro-
nowych [34, 50–52, 58, 61]. Wykazano ponadto, że po dalszych 15–60 min

pewna ilość znakowanych ligandów obecna jest już w lizosomach. Nie obserwowano jednak wcześniejszego łączenia się receptosomów z lizosomami zanim osiągną one cysterny aparatu Golgiego.

Po włączeniu znakowanych ligandów do komórki, powierzchnia komórkowa przez okres co najmniej kilkudziesięciu minut nie może zaadsorbować nowej porcji ligandów, co świadczy, że do wnętrza komórki w procesie endocytozy adsorpcyjnej zostały wchłonięte również i te receptory, które nie związały ligandu. Thyberg i wsp. [52] inkubując makrofagi otrzewnowe z kationizowaną peroksydazą zauważyli, że po endocytozie tego ligandu komórki te nie mogą przez okres 2–3 godzin wiązać nowych porcji k-HRP oraz że pewna liczba cząsteczek tego gęstego elektronowo markera pojawia się ponownie na powierzchni komórek po upływie 3–4 godzin od czasu rozpoczęcia doświadczenia, pomimo przeniesienia makrofagów do środowiska nie zawierającego peroksydazy. Był to dowód na istnienie procesu recyrkulacji fragmentów błony komórkowej zaangażowanych uprzednio w procesie endocytozy adsorpcyjnej, a z nimi i receptorów powierzchniowych wiążących ten marker. Szybkie pojawianie się kompleksów ligand—receptor w aparacie Golgiego oraz ponowne pojawianie się takich kompleksów na powierzchni komórek było dalszym dowodem na postulowany już wcześniej udział aparatu Golgiego w segregacji i recyrkulacji błon w komórce [11, 12, 20, 22, 42, 47, 50].

Fakt, że ligandy wcielone do komórek na drodze endocytozy adsorpcyjnej są przenoszone do aparatu Golgiego, a tylko niewielka ich ilość jest widoczna w lizosomach odróżnia drogę receptosomów w komórce od drogi pęcherzyków endocytarnych płynnej fazy, które bardzo szybko po wnikięciu do komórki łączą się z lizosomami, a ich zawartość zostaje strawiona przez kwaśne hydrolazy [50]. Ligandy włączone na drodze endocytozy adsorpcyjnej przebywają znacznie dłużej w komórce w niezmienionej postaci, przez co — jak się sugeruje — przynajmniej niektóre z nich mogłyby wywierać pewien biologiczny wpływ również śródkomórkowo. Zagadnienie to jest szczególnie ciekawe w odniesieniu do hormonów białkowych [30, 52, 58, 61, 62]. Wydaje się, że niektóre z tych białkowych ligandów zanim trafią do lizosomów mogą być rozesłane do innych organelli komórkowych. Jednostkami transportowymi mogłyby tu być nowo powstałe fragmenty błon cytoplazmatycznych, za których dystrybucję jest odpowiedzialny aparat Golgiego [38]. Dotychczas nie przedstawiono jednak morfologicznych dowodów na istnienie takiej drogi transportowej dla włączonych do komórki ligandów.

Badając problem obiegu receptorów dla poszczególnych czynnych biologicznie ligandów, stwierdzono, że zwykle ulegają one degradacji

wraz z cząsteczkami ligandów, a tylko niewielka ich liczba może powrócić na powierzchnię komórki wraz z recyrkulującymi fragmentami błon. Ale nie jest to reguła. Wykazano np., że receptory wiążące EGF są całkowicie degradowane przez aparat lizosomowy komórki razem z niesionym przez nie czynnikiem wzrostowym. Proces endocytozy nowej porcji EGF jest możliwy dopiero po syntezie nowej porcji swoistych receptorów przez komórkę, a proces syntezy de novo i transportu na powierzchnię komórki tych receptorów wymaga zwykle kilku godzin czasu [30]. W przypadku insuliny i LDL wiążące je receptory tylko częściowo powracają na powierzchnię komórki [1, 4, 5]. Nie wiadomo jednak czy są to receptory, od których został odtrawiony ligand czy też receptory zapasowe, które poprzednio nie wiązały ligandu, a zostały również włączone do komórki. Nie stwierdzono natomiast istotnego ubytku liczby receptorów wiążących α_2M przebiegu całego cyklu cyrkulacji, co tłumaczyć można faktem, że ligand ten jest inhibitorem proteaz [9, 21]. Wydajność procesów recyrkulacji fragmentów i receptorów powierzchniowych jest jednak zależna od fazy cyklu komórkowego, wieku komórki i wielu innych czynników obecnych w środowisku lub we wnętrzu komórki [11, 12, 21]. Recyrkulacja ulega np. znacznemu upośledzeniu przy wprowadzeniu do komórek substancji, które nie mogą być strawione przez enzymy lizosomowe i zalegają w fagolizosomach. Wprowadzenie do komórek lateksu lub thorotrastu sprawia, że komórka duży procent swej puli błon zużywa na opakowanie tych egzogennych cząstek i nie obserwuje się w takich przypadkach przechodzenia fragmentów błony komórkowej uprzednio oznakowanej ferrytyną do aparatu Golgiego [51]. Potraktowanie komórek konkanawaliną A-lektyną, która wiązana jest przez reszty alfa-D-mannopyrazowe wielocukrowców obecnych na powierzchni błony komórkowej powoduje znaczne nasilenie endocytozy zarówno w komórkach normalnych, jak i nowotworowych. Po upływie 20–30 min od potraktowania komórek lektyną pojawiają się w jej cytoplazmie duże, liczne wakuole otoczone błoną wyznakowaną konkanawaliną. Wakuole takie długo pozostają w komórce, nie łączą się z lizosomami, a otaczające je fragmenty błony tylko w minimalnym stopniu pojawiają się ponownie na powierzchni komórki po upływie kilku godzin [28, 50]. Odpowiedzią komórki na takie zablokowanie błon, które nie mogą podlegać recyrkulacji, jest wzmożona biogeneza nowych fragmentów błoniastych [37].

Transport receptosomów poprzez komórkę oraz proces recyrkulacji fragmentów błony zaangażowanych w procesie endocytozy adsorpcyjnej wydaje się zależeć od obecności nie uszkodzonych mikrotubul. Kolchicina, która powoduje dezorganizację mikrotubul i upośledzenie przestrzennej organizacji aparatu Golgiego, hamuje w znacznym stopniu oba

te procesy. Lumikolchicyna i cytochalazyna B nie mają według Thyberga i wsp. [50, 52] żadnego wpływu na procesy transportu receptosomów przez komórkę. Cytochalazyna B upośledza natomiast w znacznym stopniu procesy fagocytozy cząstek, takich jak lateks i thorotrast oraz endocytozę płynnej fazy włączającą do komórki takie markery jak: natywna peroksydaza czy ferrytyna [52]. Wyniki te podkreślają jeszcze bardziej różnice pomiędzy procesami endocytozy płynnej fazy i endocytozy adsorpcyjnej, sugerując, że w śródkomórkowy transport pęcherzyków endocytarnych płynnej fazy i receptosomów zaangażowane są inne elementy cytoszkieletu.

Podsumowując przytoczone w niniejszym opracowaniu wyniki doświadczeń kilku grup badaczy należy zaznaczyć, że w chwili obecnej nie wystarcza już prosty podział procesów endocytozy ze względu na wielkość czy zdolność rozpuszczania się pobieranych przez komórkę substancji. Terminy fagocytoza i pinocytoza nie wystarczają do opisanego i regulowanego ilościowo i jakościowo procesu pobierania przez komórkę szeregu wielkocząsteczkowych substancji, których rolę biologiczną upatrywano do niedawna tylko w pobudzaniu receptorów powierzchniowych aktywujących system cyklicznej adenylowej i guanylowej. Opisanie mechanizmów, w wyniku działania których duże cząsteczki hormonów białkowych, czynników wzrostowych czy pewnych enzymów są włączane do wnętrza komórki oraz ich dróg wewnątrzkomórkowych pozwala na snucie szeregu hipotez dotyczących również śródkomórkowej roli tych substancji.

Proces endocytozy kompleksów hormon—receptor lub samych receptorów może służyć alternatywnie jako mechanizm eliminowania z powierzchni komórki receptorów dla określonego hormonu. Taka internalizacja receptorów może sprawiać, że przez pewien czas komórka jest niewrażliwa na nowe porcje lub nadmiar hormonu pobudzającego do wytwarzania cyklicznych nukleotydów. Istnienie takiego komórkowego mechanizmu regulacyjnego opisano w komórkach tarczycy, gdzie indukowany działaniem tyreotropiny wysoki poziom c-AMP przyspiesza znacznie agregację kompleksów cząsteczek tyreotropiny z receptorami oraz samych wolnych receptorów w opłaszczonych klatryną dołkach oraz zwiększa stopień ich endocytozy [2]. Nowa porcja hormonu nie może więc wywołać dalszej aktywacji cyklicznej adenylowej.

Poznanie substancji hamujących lub nasilających procesy endocytozy adsorpcyjnej i endocytozy płynnej fazy może dostarczyć nowych możliwości ingerencji w procesy metaboliczne komórki regulowane przez włączane do niej makrocząsteczki, a nawet może przyczynić się do usprawnienia terapii pewnych chorób metabolicznych i inwazyjnych.

LITERATURA

- [1] ANDERSON R. G. W., VASIK E., MELLO R. J., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., Immunochemical visualisation of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution, *Cell*, **15**: 919-933, 1978.
- [2] AVIVI A., TRAMONTANO D., AMBESI-IMPIOMBATO F. S., SCHLESINGER J., Adenosine 3', 5'-monophosphate clustering and thyreothropin activity in culture, *Science*, **214**: 1237-1239, 1981.
- [3] BRETSCHER M. S., THOMPSON J. N., PEARSE B. M. F., Coated pits act as molecular filters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 4156-4162, 1980.
- [4] BROWN M. S., KOVANEN P. T., GOLDSTEIN J. L., Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors, *Science*, **212**: 628-635, 1981.
- [5] CARO J. F., AMATRUDA J. M., Insulin receptors in hepatocytes, *Science*, **210**: 1029-1030, 1980.
- [6] CHENG S. Y., MAXFIELD F. R., ROBINS J., WILLINGHAM M. C., PASTAN I., Receptor mediated uptake of 3, 3', 5-trijodo-L-thyronine by cultured fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3425-3229; 1980.
- [7] CHIARUGI V. P., Involvement of modulation of cell coat glycosaminoglycans in guinea pigs peritoneal macrophage activity, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **27**: 383-391, 1980.
- [8] DE ROBERTIS E. D. P., DE ROBERTIS EMF., *Endocytosis, Cell and molecular biology*, 7 ed. Saunders Coll. Philadelphia 1980: 288-293.
- [9] DICKSON R. B., WILLINGHAM M. C., GALLO M., PASTAN I., Inhibition by bacitracin of high affinity binding of ¹²⁵J-alpha₂ macroglobulin to plasma membranes., *FEBS lett.*, **126**: 265-270, 1981.
- [10] DURHAM A. C. H., A unified theory of the control of actin and myosin in nonmuscle movements, *Cell*, **2**: 123-136, 1974.
- [11] FARQUAR M. G., Recovery of surface membrane in anterior pituitary cells. Variation in traffic detected with anionic and cationic ferritin, *J. Cell. Biol.*, **77-R**: 35-42, 1978.
- [12] FITZGERALD D., MORIS R. E., SAELINGER C. B., Receptor mediate internalization of pseudomonas toxin by cultured fibroblasts, *Cell*, **21**: 863-873, 1980.
- [13] FOX C. F., DAS M., Internalization and processing of the NGF receptor in the induction of DNA synthesis in cultured fibroblasts, *J. Supramolec. Struct.*, **10**: 199-214, 1979.
- [14] GOLDSTEIN J. C., ANDERSON G. W., BROWN M. S., Coated pits coated vesicles and receptor mediated endocytosis, *Nature*, **279**: 679-685, 1979.
- [15] GONATAS J., STIEBER A., OLSNES S., GONATAS N. K., Pathways involved in fluid phase and adsorptive endocytosis in neuroblastoma, *J. Cell. Biol.*, **87**: 579-588, 1980.
- [16] GONATAS N. K., Surface distribution and endocytosis of NSI antigen of neuroblastoma, *Exp. Cell. Res.*, **128**: 237-248, 1980.
- [17] GORDEN P., RAPENTIER J. L., COHEN S., ORCI L., Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization and lysosomal association in human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 5025-5029, 1978.
- [18] HELENIUS A. J., KARTENBECK J., SIMONS K., FRIES E., On the entry of semliki forest virus into BHK-21 cells., *J. Cell. Biol.*, **84**: 404-429, 1980.

- [19] HENSER J., EVANS L., Three dimensional visualisation of coated vesicles formation in fibroblasts, *J. Cell. Biol.*, **84**: 560–583, 1980.
- [20] KAPLAN J., MOSKOWITZ M., Studies on the turnover of plasma membranes in cultured mamalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **389**: 290–305, 1975.
- [21] KAPLAN J., Evidence for reutilisation of surface receptors for macroglobulin protease complex in rabbit alveolar macrophages, *Cell*, **19**: 197–205, 1980.
- [22] KAPLAN G., UNKELES J. C., COHN Z. A., Insertion and turnover of macrophage plasma membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3824–3828, 1979.
- [23] KEEN J. H., WILLINGHAM M. C., PASTAN I. H., Clathrin coated vesicles, *Cell*, **16**: 303–312, 1979.
- [24] LOH H. H., LAW P. Y., The role of membrane lipids in receptor mechanism, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**: 201–234, 1980.
- [25] MARSCHALONIS J. J., Lymphocyte surface immunoglobulins, *Science*, **190**: 20–29, 1975.
- [26] MAXFIELD F. R., SCHLESINGER J., SCHECHTER Y., PASTAN I., WILLINGHAM M. C., Collection of insulin, EGF and alpha₂macroglobulin in the some patches on surface of cultured fibroblasts and common internalization, *Cell*, **14**: 805–810, 1978.
- [27] MAXFIELD F. R., WILLINGHAM M. C., DAVIES P. J. A., PASTAN I., Amines inhibit the clustering of alpha₂macroglobulin and EGF on the fibroblasts cell surface, *Nature*, **277**: 661–665, 1979.
- [28] NICOLSON G. L., The interactions of lectins with animal cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.* **39**: 89–190, 1974.
- [29] NOWAK J., Receptory powierzchniowe limfocytów — Badania powierzchniowych immunoglobulin, *Post. Biol. Kom.*, **3**: 287–301, 1976.
- [30] PASTAN I. H., WILLINGHAM M. C., Journey to the center of the cell. Role of the receptosomes, *Scienc*, **214**: 504–509, 1981.
- [31] PASTAN I. H., WILLINGHAM M. C., Receptor mediated endocytosis of hormones in cultured cells, *Ann. Rev. Physiol.*, **43**: 239–250, 1981.
- [32] PEARSE B. M. F., Clathrin a unique protein associated with intracellular transfer of membrane coated vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1255–1259, 1976.
- [33] PEARSE B. M. F., On the structural and functional components of coated vesicles, *J. Mol. Biol.*, **126**: 803–812, 1978.
- [34] PIASEK A., THYBERG J., Effects of colchicine on endocytosis of horseradish peroxydase by peritoneal macrophages, *J. Cell. Sci.*, **45**: 59–71, 1980.
- [35] RENNKE H. G., VENKATACHALAM M. A., Chemical modification of horseradish peroxydase, Preparation and characterisation of tracer enzymes with different isoelectric points., *J. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1352–1353, 1979.
- [36] ROTH T. F., PORTER K. R., Yolk protein uptake in the oocyte of mosquito *Aedes aegypti* L., *J. Cell. Biol.*, **20**: 330–337, 1964.
- [37] ROTH J., Compensatory membrane biogenesis and exocytosis as a result of con A induced membrane internalization., *Exp. Cell. Res.*, **114**: 31–38, 1978.
- [38] ROTHMAN J. E., The Golgi apparatus: two organelles in tandem, *Science*, **213**: 1212–1219, 1981.
- [39] SALISBURY J. L., CONDELIS J. G., SATIR P., Role of coated vesicles, microfilaments and calmodulin in receptor mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells, *J. Cell. Biol.*, **87**: 132–141, 1980.
- [40] SCHECHTER Y., HERNAEZ L., SCHLESINGER J., CUATRECASS P., Local

- aggregation of hormone receptor required for activation by epidermal growth factor, *Nature*, **278**: 835-838, 1979.
- [41] SCHLESINGER J., SCHECHTER Y., WILLINGHAM M. C., PASTAN I., Direct visualisation of the binding, aggregation and internalization of insulin, and EGF on fibroblastoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 2659-2663, 1978.
- [42] SCHNEIDER Y., TULKENS J. P., DE DUVE C., TROUET A., Fate of plasma membrane during endocytosis. Evidence for recycling (schuttle) of plasma membrane constituents, *J. Cell. Biol.*, **82**: 466-474, 1979.
- [43] SILVERSTEIN S. C., STEINMAN R. M., COHN Z. A., Endocytosis, *Ann. Rev. Bioch.*, **46**: 669-722, 1977.
- [44] SILVERSTEIN S. C. (ed), Transport of molecules in cellular system, Dahlem Konferenzen, Berlin 1978.
- [45] SKRZYPEK-OSIECKA I., Receptory hormonów peptydowych, *Post. Biochem.*, **25**: 373-400, 1979.
- [46] SLY W. S., STAHL P., Transport of macromolecules in cellular system, Dahlem Konferenzen, Berlin 1978.
- [47] STAHL P., SCHLESINGER P. H., SIGARDSON E., RODMAN J. S., LEE Y. C., Receptor mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: Characterisation and evidence for receptor recycling, *Cell.*, **19**: 207-215, 1980.
- [48] STEINMAN R. M., BRODIE S. E., COHN Z. A., Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis, *J. Cell. Biol.*, **68**: 665-687, 1976.
- [49] ST. JOHN A. C., MERION M., TRIEMER R. E., KUCHLER R. J., BIRG J. W., CARTER J. H., PORETZ R. D., Internalization and intracellular fate of wistarina floribunda agglutinin in BALB/c 3T3 fibroblasts, *Exp. Cell. Res.*, **128**: 143-150, 1980.
- [50] THYBERG J., NILSON J., HELLGREN D., Recirculation of cationized ferritin in cultured mouse peritoneal macrophages. Electron microscopic and cytochemical studies with double labeling technique, *Eur. J. Cell. Biol.*, **23**: 85-94, 1980.
- [51] THYBERG J., Internalization of cationized ferritin into the Golgi complex of cultured mouse peritoneal macrophages. Effect of colchicine and cytochalasin B, *Eur. J. Cell. Biol.*, **23**: 95-103, 1980.
- [52] THYBERG J., STENSETH K., Endocytosis of native and cationised horseradish peroxidase by cultured mouse peritoneal macrophages. Variation in cell surface binding and intracellular traffic and effects of colchicine, *Eur. J. Cell. Biol.*, **25**: 308-318, 1981.
- [53] WALTER R. J., BERLIN R. D., PFEIFER J. R., OLIVER J. M., Polarisation of endocytosis and receptor topography on cultured macrophages, *J. Cell. Biol.*, **86**: 199-211, 1980.
- [54] WEHLAND J., WILLINGHAM M. C., DICKSON R. B., PASTAN I., Microinjection of anticlathrin antibodies into fibroblasts does not interfere with the receptor mediated endocytosis of α_2 macroglobulin, *Cell.*, **25**: 125-133, 1982.
- [55] WILLINGER M., GONATAS N. K., FRANKEL F. R., Fate of surface proteins of rabbit polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis, *J. Cell. Biol.*, **82**: 45-56, 1979.
- [56] WILLINGHAM M. C., YAMADA S. S., PASTAN I., Ultrastructural antibody localisation of α_2 macroglobulin in membrane limited vesicles in cultured cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4359-4363, 1978.

- [57] WILLINGHAM M. C., YAMADA S. S., Mechanism for the destruction of pinosomes in cultured fibroblasts, *J. Cell. Biol.*, **78**: 480-487, 1978.
- [58] WILLINGHAM M. C., PASTAN I., The visualization of fluorescent proteins in living cells by video intensification microscopy (VIM), *Cell.*, **13**: 501-507, 1978.
- [59] WILLINGHAM M. C., YAMADA S. S., PASTAN I., Ultrastructural antibody localization of alpha₂macroglobulin in membrane limited vesicles in cultured cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4359-4363, 1978.
- [60] WILLINGHAM M. C., MAXFIELD F. R., PASTAN I., Alpha₂macroglobulin binding to the plasma membrane of cultured cells: Diffuse binding followed by clustering in coated regions, *J. Cell. Biol.*, **82**: 614-625, 1979.
- [61] WILLINGHAM M. C., PASTAN I., The receptosome: An intermediate organelle of receptor mediated endocytosis in cultured fibroblasts, *Cell.*, **21**: 67-77, 1980.
- [62] WILLINGHAM M. C., RUTHERFORD A., GALLO M., WEHLAND J., DICKSON R. B., SCHLEGEL R., PASTAN I., Receptor mediated endocytosis in cultured fibroblasts. Cryptic coated pits and the formation of receptosomes, *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 1003-1013, 1981.
- [63] WILLINGHAM M. C., HAIGLER H. T., DICKSON R. B., PASTAN I., The receptosome in *International Cell. Biology*, 1980-1981, H. G. Schweiger Ed. Springer Verlag, Berlin 1981, 613-621.
- [64] WILLINGHAM M. C., KEEN J. H., PASTAN I., Ultrastructural immunohistochemical localisation of clathrin in cultured fibroblasts, *Exp. Cell. Res.*, **132**: 329-338, 1981.
- [65] WOODS J., WOODWARD W., ROTH T. F., Common features of coated vesicles from dissimilar tissues, composition and structure, *J. Cell. Sci.* **30**: 87-97, 1978.

Nadesłano: 4 kwietnia 1982.

Przyjęto: 5 maja 1982.

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

- [1] ...
- [2] ...
- [3] ...
- [4] ...
- [5] ...
- [6] ...
- [7] ...
- [8] ...
- [9] ...
- [10] ...
- [11] ...
- [12] ...
- [13] ...
- [14] ...
- [15] ...
- [16] ...
- [17] ...
- [18] ...
- [19] ...
- [20] ...
- [21] ...
- [22] ...
- [23] ...
- [24] ...
- [25] ...
- [26] ...
- [27] ...
- [28] ...
- [29] ...
- [30] ...
- [31] ...
- [32] ...
- [33] ...
- [34] ...
- [35] ...
- [36] ...
- [37] ...
- [38] ...
- [39] ...
- [40] ...
- [41] ...
- [42] ...
- [43] ...
- [44] ...
- [45] ...
- [46] ...
- [47] ...
- [48] ...
- [49] ...
- [50] ...

Author's address:
 Department of ...
 University of ...

FIZJOLOGICZNE INHIBITORY KATEPSYNY B

PHYSIOLOGICAL INHIBITORS OF CATHEPSIN B

Maria WARWAS

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Instytut Bioanalizy i Badania Środowiska
AM we Wrocławiu

Streszczenie. Na podstawie danych z piśmiennictwa zestawiono właściwości fizjologicznych inhibitorów katepsyny B wyizolowanych z tkanek oraz surowicy krwi. Przedyskutowano problemy związane z fizjologiczną rolą katepsyny B i jej inhibitorów.

Summary. The characteristics of physiological inhibitors of cathepsin B isolated from tissues and serum have been described on the basis of published reports. Some problems concerning the physiological role of cathepsin B and its inhibitors are discussed.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

m.cz. — masa cząsteczkowa
pI — punkt izoelektryczny
Hp — haptoglobina

WSTĘP

Katepsyna B (E. C. 3.4.22.1) jest najlepiej poznaną lizosomalną proteinazą tiolową [5, 28, 29]. Terminu katepsyna B używano pierwotnie dla określenia enzymu wyizolowanego ze śledziony wołowej, hydrolizującego amid benzoilo-argininy [15]. Otto i wsp. [39] rozdzielili tę aktywność na dwie komponenty. Jedną z nich o m. cz. 26 000 daltonów, hydrolizującą również β -naftyloamid i p-nitroanilid benzoilo-argininy nazwali katepsyną B 1, drugą o m. cz. 52 000 daltonów — katepsyną B 2. Po stwierdzeniu, że katepsyna B 2 jest karboksypeptydazą aktywną w stosunku do benzoilo-glicylo-argininy i benzoilo-glicylo-fenyloalaniny [35, 36], dla uproszczenia katepsynę B 1 zaczęto określać terminem katepsyna B. Obecnie wiadomo również, że preparat katepsyny B 1 otrzymany

przez Otto i wsp. [39] zawierał oprócz katepsyny B inne proteiny tiolowe, a mianowicie katepsynę L [26, 59] i H [27]. Katepsyna B jest szeroko rozpowszechniona, występuje w wielu tkankach, takich jak: wątroba, śledziona, mózg, łożysko itd. Masa cząsteczkowa enzymu wyizolowanego z różnych organizmów i tkanek wynosi od 24 000 do 28 000 daltonów, optimum pH dla substratów syntetycznych 6,0, a dla białkowych 4,3, pI waha się od 4,5 do 6,5, jako że enzym występuje pod postacią kilku form molekularnych. Katepsyna B posiada aktywność endopeptydazową w stosunku do licznych substratów białkowych, takich jak: hemoglobina, kazeina, kolagen, żelatyna, miozyna, immunoglobulina G i innych oraz aktywność peptydylo-dwupeptydazy niedawno zaobserwowaną dla glukagonu [2] i aldolazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej [6], polegającą na kolejnym odcinaniu C-terminalnych dwupeptydów. W lizosomach, gdzie stężenie enzymu jest milimolowe, a niskie pH może powodować denaturację lub zmiany konformacyjne większości substratów białkowych, katepsyna B działa głównie jako endopeptydaza. Natomiast w stężeniach niższych (mikromolowych), jak to ma zwykle miejsce w badaniach *in vitro*, i prawdopodobnie w przestrzeni pozalizosomalnej komórki powoduje ograniczoną proteolizę. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że w wyniku ograniczonej proteolizy katepsyna B powoduje aktywację szeregu hormonów, takich jak: proinsulina [1], proglukagon [2], proparathormon [16] oraz inaktywację szeregu enzymów: glukokinazy, aldolazy, kinazy pirogronianowej, aminotransferazy tyrozynowej i heksozo-dwufosfatazy [4].

Większość sugestii co do fizjologicznej roli katepsyny B oraz innych proteinaz tiolowych opiera się na wynikach badań prowadzonych *in vitro* z użyciem izolowanych enzymów i substratów, często w warunkach нефizjologicznych. Nie ulega wątpliwości, że katepsyna B wraz z innymi proteinazami lizosomalnymi bierze udział w degradacji wewnątrzlizosomalnej białek pochodzenia komórkowego i endocytarnego, zaopatrując komórkę w aminokwasy potrzebne do resyntezy białek komórkowych. Odnośnie funkcji zewnątrzlizosomalnej, bardzo ważnej w selektywnej proteolizie (np. degradacji kolagenu, który nie ulega endocytozie), sugeruje się dwie możliwości: kontrolowane uwalnianie katepsyn z lizosomów i komórek lub rozmieszczenie tych enzymów po zewnętrznej stronie błon lizosomalnych [28].

Regulacja aktywności katepsyny B, podobnie jak innych enzymów, zachodzić może poprzez inhibitory. Wśród naturalnych inhibitorów wyróżnia się inhibitory fizjologiczne, występujące w komórkach, przestrzeniach komórkowych, osoczu krwi i płynach ustrojowych oraz inhibitory нефizjologiczne wyizolowane z drobnoustrojów, roślin oraz zwierząt niższych. Te ostatnie zostały opisane w artykule Worowskiego [63].

INHIBITORY TKANEK ZWIERZĘCYCH

W ostatnim ćwierćwieczu ukazało się niewiele prac dotyczących endogennych inhibitorów proteinaz tiolowych, do których zalicza się katepsynę B. Część tych danych jest w dodatku niezbyt ścisła z powodu niedostatecznej charakterystyki użytych enzymów. Na przykład, jeżeli używa się p-nitroanilidu-benzoilo-argininy do oznaczania aktywności, enzymem rozkładającym substrat może być nie tylko katepsyna B, ale również katepsyna H lub ich mieszanina. Katepsyna H bowiem, podobnie jak katepsyna B, rozkłada N-podstawione syntetyczne substraty, np. benzoilo-L-arginino- β -naftylamid [29].

Po raz pierwszy Finkenstaedt [9] w roku 1957 doniósł o obecności termostabilnego i dializującego inhibitora katepsyny B i C w supernatancie homogenatu wątroby szczura. W następnych latach ukazało się szereg prac dotyczących niskocząsteczkowych inhibitorów proteinaz tiolowych, a więc i katepsyny B. Inhibitory te stwierdzono m. in. w białku jaja kurzego [25], skórze [20, 21], ekstrakcie z mięśni szczura [49], leukocytach i śledzionie [32], płucach [38, 51] oraz chrząstce nosowej wołu [45].

W roku 1979 Lenney i wsp. [33] znaleźli niskocząsteczkowe inhibitory katepsyny B i H w 12 badanych tkankach szczura i człowieka, jak również u kur, ryb, żab oraz organizmów niższych (protozoa). U ludzi najwięcej inhibitorów występuje w wątrobie i nerkach, a także w erytrocytach, natomiast nie stwierdza się ich obecności w surowicy krwi. Autorzy oczyścili częściowo inhibitor katepsyny B oraz inhibitor katepsyny H i stwierdzili, że obydwa występują pod postacią kilku form molekularnych. Stosunek ilościowy obu inhibitorów jest różny w poszczególnych tkankach, z czego wyciągnięto wniosek, że są to dwa odrębne białka. Nie można jednak wykluczyć, że mogą to być różne formy tego samego inhibitora, różniące się powinowactwem do poszczególnych katepsyn. Zarówno inhibitory katepsyny B, jak i H z nerki wieprzowej mają m. cz. 11 000 daltonów, inhibitory z płuc szczura zaś 14 000.

Kominami i wsp. [31] wyizolowali inhibitor proteinaz tiolowych z wątroby szczura hamujący katepsyny: B, H i L oraz papainę. Inhibitor ten o m. cz. 11 500 daltonów występuje pod postacią trzech form molekularnych o pI 4,9, 5,2 i 5,6. Współczynnik aktywności specyficznej inhibitora do określonej proteiny tiolowej pozostaje nie zmieniony na poszczególnych etapach oczyszczania, co według autorów wskazuje na jedno białko o szerokim spektrum hamowania. Jest także prawdopodobne, że poszczególne formy molekularne pochodzą z różnego typu komórek.

Ostatnio Hirado i wsp. [18] stwierdzili obecność inhibitora katepsyny B w cytozolu homogenatu tkanek szczura. Największą aktywność

inhibitorową wykazywał cytozol tarczycy, grasicy i żołądka, niższą wątroby, nerek, płuc itp. Surowica zawiera tylko śladowe ilości inhibitora. Inhibitor wyizolowany z wątroby o m. cz. 12 400 daltonów i pI 5,04 jest termostabilny. Nie stwierdzono obecności form molekularnych. Inhibitor ten hamuje katepsyny: B, B₂, H, L, C i papainę, nie hamuje katepsyn A i D ani trypsyny i chymotrypsyny. W wyciągach z tkanki łożyska ludzkiego (9-tyg. i dojrzałego) oraz warstwy kosmówkowo-doczesnowej błon płodowych występuje także inhibitor hamujący katepsynę B wyizolowaną z łożyska ludzkiego oraz papainę [61]. Podczas oczyszczania stwierdzono obecność zarówno inhibitora dializującego, jak i niedializującego. Prawdopodobnie inhibitor dializujący jest produktem degradacji inhibitora niedializującego.

Fizjologiczne znaczenie inhibitorów proteinaz tiolowych nie zostało do tej pory poznane. Prawdopodobnie odgrywają one dużą rolę w ochronie przed niekontrolowanym działaniem proteinaz tiolowych. Przykładowo w stanach patologicznych, lizosomalne proteinazy leukocytów i makrofagów biorą udział w destrukcji tkanki płucnej prowadzącej do rozedmy płuc [19, 44]. Badania nad rolą proteinaz w tym procesie skupiły się głównie na enzymach trypsyno- i chymotrypsyno-podobnych oraz kolagenazie, niemniej i katepsyna B została wyizolowana z tkanki płuc [51]. Według Orłowskiego i wsp. [38] jest ona zlokalizowana w makrofagach płuc. Wiadomo, że katepsyna B jest zdolna nie tylko do degradacji kolagenu *in vitro* [7], ale także do aktywacji latentnej kolagenazy [8]. Procesy proteolizy w płucach znajdują się pod kontrolą α_1 -antytrypsyny endogennej inhibitora proteinaz. Johnson i Travis [23] stwierdzili, że katepsyna B może także inaktywować α_1 -antytrypsynę i tym samym osłabić odporność płuc na działanie proteinaz. Można więc założyć, że komórkowe inhibitory katepsyny B i innych proteinaz stanowią drugą linię obrony tkanki płuc.

Istnieją także dane, że pewne stany patologiczne mięśni, takie jak dystrofia i nieprawidłowy wzrost, są wynikiem zwiększonego katabolizmu białek w mięśniach. Sugeruje się udział enzymów lizosomalnych w tym procesie [34, 49]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że leupeptyna, inhibitor katepsyn B i H, zmniejsza stopień degradacji białek w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym [34]. Tym samym inhibitory komórkowych enzymów tiolowych mogą pełnić funkcję ochronną.

Katepsynie B przypisuje się również udział w inwazji procesu nowotworowego i tworzeniu się przerzutów [43, 52, 57], a inhibitory ze śledziony oraz leukocytów hamują tworzenie się przerzutów u myszy z doświadczeniami nowotworowymi płuc [13, 14].

INHIBITORY SUROWICY KRWI

W warunkach fizjologicznych katepsyna B występuje w surowicy krwi w ilościach śladowych. Pietras i wsp. [41, 42] zaobserwowali wzrost jej poziomu w dwu ostatnich trymestrach ciąży, a także jej pojawienie się u kobiet w czasie cyklu miesięcznego, skorelowane z poziomem estrogenów. Stwierdzili także wzrost poziomu katepsyny B w pewnych stanach chorobowych, jak: gruczolaki, gruczolaki z towarzyszącą dysplazją oraz w nowotworach zależnych od dwuetylostilbestrolu. Co ciekawe, autorzy nie zaobserwowali wzrostu aktywności w wielu badanych chorobach zapalnych i metabolicznych o charakterze nienowotworowym, pomimo podwyższonego poziomu innych enzymów lizosomalnych [42]. Poziom katepsyny B w surowicy, według nich jest ściśle skorelowany ze wzrostem komórek, niezależnym od ich typu.

Regulacja aktywności katepsyny B w surowicy krwi może zachodzić poprzez obecne w niej inhibitory. Większość dobrze poznanych inhibitorów surowicy krwi, z wyjątkiem α_2 -makroglobuliny, to inhibitory proteinaz serynowych [17, 50]. W surowicy występują jednak również inhibitory proteinaz tiolowych.

Snellman i Sylven [53, 54] donosili, że haptoglobina (Hp) jest inhibitorem katepsyny B. Natomiast Starkey i Barrett [55] podają, że głównym inhibitorem katepsyny B w surowicy jest α_2 -makroglobulina, słabsze hamowanie wykazuje immunoglobulina G, zaś Hp jest nieaktywna jako inhibitor katepsyny B przy użyciu do badań substratów niskocząsteczkowych. Pagano i wsp. [40] potwierdzili hamujące działanie Hp na aktywność katepsyny B. Procent hamowania, mającego charakter kompetycyjny, rośnie wraz z ciężarem cząsteczkowym użytego substratu. Z drugiej zaś strony, katepsyna B nie ma wpływu na zmianę ruchliwości elektroforetycznej Hp czy też jej kompleksu z hemoglobina. Ostatnio Kalsheker i wsp. [24] stwierdzili, że hamowanie katepsyny B przez Hp jest odwracalne w obecności monospecyficzných przeciwciał antyhaptoglobinowych. Pagano i wsp. [40] wskazują na ewentualne fizjologiczne znaczenie hamowania katepsyny B przez Hp w przebiegu procesów zapalnych, przebiegających, jak wiadomo, ze zwiększoną przepuszczalnością błon lizosomalnych [12, 44]. W myśl hipotezy Koja [30], w odpowiedzi na pojawienie się lizosomalnych katepsyn, hepatocyty produkują i zwalniają białka „ostrej fazy”, do których należy Hp. Białkom „ostrej fazy” przypisuje się rolę adaptacyjną i regulatorową w przebiegu proteolizy tkankowej.

Jak już wspomniano, głównym inhibitorem katepsyny B występującym w surowicy krwi jest α_2 -makroglobulina. Inhibitor ten wykazuje bardzo szerokie spektrum działania [17], hamuje zarówno endopeptydazy

pochodzenia zwierzęcego, roślinnego oraz bakteryjnego (proteinyazy serynowe, tiolowe, karboksylowe i metalopeptydazy), jak również egzopeptydazy (karboksypeptydazę) łącząc się z nimi nieodwracalnie. Interakcja α_2 -makroglobuliny z proteinazami może być sklasyfikowana jako coś pośredniego pomiędzy reakcją antygen—przeciwciała a typową reakcją inhibitor-proteinaza [17]. Proteinyazy odszczepiają fragment peptydowy od α_2 -makroglobuliny, w wyniku czego ulega ona zmianom konformacyjnym umożliwiającym wiązanie się z enzymem poza jego centrum katalitycznym. Inhibitor stanowi w ten sposób jedynie przeszkodę przestrzenną dla substratów wielcząasteczkowych, gdyż kompleks α_2 -makroglobulina—proteinaza posiada zdolność hydrolizowania substratów niskocząsteczkowych. Kompleks ten jest traktowany przez ustrój jako obce białko i szybko eliminowany z krwiobiegu [37].

Stan równowagi pomiędzy proteinazami a ich inhibitorami jest szczególnie ważny w przebiegu procesów wzrostu. I tak w przypadku α_2 -makroglobuliny stwierdza się jej wyższy poziom u dzieci niż u dorosłych [11] oraz 20% wzrost poziomu podczas ciąży [10]. Kobiety nieciążarne mają 20% wyższy poziom α_2 -makroglobuliny we krwi w porównaniu z mężczyznami [11]. Całkowita zdolność hamowania proteinaz tiolowych (używając papainy jako enzymu) wzrasta odczas normalnej ciąży, z maksimum pomiędzy 13 a 24 tygodniem, czyli w okresie wzrostu i różnicowania się zarówno łożyska, jak i płodu [62]. Być może wzrost ten pozostaje w związku z zaobserwowanym przez Pietrasa i wsp. [42] wzrostem aktywności katepsyny B w ciąży skorelowanym z poziomem estrogenów. Za aktywność antypapinową surowicy krwi odpowiedzialne są głównie α_2 -makroglobulina oraz niżejcząsteczkowe inhibitory proteinaz tiolowych. Valeri i wsp. [60] donoszą, że antytrombina ma także zdolność hamowania papainy.

W roku 1977 Sasaki i wsp. [47] wyizolowali z surowicy krwi ludzkiej inhibitor hamujący proteinyazy tiolowe o m. cz. 90 000 i ruchliwości elektroforetycznej α_2 -globulin. Inhibitor ten hamuje papainę, ficynę, bromelinę i katepsynę B, nie hamuje zaś trypsyny ani chymotrypsyny. Ostatnio ukazała się praca tych samych autorów [48] wykazująca, że inhibitor ten występuje pod postacią trzech form molekularnych (P-1, P-2, P-3). Dwie z tych form, P-1 i P-2, wędrujące w rejonie α_2 -globulin, mają bardzo podobne właściwości, ale różnią się od formy P-3 wędrującej w rejonie α_1 -globulin ciężarem cząsteczkowym i pI. Fakt, że formy te wykazują zgodność immunologiczną oraz że wszystkie w jednakowym stopniu są hamowane przez przeciwciała otrzymane przeciwko formie P-3 sugeruje, że składają się one z identycznych podjednostek, a formy P-1 i P-2 są pośrednimi producentami dysocjacji formy P-3. Możliwość taką potwierdza także obecność inhibitorów proteinaz tiolowych w moczu [58].

Formy molekularne inhibitora proteinaz tiolowych wyizolowane z moczu w porównaniu do surowicznych mają nieco niższą m. cz., ale podobne właściwości antygenowe. Autorzy przypuszczają, że są to produkty degradacji inhibitorów surowicznych. W przeciwieństwie do α_2 -makroglobuliny, która hamuje aktywność proteinaz tylko wobec substratów wielkocząsteczkowych, inhibitory wyizolowane przez Sasaki i wsp. [47, 48] hamują aktywność proteinaz także wobec substratów niskocząsteczkowych, co świadczy o innym mechanizmie inhibicji. α_2 -Makroglobulina zbudowana jest z 4 podjednostek o m. cz. 180 000 daltonów każda [3, 56]. Podobną m. cz. ma forma P-3, ale do tej pory brak jest danych o ewentualnej aktywności inhibitorowej poszczególnych podjednostek α_2 -makroglobuliny czy też o ich reaktywności immunologicznej. Wyklucza to możliwość powstawania niskocząsteczkowych proteinaz tiolowych na drodze degradacji α_2 -makroglobuliny.

Także inni autorzy donosili już wcześniej o występowaniu inhibitorów proteinaz tiolowych w osoczu lub surowicy krwi ludzkiej. Wyizolowany przez Ryley'a [46] heterogenny w elektroforezie inhibitor jest glikoproteidem zawierającym 10% cukrów, charakteryzuje się wysoką zawartością aminokwasów kwaśnych. Inhibitor ten hamuje całkowicie papainę, katepsynę B zaś tylko w 70% przy 10-krotnym nadmiarze molowym inhibitora w stosunku do enzymu. Stężenie tego inhibitora oznaczone metodą immunologiczną w surowicy krwi ludzi dorosłych niezależnie od płci wynosi $42,8 \pm 6,8$ mg/100 ml, a w surowicy pępowinowej $24,1 \pm 3,5$ mg/100 ml. Järvinen [22] natomiast oprócz inhibitora o ruchliwości α_2 -globulinowej wyizolował z surowicy krwi ludzkiej inhibitor proteinaz tiolowych z frakcji α_1 -globulinowej. Oba inhibitory posiadają podobne spektrum hamowania oraz zgodność immunologiczną, lecz różnią się m. cz. i ładunkiem.

Jak wynika z przedstawionych w referacie danych, wiedza na temat fizjologicznych inhibitorów proteinaz tiolowych (z wyjątkiem α_2 -makroglobuliny) jest ograniczona. Dokładniejsze poznanie właściwości tych inhibitorów, ich mechanizmów działania oraz zachowanie się w stanach patologicznych pozwoli być może w przyszłości na ich zastosowanie w medycynie, to jest w diagnostyce i leczeniu.

Praca była finansowana z Problemu MR-I-9.

LITERATURA

- [1] ANSORGE S., KIRSCHKE H., FRIEDRICH K., Conversion of proinsulin into insulin by cathepsin B and L from rat liver lysosomes, *Acta biol. med. germ.*, **36**: 1723–1727, 1977.

- [2] ARONSON N. N., BARRETT A. J., The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the c-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism, *Biochem. J.*, **171**: 759-765, 1978.
- [3] BARRETT A. J., BROWN M. A., SAYERS C. A., The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the α_2 -macroglobulin molecule, *Biochem. J.*, **181**: 401-418, 1979.
- [4] BARRETT A. J., Lysosomal and related proteinases, [w] *Proteases and biological control*, red. E. Reich, D.E. Rifkin, E. Shaw, Cold Spring Harbor Laboratory USA 1975, vol. 2, 467-480.
- [5] BARRETT A. J., Intracellular and extracellular activities of lysosomal proteins, [w:] *Cellular Aspects of Protein Degradation and Turnover*, *Zeszyty Naukowe U. J.*, **196**: 9-17, 1980.
- [6] BOND J. S., BARRETT A. J., Degradation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase by cathepsin B. A further example of peptidyl dipeptidase activity of this proteinase, *Biochem. J.*, **189**: 17-25, 1980.
- [7] BURGLEIGH M. C., BARRETT A. J., LAZARUS G. S., Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen, *Biochem. J.*, **137**: 387-398, 1974.
- [8] ECKHOUT Y., VAES G., Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation, *Biochem. J.*, **166**: 21-31, 1977.
- [9] FINKENSTAEDT J. T., Intracellular distribution of proteolytic enzymes in rat liver tissue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**: 302-304, 1957.
- [10] GANROT P. O., BJERRE B., Alpha₁-antitrypsin and alpha₂-macroglobulin concentration in serum during pregnancy, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **46**: 126-137, 1967.
- [11] GANROT P. O., SCHERSTEN B., Serum α_2 -macroglobulin concentration and its variation with age and sex, *Clin. Chim. Acta*, **15**: 113-120, 1967.
- [12] GIEŁDANOWSKI J., Współczesne poglądy na patochemizm zapaleń i działanie niesterydowych leków przeciwzapalnych, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **27**: 255-294, 1973.
- [13] GIRALDI T., KOPITAR M., SAVA G., Antimetastatic effects of a leukocyte intracellular inhibitor of neutral proteases, *Cancer Res.*, **37**: 3834-3835, 1977.
- [14] GIRALDI T., SAVA G., KOPITAR M., BRZIN J., TUREK V., Neutral proteinase inhibitors and antimetastatic effects in mice, *Europ. J. Cancer*, **16**: 449-454, 1980.
- [15] GREENBAUM L. M., FRUTON J. S., Purification and properties of beef spleen cathepsin B, *J. Biol. Chem.*, **226**: 173-180, 1957.
- [16] HAMILTON J. W., NIALL H. D., JACOBS J. W., KEUTMANN H. T., PATTS J. T. Jr, COHN D. V., The N-terminal amino-acid sequence of bovine parathyroid hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 653-656, 1974.
- [17] HEIMBURGER N., Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma: a review of recent development, [w:] *Bayer-Symposium V „Proteinase Inhibitors*, Springer 1974, 14-22.
- [18] HIRADO M., IWATA D., NIINOBE M., FUJII S., Purification and properties of thiol proteinase inhibitor from rat liver cytosol, *Biochem. Biophys. Acta*, **669**: 21-27, 1981.
- [19] JANOFF A., Induction of α_1 -antitrypsin; A prophylactic treatment of pulmonary emphysema?, *Agents and Actions*, **7**: 249-250, 1977.
- [20] JÄRVINEN M., Purification and properties of two protease inhibitors from

- rat skin inhibiting papain and other SH-proteases, *Acta Chem. Scand.*, **B30**: 933-940, 1976.
- [21] JÄRVINEN M., RÄSÄNEN O., RINNE A., The low-molecular weight SH-inhibitor in rat skin is epidermal, *J. Invest. Dermatol.*, **71**: 119-121, 1978.
- [22] JÄRVINEN M., Purification and some characteristics of two human serum proteins inhibiting papain and other thiol proteinases, *FEBS Lett.*, **108**: 461-464, 1979.
- [23] JOHNSON D., TRAVIS J., Inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor by thiol proteinases, *Biochem. J.*, **163**: 639-641, 1977.
- [24] KALSHEKER N. A., BRADWELL A. R., BARNETT D., The inhibition of cathepsin B by plasma haptoglobin, *Experientia*, **37**: 447-448, 1981.
- [25] KEILOVÁ H., TOMÁŠEK V., Naturally occurring inhibitors of intracellular protease, *Acta biol. med. germ.*, **36**: 1873-1881, 1977.
- [26] KIRSCHKE H., LANGNER J., WIEDERANDERS B., ANSORGE S., BOHLEY P., Cathepsin L. A new proteinase from rat liver lysosomes, *Eur. J. Biochem.*, **74**: 293-301, 1977.
- [27] KIRSCHKE H., LANGNER J., WIEDERANDERS B., ANSORGE S., BOHLEY P., HANSON H., Cathepsin H. An endoaminopeptidase from rat liver lysosomes, *Acta biol. med. germ.*, **36**: 185-199, 1977.
- [28] KIRSCHKE H., LANGNER J., RIEMANN S., WIEDERANDERS B., ANSORGE S., BOHLEY P., Lysosomal cysteine proteinases, [w:] *Protein Degradation in Health and Disease*, *Excerpta Medica* 1980, 15-35.
- [29] KIRSCHKE H., LANGNER J., RIEMANN S., SALAMAN Z., WIEDERANDERS B., BOHLEY P., Properties of lysosomal cysteine proteinases, [w:] *Mechanism of Muscle Adaptation to Functional Requirements*, red. F. Guba, G. Marechal, O. Takacs, *Adv. Physiol. Sci.*, **24**: 201-212, 1981.
- [30] KOJ A., Acute-phase reactants: their synthesis, turnover and biological significance, [w:] *Structure and Function of Plasma Proteins*, red. A. C. Allison, Plenum Press. London, New York 1974, vol. 1, 73-131.
- [31] KOMINAMI E., WAKAMATSU N., KATUNUMA N., Endogenous thiol protease inhibitors from rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **99**: 568-575, 1981.
- [32] KOPITAR M., BRZIN J., ZVONAR T., LOČNIKAR P., KREGAR J., TURK V., Inhibition studies of an intracellular inhibitor on thiol proteinases, *FEBS Lett.*, **91**: 355-359, 1978.
- [33] LENNEY J. F., TOLAN J. R., SUGAI W. J., LEE A. G., Thermostable endogenous inhibitors of cathepsin B and H, *Eur. J. Biochem.*, **101**: 153-161, 1979.
- [34] LIBBY, P., GOLDBERG A. L., Leupeptin, a protease inhibitor, decrease protein degradation in normal and diseased muscles, *Science*, **199**: 534-536, 1978.
- [35] McDONALD J. K., ELLIS S., On the substrate specificity of cathepsin B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1, *Life Sci.*, **17**: 1269-1276, 1975.
- [36] NIJOOR V., TAYLOR S. L., TAPPELL A. L., Purification and characterization of rat liver lysosomal cathepsin B2, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**: 308-321, 1974.
- [37] OHLSSON K., LAURELL C. B., The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from the circulation of man, *Clin. Sci. mol. Med.*, **51**: 87-92, 1976.
- [38] ORŁOWSKI M., ORŁOWSKI J., LESSER M., KILBURN K. H., Proteolytic enzymes in bronchopulmonary lavage fluids: cathepsin B-like activity and propyl endopeptidase, *J. Lab. Clin. Med.*, **97**: 467-476, 1981.

- [39] OTTO K., Cathepsin B1 and B2, [w:] Tissue Proteinases, red. Barrett A. J., Dingle J. T., North-Holland Publishing Co, Amsterdam 1971, 1-28.
- [40] PAGANO M., ENGLER R., GELIN M., YAYLE M. F., Kinetic study of the interaction between rat haptoglobin and rat liver cathepsin B, *Can. J. Biochem.*, **58**: 410-417, 1979.
- [41] PIETRAS R. J., SZEGO C. M., MANGAN C. E., SEELER B. J., BURTNETT M. M., OREVI M., Elevated serum cathepsin B1 activity with vaginal adenosis and adenocarcinoma in young women exposed in utero to diethylstilbestrol, *Fed. Proc.*, **36**: 387, 1977.
- [42] PIETRAS R. J., SZEGO C. M., MANGAN C. E., SEELER B. J., BURTNETT M. M., OREVI M., Elevated serum cathepsin B1 and vaginal pathology after prenatal DES exposure, *Obstet. Gynecol.*, **52**: 321-327, 1978.
- [43] RECKUES A. D., TLITMAN K. J., STOCKER A. M., POOLE A. R., Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue, *Cancer Res.*, **40**: 550-556, 1980.
- [44] ROSTWOROWSKA B., Proteazy lizosomalne i ich znaczenie w patologii, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **28**: 875-909, 1974.
- [45] ROUGHLEY P. J., MURPHY G., BARRETT A. J., Proteinase inhibitors of bovine nasal cartilage, *Biochem. J.*, **169**: 721-724, 1978.
- [46] RYLEY M. C., Isolation and partial characterization of a thiol proteinase inhibitor from human plasma, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **89**: 871-878, 1979.
- [47] SASAKI M., MINAKATA K., YAMARNOTO H., NIWA M., KATO T., ITO N., A new serum component which specifically inhibits thiol proteinases, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **76**: 917-924, 1977.
- [48] SASAKI M., TANIGUCHI K., MINAKATA K., Multimolecular forms of thiol proteinase inhibitor in human plasma, *J. Biochem.*, **89**: 169-177, 1981.
- [49] SCHWARTZ W. N., BIRD J. W. C., Degradation of myofibrillar proteins by cathepsin B and D, *Biochem. J.*, **167**: 811-820, 1977.
- [50] SCHWICK H. C., HAUPT H., Chemistry and function of human plasma proteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**: 87-99, 1980.
- [51] SINGH H., KALNITSKY G., Separation of a new α -N-benzoylarginine- β -naphthylamide hydrolase from cathepsin B1. Purification, characterization, and properties of both enzymes from rabbit lung, *J. Biol. Chem.*, **253**: 4319-4326, 1978.
- [52] SLOANE B. F., RUNN J. R., HONN K. V., Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential, *Science*, **212**: 1151-1153, 1981.
- [53] SNELLMAN O., SYLVÉN B., Haptoglobin acting as a natural inhibitor of cathepsin B activity, *Nature*, **216**: 1033, 1967.
- [54] SNELLMAN O., SYLVÉN B., A carbohydrate inhibitor of cathepsin B activity associated with haptoglobin, *Experientia*, **30**: 114-115, 1974.
- [55] STARKEY P. M., BARRETT A. J., Human cathepsin B1. Inhibition by α_2 -macroglobulin and other serum proteins, *Biochem. J.*, **131**: 823-831, 1973.
- [56] SWENSON R. P., HOWARD J. B., Structural characterization of human α_2 -macroglobulin subunits, *J. Biol. Chem.*, **254**: 4452-4456, 1979.
- [57] SYLVÉN B., Biochemical factors involved in the cellular detachment from tumors, *Schweiz. med. Wschr.*, **104**: 258-261, 1974.
- [58] TANIGUCHI K., ITO J., SASAKI M., Partial purification and properties of urinary proteinase inhibitors, *J. Biochem.*, **89**: 179-184, 1981.
- [59] TAWATORI T., TANAKA K., YOSHIKAWA D., KATUNUMA N., Separation

tion of a new protease from cathepsin B1 of rat liver lysosomes, FEBS Lett., **67**: 284-288, 1976.

- [60] VALERI A. M., WILSON S. M., FEINMAN R. D., Reaction of antitrombin with proteases. Evidence for a specific reaction with papain, Biochem. Biophys. Acta, **614**: 526-533, 1980.
- [61] WARWAS M., Inhibitor katepsyny B z łożyska ludzkiego, Streszczenia prac XVIII Zjazdu PTBioch., Wrocław 1981, 197.
- [62] WARWAS M., MALINOWSKI J., SWARD J., Serum antipapain activity during normal pregnancy, Enzyme — w druku.
- [63] WOROWSKI K., Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych, Post. Biol. Kom., **3**: 51-74, 1976.

Nadestano: 23 grudnia 1981.

Przyjęto: 13 czerwca 1982.

Adres autora: ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław.

KOMUNIKAT

W SPRAWIE BIBLIOGRAFII PRAC BIOCHEMICZNYCH

W 1982 r. ukazała się „Bibliografia polskich prac biochemicznych 1945 - 1975”. Z myślą o kontynuowaniu wydawnictwa w mniejszych przedziałach czasowych, Komitet Biochemii i Biofizyki oraz Polskie Towarzystwo Biochemiczne pragną rozpocząć pracę nad zebraniem bibliografii za lata 1976 - 1980. W związku z tym zwróciliśmy się do kierowników placówek biochemicznych w kraju z prośbą o przysłanie spisu publikacji za ten okres. Ponieważ jednak wiele prac biochemicznych powstaje w innych placówkach, prosimy autorów o przysłanie spisu prac bezpośrednio pod adresem:

Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska
Katedra Biochemii AM we Wrocławiu
ul. Chałubińskiego 10, 50 - 368 Wrocław.

Pracę nad bibliografią bardzo ułatwi sporządzenie notek dokładnie według następującego wzorca: nazwiska i inicjały autorów, pełna nazwa instytucji (jeżeli autorzy pochodzą z kilku instytucji krajowych lub zagranicznych, prosimy o wymienienie wszystkich placówek), tytuł pracy w języku, w jakim ją ogłoszono, skórt nazwy czasopisma, rok, tom, strona. Prace przeglądowe proszę oznaczyć literą B na marginesie wykazu. W spisie nie należy umieszczać komunikatów zjazdowych.

CYTOLOGICZNE EFEKTY DZIAŁANIA REZERPINY

CYTOLOGICAL EFFECT OF ACTION OF RESERPINE

Stanisława GŁOWACKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN Warszawa

Streszczenie. Rezerpina, lek o działaniu hipotensyjnym, ma zdolność wypierania jonów wapnia z fosfolipidów struktur komórkowych. Powoduje to zmiany konformacyjne i funkcjonalne błon komórkowych oraz naruszenie homeostazy wapnia i równowagi elektrolitycznej, co w następstwie prowadzi do zaburzenia aktywności szeregu enzymów. Ponadto rezerpina, zaburzając równowagę substancji neuroprzekaźnikowych poprzez uwalnianie ich z zakończeń nerwowych, uszkadza przewodnictwo nerwowe, a także zaburza funkcję układu neuroendokrynalnego. Przejawem tego są np. obserwowane zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców nieprawidłowości w przebiegu cyklu rozrodczego po zastosowaniu rezerpiny.

Summary. Reserpine, a psychotropic drug, can interact with phospholipids of intracellular membranes displacing calcium therefrom. In consequence, there may occur conformational and functional alterations in the cell membranes leading to disturbances in the homeostasis of intracellular calcium and in electrolytes balance, which reflect on the enzymatic activity of the cell. Moreover, by releasing neurotransmitters from the nerve terminals reserpine impairs transmission of signals and the function of the neuroendocrinal system. The latter may result in abnormalities of the reproductive cycle what was observed both in vertebrates and invertebrate treated with reserpine.

WSTĘP

Rezerpina jest alkaloidem występującym w korzeniach wężodrzewu indyjskiego (*Rauwolfia serpentina*). Roślina ta miała szerokie zastosowanie w ludowej medycynie na terenach Indii i Afryki, gdzie już przed wiekami leczono nią niektóre choroby psychiczne. Rezerpina została wyizolowana z korzeni wężodrzewu po raz pierwszy w 1952 r. przez Schittera i jego współpracowników [11]. Od tamtej pory zaczęto stosować ją w medycynie jako: (a) środek obniżający ciśnienie tętnicze krwi. (b) lek o swoi-

stym działaniu uspokajającym, (c) lek przeciwalergiczny. Obecnie rezerpina i jej pochodne (deserpidine, syrasynopine, rescinnamine) stosowane są powszechnie w medycynie, stanowiąc jeden ze składników mieszanek hipotensyjnych. Jak wykazały badania radioimmunologiczne, rezerpina może wiązać się z albuminami krwi [29, 31] oraz wbudowywać się w tkankę nerwową [13].

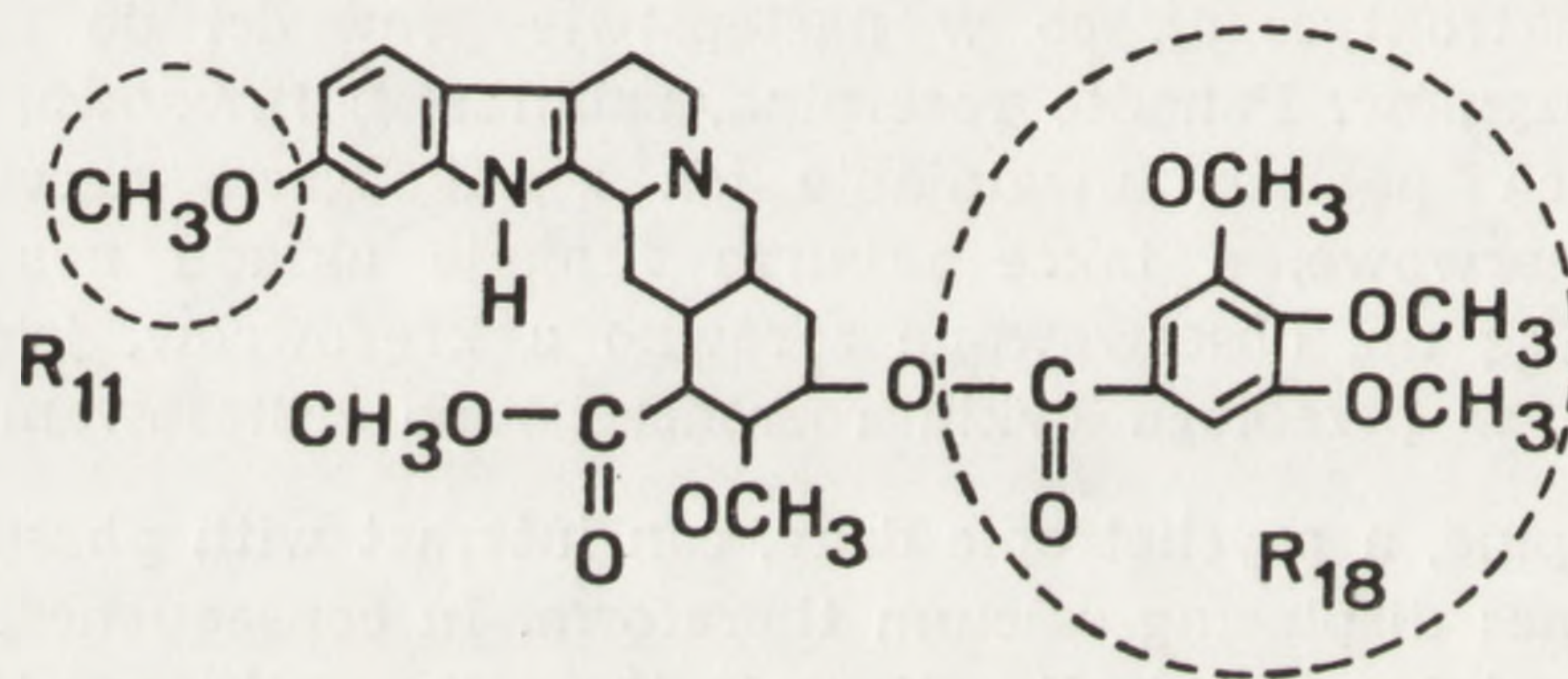
Celem niniejszej pracy jest przedstawienie właściwości fizykochemicznych rezerpiny oraz cytologicznych efektów działania tego leku.

OGÓLNE WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE REZERPINY

Rezerpina jest esterem metylorezerpinowym kwasu 3, 4, 5-trójmetoksybenzeosowego. Chemiczny wzór cząsteczki rezerpiny oraz głównych jej pochodnych przedstawiono w tab. 1.

TABELA 1

Chemiczna struktura rezerpiny i jej pochodnych [31]

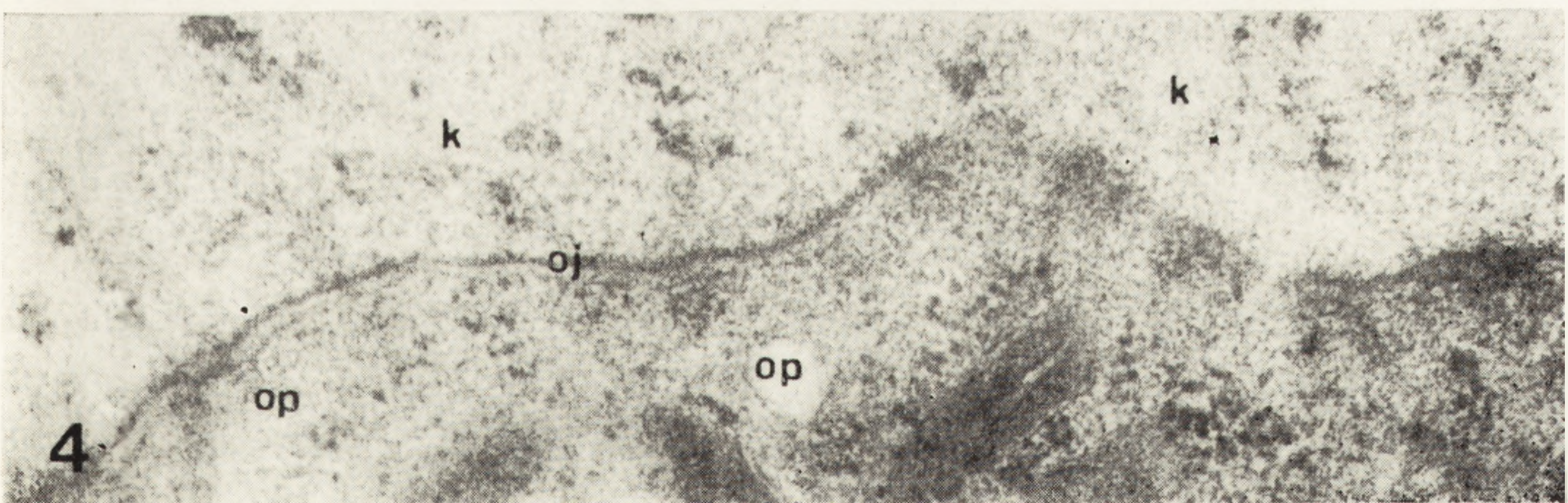
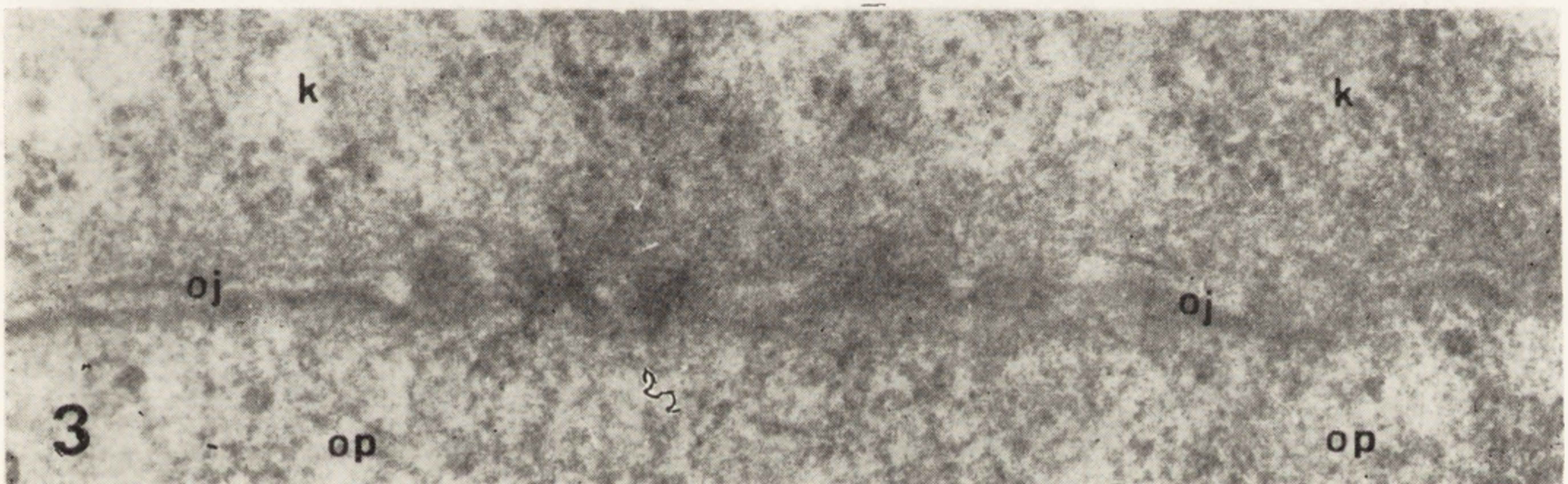
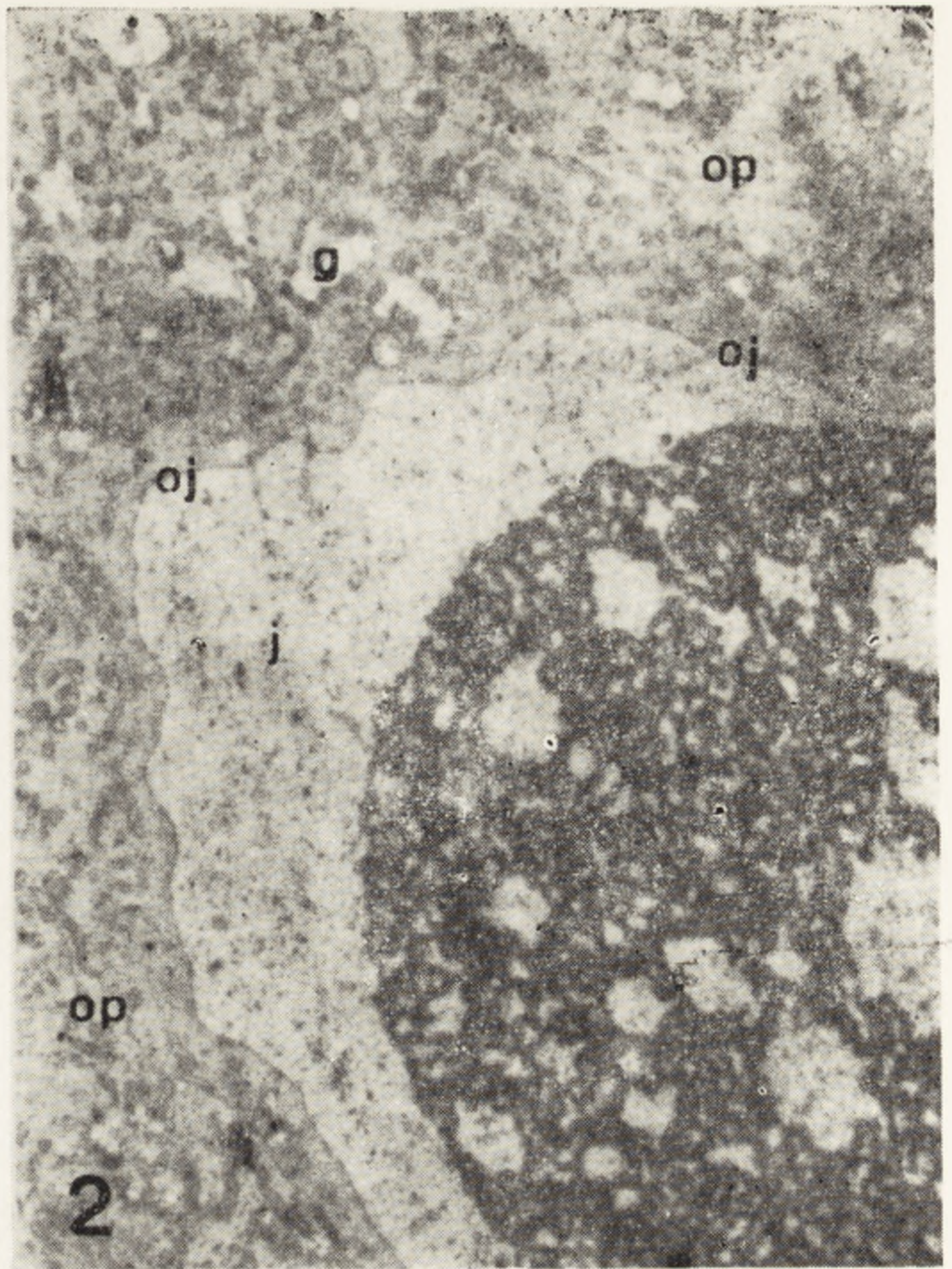
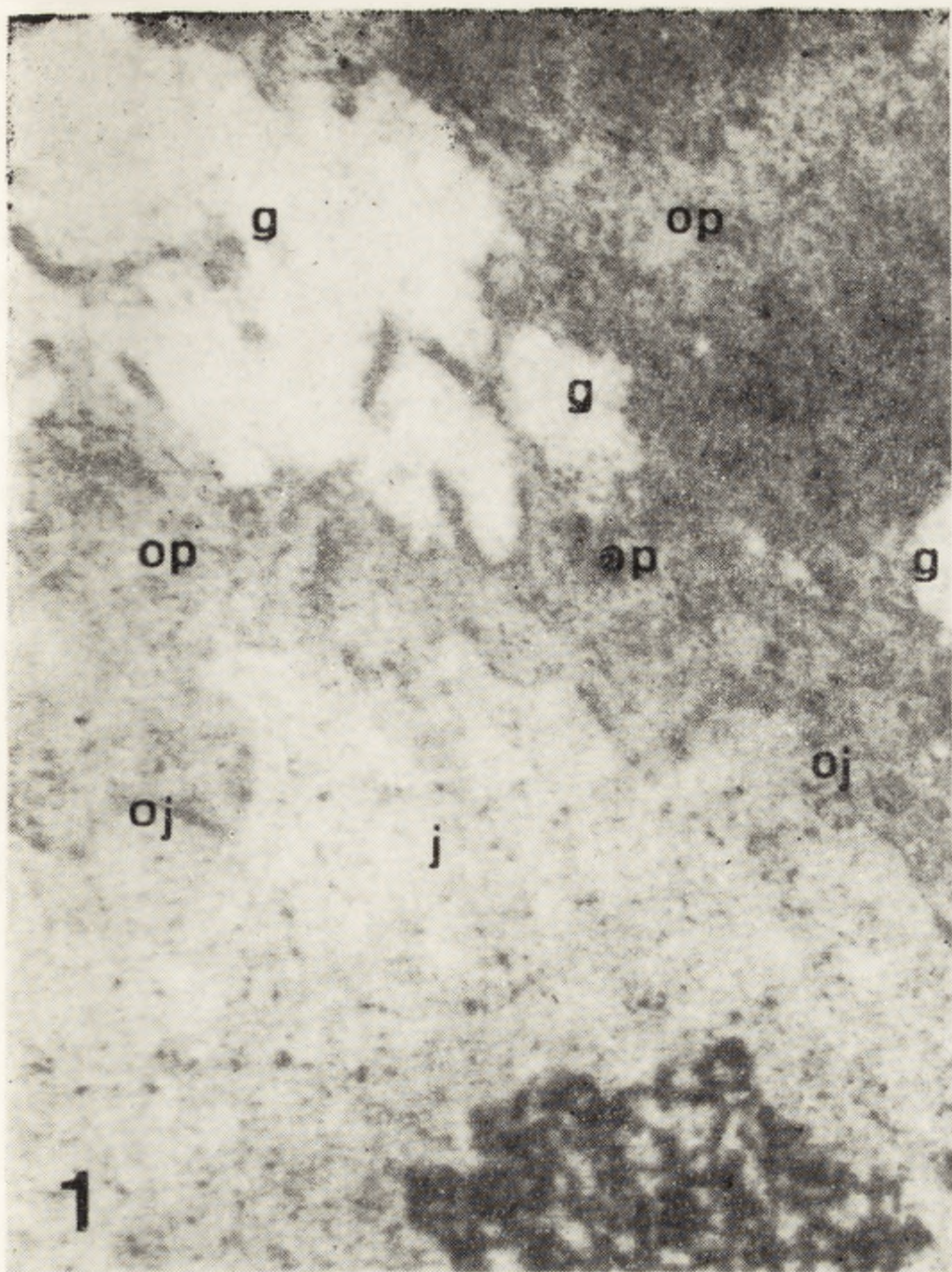


Nazwa leku	R ₁₁	R ₁₈
Rezerpina	CH ₃ O	3,4,5-trójmetoksybenzoil
Deserpidine	H	3,4,5-trójmetoksybenzoil
Syrosingopine	CH ₃ O	3,5-dwumetoksy-4-etylkarbonatobenzoil

Cząsteczka rezerpiny posiada bardzo reaktywną kationową grupę iminową (-NH-), dzięki której ma zdolność reagowania między innymi z cząsteczkami tłuszczów [7].

ODDZIAŁYWANIE REZERPINY NA FOSFOLIPIDY STRUKTUR KOMÓRKOWYCH

Badania nad transportem jonów Ca²⁺ prowadzone przez Mule [37] wykazały, że narkotyki i inne leki działające na centralny układ nerwowy — zawierające w cząsteczce grupy imidowe — mogą wypierać jony wapnia z fosfolipidów zawartych w błonach komórek nerwowych, upośledzając jednocześnie transport Ca²⁺. Anionowe grupy fosforylowe w fosfo-



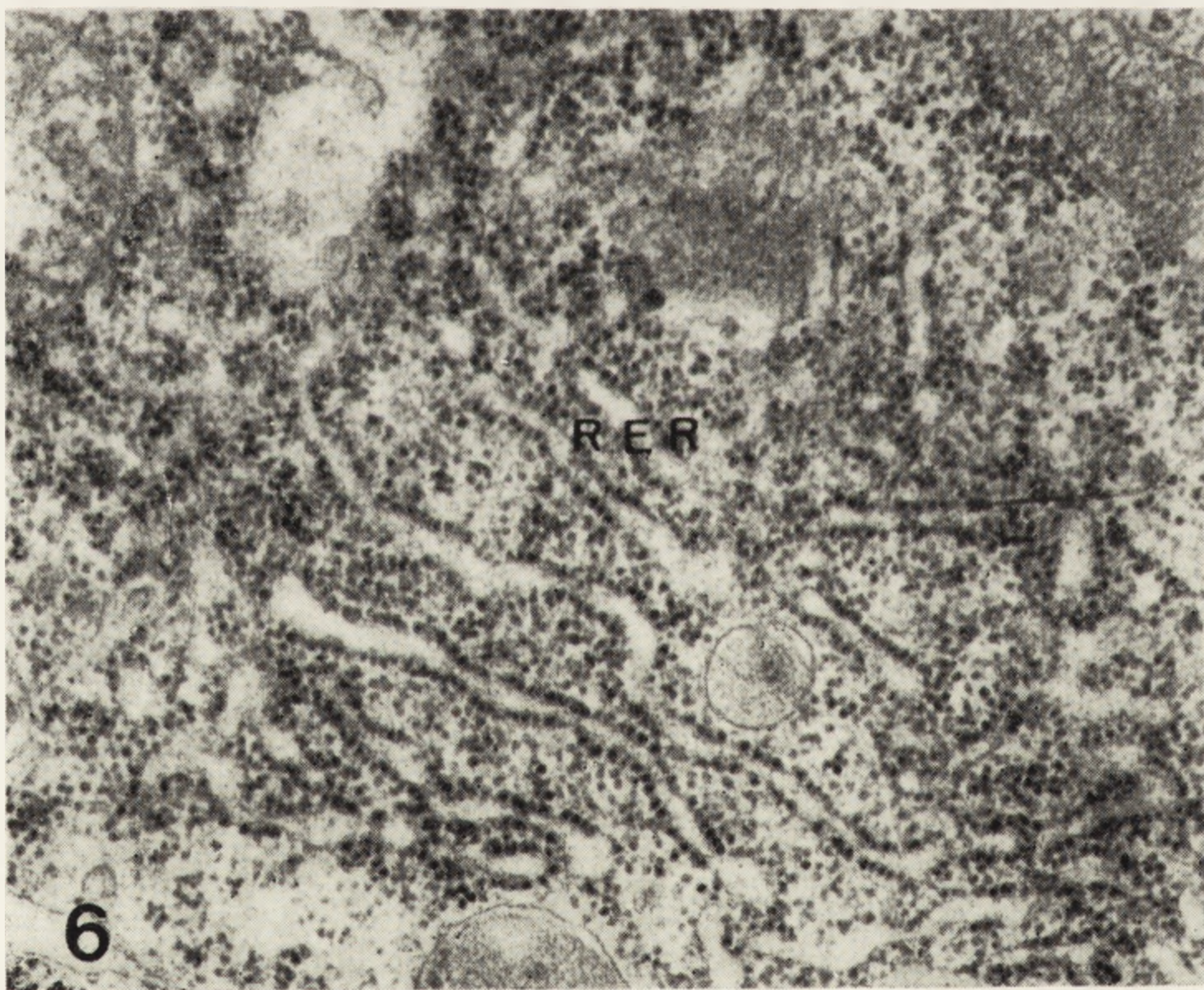
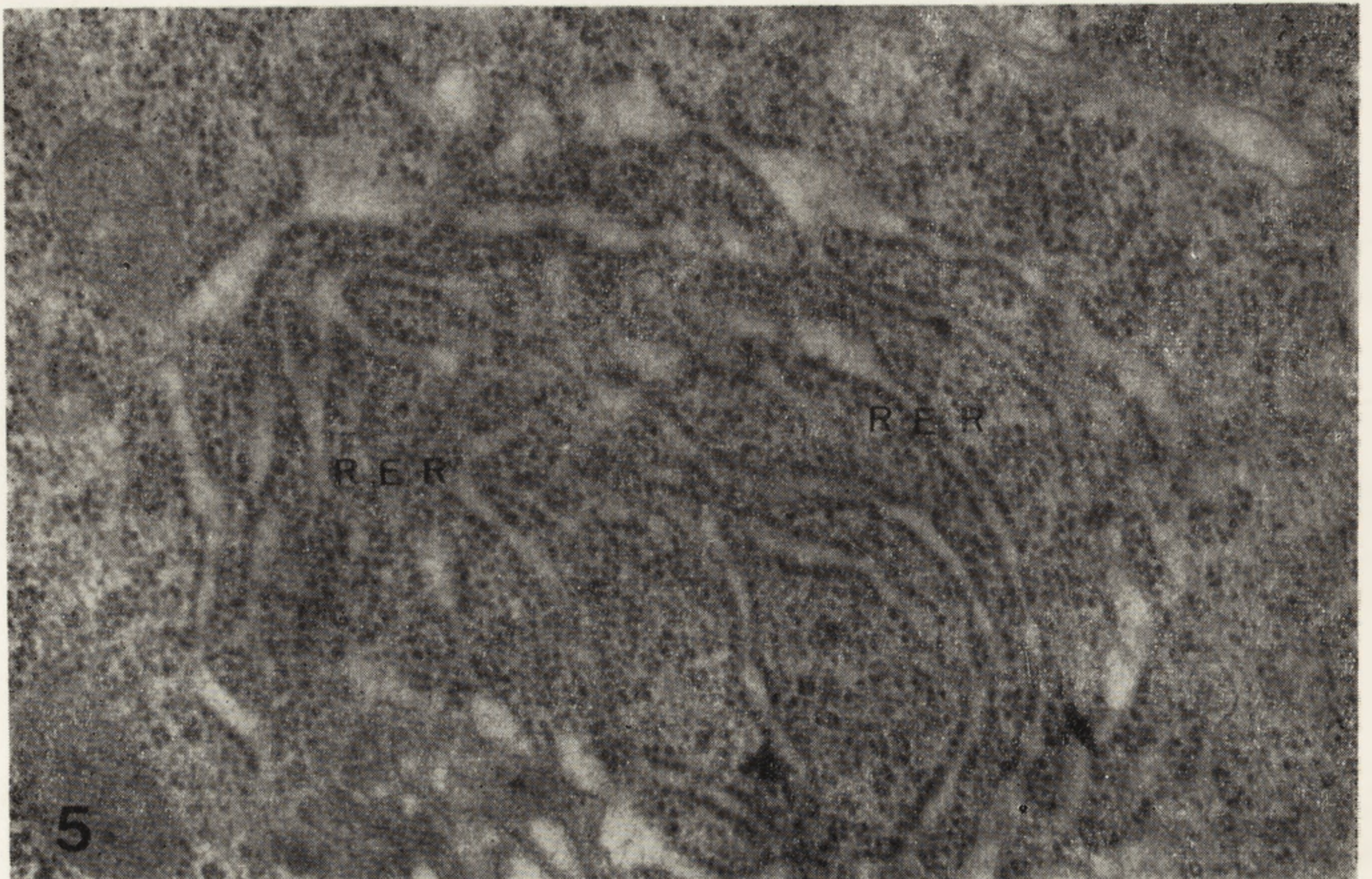
Ryc. 1-10. Oocyty *Galleria mellonella*

Ryc. 1. Fragment prewitellogenicznego oocyty poddanego działaniu rezerpiny. $\times 9600$; g — złoży glikogenu w ooplazmie (op), j — jądro oocyty z otoczką tworzącą liczne fałdy (oj)

Ryc. 2. Fragment prewitellogenicznego oocyty normalnie rozwijającego się owada. $\times 9000$. Oznaczenia jak na ryc. 1

Ryc. 3. Fragment otoczki jądrowej zmienionej patologicznie pod wpływem działania rezerpiny. $\times 60\ 000$; k — karyoplazma, op — ooplazma, oj — otoczka jądra

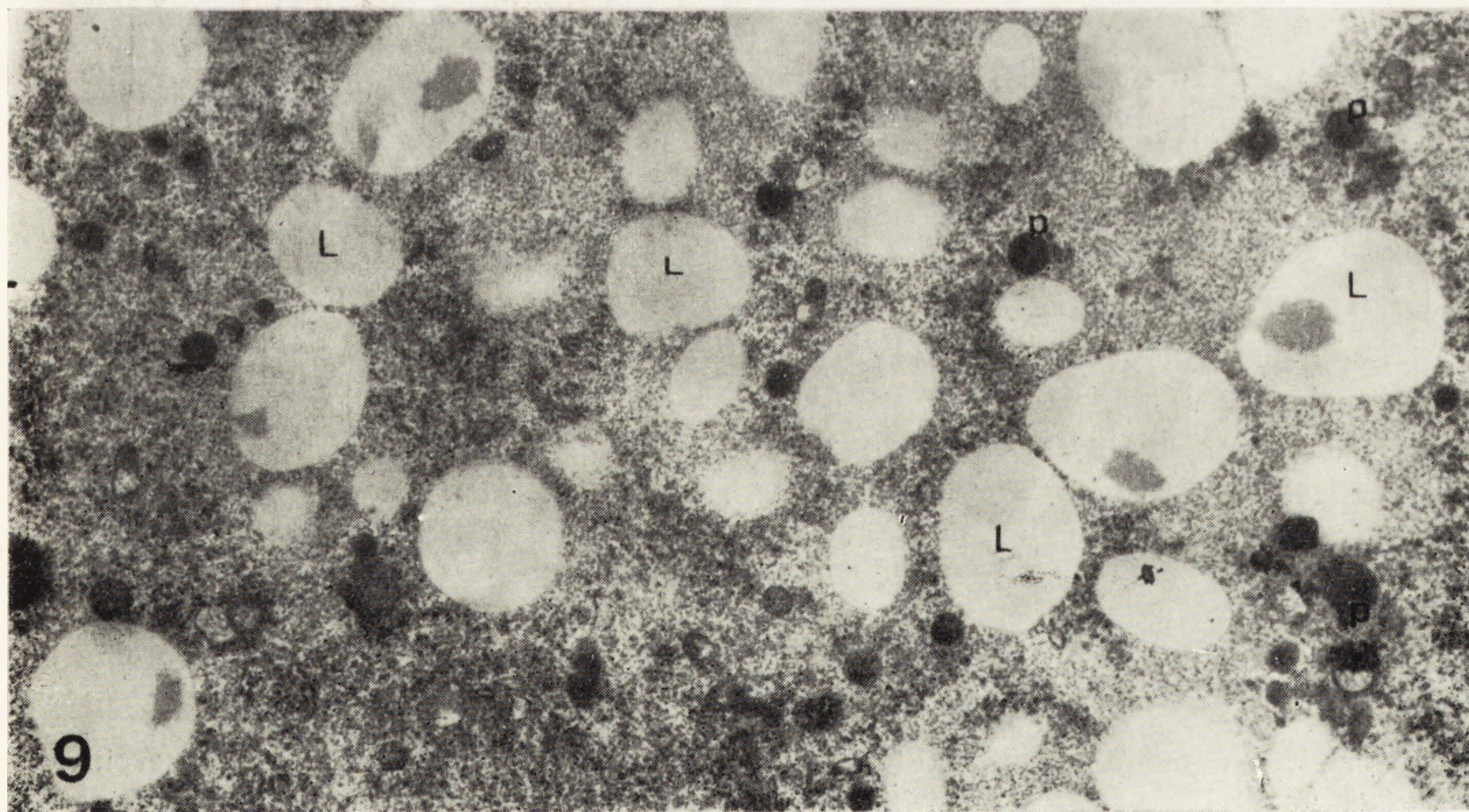
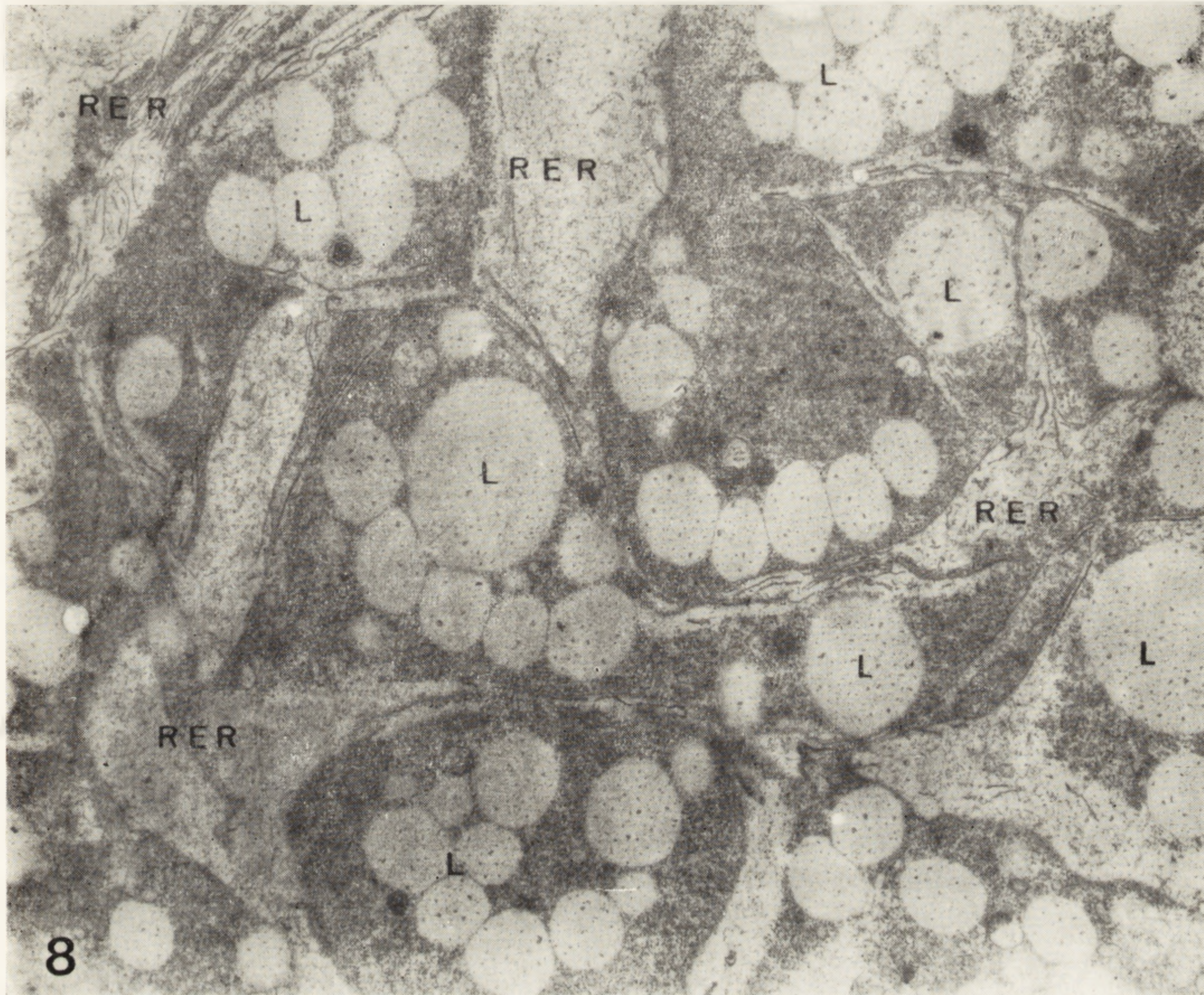
Ryc. 4. Fragment otoczki jądrowej normalnie rozwijającego się oocyty. $\times 60\ 000$; k — karyoplazma, op — ooplazma, oj — otoczka jądra



Ryc. 5. Fragment szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (rER) w komórce nabłonka folikularnego owada traktowanego rezerpiną. $\times 24\ 000$

Ryc. 6. Fragment rER z komórki folikularnej normalnie rozwijającego się owada. $\times 24\ 000$

Ryc. 7. Fragment cytoplazmy komórki folikularnej ze znaczną liczbą rozrzuconych w niej mikrotubuli (t). $\times 24\ 000$



Ryc. 8. Fragment ooplazmy z patologicznie rozszerzonymi kanałami szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (rER). $\times 12\,000$; L — lipidowe kule żółtka

Ryc. 9. Fragment normalnie rozwijającego się oocytu z odkładającymi się w ooplazmie kulami żółtka lipidowego i białkowego. $\times 12\,000$; L — lipidowe kule żółtka, p — białkowe kule żółtka



Ryc. 10. Fragment ściany rurki jajnikowej owada poddanego działaniu rezerpiny. $\times 12\,000$; Włókna mięśniowe (wm) rozszczerzone są niejednokrotnie na drobne paski, Z — strefa „Z” mięśnia, m — mitochondria, t — tchawki, bk — błony komórek mioepitelialnych, bz — blaszka zewnętrzna ściany rurki jajnikowej

lipidach posiadają duże powinowactwo do wapnia i mogą działać jako wymienniki jonowe w kontroli przepływu jonów przez błony. Wiązanie cząsteczek rezerpiny z fosfolipidami powoduje uwolnienie wapnia z błon komórek nerwowych [37], komórek mięśnia sercowego [8], a także komórek tkanki naczyniowej [5, 8]. Przyczynia się to zarówno do zmian w strukturze błon, jak i zaburzeń metabolizmu i funkcji fosfolipidów. Zmiany w zawartości wapnia prowadzą do zmian elektrofizjologicznych właściwości błon [34]. Wytwarza się silna depolaryzacja błon powodująca wzrost selektywnej przepuszczalności dla jonów Na^+ , a w następstwie zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu [6, 27, 37]. Takie uszkodzenie struktury i funkcji błony przejawiać się mogą np. w upośledzeniu przewodzenia jonów w neuronie [37] lub w zaburzeniu wchłaniania komórkowego, co wpływa bezpośrednio na procesy różnicowania się komórek [38, 42].

Przytoczone wyniki badań dotyczących oddziaływania rezerpiny na błony komórkowe zostały uzupełnione w ostatnich latach analizą ultrastrukturalną komórek tworzących pęcherzyki jajowe mola woskowego, *Galleria mellonella* L. [16]. Pod wpływem działania rezerpiny obserwowano znaczne zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych, co prawdopodobnie spowodowane zostało zmianami w strukturze błon komórkowych oocytów, trofocytów i komórek nabłonka foliularnego. Zmiany obserwowano także w otoczce jądrowej rozwijającego się oocytu. Otoczka ta była silnie pofałdowana (ryc. 1, dla porównania ryc. 2) i tworzyła liczne wypustki, a niekiedy całe jej fragmenty ulegały destrukcji (ryc. 3, dla porównania ryc. 4). Obserwowano również zniekształcenia innych struktur błoniastych np. siateczki śródplazmatycznej, której kanaliki ulegały silnym rozszerzeniom (ryc. 5 i 7; dla porównania ryc. 6 i 8).

WPLYW REZERPINY NA HOMEOSTAZĘ WAPNIA

Uwolnienie jonów wapnia z ich charakterystycznych wiązań narusza homeostazę wapnia oraz równowagę elektrolityczną. U ssaków (koty, psy, króliki, szczury) poddanych działaniu rezerpiny obniżał się poziom wapnia i potasu w krwi, podczas gdy poziom jonów sodu i magnezu wzrastał [6, 27]. Opisano także wzrost poziomu jonów wapnia w ekskrementach szczurów traktowanych rezerpiną [8]. Obecność jonów wapnia niezbędna jest dla prawidłowego przebiegu cyklu mitotycznego. Badania Lewisa i wsp. [30] ujawniły, że rezerpina obniża znacznie aktywność mitotyczną komórek w rozwijających się mózgach szczurów. Natomiast w komórkach niektórych roślin, niedobory jonów wapnia zwiększają częstość występowania spontanicznych mutacji w chromosomach [12]. Ponadto, niektóre środki chemiczne z grupy tzw. związków alki-

lujących, np. etylenoiminy, mogą wywoływać mutacje typu pęknięć chromosomów [12]. Na temat ewentualnego bezpośredniego oddziaływania grupy iminowej rezerpiny z genomem komórki trudno jest w tej chwili snuć jakiegokolwiek przypuszczenia.

WPŁYW DZIAŁANIA REZERPINY NA AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNĄ

Rezerpina może powodować również zmiany w układzie enzymatycznym komórek. Lek ten należy do grupy leków zwanych neuroleptykami, wśród których najbardziej znanymi są: fenotiazyna, chlorpromazyne, flufenazyne, tioksantyna i chlorprotiksen. Rezerpina tak, jak pozostałe z wymienionych leków, może wpływać na aktywność niektórych enzymów [34] poprzez usunięcie jonów wapnia z błon i unieczynnienie cyklicznej adenylowej, w wyniku czego następują zaburzenia w funkcjonowaniu cyklicznego AMP [34, 51]. W podobny sposób tłumaczono występowanie zaburzeń w przebiegu procesów fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach komórek mózgu [38] oraz mięśnia sercowego [40] u zwierząt poddanych działaniu rezerpiny. Poza tym, neuroleptyki i niektóre leki psychotropowe hamują aktywność fosfodwuesterazy cyklicznego AMP [26, 49, 51]. Jak sugerują Wolff i Brostrom [51], mechanizm działania leków neuroleptycznych na układ enzymatyczny polega na blokowaniu kalmoduliny — czynnika zależnego od jonów wapnia i regulującego aktywność szeregu enzymów. Leki psychotropowe hamują również Ca^{2+} — Mg^{2+} —ATPazę erytrocytów ludzkich [26]. Na podstawie przeprowadzonej analizy kinetycznej wysunięto hipotezę, że mechanizm takiego hamującego działania leku polega na uszkodzeniu kompleksów typu białko—białko pomiędzy Ca^{2+} — Mg^{2+} —ATPazą i aktywną cząsteczką kalmoduliny. Potwierdziły to badania Weisa i wsp. [49], którzy wykazali, że rezerpina posiada wysoką zdolność wiązania się z kalmoduliną w miejsce wapnia. Zatem szereg procesów komórkowych regulowanych przez biologicznie czynną kalmodulinę (związaną z wapniem) może zostać uszkodzonych w wyniku działania rezerpiny. W badaniach nad wpływem działania rezerpiny na strukturę rozwijających się oocytów owadów [15, 16] obserwowano między innymi znaczne nieprawidłowości w występowaniu mikrotubuli (ryc. 9) oraz odkładania się glikogenu (ryc. 1, 2). Uzyskane wyniki sugerują, że rezerpina, dzięki zdolności wypierania wapnia z połączeń z kalmoduliną, a więc blokowania aktywności biologicznej tego białka, mogła w danym przypadku zaburzyć procesy glikogenolizy, a także procesy depolimeryzacji dimeru tubuliny. Podobnie, zmiany w układzie włókien mięśniowych w komórkach mioepitelialnych rurerek jajnikowych tego owada również wydają się wskazywać na zakłócenia w regulacji enzymatycznej ich cyklu skurczowo-rozkurczowego (ryc. 10).

INNE EFEKTY DZIAŁANIA REZERPINY

DZIAŁANIE REZERPINY NA SUBSTANCJE NEUROPRZEKAŹNIKOWE

Jak wspomniano we wstępie, głównym efektem działania rezerpiny na organizmy kręgowców jest obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Efekt ten uzyskiwany jest nie tylko na skutek zaburzeń równowagi elektrolitycznej i homeostazy wapnia, lecz także w wyniku stymulowanego przez rezerpinę uwalniania katecholamin (dopaminy, noradrenaliny, adrenaliny) oraz indoloaminy (serotoniny) zmagazynowanych w zakończeniach nerwowych [18, 43, 44]. Ponadto, rezerpina wpływa na aminy biogenne zmagazynowane w pęcherzykach ziarnistych w przestrzeniach międzyneuronalnych [17, 44]. Cząsteczki leku wiążą się z błonami tych pęcherzyków powodując w nich konformacyjne zmiany [41]. Efektem działania rezerpiny jest także uaktywnienie enzymów: oksydazy monoaminowej (MAO) i katecholo-O-transferazy (COMT), rozkładających katecholaminy [1, 18]. Rezerpina wywiera wpływ na poziom katecholamin zarówno w centralnym układzie nerwowym, jak i w obwodowym, co wykazały badania prowadzone przy zastosowaniu metod: fluorescencji [17, 18], autoradiografii [1] oraz analizy ultrastrukturalnej [19, 22, 53].

W prowadzonych w ostatnich latach badaniach nad lokalizacją komórek zawierających aminy biogenne w mózgu mola woskowego, *Galleria mellonella* L. [45], oraz funkcjonalną współzależnością pomiędzy tymi komórkami a komórkami neurosekrecyjnymi [46–48], jedną serię doświadczeń wykonano po zastosowaniu rezerpiny. Wpływ działania rezerpiny obserwowano zarówno w ultrastrukturze komórek aminoergicznych, jak i neurosekrecyjnych. (Działanie rezerpiny na komórki neurosekrecyjne owadów omówiono w jednym z następnych rozdziałów). Wstrzyknięcie 125 µg lub 250 µg rezerpiny (na gram wagi ciała) do jamy ciała gąsienic ostatniego stadium larwalnego badanego owada powodowało znaczne zmniejszenie liczby pęcherzyków zawierających aminy (dense-cored vesicles) tak w perikaryonach, jak i w wypustkach komórek aminoergicznych. Zmiany te utrzymywały się przez długi czas i obserwowane były nawet po 48 godz. od chwili wstrzyknięcia leku. Długotrwałe działanie rezerpiny stwierdzone było także przez innych badaczy [28, 30, 32, 41].

EFEKTY DZIAŁANIA REZERPINY NA ORGANIZMY KRĘGOWCÓW

Poprzez zaburzenie równowagi substancji neuroprzekaźnikowych oraz uszkodzenie wchłaniania komórkowego, rezerpina może wywierać bezpośredni wpływ na proliferację i aktywność komórek, co stwierdzono np. w mózгах nowo narodzonych zwierząt [30, 38]. Po długotrwałym stosowaniu rezerpiny obserwowano ponadto występowanie wtórnych

zmian w mięśniu sercowym, wątrobie, korze nadnerczy [52]. Zmiany te powstały w wyniku ostrej niewydolności krążenia, spowodowanej uszkodzeniem równowagi substancji neuroprzekaźnikowych.

Wieloletnie badania prowadzone na zwierzętach oraz obserwacje kliniczne kobiet ujawniły oddziaływanie rezerpiny na układ endokrynalny. Rezerpina hamuje niektóre funkcje podwzgórza (Hypothalamusa), w wyniku czego zaburzone zostaje funkcjonowanie przysadki mózgowej, zwłaszcza jej przedniego płata [25, 35, 36, 41]. W następstwie tego obserwowano między innymi zakłócenia w funkcji tarczycy i gonad. Stwierdzono również, że długotrwałe stosowanie rezerpiny powoduje silne zaburzenia cyklu rozrodczego ssaków, np. wstrzymanie owulacji i przyspieszenie laktacji [2, 3, 10, 25, 35, 36].

EFEKTY DZIAŁANIA REZERPINY NA ORGANIZMY OWADÓW

Wpływ rezerpiny na gonady owadów. Wyniki przytoczonych badań nasunęły przypuszczenie, że rezerpina może być czynnikiem skutecznie osłabiającym zdolności rozrodcze owadów. Toteż wpływ tego leku na gonady owadów stał się przedmiotem zainteresowania wielu badaczy.

Po podaniu w pożywieniu różnych dawek rezerpiny stwierdzono znaczne zmniejszenie lub całkowite zahamowanie owulacji u *Tribolium confusum* [23]. Późniejsze badania prowadzone na *Tribolium confusum* i *Musca domestica* [20, 21, 24] wykazały, że rezerpina może powodować zmniejszenie liczby składanych jaj na skutek zahamowania procesów ich dojrzewania. Banschoter [4] zaobserwował, że zastosowanie diety rezerpinowej z różną zawartością leku powodowało u *Anastrepha ludens* nie tylko zahamowanie rozwoju i składania jaj, ale także zmniejszenie i zniekształcenie gonad żeńskich, natomiast w gonadach męskich tego owada nie stwierdzono żadnych zmian. W gonadach męskich *T. confusum* rezerpina hamowała wzrost gruczołów dodatkowych (accessory glands) [33], podczas gdy w gonadach żeńskich tego owada obserwowano zahamowanie wzrostu objętości germarium i oocytów, a także zmniejszenie ogólnej liczby produkowanych jaj.

Badania nad wpływem działania rezerpiny na rozwój pęcherzyków jajowych *Galleria mellonella* L. dostarczyły dalszych informacji [14–16]. Okazało się, że podanie rezerpiny gąsienicom ostatniego stadium larwalnego mola woskowego spowodowało nie tylko zmniejszenie liczby produkowanych pęcherzyków jajowych [14], ale także szereg zmian morfologicznych [15] i ultrastrukturalnych [16]. Nieprawidłowości strukturalne obserwowano w oocytach, trofocytach i w komórkach nabłonka foliularnego. Główne z nich, to wspomniane zniekształcenia błon komórkowych, otoczki jądrowej i innych struktur błoniastych (np. szorstkiej siateczki śródplazmatycznej) oraz występowanie mikrotubuli i nadmierne odkładanie się glikogenu.

Wpływ rezerpiny na układ endokryalny i nerwowy owadów. Autorzy przytoczonych w poprzednim rozdziale prac sugerowali, że rezerpina działa na układ neuroendokryalny owadów [9, 14, 24, 33], analizy przeprowadzone przy użyciu mikroskopu świetlnego wykazały bowiem nadmierne nagromadzenie materiału neurosekrecyjnego w komórkach neurosekrecyjnych położonych w pars intercerebralis. Występowanie takiego zjawiska stwierdzono u *Tenebrio molitor* i *Tribolium confusum* z rzędu *Coleoptera* [33] oraz *Galleria mellonella* z rzędu *Lepidoptera* [9]. Badania ostatnich lat przeprowadzone przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego potwierdziły te hipotezy [46–48]. Po podaniu (drogą iniekcji) 1,25 µg rezerpiny na 1 g wagi ciała owada obserwowano niewielkie zwiększenie ilości neurosekretu w komórkach pars intercerebralis, widoczne jednak dopiero po upływie około 48 godz. Znacznie wcześniej i bardzo wyraźnie ujawnił się wpływ rezerpiny, gdy zastosowano 100-krotnie większą dawkę (125 µg/g wagi ciała). Już po 9–16 godz. od chwili wstrzyknięcia leku obserwowano proces nadmiernego gromadzenia się neurosekretu, a po 24–48 godz. zmiany te ujawniały się jeszcze bardziej. Autorzy tych prac sugerowali, że przyczyną obserwowanego zjawiska jest przemijające, aczkolwiek długotrwałe, uszkodzenie mechanizmów odpowiadających za transport materiału neurosekrecyjnego wzdłuż aksonów. Przypuszcza się, że zaburzenia w układzie neuroendokryalnym owadów, obserwowane po podaniu rezerpiny, były powodem znacznego przedłużenia czasu trwania ostatniego stadium larwalnego mola woskowego [9, 14].

Inne rzejawy działania rezerpiny na układ nerwowy owadów badano u *Formica rufa* [28], *Musca domestica* [50], *Tribolium confusum* [39]. Polegały one na obniżonej aktywności ruchowej, niezdolności do lotu, zahamowaniu reakcji fototropowej oraz na utracie kontaktu pomiędzy owadami żyjącymi w społeczeństwach [28]. Efekty te mogły być spowodowane jednak nie tylko zaburzeniem równowagi neurotransmiterów, lecz także zmianą poziomu elektrolitów w hemolimfie, którą obserwowano np. u *G. mellonella*. Po podaniu rezerpiny w hemolimfie tego owada następował znaczny wzrost poziomu jonów sodu i potasu [9].

Na zakończenie należy zwrócić uwagę na fakt, że zastosowanie rezerpiny do badań nad morfologią i funkcjonowaniem układu neuroendokryalnego owadów [45–48] oraz wpływem zaburzeń hormonalnych na rozwój [14] i zdolności rozrodcze owadów [15, 16], nie tylko uzupełniło dotychczasowe informacje o wielopoziomym działaniu rezerpiny, ale także pozwoliło prześledzić efekty tego działania na organizm jednego gatunku owada. Wydaje się, że wyniki tych badań mogą być wykorzystane do opracowania metody biologicznej walki z owadami szkodliwymi. Poza tym, poznanie cytologicznych efektów działania rezerpiny może być przydatne dla medycyny.

LITERATURA

- [1] ANDEN N. E., CARLSON A., WALDECK B., Reserpine — resistant uptake mechanisms of noradrenaline in tissues, *Life, Sci.*, **12**: 889–894, 1963.
- [2] BARRACLOUGH C. A., SAWYER, C. H., Blockade of the release of pituitary ovulating hormone in the rat by chlorpromazine and reserpine: possible mechanisms of action, *Endocrinol.*, **61**: 341–351, 1957.
- [3] BARRACLOUGH C. A., SAWYER C. H., Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine, *Endocrinol.*, **65**: 563–571, 1959.
- [4] BENSCHOTER C. A., Reserpine as a terilant for the mexican fruit fly (*Anastrepha ludens* Loew) (*Diptera: Tephritidea*), *J. econom. Entomol.*, **59**: 333–334, 1966.
- [5] CARRIER O., Jr., SHIBATA S., A possible role for tissue calcium in reserpine supersensitivity, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **155**: 42–49, 1967.
- [6] CARRIER O., Jr., DOUGLAS B. H., The effect of reserpine on vascular tissue sodium and potassium content, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **158**: 494–503, 1967.
- [7] CARRIER O., Jr., CLOWER B. R., WHITTINGTON P. J., Inhibition of cholesterol — induced vascular lesions by dietary reserpine, *J. Atheroscler. Res.*, **8**: 229–236, 1968.
- [8] CARRIER O., Jr., WHITTINGTON-COLEMAN P. J., MATHENY J., SHIBATA S., Tissue calcium losses following reserpine administration in rabbits, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **187**: 97–105, 1970.
- [9] CYMBOROWSKI B., KRYSPIŃ I., Effect of reserpine on development and its neuro-endocrine regulation in *Galleria mellonella*, *Gen. Pharmacol.*, **6**: 209–213, 1975.
- [10] DE FEO V. J., REYNOLDS S. R., Modification of the menstrual cycle in rhesus monkeys by reserpine, *Science*, **124**: 726–727, 1956.
- [11] FLEGEL H., DOMINICUS R. D., Neuroleptyki, str. 382–392, [w:] *Farmakologia kliniczna i farmakoterapeutyczna*, PZWL, Warszawa 1976.
- [12] GAJEWSKI W., *Genetyka ogólna i molekularna*, PWN, Warszawa 1972, str. 234.
- [13] GIACHETTI A., SHORE P. A., The reserpine receptor, *Life Sci.*, **23**: 89–92, 1978.
- [14] GŁOWACKA S. K., DUTKOWSKI A. B., Effect of reserpine on the larval-pupal moult of the wax moth *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*), *Experientia*, **35**: 1491–1492, 1979.
- [15] GŁOWACKA S. K., Disturbances in the egg chambers development of *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*) after reserpine administration, *J. Insect Physiol.*, w druku, 1981.
- [16] GŁOWACKA S. K., Zaburzenia w rozwoju pęcherzyków jajowych *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera*) wywołane działaniem rezerpiny. Rozprawa doktorska, Inst. Biol. Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Warszawa 1980.
- [17] HAMBERGER B., MALMFORS T., Uptake and release of — methylnoradrenaline in vitro after reserpine pretreatment. A histochemical study, *Acta Physiol. Scand.*, **70**: 412–418, 1967.
- [18] HAMBERGER B., Reserpine — resistant uptake of catecholamines in isolated tissues of the rat, *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, **295**: 1–56, 1967.
- [19] HANSEN J. T., YATES R. D., I-LI CHEN., An electron microscopic study of

- the effects of reserpine on the subclavian glomera of the rabbit, *Am. J. Anat.*, **144**: 491-502, 1975.
- [20] HAYS S. B., Some effects of reserpine, a tranquilizer, on the house fly, *J. econom. Entomol.*, **58**: 782-783, 1965.
- [21] HAYS S. B., AMERSON G. H., Reproductive control in the house fly with reserpine, *J. econom. Entomol.*, **60**: 781-783, 1967.
- [22] HÖKFET T., The effect of reserpine on the intraneuronal vesicles of the rat vas deferens, *Experientia*, **22**: 56, 1966.
- [23] HUOT L., CORRIVAUULT G. W., BOURBEAU G., Les substances neuroleptiques et le comportement des insects. I- L'influence de la reserpine sur la ponte de *Tribolium confusum* Duval (*Coleoptere, Tenebrionidae*), *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **68**, 577-585, 1960.
- [24] HUOT L., CORRIVAUULT G. W., Les substances neuroleptiques et le comportement des insects. V Etude comparative de l'action de la reserpine et de quelques-une de ses derives sur le *Tribolium confusum* Duval, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **75**: 745-753, 1967.
- [25] KHAZAN N., SULMAN F. G., WINNIK H. Z., Effect of reserpine on pituitary — gonadal axis, *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**: 201-204, 1960.
- [26] KOBAYASHI R., TAWATA M., HIDAKA H., Ca²⁺ regulated modulator protein interacting agents: Inhibition of Ca²⁺ — Mg²⁺ — ATPase of human erythrocyte ghost, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **88**: 1037-1045, 1979.
- [27] KOMATSU Y., CONSTANTOPOULOS G., Effect of reserpine on water, cation and norepinephrine contents of cardiovascular tissues of normotensive dogs, *Can. J. Physiol. Pharm.*, **55**: 206-211, 1977.
- [28] KOSTOWSKI W., BECK J., MESZAROS J., Badanie wpływu niektórych neurohormonów i środków psychotropowych na czynność bioelektryczną ośrodkowego układu nerwowego i zachowanie mrówek (*Formica rufa* L.), *Acta Physiol. Pol.*, **17**: 119-133, 1966.
- [29] LEVY A., KAWASHIMA K., SPECTOR S., Radioimmunoassay for reserpine: *Life Sci.*, **19**: 1421-1429, 1976.
- [30] LEWIS P. D., PATEL A. J., BÉNDEK G., BALÁZS R., Effect of reserpine on cell proliferation in the developing rat brain: a quantitative histological study, *Brain Res.*, **129**: 299-308, 1977.
- [31] LOEFFLER L. J., SCHRANK H. F., Antibody specificity studies for reserpine, its metabolites, and synthetic reserpine congeners. Radioimmunoassay, *J. Pharm. Sci.*, **68**: 1433-1435, 1979.
- [32] MANARA L., GARATTINI S., Time course of ³H-reserpine levels in brains of normal and tetrabenazine — pretreated rats, *Europ. J. Pharmacol.*, **2**: 139-141, 1967.
- [33] MASNER P., HUOT L., CORRIVAUULT G. W., PRUDHOMME J. C., Effect of reserpine on the function of the gonads and its neuro-endocrine regulation in tenebrionid beetles, *J. Insect Physiol.*, **16**: 2315-2326, 1970.
- [34] MEISHERI K. D., TENNER T. E., Jr., McNEILL J. H., Reserpine — induced supersensitivity to the cardiac effect of agonists, *Life Sci.*, **24**: 473-480, 1979.
- [35] MEITES J., Induction of lactation in rabbits with reserpine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **96**: 728-730, 1957.
- [36] MOON R. C., TURNER Ch. W., Effect of reserpine on oxytocin and lactogen discharge in lactating rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **101**: 332-334, 1959.

- [37] MULE S. J., Inhibition of phospholipid — facilitated calcium transport by central nervous system — acting drugs, *Biochem. Pharmacol.*, **18**: 339–346, 1969.
- [38] PATEL A. J., BAILEY P., BALÁŽS R., Effect of reserpine on cell proliferation and energy stores in the developing rat brain, *Neurosci.*, **4**: 139–143, 1979.
- [39] PERRON J. M., CORRIVAUT G. W., HUOT L., Les substances neuroleptiques et le comportement des insectes. VI — Influence de la reserpine sur le poids corporel de *Tribolium confusum*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**: 233–238, 1969.
- [40] SCHWARTZ A., LEE K. S., Effect of reserpine on heart mitochondria, *Nature*, **188**: 948–949, 1960.
- [41] SRIABINE A., Reserpine, [w:] *Pharmacology of antihypertensive drugs*, red. A. Scriabine, Raven Press, New York 1980, 119–126.
- [42] SPARBER S. B., SCHIDEMAN F. E., Prenatal administration of reserpine: Effect upon hatching, behavior, and brainstem catecholamines of the young chick, *Develop. Psychobiol.*, **1**: 236–244, 1968.
- [43] SPARBER S. B., SHIDEMAN F. E., Estimation of catecholamines in the brains of embryonic and newly hatched chickens and the effects of reserpine, *Develop. Psychobiol.*, **2**: 115–119, 1969.
- [44] SULSER F., BRODIE B. B., Is reserpine tranquilization linked to change in brain serotonin or brain norepinephrine?. *Science*, **131**: 1440–1441, 1960.
- [45] WARTON S., Monoamine — containing cells in the brain of *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Acta Med. Pol.*, **18**: 381–383, 1977.
- [46] WARTON S., GŁOWACKA S. K., Changes in the ultrastructure of neurosecretory cells of pars intercerebralis after various treatments of *Galleria mellonella* with reserpine, Abstract, Proceedings of the XVth Czechoslovak Conference on Electron Microscopy with International Participation, V.A.: 404–405, 1977.
- [47] WARTON S., GŁOWACKA S. K., The influence of reserpine on the ultrastructure of the brain of *Galleria mellonella*, *Folia Histochem. Cytochem.*, **16**: 160, 1978.
- [48] WARTON S., DUTKOWSKI A. B., Ultrastructural analysis of the action of reserpine on the brain neuroendocrine system of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera), *Cell Tiss. Res.*, **192**: 143–155, 1978.
- [49] WEISS B., PROZIALECK W., CIMINO M., SELLINGER BARNETTE, WALLACE T. L., Pharmacological regulation of calmodulin, [w:] *Calmodulin and Cell Functions*, Eds. D. M. Watterson, F. F. Vincenzi, Ann. New York Acad. Sci., **356**: 319–345, 1980.
- [50] WICHT M. C., HAYS S. B., Effect of reserpine on reproduction of the house fly, *J. econom. Entomol.*, **60**: 36–38, 1967.
- [51] WOLFF D. J., BROSTROM Ch. O., Properties and Functions of CDR (Calcium dependent regulator), *Adv. Cyclic. Nucleot. Res.*, **11**: 26–88, 1979.
- [52] ZAIMS E., Reserpine — induced circulatory failure, *Nature*, **192**: 521–523, 1961.
- [53] YATES R. D., An electron microscopic study of the effects of reserpine on adreno- medullary cells of the syrian hamster, *Anat. Rec.*, **116**: 29–45, 1963.

Nadestano: 15 marca 1982.

Przyjęto: 24 czerwca 1982.

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

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 320,— półrocznie zł 160,—

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 za 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

K. K. BROŻYŃSKI, B. L. KMIEĆ, Budowa i czynność tkanki tłuszczowej brunatnej	1
A. HINEK, Endocytoza adsorpcyjna i receptosomy . . .	23
M. WARWAS, Fizjologiczne inhibitory katepsyny B . . .	43
S. GŁOWACKA, Cytologiczne efekty działania rezerpiny	55