

wodować choroby, poza ograniczonymi zmianami w miejscu iniekcji.

Piśmiennictwo

1. Baskaya H., Aydin N., Akay O.: Vet. Fak. Derg. Ankara Univ. 30, 440, 1983.
2. Dąbrowski J.: Medycyna Wet. 32, 464, 1976.
3. Götz K.: Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, München 1984.
4. Keuhani M.: Revue Med. vet. 123, 1089, 1972.
5. Kujaszczyk W.: Zesz. probl. Post. Nauk roln. 164, 181, 1975.
6. Różańska M.: Medycyna Wet. 10, 584, 1987.
7. Różańska M.: Zesz. probl. Post. Nauk roln. 164, 185, 1975.
8. Różańska M.: Zesz. probl. Post. Nauk roln. 164, 189, 1975.
9. Stępkowski S., Rzedzicki J.: Pol. Arch. Wet. 14, 51, 1971.
10. Stoll L., Lucas H.: Mh. Tierhk. 15, 163, 1963.
11. Tuboły S., Fábian L.: Prakt. Tierarzt. 7, 504, 1978.
12. Żórawski C., Skwarek P.: Metody i testy stosowane do izolowania i identyfikacji prątków kwasoopornych. I. Wet. Puławy 1980.
13. Żórawski C., Lipiec M., Cegielski A., Skwarek P., Szpejna M.: Medycyna Wet. 44, 205, 1988.

Adres autora: lek. wet. Marek Lipiec, ul. Kościuszki 12/20, 24-100 Puławy

PATOLOGIA I TERAPIA

JANUSZ A. MADEJ
Wrocław

Zaburzenia metabolizmu limfocytów białaczkowych in vivo i in vitro u zwierząt

Rola limfocytów w mechanizmach obronnych, tj. produkcji białek odpornościowych, limfokin, wytwarzaniu pamięci immunologicznej czy rozpoznawaniu antygenów jest stosunkowo dobrze poznana. Natomiast wiadomości na temat biochemii limfocytów są nadal skąpe.

Metabolizm limfocytów jest ściśle związany z ich strukturą i wyposażeniem biochemicznym. Dzięki niemu limfocyty spoczynkowe poddane aktywacji są zdolne do rozwinięcia wielu przemian i syntez odpowiadających nowym zadaniom. Jedną z najistotniejszych cech metabolicznych tych komórek jest zdolność do przekształceń, połączona z możliwością zwiększenia intensywności przemian wewnątrzkomórkowych. W limfocytach wykazano przede wszystkim obecność dużej ilości RNA i DNA oraz licznych enzymów związanych z metabolizmem wymienionych kwasów nukleinowych, a także białek, węglowodanów i lipidów. Ponadto komórki te zawierają lizosomy wyposażone w kwaśne hydrolazy oraz mitochondria, w których dokonuje się tlenowy rozkład glukozy, jak również degradacja tego węglowodanu w cyklu pentozowym (7).

Pod wpływem niektórych stymulatorów limfocyty ulegają wielokierunkowej aktywacji, co może dokonywać się zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. W wyniku aktywacji limfocyty spoczynkowe wychodzą z fazy G₀ i proliferują. W skrajnej postaci hiperprolifracji może prawdopodobnie dojść do derepresji onkogenów, zawierających informację dla transformacji nowotworowej. Mamy wówczas do czynienia z limfoprolifracją nowotworową. Na znaczne możliwości powiązań między aktywacją i limfoprolifracją z jednej, a leukemogenezą z drugiej strony, zwrócono już uwagę we wcześniejszych pracach własnych (27, 37).

Transformacja limfocyta prawidłowego w kierunku limfocyta białaczkowego u zwierząt prawdopodobnie związana jest nie tylko z istotnymi zmianami bioenergetycznymi (32), ale także biochemicznymi zachodzącymi w tej komórce. W dobrze poznanym pod względem regulacji metabolizmu wątrobiaku szczurów zaobserwowano, że szybkość syntezy i degradacji metabolitów w komórkach nowotworowych jest inna, niż w komórkach prawidłowych (7). Obserwacje te świadczą o tym, że transformacja nowotworowa wpływa na zmianę mechanizmów regulujących aktywność poszczególnych dróg

metabolicznych (41, 45, 64). Jednocześnie należy zaznaczyć, że różnice metaboliczne między komórką prawidłową i nowotworową są z reguły nieznaczne i wówczas nowotwory takie określa się mianem „minimal deviation tumors” (7).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie: 1) różnic metabolicznych między limfocytami prawidłowymi i limfocytami białaczkowymi *in vivo* i *in vitro* u myszy i bydła oraz 2) określenie miejsc zmian ilościowych wybranych związków nisko- i wysokocząsteczkowych w niektórych ciągach metabolicznych tych komórek.

Badania limfocytów białaczkowych *in vivo* u myszy i bydła

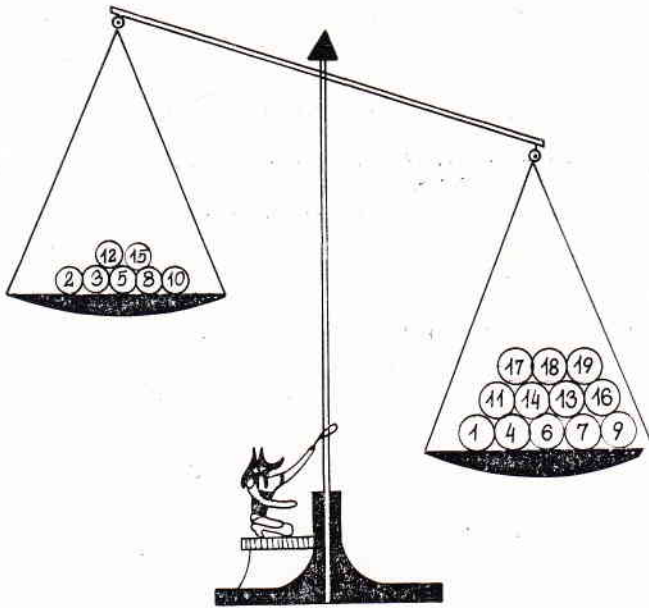
I. Enzymy, lipidy, kwasy tłuszczowe oraz gliko- i sialo-proteidy

Zawartość wybranych związków nisko- i wysokocząsteczkowych w limfocytach białaczkowych *in vivo* u myszy i bydła przedstawiono na ryc. 1, zaś zaburzenia w niektórych ciągach metabolicznych tych komórek na ryc. 3. Wykazano znaczne różnice ilościowe w wielu ww. związkach między limfocytom normalnym i stransformowanym nowotworowo, co opisano już wcześniej w pracy, dotyczącej znaczenia markerów biologicznych w diagnostyce białaczek u zwierząt (30). Stwierdzono, że wiele z wymienionych związków ma charakter dobrych markerów biologicznych w rozpoznawaniu białaczek, a to dlatego, że wykrycie podwyższonego ich poziomu, np. enzymów, ma znaczenie dla monitorowania terapii, zwłaszcza u ludzi. Jeżeli podwyższony poziom biomarkera przed zabiegiem obniży się do normalnego, wówczas każda zwyżka może być interpretowana jako wznowa nowotworowa. Wynika to z faktu, że wahania poziomów biomarkerów uzależnione są od masy nowotworów w stopniu wprost proporcjonalnym

II. Aminokwasy

Aminokwasy są kluczowymi związkami metabolizmu komórek. Ich aktywacja i synteza odbywa się w cytoplazmie komórki, zaś przemiany kataboliczne aminokwasów zachodzą w mitochondriach.

U myszy z białaczką limfatyczną L 1210 wykazano wzrost ilości kwasu glutaminowego, izoleucyny, proliny, spadek natomiast zawartości glicyny. Wymienione ami-



- - wzrost badanego parametru w odniesieniu do limfocyta prawidłowego
- - spadek badanego parametru w odniesieniu do limfocyta prawidłowego

Ryc. 1. Zawartość niektórych związków nisko- i wysokocząsteczkowych w limfocycie białaczkowym *in vivo* u myszy i bydła w porównaniu z limfocytym prawidłowym

ENZYMY

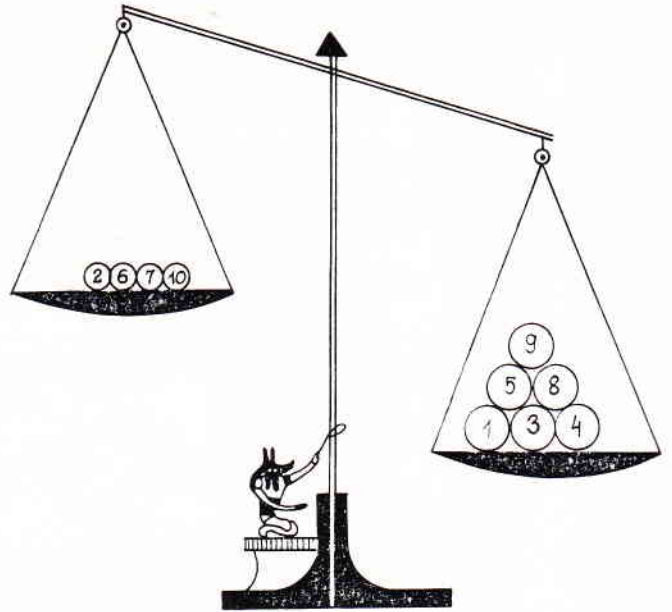
Objaśnienia:

1. Hydrolazy (gamma-glutamylotransferaza — GGT, alanyloamino-peptydaza — AAP, leucyloaminopeptydaza — LAP, acylaza aktywowana kobaltem — AACo, arylosulfataza — ASA, rybonukleaza — RNA-aza)
2. Hydrolazy (fosfataza zasadowa — FZ, 5'-nukleotydaza — 5'-NT, adenozyntrojfosfataza — ATP-aza, glukoza-6-fosfataza — G-6-P-aza, fosfataza kwaśna — FK, beta-glukuronidaza — B-GU, lizozym — Li)
3. Oksydoreduktazy (peroksydaza glutationowa — GSH-px, dymu-taza nadtlenkowa — SOD, katalaza, dehydrogenaza mleczano-wa — LDH, dehydrogenaza bursztynianowa — SDH)
4. Transferazy (polimeraza RNA, polimeraza DNA, aminotransfe-raza alaninowa — ALAT)
5. Transferazy (aminotransferaza asparaginianowa — AspAT)
6. Liazy (aldolaza — ALD)
NIEFOSFORYLACYJNA TRANSLIKOZYLACJA
7. Homotransglikozylacja
8. Heterotransglikozylacja
LIPIDY POLARNE I OBOJĘTNE
9. Cholesterol, sfingomielina
10. Lecetyna, fosfoetanolamina
LIPIDY POLARNE I OBOJĘTNE
11. Kwas linolenowy, linolowy, olejowy, eikozenowy
KWASY TŁUSZCZOWE
12. Kwas arachidonowy, stearynowy
KWASY TŁUSZCZOWE
13. KWASY ŻÓLCIOWE
KWASY TŁUSZCZOWE
14. Kwas glutaminowy, prolina, izoleucyna
AMINOKWASY
15. Glicyna
AMINOKWASY
16. Seromukoid, histomukoid
GLIKO- I SIALOPROTEIDY
17. RNA, DNA
KWASY NUKLEINOWE
18. Cytidyna, urydyna
PREKURSORY RNA
19. GLIKOGEN, GLIKOLIZA, CYKL PENTOZOWY
PREKURSORY RNA

nokwasy, ulegając przemianom metabolicznym w orga-nizmie, przekształcają się ostatecznie w amfiboliczne związki pośrednie z tworzeniem albo glikogenu (ami-nokwasy „glikogenne”, tj. kwas glutaminowy, prolina i glicyna), albo glikogenu i lipidów (aminokwasy „gli-kogenne” i „ketogenne” — tj. izoleucyna). Stąd można wnioskować, że w białaczkę L 1210 dochodzi do wyraź-nych zmian w poziomie niektórych aminokwasów „gli-kogennych” oraz aminokwasów „gliko- i ketogennych”, co może znajdować odbicie z zaburzeniach cyklu Krebsa (25) — ryc. 3.

III. Cholesterol i kwasy żółciowe

Jednym ze zjawisk towarzyszących onkogenezie jest destabilizacja błon biologicznych komórki. Dużą rolę



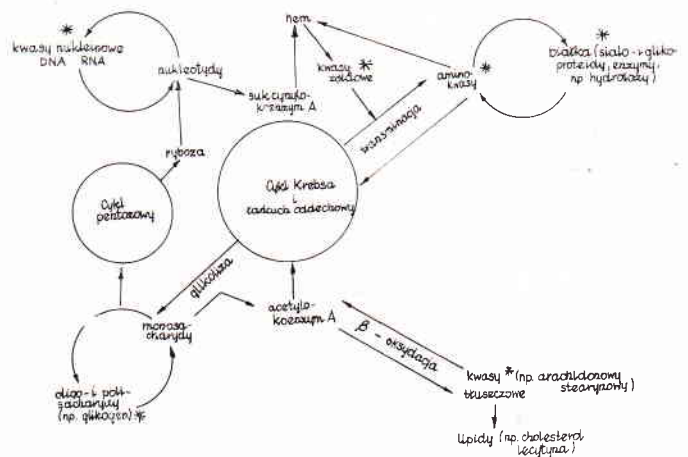
- - wzrost badanego parametru w odniesieniu do limfo-cyta prawidłowego
- - spadek badanego parametru w odniesieniu do limfo-cyta prawidłowego

Ryc. 2. Zawartość niektórych związków nisko- i wysokocząsteczkowych w limfocycie białaczkowym *in vitro* u by-dła w porównaniu z limfocytym prawidłowym

ENZYMY

Objaśnienia:

1. Gamma glutamylotransferaza (GGT), aldolaza (ALD), 5'-nukleo-tydaza (5'-NT)
2. Adenozyntrojfosfataza (ATP-aza-Ca²⁺ zależna), ATP-aza-Mg²⁺ zależna, fosfataza zasadowa (FZ)
3. Inhibitor papainy, inhibit trypsyny
INHIBITORY
GLIKOPROTEIDY
4. Histomukoid
GLIKOPROTEIDY
5. Kwas linolenowy, kwas linolowy
KWASY TŁUSZCZOWE
6. Kwas arachidonowy, kwas eikozenowy
KWASY TŁUSZCZOWE
7. Kwas glutaminowy, prolina, glicyna, histydyna
AMINOKWASY
8. Waina, leucyna, arginina
AMINOKWASY
9. Cholesterol
LIPIDY OBOJĘTNE
10. AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA WOBEC KAZEINY
LIPIDY OBOJĘTNE



Ryc. 3. Miejsca zmian ilościowych związków nisko- i wy-sokocząsteczkowych w niektórych ciągach metabolicznych limfocytów białaczkowych *in vivo* i *in vitro* u zwierząt

w integralności tych błon odgrywa m.in. cholesterol. Wykazano, że w wyniku transformacji nowotworowej może dochodzić do zaburzeń w aktywności reduktazy beta-hydrokso-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA) — klu-

czowego enzymu regulującego szybkość biosyntezy cholesterolu (7, 12). W warunkach fizjologicznych aktywność HMG-CoA jest hamowana przez kwasy żółciowe i cholesterol w wyniku inaktywacji enzymu już istniejącego oraz inhibicji procesu syntezy reduktazy *de novo* (13).

U myszy z białaczką limfatyczną L 1210 wykazano (33), że poziom cholesterolu rośnie w miarę rozwoju procesu nowotworowego. Zjawisko to wydaje się być zrozumiałe w świetle danych mówiących o tym, że w komórkach nowotworowych nie dochodzi do represji reduktazy HMG-CoA. Zaburzenia represji HMG-CoA w białaczkach u myszy są prawdopodobnie spowodowane obniżeniem przez cholesterol syntezy nowej reduktazy, względnie pobudzenia syntezy enzymów powodujących degradację istniejącego enzymu.

Kwasy żółciowe są końcowym produktem katabolizmu cholesterolu. Przemiana tego lipidu w kwasy żółciowe zachodzi w siateczce cytoplazmatycznej przy współudziale mikrosomalnego układu utleniającego, tj. cytochromu P-450, reduktazy cytochromu, NADPH⁺, O₂ i witaminy C (13, 49).

Wzrostowi poziomu cholesterolu u zwierząt białaczkowych towarzyszy podniesienie się ilości kwasów żółciowych, co wskazuje na równoległe przebiegającą, wydatną syntezę obu wymienionych związków. Zjawisko to należy prawdopodobnie wiązać z obniżeniem aktywności reduktazy HMG-CoA, być może na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

IV. Kwasy nukleinowe (DNA, RNA) oraz glikogen

W komórkach wielu nowotworów obserwuje się wzrost szybkości syntezy RNA, aktywności enzymów związanych z tym procesem, tj. kinazy urydylowej i polimerazy RNA, jak również zwiększenie ilości pobranych z otoczenia prekursorów RNA — cytydyny i urydyny. Procesowi temu towarzyszy wzrost syntezy DNA i enzymów regulujących, tj. polimerazy DNA, kinazy tymidylanowej oraz nieswoistych fosfomonoesteraz. Wzrost syntezy kwasów nukleinowych w komórkach nowotworowych uważany jest zatem za wynik zwiększenia aktywności kluczowych enzymów heksozomonofosforanowych oraz biosyntezy puryn i pirymidyn, a także obniżenia ich wrażliwości na inhibitory działające na zasadzie sprzężenia zwrotnego i spadku aktywności enzymów procesu degradacji puryn i pirymidyn (7).

Niektórzy uważają nawet, że białaczka jest „chorobą DNA” (46). Tłumaczy się to faktem, że błędy w polimeryzacji nici DNA są kopiowane w procesie kolejnych replikacji tego kwasu, co może wywołać mutację i w konsekwencji prowadzi do leukemogenezy. Np. o wzroście ilości kwasów nukleinowych w limfocytach krwi krów białaczkowych donoszą Nikitienko (42) i Sviridow (61).

Ostatnio duże zainteresowanie budzi rola RNA w jąderkach limfocytów (20, 39). Wykazano bowiem, że gotowość limfocytów do odpowiedzi immunologicznej zależy od obecności w nich jąderka zdolnych do syntezy RNA (16, 20, 46). W limfocytach są trzy postacie jąderka: aktywne (złożone), pierścieniowe oraz mikrojąderka (46, 56), przy czym wiadomo, że zachodzi ścisła zależność między zdolnością jąderka do syntezy RNA a ich postacią morfologiczną (20, 39). Jąderka aktywne charakteryzują się aktualną syntezą RNA, pierścieniowe — odwracalną inhibicją tego procesu, w mikrojąderkach zaś ma miejsce całkowite zahamowanie syntezy kwasu nukleinowego. W badaniach nad zachowaniem się jąderka limfocytów krwi w chorobach proliferacyjnych

obserwowano zmiany w udziale procentowym poszczególnych form (39). Między innymi w białaczkach limfatycznej u ludzi stwierdzono wzrost ilości limfocytów z jąderkami aktywnymi (54). Nie znana jest natomiast zmienność omawianych struktur w limfocytach narządowych, objętych procesem białaczkowym.

Badania własne (26) pozwoliły na stwierdzenie, że u myszy z przeszczepialną białaczką L 1210 dochodzi w miarę rozwoju nowotworu do wyraźnego wzrostu udziału limfocytów narządowych z jąderkami pierścieniowymi, przy dużym spadku ilości komórek z mikrojąderkami i jąderkami aktywnymi. Przy założeniu, że zmianie aktywności komórek towarzyszy zmiana morfologii niektórych jej struktur, np. jąderka, można sądzić, że w trakcie proliferacji nowotworowej u myszy dochodzi do pobudzenia komórek limfoidalnych. Przemawia za tym wzrost liczby limfocytów z jąderkami pierścieniowymi, przy czym należy zaznaczyć, że nie oznacza to jeszcze wzrostu aktywnej syntezy RNA w jąderku, a jedynie wskazuje na stan ich gotowości. Podobne zjawisko, tj. wzrost ilości komórek z jąderkami pierścieniowymi, a spadek liczby komórek z mikrojąderkami, obserwowała Matejkova (39) w limfocytach krwi szczerów w początkowej fazie proliferacji *Yoshida ascites sarcoma*.

Podczas przekształceń limfocytów źródłem energii dla przemian biochemicznych są procesy glikolityczne, biorące swój początek od glikogenu i glukozy z wytworzeniem kwasów pirogronowego i mlekowego. Nasilenie procesów glikolitycznych obserwuje się od chwili rozpoczęcia pobudzenia limfocytów. Równocześnie notuje się nasilenie przemian cyklu pentozowego, wzrost aktywności LDH oraz wzmocnienie wytwarzania zredukowanego NADP i NAD (7).

W chorobach limfoproliferacyjnych u ludzi, tj. w białaczkach limfatycznej i ziarnicy złośliwej obserwowano wyraźny wzrost ilości glikogenu w limfocytach (62). Podobne zjawisko notowali w limfocytach białaczkowych krwi była m.in. Słowik i Barnecki (55) oraz Nikitienko (42).

Wzrost ilości glikogenu w limfocytach białaczkowych nie zawsze musi być oznaką wzrostu nowotworowego, ale przedstawia ogólny objaw wzmoczonej przemiany materii w tych komórkach. Niemniej można wykazać, że komórki białaczkowe mają zwiększoną aktywność glikolityczną, konieczną do rozrostu nowotworowego (62). Aktywacja procesów glikolitycznych połączona jest ze zmianami, jakie zachodzą w lizosomach. Wśród enzymów, których uwolnienie aktywuje glikolizę, wymienia się m.in. LDH i SDH, co przedstawiono już w poprzedniej pracy (32).

Badania limfocytów białaczkowych *in vitro* u bydła

I. Przemiana białkowa i węglowodanowa

Z chwilą uzyskania możliwości obserwacji komórek *in vitro* zakres doświadczeń przeprowadzonych na komórkach żywych został wyraźnie poszerzony. Izolowane komórki stanowią dogodny materiał do bezpośredniego badania wpływu różnych czynników onkogennych, np. fizycznych, chemicznych czy wirusowych (wirus BLV), a także zachodzących w nich zmian biochemicznych z wyłączeniem ogólnoustrojowych procesów regulacyjnych (31).

Jednym z istotnych mechanizmów obronnych ustroju jest biologiczna aktywność limfocytów, stanowiąca odpowiedź organizmu na obecność substancji o cechach antygenowych, np. pochodzenia wirusowego (wirus

BLV). Osłabienie zdolności limfocytów do aktywacji świadczy o zmniejszeniu obronności organizmu i spotykane jest głównie w nowotworach układu limfatycznego, tj. w białaczce, ziarnicy złośliwej, mięsaku limfatycznym, mięsaku siateczki i plazmocytoma (51, 52).

W badaniach własnych obserwowano w limfocytach białczkowych *in vitro* u bydła wyraźny wzrost aktywności aldolazy (ALD) — enzymu biorącego udział w reakcji ciągu glikolitycznego. Wzrost aktywności enzymu obserwowano także w surowicy jak i samej tkance nowotworowej w większości przypadków takich nowotworów, jak: rak żołądka, prostaty, jelita grubego, rak przerzutowy wątroby i rakach układu moczowo-płciowego i to zarówno u ludzi, jak i zwierząt (8, 51). Takie zachowanie się aldolazy tłumaczy się derepresją genów płodowych typów enzymu (52).

Oprócz zaburzeń metabolicznych cukrowców obserwowano w limfocytach białczkowych *in vitro* u bydła także istotne uszkodzenie przemiany białkowej tych komórek (ryc. 2). Manifestowało się to wzrostem stężenia obu badanych inhibitorów, tj. inhibitora papainy i inhibitora trypsyny oraz wzrostem aktywności gamma-glutamylotransferazy (GGT), spadkiem natomiast aktywności proteolitycznej wobec kazeiny i obniżeniem stężenia histomukoidu.

Interesujący jest wzrost stężenia inhibitorów papainy i trypsyny, związanych z enzymami rozszczepiającymi IgG na 3 fragmenty — 2 fragmenty Fab i fragment Fc. Fragmenty Fab posiadają miejsca łączenia się przeciwciała z antygenem, zaś fragment Fc nie ma znaczenia dla swoistości przeciwciała.

Ciekawie zachowuje się także GGT — enzym katalizujący przeniesienie grupy gamma-glutamylowej z gamma-glutamylowego donora na odpowiedni akceptor, którym może być peptyd lub aminokwas. Można przyjąć, że wzrost aktywności GGT świadczy o znacznych zmianach we wchłanianiu aminokwasów i peptydów poprzez błony komórkowe limfocytów białczkowych *in vitro* u bydła.

Fiala i wsp. (11) obserwowali wzrost aktywności GGT w guzach wywołanych doświadczalnie 2-metylo-hydrazyną, a także w raku jelita grubego u człowieka. Podobnie Beck i wsp. (2) oraz Steele i wsp. (60) notowali wzrost aktywności GGT, a także ALD w surowicy krwi osób z przerzutowym rakiem jelita grubego do wątroby.

Badając aktywność aryloamidazolową wobec siedmiu beta-naftyloamidów L-aminokwasów stwierdzono istotny spadek aktywności AlaBNA (alanylo-beta-naftyloamidu) w limfocytach białczkowych *in vitro*, w porównaniu z komórkami normalnymi. Najwyższą aktywność aryloamidazolową oznaczano wobec PhBNA (fenyloalanylo-beta-naftyloamidu), a następnie AlaBNA i LeuBNA (leucylo-beta-naftyloamidu). Spośród siedmiu substratów tylko wobec dwóch, tj. AlaBNA i LeuBNA wykazano niższą aktywność w materiale białczkowym, natomiast w stosunku do pozostałych wykazano o 13—15% wyższą aktywność (36).

Ostatnio uważa się, że zmiany metaboliczne komórki są raczej skutkiem transformacji nowotworowej niż jej przyczyną, niemniej badania aktywności enzymatycznej w komórkach nowotworowych ustroju obciążonego nowotworem rokuja nadzieję postępu w diagnostyce onkologicznej (47, 58). Przedstawione zaburzenia w przemianie białkowej i węglowodanowej w limfocytach białczkowych *in vitro* u bydła (ryc. 3) są pierwszą próbą wyjaśnienia przyczyn, charakteru i skutków metabolicznych obserwowanych zmian.

II. Kwasy tłuszczowe

W badaniach własnych u zwierząt z naturalną (22), a także przeszczepialną białczką limfatyczną (23, 24) wykazano istotny udział kwasów tłuszczowych (FA) w destabilizacji błon biologicznych komórek nowotworowych. Zdaniem Hopkinsa i Westa (15) nienasycone kwasy tłuszczowe (UFA) mogą sprzyjać muta- i onkogenezie, poprzez reakcje wolnorodnikowe i peroksydację lipidów błonowych. Z kolei Pande i Mead (43) uważają, że FA nagromadzone wewnątrzkomórkowo wpływają na zmianę estryfikacji fosfolipidów, efektem czego jest kumulacja lizofosfolipidów, które przez swój efekt detergentowy powodują destabilizację błon komórkowych i błon lizosomalnych.

W limfocytach białczkowych *in vitro* u bydła dochodzi (31), w porównaniu z limfocytami prawidłowymi, do wyraźnego wzrostu ilości kwasów: linolowego ($C_{18} = 2$) i linolenowego ($C_{18} = 3$), spadku natomiast ilości kwasu eikozenowego ($C_{20} = 1$) i arachidonowego ($C_{20} = 4$). Ciekawym zjawiskiem obserwowanym w limfocytach białczkowych *in vitro* jest wzrost ilości kwasu linolowego. Zdaniem Anthony (1) wzrost ilości tego kwasu może być źródłem nasilonej syntezy prostaglandyny PGE_1 . Prostaglandyna ta ma z kolei hamować uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów i odwrotnie, niedobór PGE_1 prowadzi do wzmożonego metabolizmu tego kwasu. Obniżenie się ilości kwasu arachidonowego w limfocytach *in vitro* może także świadczyć o wyraźnym zaburzeniu procesów beta-oksydacji zachodzących w komórkach stransformowanych nowotworowo.

Wykazano, że kwasy tłuszczowe są łatwo wbudowywane do fosfolipidów błonowych, np. błon trombocyta (59). Wbudowywanie to pobudza przemianę kwasu arachidonowego obecnego w fosfolipidach błon trombocyta, a także zmienia właściwości fizyko-chemiczne tej błony (3).

Notowana w badaniach własnych zmniejszona ilość kwasów tłuszczowych nienasyconych w limfocytach białczkowych *in vitro* wskazuje, że w komórkach stransformowanych nowotworowo może dochodzić do słabszego odwodorowywania kwasów UFA, aniżeli w limfocytach prawidłowych.

Udział UFA w onkogenezie jest zagadnieniem bardzo kontrowersyjnym. Uważa się, że kwasy tłuszczowe mogą sprzyjać indukcji takich nowotworów u ludzi i zwierząt jak: rak sutka, macicy, jajnika, prostaty, trzustki i okrężnicy (4—6, 9, 14, 15, 48, 65). Z kolei Tannenbaum (63) wykazał hamujący wpływ UFA na przeszczepialne białaczki *in vitro* u myszy AKR. Istnieją także doniesienia, informujące o tym, że zarówno kwasy tłuszczowe nasycone, jak i nienasycone działają inhibująco *in vitro* na takie nowotwory, jak: rak Ehrlicha, rak sutka T_3 i chłoniakomięsak 6 C_3 HED u myszy (17, 19).

III. Aminokwasy i cholesterol

Wykazano, że transformacja nowotworowa wpływa na zmianę mechanizmów regulujących aktywność niektórych dróg metabolicznych (40, 64). Np. w *hepatoma* Reubera u szczurów notowano przyspieszenie glikolizy, syntezy kwasów nukleinowych i kwasów tłuszczowych oraz wzrost zawartości cholesterolu i niektórych aminokwasów (7).

W limfocytach białczkowych *in vitro* u bydła obserwuje się wyraźny spadek ilości kwasu glutaminowego, proliny, glicyny, izoleucyny, leucyny i argininy, wzrost natomiast poziomu waliny i histydyny, w porównaniu z limfocytami normalnymi (35). Zjawisko to, podobnie

jak miało to miejsce w limfocytach *in vivo* u myszy białaczkowych, przemawia za znacznymi zaburzeniami w przemianie niektórych aminokwasów „gliko- i keto-gennych” i rozkojarzeniu cyklu kwasu cytrynowego (ryc. 3). Pełny opis zaburzeń metabolicznych wymienionych aminokwasów w limfocytach *in vitro* u bydła, przedstawiono we wcześniejszej pracy (35).

Jak wspomniano stałej wysokiej syntezie cholesterolu *in vitro* u myszy i bydła białaczkowego towarzyszy wydatna produkcja kwasów żółciowych. Wzrasta także poziom frakcji lipoproteidów o wysokiej gęstości związanych z cholesterolem (HDL-C) w osoczu zwierząt białaczkowych (34), co może prowadzić do wyraźnej aktywacji lipazy lipoproteinowej i enzymu estryfikującego cholesterol (44).

Wzrost poziomu cholesterolu notowano w limfocytach białaczkowych *in vitro* u bydła (35), co w kontekście wyżej opisanych zaburzeń ilości HDL-C wskazuje, że transformacja białaczkowa, bez względu na gatunek zwierzęcia, a także typ białaczki, tj. T lub B receptorowej, wpływa w istotny sposób na metabolizm cholesterolu w procesie onkogenezy.

Cholesterol łącznie z trójglicerydami występuje w połączeniach z kwasem arachidonowym, stanowiąc materiał budulcowy fosfolipidów błon komórkowych. Uwolnienie tego kwasu odbywa się przez aktywację fosfolipazy A_2C w obecności jonów Ca^{2+} (21) i ma miejsce w procesie białaczkowym. Wykazano bowiem spadek ilości kwasu arachidonowego u zwierząt białaczkowych (21, 23), co może świadczyć o hamowaniu uwalniania tego kwasu z fosfolipidów przez prostaglandynę PGE_1 (1). Istnieje zatem powiązanie przemiany cholesterolu, poprzez kwas arachidonowy, z metabolizmem niektórych aminokwasów, np. aminokwasów „glikogennych”, co potwierdzono we wcześniejszych badaniach własnych (35).

Ponadto zdaniem Fabrieanta i wsp. (10) niektóre wirusy, np. MDV (Marek's disease herpesvirus) same mogą powodować zmiany w metabolizmie lipidów, co manifestuje się nadmierną kumulacją w komórkach nie tylko cholesterolu, ale także tłuszczowych.

Reasumując można stwierdzić, że błonv komórkowe limfocytów białaczkowych *in vitro* u bydła ulegają wyraźnej destabilizacji pod wpływem wyżej wymienionych związków, jak również kwasów tłuszczowych, co sprzyja prawdopodobnie „prowokacji” różnych nowotworów i kokancerogenów oraz wnikaniu do komórki leukemowirusa, np. BLV.

IV. Enzymy błonowe

W procesie onkogenezy zachodzą zmiany w obrębie błony komórkowej, które doprowadzają m.in. do zaburzeń w transporcie niektórych jonów oraz aktywności pewnych enzymów (7).

W błonach komórkowych limfocytów białaczkowych *in vitro* u bydła obserwuje się spadek aktywności ATP-azy- Ca^{2+} zależnej oraz słabiej zaznaczone obniżenie się aktywności ATP-azy- Mg^{2+} zależnej (38). Spadek ATP-azy w błonach komórkowych *in vivo* u myszy stwierdził Sobiech i wsp. (57) w takich nowotworach przeszczepialnych, jak: białaczka limfatyczna L 1210, L 1210/ara-C, L 1210/ CH_3 G, chłoniaku AKSL-4 i plazmocytoma ADJPC-5. Podobnie obniżenie się aktywności tego enzymu w błonach biologicznych komórek białaczki L 1210 u myszy w obrazie ultrastrukturalnym opisali Madej i Kuryszko (28, 29).

ATP-azy są zaangażowane w wiązaniu i transporcie jonów wapniowych poprzez błonę komórkową. W komórce stężenie Ca^{2+} jest kontrolowane przez ATP-azę-

Ca^{2+} zależną i odwrotnie, jony wapniowe w połączeniu z kalmoduliną regulują aktywność tego enzymu (18). Można zatem przyjąć, że duży napływ wapnia, obserwowany w limfocytach białaczkowych *in vitro* u bydła (38), rozdziela kompleks kalmodulina — wapń, co utrudnia lub uniemożliwia jego działanie jako aktywatora ATP-azy- Ca^{2+} zależnej. Mechanizm regulacji wapnia uzależniony jest także od aktywności ATP-azy- Mg^{2+} zależnej, poziom której — jak już wspomniano — był tylko nieznacznie obniżony w porównaniu z limfocytami prawidłowymi (38).

Opisanym zmianom ATP-az towarzyszy wyraźny wzrost aktywności 5'- nukleotydu (5'- NT) na powierzchni limfocytów białaczkowych, z czym związana jest prawdopodobnie utrata właściwości inhibicji kontaktowej tych komórek (50). Wysoka aktywność tego enzymu sprzyja prawdopodobnie także wzmożonemu rozwojowi populacji komórek białaczkowych, na skutek dostarczania prekursorów kwasów nukleinowych, np. puryn (18). Notowano również w limfocytach białaczkowych u bydła spadek aktywności fosfatazy zasadowej (FZ), jako wynik czynnościowej i morfologicznej niedojrzałości tych komórek, gdyż prawidłowemu różnicowaniu ich towarzyszy znaczna aktywność tego enzymu. Niska aktywność FZ w ww. komórkach świadczy o zaburzeniu w przepuszczalności ich błon komórkowych i jest najprawdopodobniej powodem nadmiernego gromadzenia się w nich jonów Ca^{2+} (38).

Podsumowując można stwierdzić, że limfocyty białaczkowe *in vitro* u bydła charakteryzują się spadkiem aktywności ATP-azy i FZ, wzrostem zaś 5'- NT, czemu towarzyszy podniesienie się poziomu jonów Ca^{2+} i obniżenie jonów Mg^{2+} . Procesy te prawdopodobnie podlegają sprzężeniu zwrotnemu, tzn. ilość kationów Mg^{2+} i Ca^{2+} wpływa modelująco na aktywność ATP-azy i FZ i odwrotnie. Efektem jest otwieranie się kanałów wapniowych z następową cytoplazmatyczną hiperkalcemią (38). Może to mieć pewne znaczenie w zmianie przepuszczalności i elastyczności błony komórkowej i w następstwie także w penetracji wirusów, np. BLV do wnętrza komórki.

Niezależnie od tego wykazano, że w limfocytach dokonuje się biotransformacja i detoksykacja różnych związków chemicznych, w tym onkogennych nitrozamin, benzoantracenu i benzopirenu (7). Reakcje te uzależnione są od obecności takich enzymów, jak np. kwaśne hydrolazy, dehydrogenazy, lipazy czy cAMP.

W pracy wykazano istnienie u zwierząt dużych różnic ilościowych w poziomie różnych metabolizowanych związków nisko- i wysokocząsteczkowych między limfocytami białaczkowymi a limfocytami prawidłowymi i to zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (ryc. 1 i 2). Upoważnia to do stwierdzenia, że białaczkę limfatyczną u zwierząt można traktować jako „maximal metabolic deviation tumor”, tj. nowotwór wykazujący duże różnice metaboliczne w porównaniu z tkanką macierzystą.

W limfocytach białaczkowych procesy metaboliczne przebiegają żywiej niż w komórkach prawidłowych, co sugeruje, że szybkość produkcji entropii jest wprost proporcjonalna do metabolizmu komórek nowotworowych (32). Dokonano także porównania między wzmożonym metabolizmem limfocytów białaczkowych a intensywnym rozwojem komórek w okresie embriogenezy i wysunięto przypuszczenie, że nowotwór jest przykładem „odwrócenia” zjawisk ewolucyjnych w sensie termodynamicznym (32). Z kolei świadomości o metabolizmie limfocytów pozwalają na stwierdzenie, że tkanka białaczkowa ma charakter embrionalny nie tylko w po-

jęciu biotermodynamicznym, ale także biochemicznym, czyli białaczka może być stadium zablokowanej ontogenezy. Obserwowano bowiem, że wraz z cofnięciem się ontogenezy w tkance nowotworowej zmienia się typ oddychania, tj. notuje się wzrost beztlenowej glikolizy, co odpowiada wczesnym stadium tkanki embrionalnej (53). Jest to więc powrót do archaicznej postaci uwalniania energii przez fermentację.

Piśmiennictwo

1. Anthony M.: Cephalgia 1, 83, 1981.
2. Beck H. P., Beljied A., Spooner R., Blumgort L. H.: Cancer, Philad. 43, 1772, 1979.
3. Bloch K., Vance D.: A Rev. Biochem. 46, 263, 1977.
4. Brotman S. A., Vitale J. J., Vavrousch-Jakube F., Gottlieb L. S.: Cancer, Philad. 40, 2455, 1977.
5. Carrol K. K., Khor H. T.: Prog. Biochem. Pharmacol. 10, 308, 1975.
6. Carrol K. K.: J. Environ. Pathol. Toxicol. 3, 253, 1980.
7. Criss W. R., Pradhan T. K.: In: control mechanisms in cancer. Raven Press. New York, 401-410, 1976.
8. Dali R. A.: Clinica Chim. Acta 11, 547, 1985.
9. Eniç M. E., Munn R. J., Keeney M.: Fedn Proc. 37, 2215, 1987.
10. Fabricant C. G., Hajjar D. P., Mimich C. R.: Fedn Proc. 29, 110, 1980.
11. Fida S., Tront E., Pregani B.: Lancet 1, 1145, 1979.
12. Gibson D. M., Ingebriten T. S.: Life Sci. 23, 2649, 1978.
13. Ginter E.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 258, 410, 1975.
14. Hill M. J.: Proc. Nutr. Soc. 40, 15, 1981.
15. Hopkins G. J., West C. E.: Life Sci. 19, 1103, 1976.
16. Ivanyi D., Ivanyi P.: Fol. biol. (Praha) 15, 354, 1969.
17. Jacobs L. R.: Am. J. clin. Nutr. 37, 361, 1983.
18. Kawiak J. (red.): Podstawy cytotologii. Warszawa, 1985.
19. Kigoshi S., Ito R.: Experimentia 29, 1408, 1973.
20. Kopeć J., Sitarska E., Leszko B.: Arch. Immun. Ther. 31, 48, 1983.
21. Kraus-Filarska M.: Post. hig. 39, 376, 1985.
22. Madej J. A.: Weterynaria. Wrocław 33, 5, 1982.
23. Madej J. A., Kaszubkiewicz C., Szymczak J.: Medycyna Wet. 39, 110, 1983.
24. Madej J. A., Szymczak J.: Medycyna Wet. 41, 691, 1985.
25. Madej J. A., Kaszubkiewicz C.: Medycyna Wet. 42, 30, 1986.
26. Madej J. A., Graczyk S., Kuryszko J., Stowik J.: Pol. Arch. wet. 26, 87, 1986.
27. Madej J. A.: Medycyna Wet. 42, 259, 1986.
28. Madej J. A., Kuryszko J.: Arch. exp. VetMed. 6, 939, 1986.
29. Madej J. A., Kuryszko J.: Arch. exp. VetMed. 3, 419, 1988.
30. Madej J. A.: Medycyna Wet. 44, 140, 1988.
31. Madej J. A., Szymczak J., Klimentowski S.: Folia histoch. Cytobiol. 2, 83, 1988.
32. Madej J. A.: Medycyna Wet. 44, 352, 1988.
33. Madej J. A., Kaszubkiewicz C., Jopek Z.: Weterynaria, Wrocław 172, 109, 1988.
34. Madej J. A., Jopek Z.: Zeszyty Naukowe, Weterynaria, Wrocław (w druku).
35. Madej J. A., Klimentowski S., Miśkiewicz J.: Arch. exp. VetMed. (w druku).
36. Madej J. A., Klimentowski S., Sobiech K. A.: Arch. exp. VetMed. (w druku).
37. Madej J. A.: Medycyna Wet. (w druku).
38. Madej J. A.: Pol. Arch. wet. (w druku).
39. Matejkova E.: Fol. biol., (Praha) 21, 349, 1975.
40. Mertin J., Hugges D., Shenton B. Y., Dickinsen J. P.: Klin. Wschr. 52, 247, 1974.
41. Mishra N. K., Di Mayorea G.: Biochim. biophys. Acta 355, 205, 1975.
42. Nikitienko A. M.: Veterinarija, Moskwa 6, 41, 1976.
43. Pande S. V., Mead J. F.: J. biol. chem. 23, 6180, 1968.
44. Philips M. S., McLern L. R., Stoudt G. W., Rothblat G. H.: Atherosclerosis 36, 409, 1980.
45. Puro H. C.: A Rev. Med. 30, 25, 1979.
46. Potmesil M., Smetana K.: Fol. biol., (Praha) 15, 300, 1969.
47. Przewoźki T.: Pat. Pol. 1, 39, 1980.
48. Reddy B. S.: Cancer Res. 41, 3600, 1981.
49. Rodwell V. W., Nordstom J. L., Mitschelon J. J.: Adv. Lipid Res. 14, 1, 1976.
50. Roseman S.: Chem. phys. Lipids 5, 270, 1980.
51. Rupniewska Z. M., Kurowska M.: Pol. Tyg. lek. 35, 455, 1980.
52. Schwarz M. K.: Clinica Chem. 19, 10, 1973.
53. Sodiak W.: Zesz. Nauk. KUL 1, 57, 1962.
54. Sitarska E., Kopeć J., Graczyk M.: Medycyna Wet. 37, 42, 1982.
55. Stowik J., Barnecki W.: Weterynaria, Wrocław 29, 225, 1972.
56. Smith L. C., Pownall H. J., Gotto A. M.: Am. Rev. Biochem. 47, 751, 1978.
57. Sobiech K. A., Madej J. A., Fiszer-Maliszewska E., Mazurkiewicz M.: Arch. Immun. Ther. 34, 35, 1986.
58. Sobiech K. A., Słowińska R., Madej J. A., Mazurkiewicz M.: Folia histoch. Cytobiol. 24, 61, 1987.
59. Spector A. A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 768, 1938.
60. Steele L., Cooper E. H., Mackay A. M., Lasowsky M. S.: Br. J. Cancer. 30, 319, 1974.
61. Spiridow W. D.: Veterinarija, Moskwa 10, 52, 1970.
62. Szmidtowski S., Litwin J., Zupańska B., Królikowska J.: Post. Hig. 1, 19, 1965.
63. Trautenberg A.: Cancer Res. 2, 468, 1982.
64. Weber G., Jackson R. C., Williams J. C., Goulding F. J., Ebert T. J.: Adv. Enzyme Regul. 15, 53, 1977.
65. Weuman C., Belin J., Smith A. P., Thomson R. H. S.: Lancet 2, 37, 1975.

Adres autora: doc. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław

MARIAN GRUNDBOECK, JADWIGA GRUNDBOECK-JUŠKO*,
EWA BUZAŁA, MARIA SZCZOTKA, JAN RULKA

Próby uodpornienia zwierząt przeciw wirusowi enzootycznej białaczki bydła (EBB). II. Szczepienia przy użyciu komórek utrwalonych formaliną lub aldehydem glutarowym

Pracownia Patologii Komórkowej i * Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii,
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Attempts of immunization of animals against bovine leukosis virus (BLV). II. Vaccination with formalin- or glutaraldehyde fixed cells

FLK cells persistently infected with BLV were used for the preparation of two vaccines. One contained the formalin-fixed cells (FORM vaccine) and another the cells treated with glutaraldehyde (GLUT vaccine). The concentration, temperature and time of action of the fixatives were different. It was stated that the vaccine FORM elicited the formation of antibodies for the gp antigen of BLV which persisted in the serum not longer than 75 days. The prolongation of this time could be achieved by means of revaccination of animals or by injection of an appropriate dose of BLV. The resistance acquired due to the vaccination could be overcome by a large dose of BLV. Since the vaccine had only a limited capacity to control the horizontal transmission of the virus, therefore, it could not be recommended for practical use. The vaccine GLUT proved to be ineffective. The effectiveness of the both preparations was compared with that one prepared previously from BLV treated with UV rays.

Użycie oczyszczonych cząstek wirusa EBB jako materiału do sporządzenia szczepionki przeciw temu wirusowi jest rzadko stosowane (1, 5). Wprawdzie uzyskane w ten sposób preparaty zawierają stosunkowo mało nieswoistych białek, jednakże metoda ta jest pracochłonna, a zatem kosztowna. Częściej używa się do tego celu płynu z nad hodowli komórek FLK (2, 3) lub analogicznego płynu z nad hodowli innych komórek zakażonych omawianym wirusem (6, 7), a niekiedy nawet całych komórek linii FLK lub fibroblastów transformowanych przy użyciu wirusa EBB (4).

Dlatego też po przeprowadzonych przez nas próbach uodpornienia owiec cząstkami wirusa, poddany działaniu promieni ultrafioletowych (1), podjęto badania immunogennej wartości całych komórek, zawierających inaktywowany wirus EBB. Dwa doświadczenia na ten temat, z użyciem komórek FLK-BLV, są przedmiotem niniejszej pracy.