

„BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK ÉS TRANSPORT-FOLYAMATOK IV.” KONFERENCIA

Tihany, 1974. szeptember 3–6.

AZ EXOCITÓZIS MINT A HORMONÜRÍTÉS EGY LEHETSÉGES MECHANIZMUSA

BENEDECZKY ISTVÁN

Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Kórbonctani Intézete

I. Bevezetés

A sejtanyagcsere két alapvető folyamat; anyagfelvétel és -leadás dinamikus egyensúlya révén megy végbe. Az anyagfelvétel változatos formái: permiáció, aktív transzport, fagocitózis, pinocitózis ismeretesek, ezek azonban jelentősen különböznek egymástól.

Eltekintve az aktív transzport és a permiáció útján végbemenő anyagfelvételi formák tárgyalásától megállapíthatjuk, hogy az újabb irodalmi munkákban jelentős erőfeszítések történtek az egységes nomenklatúra kialakítására. Mindenekelőtt a fagocitózis és pinocitózis felszínes különbségeitől tekintettek el és a lényegében azonos folyamat megjelölésére, az endocitózis elnevezést vezették be [21]. Lényegét tekintve az endocitózis szilárd vagy folyékony anyagok sejtbe történő felvételét jelenti a plazmamembrán invaginálódása és befűződése révén. Szigorúan véve az endocitózis fogalmi körébe csak ez a mozzanat tartozik, tágabb értelemben véve azonban a felvett anyag további sorsa is az endocitózis folyamatához sorolható. Általánosságban a fordított irányú folyamatot, azaz membránnal határolt sejtreszecskek sejtből történő kijuttatását (a membrán visszahagyásával) *nevezzük exocitózisnak*. Ezt az elnevezést ugyancsak DE DUVE vezette be 1963-ban [21] és magában foglalja a mirigysejtek szekréciós, illetve extrúziós tevékenységét és egyéb sejtfeleségek általános extrúziós tevékenységét, amely a plazmamembrán és a kijuttatandó részecske határoló membránjának fúzióját involválja.

Tárgyalásunk folyamán a belső elválasztású mirigyek exocitózisát helyezzük előtérbe, minthogy legalaposabban ez a terület tisztázott, egyes esetekben azonban más sejtfeleségekre vonatkozó adatokat is figyelembe veszünk.

II. Exocitózis a belső elválasztású mirigyekben

Az, hogy egy adott mirigysejt milyen mechanizmus igénybevételével üríti ki a megtermelt szekrétumot, alapvetően függ attól, hogy a sejten belül van-e szekrétum tárolás, avagy nincs? Még két évtizeddel ezelőtt is alapvető ismeretek hiányoztak ezen a téren, s a mirigysejtek extrúziós folyamatára

nézve erősen spekulatív elméletek voltak csak fellelhetők. Viszonylag jól tisztázott a kivetelő csővel rendelkező, külső elválasztású mirigyek szekrációs mechanizmusa, ahol: merocrin-, apocrin és holocrin típusú ürítési módok ismeretesek. Viszonylag jól tisztázott a hízósejtek degranulációs folyamata is [41, 53, 54].

Az endokrin szövetekben szintetizált hormonok, a közelmúltban használt kézikönyvek klasszikus definíciója szerint közvetlenül a vérbe jutnak. Ez a végtelenül leegyszerűsített séma már csak azért sem helytálló, mert pl. a pajzsmirigy folliculusok lumenében jelentős és tartós hormontárolás van. Hormontárol a legtöbb belső elválasztású mirigysejt és maga a vér is.

A vérben levő hormontárolás a plazmafehérjékkel kapcsolatos, a kortizon és tiroxin pl. specifikus hormontároló fehérjéhez kötődik. A hormonürítés bonyolult folyamata nem érthető meg a hormontárolás legfontosabb mozzanatainak ismerete nélkül, ezért erről részletesebben kell szólni.

A hormontárolás tekintetében az egyes endokrin mirigyek (szövetek) között óriási különbségek vannak. A már említett (emberi) pajzsmirigyben 2–3 hónapra elegendő mennyiségű hormon is tárolódhat. Ezzel szemben a mellékvesekéreg csak oly kis mennyiségű kortizont tárol, amit 1 1/2 perc alatt szecernál. SMITH szerint [60] az endokrin szövetek a hormontárolás tekintetében 3 főcsoportra oszthatók:

1. Az ún. „non-storing” szövetek (mellékvesekéreg, ovárium, tesztisz), ahol a hormontárolás turnover 3–18 perc.
2. Szövetek, ahol a tárolás extracelluláris (pajzsmirigy, a jódtárolás 1–3 hónap, a tiroxiné 1 nap).
3. Szövetek, ahol a hormontárolás intracelluláris pl. az adenohipofízis

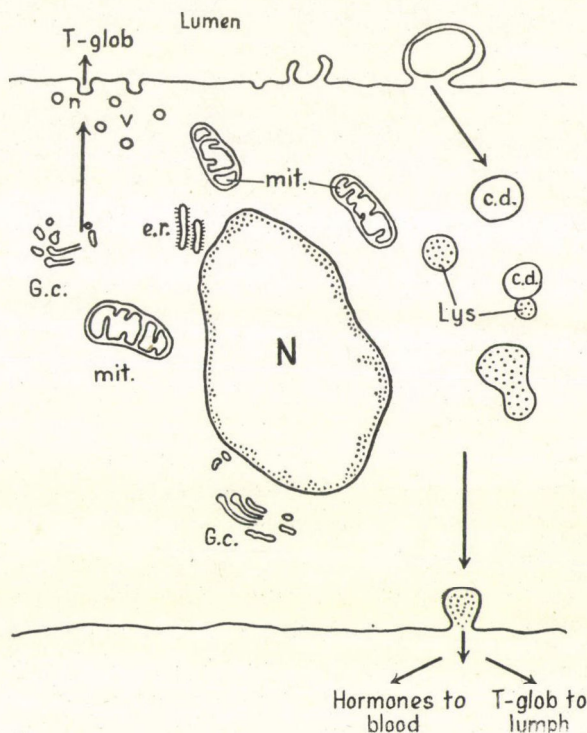
ACTH-jának turnover	20 nap
a mellékvese adrenalinjának turnover	33 nap
pankreász inzulinjának turnover	4 nap.

1. „Non-storing” szövetek hormontárolása

Mint említettük, a szteroid szecernáló mirigysejtek igen kevés hormontárolnak, ugyanakkor azonban nagy mennyiségű prekuzort, pl. koleszterint tárolhatnak. A koleszterin észterek mennyisége a petefészekben, ill. mellékvesében elérheti a nedves súly 7%-át is [14, 15]. Elektronmikroszkópos és autoradiográfiás [14, 36, 47], valamint sejtfractionációs vizsgálatok [14] szerint a prekuzor koleszterin membrántól határolt „lipid cseppek” formájában tárolódik a mirigysejtek citoplazmájában. Aktívan szecernáló mirigyek esetében a lipidcseppek száma jelentősen lecsökken [7, 31, 44]. A szteroidok bonyolult szintézisére itt most nem térhetünk ki, a kész hormonok extrúziója szempontjából az exocitózis gyakorlatilag nem jöhet szóba, mivel szekrációs granulomok a szteroidtermelő mirigysejtekben nem képződnek.

2. Extracelluláris hormontárolás

A pajzsmirigy egyedülálló a belső elválasztású mirigysejtek között, mert mint említettük, hormontárolása a sejten kívül megy végbe. Említésre méltó, hogy a pajzsmirigy hormonok, alacsonyabb rendű gerinctelenekben exokrin mirigyek által szecernálódnak, melyek nyílásai a gyomor-bél traktusba szájadzanak. Az emberi pajzsmirigy által fenntartott nagy mennyiségű „tárolt hormon” megszabja a mirigy sajátos „hormonürítési” mechanizmusát, mely exokrin és endokrin sajátosságokat egyaránt magában foglal. LEBLOND és



1. ábra. A pajzsmirigy folliculáris sejtjeinek exokrin és endokrin funkcióját bemutató vázlat. A. D. SMITH közleményéből

munkatársai [66] vizsgálatai szerint a thyreoglobulin szintézise a folliculáris sejtek citoplazmájában a durva felszínű endoplazmás retikulumban megy végbe. Itt kapcsolódik a fehérje komponenshez a mannoz is. A „félkész” glükoprotein a Golgi apparátusba kerül, ahol a galaktóz is beépül és szekréciós granulumok is kialakulnak. A mintegy 1000 Å átmérőjű szekréciós szemcsék a sejtfelszínre migrálnak, s tartalmukat exocitózis révén a folliculus lumenbe juttatják [64] 1. ábra.

A jódbeépülés pontos helye nem ismeretes, lehetséges, hogy a sejtmem-

ránon, ill. a kolloidban megy végbe. A fenti folyamat a folliculáris sejtek szekréciós tevékenységének exokrin fázisát képviseli. Az endokrin funkció a kolloidcseppek endocitózisával kezdődik a lumenből a citoplazmába. A folliculáris sejtek apikális plazmamembránja tehát endo- és exocitózisra egyaránt képes. Az endocitózis folyamán a kolloid cseppek a lizoszómákkal kerülnek szoros kontaktusba, s bennük a hidrolitikus enzimek (savanyú foszfatáz) jelenléte mutatható ki. A jelenlegi felfogás szerint tehát a kötött hormonok lizoszomális enzimtevékenység révén válnának szabaddá [60].

Sajnos, a kész hormonok vérbe történő ürítését azaz az exocitotikus fázist eddig elektronmikroszkópos ábrákon még nem sikerült demonstrálni. Az a tény azonban, hogy itt egy nagy molekulásúlyú (680 000) anyag ürítéséről van szó, amellett szól, hogy a legvalószínűbb extrúziós mód az exocitózis lehet.

3. Intracelluláris hormontárolás

Az endokrin szövetek harmadik típusában a hormonok intracitoplazmatikusan, membránnal határolt szemcsékben, ill. vezikulákban tárolódnak. A tároló részecskék kis mérete nehezítette felismerésüket és funkciójuk megértését egyaránt. A centrifugálási technika széles körű alkalmazása tette lehetővé ezen szubcelluláris részecskék izolálását; s elsőként a hipofízis elülső lebenyhormonját, a gonadotropint sikerült egy centrifugált sejtfrakcióban kimutatni [46]. Ezt követően a hormonok egész sorát identifikálták különböző szövethomogenátumok centrifugált frakcióiból [60]. A biokémiai vizsgálatokkal nagyjából egyidőben már folytak azok az elektronmikroszkópos vizsgálatok [52, 56], melyek eredményeként ultrastrukturális szinten is bizonyítást nyert a hormontároló részecskék, az ún. szekréciós szemcsék létezése. A szóban levő részecskék mérete a különböző szövetek sejtjeiben tág határok között 1000–4000 Å változott. Az elektronmikroszkópos vizsgálat önmagában nem tudta igazolni a szekréciós szemcsék hormontartalmát, s ez csak a differenciál centrifugálásos vizsgálatokkal való kombináció révén vált lehetségessé. Ennek eredményeként számos szövethomogenátumból előállították a viszonylag „tisztá” hormontartalmú granulom frakciókat, s a párhuzamos elektronmikroszkópos vizsgálatok pedig a szóban levő szövetek sejtjeiben — „in situ” is igazolták a hormontároló szekréciós szemcsék jelenlétét, így pl. mellékvese velőben [10, 61, 65], hipofízis első lebenyben [45], hipofízis hátsó lebenyben [20] és pankréaszban [35].

Fenti vizsgálatok egyértelműen tisztázták, hogy a hormonok egy jelentős része szubcelluláris részecskékben tárolódik. Felmerül azonban a kérdés, hogyan képesek ezek a részecskék a koncentráció gradienssel szemben viszonylag nagy mennyiségű hormont megkötni? A kérdés megválaszolása külön fejezetet igényel, a hormonok kiürítése — tehát maga az exocitózis is csak ezen mechanizmus kellő ismeretében érthető meg.

III. A hormonok megkötése a szekréción szemcsékben

A szekréción szemcsék relatíve nagy mennyiségű hormon megkötésére képesek. A mellékvese velő kromaffin granulumaiban (2. ábra) pl. az adrenalin a nedves súly 20%-a is lehet. A mellékvese velő állományában a hormontárolás rendkívüli jelentőségű. Ha ugyanis a megtermelt hormonok a citoplazmában „szabadon” áramlanának a vérpálya irányába — a mitokondriumok monoamin oxidáza a catecholaminokat dezaminálná, s ez a hormonhatás teljes elvesztését eredményezné [61].

A hormontárolás intragranuláris mechanizmusára nézve több elképzelés ismeretes: [61].

- a) A hormon nagy molekulásúlyú, ezért általában nem képes átdiffundálni a határoló membránon.
- b) A hormon alacsony molekulásúlyú, de kovalens kötésben van egy nagy molekulásúlyú hordozó molekulával.
- c) A kis molekulásúlyú hormon más, nem kovalens kötéssel kötődik a hordozó molekulához.
- d) A hormon képes átdiffundálni a határoló hártán, de aktív transzport útján visszakerül a granulumba.

Általánosan elfogadott az a vélemény [61], hogy a protein természetű hormonok számára a granulum határoló membránja nem átjárható. Esetenként a tárolt protein fizikai állapota olyan, ami a diffúziót megakadályozza (pl. a β sejtek granulumaiban az inzulin gyakran kristályos állapotú) [55]. A protein természetű hormonoknak kovalens kötésben való intragranuláris előfordulására ez ideig nem ismeretes példa. Nem kovalens kötésű hormontárolásra viszont jó példa a hipofízis hátsó lebenye, ahol a neurofizin nevű fehérje köti a polipeptid hormonokat: az oxitocint és vasopressint [20]. Az intracitoplazmatikus hormontárolással kapcsolatban az egyik legnagyobb problémát annak megértése jelenti, miként tárolódnak az olyan alacsony molekulásúlyú hormonok, mint pl. az adrenalin és noradrenalin.

Nagy segítséget jelentett ennek a kérdésnek a tisztázásában a sejthomogenizálás és differenciál centrifugálás technikája. Ismeretes, hogy a kromaffin granulumok viszonylag tisztán előállíthatók. Az ilyen frakciók vizsgálata azt mutatta, hogy a szemcsék szárazanyag-tartalmának 35% protein, 22% lipid, 20,5% catecholamin, 15% adenin nukleotida (főleg ATP) 0,2% Ca^{++} , Mg^{++} s néhány % nem identifikált anyag [11, 33].

Az ismertettett kémiai összetétel alapján a catecholamin tartalmú szemcsékben két olyan szóba jöhető anyag van, amely hormonkötésre alkalmas lehet.

A fehérjék közül a vízdoldékony kromogranin A, a nukleotidok közül pedig az ATP. Számítások alapján 1 molekula kromograninre a szemcséken belül cca 400 molekula hormon jut. Ez a tény a proteinek hormonkötését erősen

valószínűtlenné teszi. Ha megvizsgáljuk a katecholamin ATP molekuláris arányát az izolált szekrécíós granulumban akkor azt látjuk, hogy 4–5 molekula hormon jut egy ATP-molekulára [6]. Feltételezések szerint az ATP- és katecholamin molekulák egy komplexet képeznek, s ez aggregáció révén nagy molekulásúlyt is elérhet. Ezen aggregátumok (micellák) stabilitását növelik a kétértékű ionok, melyek közül a Ca^{++} és Mg^{++} rendszerint jelentős mennyiségben jelen van a szekrécíós szemcsékben. Jelenlegi felfogás szerint tehát a hormontárolás egyik formája — ezen aggregátumok kialakulása révén valószínűleg. Ezek az aggregátumok azonban elsősorban alacsony hőfokon stabilisek, testhőmérsékleten igen labilisek [6]. Ez a magyarázata annak, hogy izolált szemcsék a preparálási folyamat során 0°C -hoz közeli hőmérsékleten igen kismennyiségű hormont vesztenek csak el [61]. 37°C -on 1 óra alatt az inkubált szekrécíós szemcsék hormontartalmuk 90%-át is elveszthetik, viszont, ha az inkubáló mediumban ATP is van, a hormonvesztés elenyésző [63]. Az ATP hormonmegkötő képessége úgy is magyarázható, hogy a makroerg molekula a hormonszubsztanciák aktív transzport útján való felvételét biztosítja a citoplazmából a szekrécíós granulumba. Az aktív hormontranszport lehetősége mellett szól, a szekrécíós granulumban membránjában levő Mg^{++} aktiválható ATPáz jelenléte is [61].

Összefoglalva a katecholaminok intragranuláris tárolására vonatkozó ismereteket megállapítható, hogy a hormontárolási folyamatban szerepet játszik az ATP, komplexet képezve a katecholamin molekulákkal, kétértékű ionok mint a Ca^{++} és Mg^{++} , s végül az aktív transzport folyamata, a membránhoz kötött Mg^{++} aktiválható ATPáz révén.

IV. A szekrécíós granulumban sorsa

A szekrécíós granulumban ultrastrukturális szinten történő azonosítását követően kiterjedt vita folyt az illetően, vajon a szóban levő sejt-komponensek sejtorganelumoknak vagy csupán citoplazmatikus zárványoknak tekinthetők-e? [22, 65]. A vélemények többsége végül is oda hajlott, hogy a szekrécíós szemcsék ugyan nem tekinthetők sejtorganelumnak, de nem egyszerűen inert tárolóhelyek, hanem fontos szerepet játszanak a szekrécíó minden lényeges fázisában (ingeszcíó — szintézis — extrúzió) [61]. Már a hormontárolás folyamatának vizsgálatakor megállapíthattuk, hogy az igen heterogén — ennek megfelelően maga a hormonürítési mechanizmus is igen változó — és szövetenként is eltérő lehet. A szóba jöhető legfontosabb hormonürítési mechanizmusok A. D. SMITH [61] szerint a következők:

1. A tárolt szekrécíó kiszabadul a vezikula üregéből, s így nagy mennyiségű hormon válik „szabaddá” a citoplazmában — s ez kidiffundál a sejtből.

2. A hormonürítési folyamatban közvetlenül a szekréciós szemcse maga vesz részt.

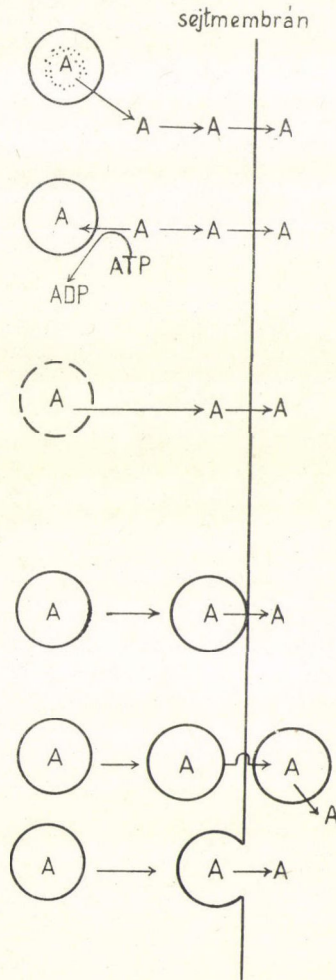
Ez a két főmechanizmus további alternatívákat foglal magában.

1. *A citoplazmatikus hormondiffúzió bekövetkezhet:*

- a) A tároló komplex destrukciója révén
- b) Az aktív felvétel gátlása révén
- c) A tároló szemcse membránjának feloldódása révén.

2. *A szekréciós szemcse sorsa lehet:*

- a) Kitapadás a sejtthártya mellett és a hormonok diffúziója a „tight junctioni”-on keresztül.
- b) A szekréciós vezikula átjutása a sejtmembránon át (expulzió).
- c) Exocitózis.



Az 1-es és 2-es főmechanizmus között számos alapvető különbség van. Míg az 1-es mechanizmus értelmében a hormonoknak „szabadon” — molekuláris formában kell átdiffundálniuk a citoplazmán —, addig a 2. mechanizmus a komplett szekréciós szemcsék migrációját involválja. A 2b és 2c lehetőség szerint a hormonok mellett az egyéb hordozó anyagok (fehérjék — lipidek — nukleotidok stb.) is a sejtfelszínre ürülnek míg az 1a, b, c mechanizmusok igénybevételével csak hormonok ürülnének. Ez viszont azt jelenti, hogy a diffundáló hormonok nincsenek megvédeve a monoamin oxidáz dezamináló tevékenységétől — s így igen gyorsan inaktiválódhatnak [40].

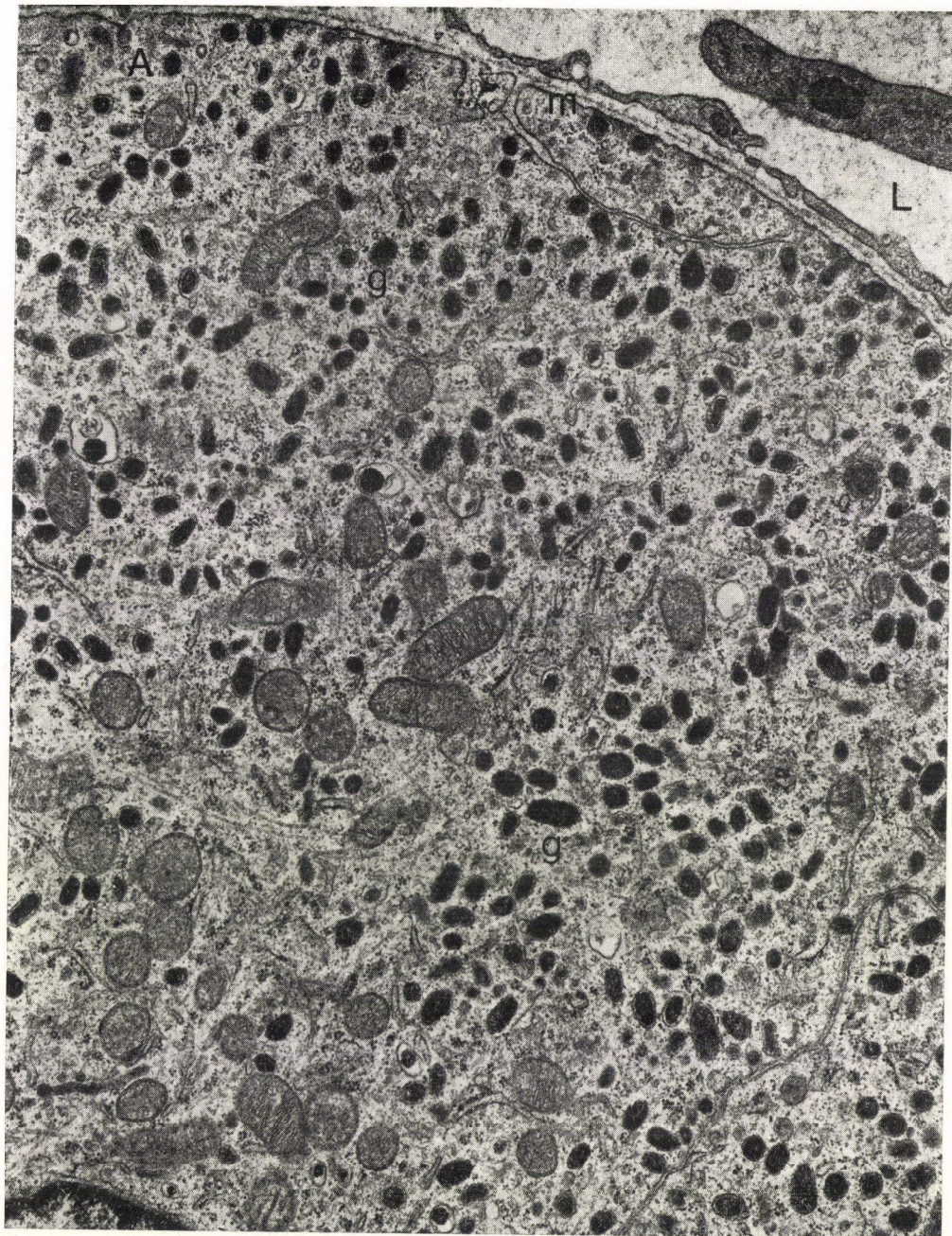
Megvizsgálva a két főmechanizmust, úgy látszik, hogy mind a régebbi elképzelések [12, 13, 26], mind az újabb irodalmi adatok [27, 39, 60] egyértelműen azt támogatják, hogy a katecholaminok legnagyobb része (ha nem a teljes mennyisége) [61] exocitózis révén ürül ki a kromaffin sejtekből. Fenti hipotézist biokémiai, farmakológiai és ultrastrukturális vizsgálatok támasztják alá (3. ábra).

Az exocitózis biokémiai bizonyítékai

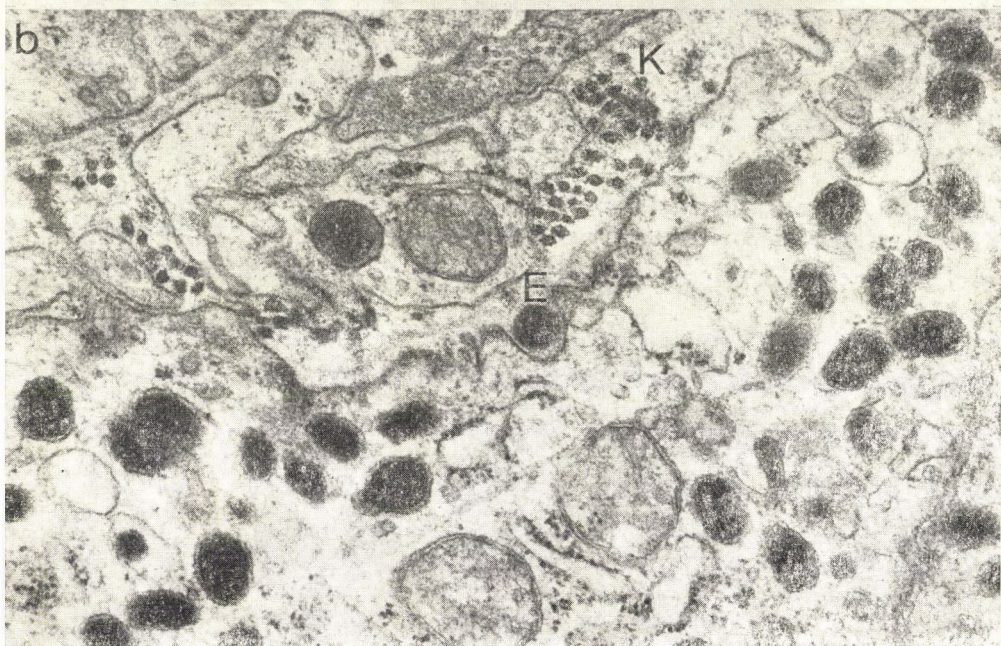
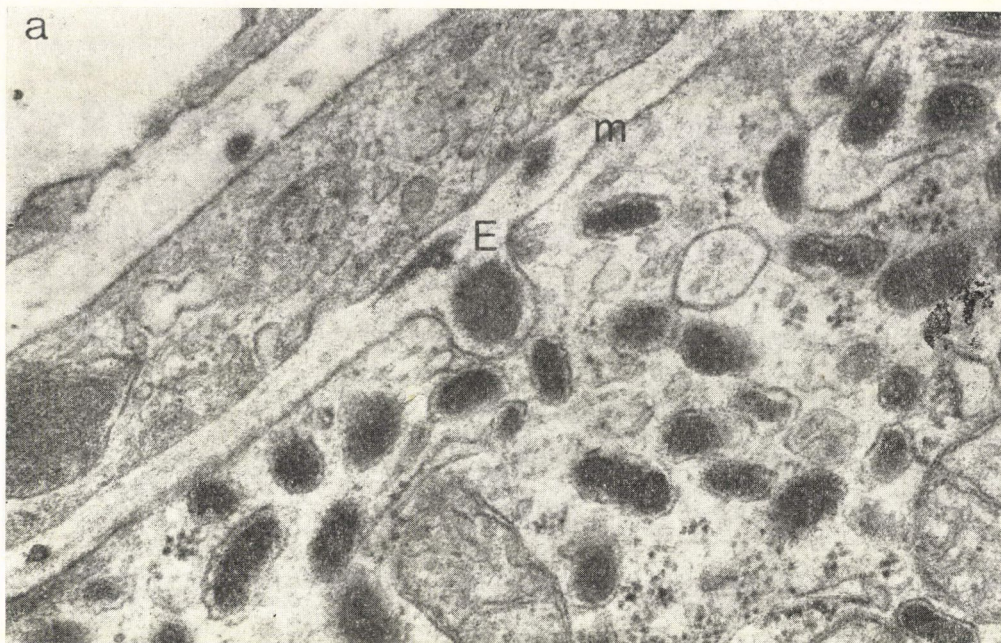
A kémiai analízisek pontos adatokat szolgáltatottak az izolált kromaffin granulomok összetételére nézve. A hormon kiürülési mechanizmusának megítélése szempontjából alapvetően fontos annak ismerete, vajon mi a sorsuk a szekréciós granulomokban tárolt hormonok mellett az ún. hordozó vagy kísérő anyagoknak? Ennek a kérdésnek a tisztázására a legmegfelelőbb mód a stimulált mirigy perfuzátumok kémiai analízise volt. STJÄRNE [62] vizsgálatai alapján megállapítást nyert, hogy a neurogén stimulusok (morfin—inzulin) után a mirigy katecholamin tartalmának csökkentésével egyidejűleg párhuzamosan csökkent az ATP-tartalom is. Ugyanezt találta BANKS [3] is nyúl mellékvesében a nervus splanchnikus elektromos stimulációját követően, ugyanakkor ellentmondó adatok is ismeretesek [25].

Említettük, hogy a kromaffin granulomok további komponensei különböző fehérjék, mint pl. a kromogranin A, dopamin β hidroxiláz stb. In vivo [57] és in vitro kísérletek [51] azt igazolták, hogy inzulin és acetilcholin kezelés egyaránt csökkentette a kromaffin granulomok fehérjetartalmát. Ezen kísérletekből azonban még nem tudtuk megmondani, mi lett a felszabaduló fehérjék sorsa? Visszamaradtak-e a citoplazmában, avagy szecernálódtak a mirigysejtből az extracelluláris térbe?

KIRSHNER és munkatársai [31, 38], valamint BLASCHKO et al. [8] kimutatták, hogy a stimulált mirigy perfuzátumában a fehérje (kromogranin A) sztöchiometrikus aránya a katecholaminokhoz *ugyanaz, mint in vivo a mirigy kromaffin granulumaiban, tehát a granulomok oldható fehérjei teljes egészében kiürültek a katecholaminokkal együtt*. Felmerül a kérdés, mi történik a kromaffin granulomok ún. oldhatatlan komponenseivel? A kromaffin granulomok lízise folytán ui. az összfehérje 22%-a, a lipidek (foszfolipid és koleszterin)

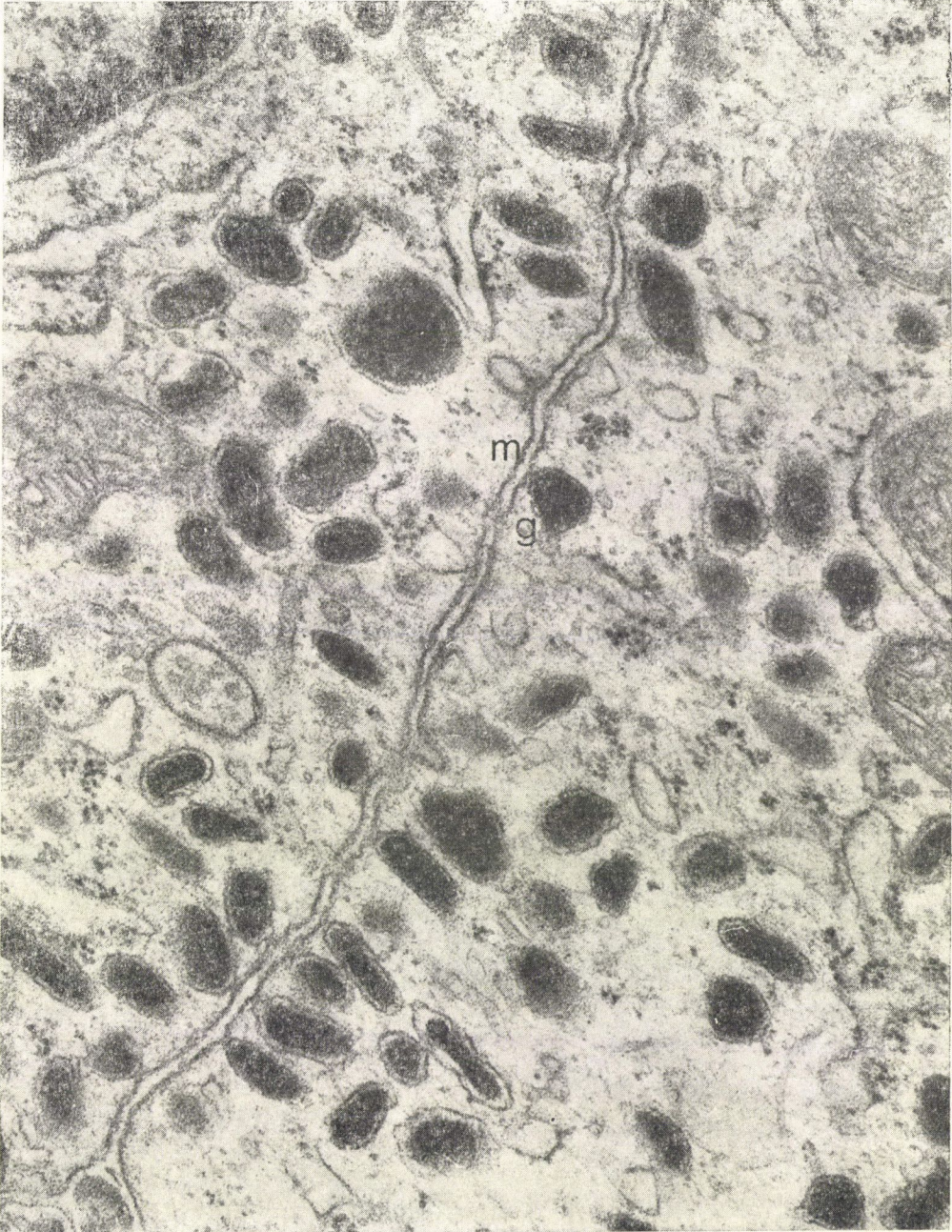


2. ábra. Úgynevezett „raktározó” mirigysejt aranyhórcsög mellékvese velőállományából. A citoplazmát csaknem kitéltik a membránnal határolt elektronrendez szekréciós szemcsék (g). A sejtek apikális pólusán (A) számos ponton kitapadt szekréciós granulák láthatók a plazmamembrán (m) szomszédságában. L = kapilláris lumene. 15 000 ×



3.a. ábra. Exocitózis aranyhórsög mellékvese kromaffin sejtjének apikális pólusán (E). A plazmamembránon (m) jól látható az U alakú bemélyedés, melynek üregében a szekréciós granulum elektronenz, membrán nélküli anyaga foglal helyet. 30 000 ×

3.b. ábra. Ugyanaz, mint 3.a. de az exocitózis (E) a laterális sejt felszínén alakult ki. Az interstitiumban kollagén rostok (K) foglalnak helyet. Az exocitózis képe teljesen az apikális sejt felszínén látottakkal azonos. 30 000 ×



4. ábra. Szekréciós granulák (g) a laterális sejthártya (m) mentén, szorosan a membránhoz tapadva. Egyes esetekben úgy látszik, a két membrán, a granulum membránja és a sejthártya összeolvadt egymással. 30 000 ×

teljes mennyisége oldhatatlannak bizonyult [67]. Ez az oldhatatlan maradék tartalmazza a kromaffin granulumok határoló membránját is. A granulum membrán kémiai összetételének ismeretében lehetőség nyílt annak eldöntésére, vajon a szekréciós granulumok határoló membránjukkal együtt, expulzió révén kerülnek-e ki a sejthártyán keresztül az extracelluláris térbe, s ez esetben a mirigy perfuzátumban a határoló membrán anyagainak is jelen kell lenniük, avagy a granulumok határoló membránjuk hátrahagyásával, azaz exocitózis révén jutnak a sejtfelszínre?

Acetilcholinnal stimulált szarvasmarha mellékvese perfuzátumok analízise azt mutatta, hogy a granulumok foszfolipid és koleszterin tartalma nem változott az alatt az idő alatt, amíg a katecholamin tartalom 40%-kal csökkent [51]. Ez a tény egyértelműen amellettszól, hogy stimulált szekréció alatt a granulum membránja, mely az említett oldhatatlan komponenseket tartalmazza, nem hagyja el a sejt citoplazmáját, *tehát a hormonürítés a membrán visszahagyásával, azaz exocitózissal és nem expulzió révén valósul meg.*

Az exocitózisra vonatkozó biokémiai és ultrastrukturális megfigyelések összevetése

A biokémiai vizsgálatokból két fő konklúziót lehet levonni:

1. A kromaffin granulumok oldékony, nukleotida komponensei szekréció alatt teljesen kiürülnek a szemcsékből és kvantitatíve visszanyerhetők a perfuzátumból.
2. A kromaffin granulumok oldhatatlan (membránhoz kötött) komponensei nem jelennek meg a stimulált mirigy perfuzátumában, azaz teljes egészében visszamaradnak a mirigyben.

Ezen konklúziók birtokában nem látszanak igazolhatónak azok a korai fény- és elektronmikroszkópos megfigyelések, melyek intakt kromaffin granulumok jelenlétét írták le a mellékvese színuszoidokban [2, 16, 18]. Pontosabban szólva — membrán által határolt katecholamin tartalmú szemcsék előfordulhatnak ugyan a színuszoidok lumenében, ezek azonban a szövet preparálása során a sejtmembrán mechanikus károsodása révén jutottak oda, s nem fiziológias ürítés révén [17]. A lehetséges hormonürítési módok között szerepelt a 2a változat is, amely a szekréciós szemcséknek a sejthártyán való „szoros kitapadását” tételezi fel. Ez a feltételezés számos elektronmikroszkópos megfigyelésre alapozott. DE ROBERTIS [23] a jelenséget már 1957-ben leírta — s azt követően számosan tettek hasonló megfigyeléseket [17, 22, 24, 42, 50]. Bár a granulumok membránja és a sejtmembrán kapcsolata valóban gyakran igen szoros (4. ábra), nem bizonyított, hogy itt igazi „tight junctio”-k alakulnak ki. Elképzelhető, hogy ez a mozzanat az exocitózis bevezető lépése, s így nem jelent egy külön hormonürítési módot. Morfológiailag nagyon nehéz különbséget tenni az ún. „tight junctio” és az exocitózis korai fázisa között. Alacsony molekulásúlyú anyagok release, ezeken a tight junctio-kon keresztül

is végbemehet, de az nem valószínű, hogy nagy molekulású anyagok át tudnak hatolni ezen a strukturális barrieren. Fluorescens citokémiai eljárások során azt találták [43], hogy a szérum albumin, melynek molekula átmérője cc. 72 Å — képes áthatolni a tight junctio-kon. A kromogranin A molekula átmérője azonban 120 Å körüli, s így nem valószínű, hogy a fenti membránokon át tudna diffundálni. Az elmondottak figyelembevételére alapján a biokémiai és morfológiai megfontolások egyaránt az exocitózis, mint legvalószínűbb hormonürítési forma — lehetőségét (2c) támasztják alá, amely jelenleg a legteljesebb összhangban áll mind a biokémiai, mind a morfológiai adatokkal egyaránt.

V. Az exocitózis szubcelluláris és molekuláris mechanizmusa

A sejtmembrán mint a „stimulus-secretion coupling” helye

DOUGLAS és RUBIN 1961-ben [29] alkotta meg az ún. „stimulus-secretion coupling” kifejezést, mely lényegében magában foglalja mindazokat a megelőző stimulusokat, amelyek a sejtet érik — s amely végül egy specifikus sejt-válaszban, a szekréción termékek extracelluláris kijuttatásában jut kifejezésre [27]. A folyamatot A. D. SMITH után [61] sémásan az alábbiakban ábrázolhatjuk.

„Stimulus-secretion coupling”: a plazmamembránon végbemenő események

Kölcsönhatás az acetilcholin és receptor között

A sejt hártya permeabilitásának megnövekedése egyes ionok számára

Membrán depolarizáció

A depolarizáció továbbterjedése a sejt felszínen elektrotonikus úton

Ca⁺⁺-ionok belépése a sejtbe

A szekréción granulák kitapadása a plazma membránhoz

Fúzió a granulum membrán és plazma membrán között, membrán átrendeződés és „nyílás” kialakulása az extracelluláris tér felé

A szabaddá váló szekréción anyag diffúziója az extracelluláris térbe

A szekréción szemcsék membránjának visszajuttatása a citoplazmába

A „stimulus-secretion coupling” eseményei, mint azt a fenti séma mutatja, a plazmamembránon zajlanak le. Ezek közül az első lépés egy kölcsönhatás az acetilcholin és a membrán receptor között. Már FELDBERG és GADDUM [30]

klasszikus vizsgálatai tisztázták, hogy a mellékvese velőt beidegző nervus splanchnikus idegvégződéseken acetilcholin szabadul fel.

Az acetilcholin a kromaffin sejtek membránját depolarizálja [27] s egyidejűleg ez a külső Na^+ ion cc. megnövekedéséhez vezet. Felmerül a kérdés, vajon ezek a változások miként involváltak a szekréció folyamatában? Először is arra kell választ adni, hogy az acetilcholin hatása lokális-e, avagy az egész sejtfelszínre vonatkozik? DOUGLAS [28] szerint az acetilcholin depolarizáló hatása lokális, és az elektrotónusosan terjedne tovább. Ez azért is valószínű, mert a kromaffin sejt kicsi és gömbölyű (nem elnyúlt s ezért a depolarizáció gyorsan tovább terjedhet), másrészt az acetilcholint a jelenlevő acetilcholin-eszteráz igen hamar inaktiválná. A depolarizációt a sejthártya permeabilitás változása követi s ennek kapcsán jelentős Ca^{++} áramlik be a sejtekbe. A Ca^{++} -nak a katecholamin szekrécióban való fontos szerepe már régóta ismert [29]. Tisztázásra szorul azonban, vajon a Ca^{++} — mely fázisban nélkülözhetetlen az exocitózis folyamatában; hiszen ismeretesek olyan hormonürítési folyamatok, ahol a Ca^{++} jelenléte nem elengedhetetlen [49]. Sokan feltételezik [27, 58], hogy a Ca^{++} a szekréciós granulumoknak a sejtfelszínre való kitapadásában tölt be fontos szerepet azáltal pl., hogy csökkenti a szekréciós granulumok negatív töltését. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az elektrofiziológiai adatok szerint az acetilcholin növeli a sejthártya permeabilitását a Ca^{++} számára (de ez átmeneti jellegű) és a felvett Ca^{++} hamarosan ismét az extracelluláris térbe kerül [4], de nincs egyértelmű bizonyíték arra nézve, mi a konkrét szerepe a Ca^{++} -nak a katecholamin szekréció folyamatában.

A sejthártyához kitapadt szekréciós granulum membránjának hamarosan fuzionálni kell a plazmamembránnal ahhoz, hogy szekrétrum a felszínre juthasson. Hogyan megy végbe ez a fúzió? A folyamat megértéséhez ismerni kell a fuzionáló membránok összetételét, továbbá ezek elrendeződését a membránon belül. Sajnos, ezek az ismeretek igen hiányosak [67]. Azt viszont már régen felismerték, hogy a mellékvese velő gazdag lizolecitinben [9, 32], s ez az anyag a granulum membránhoz kötött [68].

Feltételezések szerint a granulum membránjában levő lizolecitin, a két membrán (a granulum és sejtmembrán) fúziójának elősegítésében játszana fontos szerepet, minthogy a lizolecitin membranolitikus képessége jól ismert [34]. Hogy a granulumok a sejthártyán kitapadhassanak, kell lenni egy mechanizmusnak, amely ezt a mozgást biztosítja a sejt mélyebb régióiból a plazmamembránig. Újabban számos feltételezés van arra nézve, hogy ez a migráció a granulumok Brown-féle mozgása révén biztosított [37, 61].

Mi a sorsa a szekréciós anyagnak a membrán fúzióját követően? A micelláris szerkezetű raktározó komplex gyorsan szétesik és a megnyíló membránon át a szabaddá váló anyagok az extracelluláris térbe diffundálhatnak. A kis molekulásúlyú hormonmolekulák diffúziója természetesen elég gyorsan

végbemeget. A nagy molekulásúlyú hordozó anyagok, mint pl. kromogranin A még sokáig jelen lehetnek az σ alakú invaginációkban és szembetűnően megtartják elektrondenzitásukat [5, 24].

A korai elektronmikroszkópos vizsgálatok egy része [22, 23], mely az exocitózis felismeréséhez vezetett, nem foglalkozik azzal a kérdéssel, mi a további sorsa a granulomok membránjának, amely a sejthártyával fuzionált? PALADE viszont [48] feltételezett egy mechanizmust, amely az inkorporált membránokat visszajuttatja a citoplazmába. AMSTERDAM [1] szerint a visszakerülő membránok kis vezikulák formájában tűnnek ismét elő a sejtmembrán szomszédságában.

D'ANZI [19] elképzelése szerint a membránok fúzióját egy fissió követi, s ennek révén létrejövő az ún. „coated vesiculumok” szállítanak vissza a „membrán felesleget” a citoplazmába. Exocitózisok mentén valóban gyakran észlelték az ún. [5, 24] „coated vesiculumok” kialakulását, s ez a folyamat minden bizonnyal fontos szerepet tölt be a granulom membrán citoplazmába történő visszajuttatásában.

Konklúziók

Számba vettük az endokrin szövetek főbb hormonürítési mechanizmusait, s bizonyítékok állnak rendelkezésünkre, melyek szerint e szövetfeleségekben a legvalószínűbb hormonürítési mód az exocitózis. A mellékvese velőállományában az exocitózis normál extrúziós mechanizmusnak felel meg. Az exocitózis felismerése számos korábbi ellentmondást oldott fel a catecholaminok release-e tekintetében, azonban számos új problémát is felvetett. Mindenekelőtt tisztázandók egyes molekuláris szintű folyamatok, a granulomok eredetének — képződésének számos kérdése, a szekréciós szemcsék transzportja, a tároló vezikulák további sorsa, végül a fehérvérjék sorsa a hormon release-t követően.

IRODALOM

1. AMSTERDAM, A., OHAD, I., SCHRAMM, M.: Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle. *J. Cell Biol.* **41**, 753—773 (1969).
2. BACHMANN, R.: Die Nebenniere. In: *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*, **6**, part 5, 1—952 (1954).
3. BANKS, P.: A study of the biochemical pharmacology of the chromaffin cell. D. Phil. Thesis, University of Oxford (1964).
4. BANKS, P.: Involvement of calcium in the secretion of catecholamines. In: *A Symposium on Calcium and Cellular Function*, pp. 148—162. Ed. Cuthbert, A. W. London: McMillan Ltd. (1970).
5. BENEDECZKY, I. and SMITH, A. D.: Ultrastructural studies on the adrenal medulla of golden hamster: origin and fate of secretory granules. *Z. Zellforsch.* **124**, 367—386 (1972).
6. BERNEIS, K. H., PLETSCHER, A., DA PRADA, M.: Phase separation in solutions of noradrenaline and adenosine triphosphate: influence of bivalent cations and drugs. *Brit. J. Pharmacol.* **39**, 382—389 (1970).

7. BLANCHETTE, E. J.: Ovarian steroid cells. II. The lutein cells. *J. cell Biol.* **31**, 517—42 (1966).
8. BLASCHKO, H., COMLINE, R. S., SCHNEIDER, F. H., SILVER, M., SMITH, A. D.: Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature (Lond.)* **215**, 58—59 (1967).
9. BLASCHKO, H., FIREMARK, H., SMITH, A. D., WINKLER, H.: Phospholipids and cholesterol in particulate fractions of adrenal medulla. *Biochem. J.* **98**, 24P (1966).
10. BLASCHKO, H., HAGEN, J. M., HAGEN, P.: Mitochondrial enzymes and chromaffin granules. *J. Physiol. Lond.* **139**, 316—322 (1957).
11. BOROWITZ, J. L.: Effect of acetylcholine on the subcellular distribution of ⁴⁵Ca in bovine adrenal medulla. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 715—723 (1969).
12. CARLSSON, A. and HILLARP, N. Å.: Release of adenosine triphosphate along with adrenaline and noradrenaline following stimulation of the adrenal medulla. *Acta physiol. scand.* **37**, 235—239 (1956).
13. CARLSSON, A., HILLARP, N. Å., HÖKFELT, B.: The concomitant release of adenosine triphosphate and catechol amines from the adrenal medulla. *J. biol. Chem.* **227**, 243—252 (1957).
14. CLAESSON, L.: The intracellular localisation of the esterified cholesterol in the living interstitial gland cell of the rabbit ovary. *Acta physiol. scand.* **31**, Suppl. **113**, 53—78 (1954).
15. COOK, R. P.: In *Cholesterol, Chemistry, Biochemistry and Pathology* Ed: R. P. Cook, New York: Academic Press, p. 145 (1958).
16. COSTERO, I., CHÉVEZ, Z. A., PERALTA, L., MONROY, E., RAMÓN, F.: Rhythmic cellular movements in tissue culture of pheochromocytoma and adrenal medulla. *Tex. Rep. Biol. Med.* **23**, 213—220 (1965).
17. COUPLAND, R. E.: Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organisation of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. *J. Anat. (Lond.)* **99**, 231—254 (1965).
18. CRAMER, W.: Further observations on the thyroid-adrenal apparatus. A histochemical method for the demonstration of the adrenalin granules in the suprarenal gland. *J. Physiol. (Lond.)* **52**, viii—x. (1918).
19. D'ANZI, F. A.: Morphological and biochemical observations on the catecholamine-storing vesicles of rat adrenomedullary cells during insulin-induced hypoglycemia. *Amer. J. Anat.* **125**, 381—398 (1969).
20. DEAN, C. R., HOPE, D. B. and KAZIC, T.: Evidence for the storage of oxytocin with neurophysin-I and of vasopressin with neurophysin-II in separate neurosecretory granules. *Br. J. Pharmac.* **34**, 192P—193P (1968).
21. DE DUVE, C.: Endocytosis. In: *Lysosomes (Ciba Foundation Symposium)*. Ed. de Reuck, A. V. S. and Cameron, M. P. p. 126. London: Churchill (1963).
22. DE ROBERTIS, E. D. P., SABATINI, D. D.: Submicroscopic analysis of the secretory process in the adrenal medulla. *Fedn. Proc.* **19**, No. **4**, 70—78 (1960).
23. DE ROBERTIS, E. D. P., VAZ FERREIRA: Electron microscope study of the excretion of catechol-containing droplets in the adrenal medulla. *Exp. Cell. Res.* **12**, 568—574 (1957).
24. DINER, O.: L'expulsion des granules de la médullosurrénale chez le hamster. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **265**, 616—619 (1967).
25. D'IORIO, A. and EADE, N.: Catecholamines and adenosinetriphosphate (ATP) in the suprarenal gland of the rabbit. *J. Physiol. (Lond.)* **133**, 17P (1956).
26. DOUGLAS, W. W.: Calcium dependent links in stimulus secretion coupling in the adrenal medulla and neurohypophysis. In: *Mechanisms of Release of Biogenic Amines*, pp. 267—289. Ed. Euler, U. S. von, Rosell, S. and Uvnäs, B. Oxford: Pergamon Press. (1966).
27. DOUGLAS, W. W.: Stimulus secretion coupling: the concept, and clues from chromaffin and other cell. *Brit. J. Pharmacol.* **34**, 451—474 (1968).
28. DOUGLAS, W. W., KANNO, T., SAMPSON, S. R.: Effects of acetylcholine and other medullary and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J. Physiol. (Lond.)* **183**, 107—120 (1967).
29. DOUGLAS, W. W. and RUBIN, R. P.: The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* **159**, 40—57 (1961).
30. FELDBERG, W. and GADDUM, J. H.: The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* **81**, 305—319 (1934).
31. GIACOMELLI, F., WIENER, J. and SPIRO, D.: Cytological alterations related to stimulation of the zona glomerulosa of the adrenal cortex. *J. cell Biol.* **26**, 499—521 (1965).
32. HAJDÚ, S., WEISS, H., TITUS, E.: The isolation of a cardiac active principle from mammalian tissue. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **120**, 99—113 (1957).

33. HILLARP, N. Å.: Further observations on the state of the catecholamines stored in the adrenal medullary granules. *Acta physiol. scand.* **47**, 271—279 (1959).
34. HOWELL, J. I. and LUCY, J. A.: Cell fusion induced by lysolecithin. *FEBS Lett.* **4**, 147—150 (1969).
35. HOWELL, J. I., FINK, C. J., LACY, P. E.: Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans. I. Isolation of a secretory granules fraction. *J. cell. Biol.* **41**, 154—161 (1969).
36. IDELMAN, S.: Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex. *Int. Rev. of Cytol.* **27**, 181—281 (1970).
37. KATZ, B.: The release of neural transmitter substances. pp. 1—60. Liverpool: Liverpool University Press (1969).
38. KIRSHNER, N., SAGE, H. J., SMITH, W. J., KIRSHNER, A. G.: Release of catecholamines and specific protein from adrenal glands. *Science* **154**, 529—531 (1966).
39. KIRSHNER, N., SAGE, H. J., SMITH, W. J., KIRSHNER, A. G.: Mechanism of secretion from the adrenal medulla. 2. Release of catecholamines and storage vesicle protein in response to chemical stimulation. *Molec. Pharmacol.* **3**, 254—265 (1967).
40. KOPIN, I. J.: Storage and metabolism of catecholamines: the role of monoamine oxidase. *Pharmacol. Rev.* **16**, 179—191 (1964).
41. LAGUNOFF, D.: The mechanism of histamin release from mast cells. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 1889—1896 (1972).
42. LEVER, J. D. and FINDLAY, J. A.: Similar structural basis for the storage and release of secretory material in adrenomedullary and β -pancreatic cells. *Z. Zellforsch.* **74**, 317—324 (1966).
43. LOEWENSTEIN, W. R.: Permeability of membrane junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 441—472 (1966).
44. LUSE, S.: *The Adrenal Cortex*. Ed.: A. B. Eisenstein, London: Churchill p. I. (1967).
45. MCSHAN, W. H. and HARTLEY, M. W.: Production, storage and release of anterior pituitary hormones. *Ergebn. Physiol. biol. Chem. expt. Pharmak.* **56**, 264—296 (1965).
46. MCSHAN, W. H. and MEYER, R. K.: Gonadotrophic activity of granules from rat pituitary glands. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **71**, 407—410 (1949).
47. MOSES, H. L., DAVIS, W. W., ROSENTHAL, A. S. and GERREN, L. D.: Adrenal cholesterol: localization by electron microscope autoradiography. *Science* **163**, 1203—1205 (1969).
48. PALADE, G. E.: Functional changes in the structure of cell components. In: *Subcellular Particles*, pp. 64—83. Ed. Hayashi, T. New York: Ronald Press (1959).
49. PHILIPPU, A., HEYD, G., BURGER, A.: Über die Bedeutung der Calcium- und Magnesiumionen für die Speicherung der Nebennierenmark-Hormone. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **252**, 339—358 (1966).
50. PLATTNER, H., WINKLER, H., HÖRTNAGL, H., PFALLER, W.: A study of the adrenal medulla and its subcellular organelles by the freeze-etching method. *J. Ultrastruct. Res.* **23**, 191—202 (1969).
51. POISNER, A. M., DOUGLAS, W. W., TRIFARÓ, J. M.: The role of ATP and ATPase in the release of catecholamines from the adrenal medulla. I. ATP-evoked release of catecholamines, ATP, and protein from isolated chromaffin granules. *Molec. Pharmacol.* **3**, 561—571 (1967).
52. RINEHART, J. F. and FARQUHAR, M. G.: Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 93—113 (1953).
53. RÖHLICH, P., ANDERSON, P., ÜVNÄS, B.: Mast cell degranulation as a process of sequential exocytosis. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.* **22**, 197—213 (1971).
54. RÖHLICH, P., ANDERSON, P., ÜVNÄS, B.: Electron microscopic observation on compound 48/80 induced degranulation in rat mast cell. Evidence for sequential exocytosis. *J. Cell Biol.* **51**, 465—483 (1971).
55. SATO, T., HERMANN, L., FITZGERALD, P. J.: The comparative ultrastructure of the pancreatic islets of Langerhans. *Gen. Comp. Endocrinol.* **7**, 132—157 (1966).
56. SCHIEBLER, T. H.: Cytochemische und elektronen mikroskopische Untersuchungen an granulären Fraktionen der Neurohypophyse des Rindes. *Z. Zellforsch. mikr. Anat.* **36**, 563—576 (1952).
57. SCHÜMANN, H. J.: Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Adrenalin- und ATP-Gehalt der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **233**, 237—249 (1958).
58. SIMPSON, L. L.: The role of calcium in neurohumoral and neurohormonal extrusion processes. *J. Pharm. Pharmacol.* **20**, 889—910 (1968).
59. SMITH, A. D.: Biochemistry of adrenal chromaffin granules. In: *The Interaction of Drugs*

- and Subcellular Components in Animal Cells, pp. 239–292. Ed. by Campbell, P. N. London: Churchill Ltd. (1968).
60. SMITH, A. D.: Storage and Secretion of Hormones. *The Scientific Basis of Medicine Annual Reviews* 74–102 (1972).
 61. SMITH, A. D. and WINKLER, H.: Fundamental mechanismus in the release of Catecholamines. In *Catecholamines* Eds H. Blaschko and E. Muscholl, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin: Springer Verlag, **33**, 538–617 (1972).
 62. STJÄRNE, L.: Studies of catecholamine uptake storage and release mechanisms. *Acta physiol. scand.* **62**, Suppl. **228**, 1–60 (1964).
 63. TAUGNER, G. and HASSELBACH, W.: Über den Mechanismus der Catecholamin-Speicherung in den „chromaffinen Granula“ des Nebennierenmarks. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **255**, 266–286 (1966).
 64. WETZEL, B. K., SPICER, S. S. and WOLLMAN, S. H.: Changes in fine structure and acid phosphatase localization in rat thyroid cells following thyrotropin administration. *J. cell Biol.* **25**, 593–618 (1965).
 65. WETZSTEIN, R.: Elektronmikroskopische Untersuchungen am Nebennierenmark von Maus, Meerschweinchen und Katze. *Z. Zellforsch.* **46**, 517–576 (1957).
 66. WHUR, P., HERSCOVICS, A. and LEBLOND, C. P.: Radioautographic visualization of the incorporation of (3H) mannose and (3H) galactose into thyroglobulin by follicular cells of rat thyroids in vitro. *J. Anat.* **104**, 582–596 (1969).
 67. WINKLER, H.: The membrane of the chromaffin granule. *Phil. Trans. roy. Soc. B.* **261**, 293–303 (1971).
 68. WINKLER, H., STRIEDER, N., ZIEGLER, E.: Über Lipide, insbesondere Lysolecithin, in den chromaffinen Granula verschiedener Species. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **256**, 407–415 (1967).