

Jerzy Łazarewicz

DZIAŁANIE DEZOKSYGLUKOZY NA ZACHOWANIE SIĘ
STEŻEŃ NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH W KOMÓRKACH
I ELEMENTACH SUBKOMÓRKOWYCH NOWOTWORÓW
I NARZĄDÓW PRAWIDŁOWYCH

Praca przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu przez lek. med. Jerzego Łazarewicza, doktoranta Centrum ^Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie, celem uzyskania stopnia

doktora medycyny

Promotor: Doc. dr med. Włodzimierz Bicz.

Warszawa 1969

Praca wykonana w latach 1966-1969 pod kierunkiem Doc. dr med. W.Bicza w Pracowni Biochemii Zakładu Patologii Doświadczalnej PAN w Warszawie /Dyrektor: Prof.dr Z.Ruszczewski/ obecnie Centrum ^Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN /Dyrektor: p.o. Doc.dr med.W.Karczewski/.

Celem pełniejszego przedstawienia omawianego problemu w pracy tej zamieszczono część wyników pochodzących ze wspólnych badań z doktorantem lek.med.Joanną Strosznajder, dr Barbarą Biczową i Doc. dr W.Biczem. W niektórych wypadkach trudno dostępny materiał doświadczalny oraz względy oszczędnościowe w kosztownych odczynnikach importowanych zmuszały do planowania wspólnych układów doświadczalnych z innymi kolegami pracującymi w zbliżonej problematyce. Przedstawione wyniki ze wspólnych badań, opatrzone w tekście odpowiednimi odnośnikami, są przygotowywane do druku jako wspólne publikacje.

Dziękuję Promotorowi pracy Panu Docentowi dr Włodzimierzowi Biczowi za opiekę podczas studiów doktoranckich, oraz za pomoc w wykonywaniu tej pracy.

SPIS TREŚCI

1.	<u>Wstęp</u>	1
2.	<u>Materiał i metody</u>	12
2.1.	<u>Materiał doświadczalny</u>	12
2.2.	<u>Przygotowanie materiału do doświadczeń</u>	13
2.2.1.	Komórki nietknięte i skrawki	13
2.2.2.	Homogenaty	14
2.2.3.	Fracje mitochondrialne	15
2.2.4.	Układy cytoplazmatyczne	20
2.2.5.	Inne frakcje komórkowe raka wysiękowego Ehrlicha	21
2.3.	<u>Metody badań</u>	22
2.3.1.	Pomiar oddychania komórek, skrawków i frakcji mitochondrialnych	22
2.3.2.	Pomiar glikolizy	24
2.3.3.	Oznaczanie nukleotydów adeninowych	25
2.3.4.	Pomiary aktywności enzymów	26
2.3.5.	Inne oznaczenia ilościowe	28
2.3.6.	Środowiska inkubacyjne	29
2.3.7.	Odczynniki	31
3.	<u>Wyniki badań</u>	33
3.1.	<u>Zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych a oddychanie i glikoliza komórek nowotworowych i prawidłowych w obecności glukozy</u>	34
3.1.1.	Komórki raka wysiękowego Ehrlicha	35
3.1.2.	Wątrobiak Morrisa	43
3.1.3.	Spontaniczny rak sutka myszy	45
3.1.4.	Prawidłowa wątroba szczura	47
3.1.5.	Kora mózgu świnki morskiej	47
3.2.	<u>Dezoksyglukoza a nukleotydy adeninowe w homogenatach, mitochondriach i cytoplazmie</u>	55
3.2.1.	Oksydacyjna fosforylacja	55
3.2.2.	Glikoliza	69
3.2.3.	Aktywność heksokinazy, kinazy adenylanowej i ATPaz	75
3.3.	<u>Działanie dezoksyglukozy w świetle współzależności nukleotydy adeninowe - oddychanie w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha</u>	79
3.3.1.	ATP/ADP/AMP na tle sprzężenia glikoliza - oddychanie	79
3.3.2.	Zależności pomiędzy zużyciem dezoksyglukozy a zachowaniem się stężeń ATP, ADP, AMP i oddychaniem	82
3.3.3.	Ocena zależności nukleotydy adeninowe - oddychanie z uwzględnieniem wpływu DNP i jodocetanu	86
3.3.4.	Zagadnienie optymalnych stężeń DG w zależnościach nukleotydy adeninowe - oddychanie	89
4.	<u>Dyskusja</u>	100
5.	<u>Streszczenie najważniejszych wyników</u>	137
6.	<u>Wnioski</u>	140
7.	<u>Piśmiennictwo</u>	141

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

ADP	- adenzyno-5'-dwufosforan.
AMP	- adenzyno-5'-fosforan.
ATP	- adenzyno-5'-trójfosforan.
DG	- dezoksyglukoza.
DG-6-P	- dezoksyglukoza-6-fosforan.
DNA	- kwas dezoksyrybonukleinowy.
DNP	- 2'4'-dwunitrofenol.
EDTA	- sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczworoctowego.
GTP	- guanozyno-5'-trójfosforan.
G-6-P	- glukoza-6-fosforan
IMP	- inozyno-5'-fosforan.
K _m	- stała Michaelisa.
NAD	- dwunukleotyd nikotynamido-adeninowy.
NADP	- fosforan dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego.
P _i	- fosforan nieorganiczny.
P/O, ADP/O, ATP/O	- współczynnik fosforylacji.
RC	- współczynnik kontroli oddechowej.
RNA	- kwas rybonukleinowy.
Σ	- suma stężeń nukleotydów adeninowych.

1. W S T E P

Aforyzm Fryderyka G.Hopkinsa: "życie jest dynamiczną równowagą wielofazowego układu" (50) dobrze oddaje współczesne kierunki ujmowania procesów metabolizmu komórkowego.

Żywe komórki są z punktu widzenia termodynamiki systemami otwartymi. Podstawowym warunkiem ich normalnej funkcji jest zachowanie ujemnej entropii. Wiąże się to z utrzymaniem równowagi dynamicznej między skierowanym do komórki napływem związków bogatych w swobodną energię, a odpływem produktów degradacji tych związków. Naruszenie równowagi w kierunku przyrostu entropii/dodatniej/jest szkodliwe dla komórki, prowadzi do procesów patologicznych i śmierci. W związku z tym, podstawową funkcją mechanizmów autoregulacyjnych jest podtrzymanie tej równowagi dynamicznej i ustalenie szybkości przemian na poziomie optymalnym dla danych warunków.

Przemiana materii w nietkniętych komórkach zachodzi z pomocą wielkiej ilości enzymów, kofaktorów i jonów nieorganicznych. Żywa komórka nie jest jednak niezróżnicowaną masą protoplazmy. Nie można jej uważać za homogenny, koloidalny twór

zawierający bezładnie rozłożone enzymy i substancje rozpuszczalne. O funkcjach życiowych komórki decydują liczne oddzielone błonami przestrzenie odpowiedzialne za rozdział lub integrację systemów enzymatycznych, tworzenie barier dyfuzyjnych i regulowanie gradientów stężeń różnych substancji. Poszczególne enzymy lub złożone układy wieloenzymowe występują bądź to w postaci rozpuszczalnych białek w płynie komórkowym lub też najczęściej są przestrzennie zorganizowane w obrębie odpowiednich struktur błoniastych. To przestrzenne rozczłonowanie - kompartmentacja - poszczególnych układów wieloenzymowych i ciągów metabolicznych nie tylko nie przeczy zasadzie kompleksowości metabolizmu komórki jako całości, ale jest czynnikiem zwiększającym uporządkowanie systemu i ważnym elementem wewnętrznej regulacji metabolizmu komórkowego. Aktywności poszczególnych układów wieloenzymowych podlegają samoregulacji zarówno na drodze zabezpieczonej przez prawo działania mas /co dotyczy głównie przemian łatwo odwracalnych/ bądź też na zasadzie sprzężenia zwrotnego, gdy produkt wpływa na aktywność lub syntezę któregoś z enzymów biorących udział w przemianie.

Poszczególne układy wieloenzymowe, zlokalizowane w różnych strukturach tego wielofazowego układu, jakim jest komórka, mogą być wzajemnie powiązane poprzez wspólne enzymy, kofaktory i aktywujące jony nieorganiczne, a produkt jednego ciągu metabolicznego może być substratem innego. W ten sposób układy wieloenzymowe zlokalizowane w odpowiednich strukturach mogą na siebie wzajemnie oddziaływać i konkurować między sobą. Sprzężenie ich funkcji może zachodzić dzięki substancjom niskomolekularnym jak nukleotydy adeninowe, które cechują się niezbędną ruchliwością i mogą wpływać na samą strukturę i własności błon (58,88).

Przykładem takiego kompleksowego, dynamicznego układu zdolnego do samoregulacji jest ciąg przemian metabolizmu energetycznego. Przemiany węglowodanów zaczynają się od wejścia glukozy do ciągu Parnasa - Embdena - Meyerhafa z wytworzeniem końcowych produktów - kwasu pirogronowego i mlekowego. Ten ciąg przemian zlokalizowany jest w płynie komórkowym. W większości tkanek w warunkach tlenowych nie dochodzi do nagromadzenia kwasu mlekowego, natomiast powstający kwas pirogronowy poprzez acetylokoenzym A wchodzi na drogę przemian tlenowych w cyklu Krebsa, zlokalizowanym w mitochondriach. Powstaje nieprzerwany ciąg katabolicznych przemian węglowodanów. Energia swobodna uwalniana w czasie degradacji glukozy wiązana jest w postaci wysokoenergetycznych wiązań ATP.

Glikoliza jest procesem prawie 15 razy mniej energiodajnym niż oddychanie. Trzeba jednak pamiętać, że szlak katabolizmu węglowodanów ma na celu nie tylko dostarczanie energii, ale także w procesie tym powstają niskomolekularne produkty, które mogą być wykorzystane do syntez. Zapotrzebowanie na energię i metabolity pośrednie może kształtować się na różnym poziomie w komórkach różnych tkanek i narządów w zależności od ich zróżnicowania i stanu metabolicznego. Grupa tkanek embrionalnych, prawidłowe narządy o dużej aktywności regeneracyjnej oraz większość nowotworów cechując się zwiększonym zapotrzebowaniem na materiał do syntez wykazuje obok wysokiej aktywności cyklu pentozowego wybitną aktywność glikolityczną zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych.

Jak wykazano, komórki nowotworowe zdolne są do produkcji energii w równym stopniu podczas glikolizy w warunkach beztlenowych,

jak i w przebiegu glikolizy tlenowej oraz w czasie oddychania kosztem substratów endogennych (12, 122). Quastel i Bickis podali wzór wyrażający te zależności w przypadku oddychania i glikolizy w warunkach tlenowych:

$$6 Q_{O_2} + Q_{CO_2}^{O_2} = K$$

ATP oks. fosf. przy P/O=3 ATP glik. tlenowa

Z wzoru tego wynika, że w komórkach nowotworowych cechujących się wysoką glikolizą tlenową można oczekiwać hamowania oddychania po dodaniu glukozy, co też istotnie ma miejsce.

Opisane odrębności metabolizmu węglowodanowego nowotworów wiązane były przez Warburga ściśle z samym procesem nowotworzenia, którego przyczyną miało być jego zdaniem niedotlenienie i trwałe uszkodzenie oddychania nowotworów. Dalsze badania nie potwierdziły jednak tej koncepcji. Nie wykazano w sposób przekonujący uszkodzenia oddychania nowotworów, a pewne obniżenie oddychania może mieć raczej charakter regulacyjny (23).

Obecnie, gdy umilkły spory wokół hipotez Warburga, zagadnienia regulacji metabolizmu w komórkach nowotworowych i prawidłowych nadal są przedmiotem żywego zainteresowania i licznych badań. Wyrazem działania mechanizmów regulujących współzależność glikolizy i oddychania są efekty Pasteura i Crabtree.

Efekt, nazwany na cześć odkrywcy efektem Pasteura, który można lapidarnie określić jako hamowanie glikolizy przez oddychanie, a wyrażający się niższą aktywnością ciągu Parnasa - Embdena - Meyerhafa w warunkach tlenowych w porównaniu z beztlenowymi, występuje we wszystkich w zasadzie tkankach prawidłowych i nowotworowych. Większość nowotworów cechuje się znacznie niższym efektem Pasteura niż tkanki prawidłowe.

W 1929 r. Crabtree (34) stwierdził w badaniach na nowotworach doświadczalnych hamowanie oddychania po dodaniu glukozy. Późniejsze badania wykazały, że efekt Crabtree występuje także w niektórych tkankach prawidłowych (41, 91). Oprócz glukozy wywołują go inne heksozy jak fruktoza i mannoza (117).

Mimo wieloletnich intensywnych badań w licznych ośrodkach, mechanizmy biochemiczne efektów Pasteura i Crabtree nie zostały ostatecznie poznane. Dokładniejsze wniknięcie w istotę reakcji fosforylacji oksydacyjnej i glikolitycznej, postępy cytologii umożliwiające powiązanie funkcji komórkowych z określonymi strukturami, a także tendencja do dynamicznego i kompleksowego ujmowania zjawisk zachodzących w żywych organizmach umożliwiły jednak sformułowanie hipotez ujmujących w sposób ogólny współzależności między oddychaniem a glikolizą.

Obecnie przyjmuje się, że efekt Pasteura może być wyrazem konkurencji między enzymami glikolitycznymi zawartymi w cytoplazmie a aparatem oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach o ATP, który nagromadza się zdaniem Chance'a (42, 49, 127) w mitochondriach w przebiegu oksydacyjnej fosforylacji. Przedmiotem konkurencji między obu układami fosforylacji mogą być ADP i fosforan nieorganiczny (44, 115, 116). Istotną rolę może także odgrywać regulujący wpływ nukleotydów adeninowych na aktywność

fosfofruktokinazy /EC 2.7.1.11/, jednego z kluczowych enzymów ciągu glikolitycznego (6).

Jeszcze bardziej kontrowersyjny i niejasny jest mechanizm efektu Crabtree. Poglądy wiążące ten efekt z konkurencją o ADP i fosforan nieorganiczny między układami fosforylacji glikolitycznej i oksydacyjnej (43, 88, 116) , z hamującym wpływem zakwaszania środowiska przez gromadzący się kwas mlekowy lub ze zmianą pH błon mitochondrialnych przez protony uwalniane w reakcji heksokinazowej (89, 109) nie zostały powszechnie zaakceptowane (53, 56, 57, 83). Szczególnie interesujące są poglądy Chance'a i wspł. (22, 25, 26, 49, 127) uwzględniające przestrzenny rozdział ciągu Parnasa-Embdena-Meyerhafa od oksydacyjnej fosforylacji błoną mitochondrialną mało przenikliwą dla ATP. Przesunięcie stężeń ATP w kierunku mitochondriów miałyby prowadzić pośrednio do zahamowania glikolizy i oddychania. Według poglądów Pottera rozwijanych przez Ibsena i Overgaard - Hansena i przyjmowanych przez wielu innych autorów (53, 78, 83, 123) kluczową rolę w mechanizmie efektu Crabtree odgrywają aktywności heksokinazy /EC 2.7.1.1/, kinazy adenylanowej /EC 2.7.4.3/ i dezaminazy AMP /EC 3.5.4.6/ w błonach mitochondriów nowotworowych. Obecnie przeważają poglądy łączące mechanizm efektu Crabtree z pierwszymi reakcjami ciągu glikolitycznego, a szczególnie z reakcją heksokinazową, podnoszącą rolę rozgraniczania przestrzennego systemów glikolizy i oddychania, rolę lokalizacji heksokinazy na błonach mitochondrialnych oraz udział nukleotydów adeninowych w tym zjawisku. Rola biologiczna efektu Crabtree ujmowana jest jako wyraz mechanizmu utrzymującego równowagę między optymalną akumulacją energii w postaci ATP a zapewnieniem nieustannego napływu dostatecznej ilości związków pośrednich, mogących służyć jako materiał do

syntez / 119 /.

Nukleotydy adeninowe odgrywają kluczową rolę w wewnątrzkomórkowych procesach regulacji metabolizmu energetycznego. ADP jako substrat fosforylacji sprzężonych z oddychaniem i glikolizą jest czynnikiem kontrolującym oba te procesy w żywych komórkach / 24, 25, 26, 43, 49, 88 /. Powstający ATP jest niezbędny do fosforylowania heksoz wchodzących do ciągu glikolitycznego, przez co może wpływać na szybkość glikolizy (49, 104). Kwasy tłuszczowe będące głównym endogennym substratem oddechowym mitochondriów różnią się od innych substratów tym, że przed utlenieniem wymagają aktywacji. Niedobór ATP w mitochondriach może więc wpływać hamująco na utlenienie substratów endogennych (96, 107). Oprócz tego bezpośredniego działania nukleotydy adeninowe wywierają także niezwykle ważny wpływ regulujący na aktywność szeregu enzymów metabolizmu węglowodanowego, jak fosfofruktokinaza, dehydrogenaza izocytrynianowa /EC 1.1.1.42/ i synteza^{ta} cytrynianowa /EC 4.1.3.7/(6, 48). Podkreślano też rolę ATP w utrzymywaniu przewidzianej struktury i funkcji oddechowej i fosforylacyjnej mitochondriów (123).

ATP jako uniwersalny dawca energii oraz substrat jest niezbędny do podtrzymania syntezy kwasów nukleinowych. Także aktywacja aminokwasów przy syntezie białka jest uzależniona od ATP, a pomiar szybkości wbudowywania znakowanych aminokwasów do białka jest częstą metodą badania stanu energetycznego komórek (12, 122). Uwzględniając doniosłą ogólnobiologiczną rolę nukleotydów adeninowych wydaje się ważnym dokładne poznanie udziału tych nukleotydów w mechanizmach regulacji metabolizmu energetycznego w komórkach nowotworowych i przewidzianych.

Liczne dane z literatury oraz wyniki prac prowadzonych w naszym ośrodku od 1963 r. nasunęły możliwość wykorzystania 2-dezoksy-D-glukozy w badaniach dotyczących mechanizmów regulacji metabolizmu energetycznego w różnych komórkach nowotworowych i prawidłowych.

2-dezoksyglukoza /DG/ została wprowadzona do badań w 1952 r. przez grupę naukowców z Instytutu Franklina. Intensywne badania prowadzone następnie w licznych ośrodkach umożliwiły dość dokładne poznanie działania tego dezoksycukru.

DG silnie hamuje wzrost fibroblastów i niektórych nowotworów hodowanych in vitro (8, 13, 38) oraz wzrost drożdży (15, 112), a także przedłuża przeżycie zwierząt - nosicieli nowotworów doświadczalnych i hamuje wzrost tych nowotworów (37, 98). Wykazano, że dezoksyglukoza hamuje glikolizę, a przede wszystkim fruktolizę drożdży (112), różnych nowotworów (8, 13, 82, 113) i tkanek prawidłowych (61, 81, 104, 110, 113), a także homogenatów i układów cytoplazmatycznych różnych nowotworów (20, 82). Stwierdzono też hamujące działanie DG na oddychanie endogenne licznych nowotworów, szczególnie wysiękowych (21, 53, 56, 113, 117), a także nowotworów i fibroblastów hodowanych in vitro (19). W pewnych warunkach dezoksyglukoza hamowała oddychanie skrawków kory mózgu (104), pozostając bez wpływu na oddychanie skrawków wątroby i innych narządów prawidłowych (113).

DG szybko przenika przez błony komórkowe, który to proces jest pobudzony przez insulinę (61, 81), a następnie ulega ufosforylowaniu do 2-dezoksyglukozo-6-fosforanu /DG-6-P/ (8, 53, 77, 82, 110). W większości komórek ssaków DG-6-P nie ulega dalszym przemianom (53, 110) lub może być utleniany w śladowych ilościach (8, 77). Stwierdzono natomiast, że DG-6-P hamuje aktywność izomeryzy

glukozofosforanowej /EC 5.3.1.9/ (8 , 82 , 110) i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej /EC 1.1.1.49/ - (8 , 46). Intensywne fosforylowanie DG powoduje bardzo silne obniżenie zawartości ATP, ADP i sumy nukleotydów adeninowych, a także innych związków wysokoenergetycznych w komórkach licznych nowotworów (56, 70, 71, 77, 78, 117, 123) oraz w skrawkach kory mózgu (104) i drożdżach (100). Nie stwierdzono tego zjawiska w skrawkach wątroby i nerki (123). Wykazany został hamujący wpływ DG na syntezę kwasów nukleinowych w nowotworach (62, 98).

Mechanizm tego wielokierunkowego, hamującego działania 2-dezoksyglukozy na metabolizm i wzrost wielu nowotworów, a także na metabolizm niektórych tkanek prawidłowych nie został wyjaśniony. Hamowanie glikolizy przez DG bywa tłumaczone jako wynik konkurencji między dezoksyglukozą a heksozami - substratami ciągu glikolitycznego w procesie transportu do komórki lub na poziomie reakcji heksokinazowej. Prawdopodobnym wydaje się sugerowany mechanizm działania DG na glikolizę na drodze hamowania aktywności izomerazy glukozofosforanowej przez DG-6-P, ze zwrotnym hamowaniem heksokinazy przez nagromadzący się G-6-P (8 , 81 , 82 , 110). Podnoszono także udział dodatkowego mechanizmu, w którym obniżenie stężenia ATP pod wpływem DG może powodować hamowanie fosforylacji glukozy (104). Hamowanie syntezy kwasów nukleinowych i wzrostu komórek można tłumaczyć obniżeniem stężenia ATP i hamowaniem zużycia glukozy (62, 98). Całkowicie niewyjaśniony jest mechanizm hamującego działania DG na oddychanie nowotworów wysiękowych. Obok poglądów przypisujących działaniu DG wspólny mechanizm z efektem Crabtree, w których istotną rolę odgrywają zapewne nukleotydy adeninowe,

szczególnie ADP (53, 77, 83), inni autorzy uważają "pseudoeфекt Crabtree" wywołany przez DG za wynik innego mechanizmu (86, 103, 123). Tak więc w hipotezach wyjaśniających mechanizm działania dezo-ksyglukozy na metabolizm komórek, szczególną rolę przypisuje się nukleotydom adeninowym, a zwłaszcza zmianom w stężeniach ATP, które stoją w ścisłym związku z aktywnością i lokalizacją heksokinazy w badanych komórkach (7, 123).

Przedstawione dane wskazują na możliwość wykorzystania 2-dezoksyglukozy do badań mających na celu poznanie wzajemnych związków pomiędzy zachowaniem się stężeń nukleotydów adeninowych a aktywnością oddechową i glikolityczną komórek nowotworowych i prawidłowych. Nukleotydy adeninowe są bowiem wspólnym elementem łączącym mechanizmy regulacji metabolizmu energetycznego z postulowanym mechanizmem działania DG na ten metabolizm. Szczególnie istotne w takich badaniach wydawało się zastosowanie materiału nowotworowego i prawidłowego o różnej aktywności glikolitycznej, a przede wszystkim różnej aktywności i lokalizacji wewnątrzkomórkowej niektórych enzymów. Badania te mogłyby przyczynić się do dokładniejszego poznania niektórych szczegółów mechanizmu regulacji metabolizmu energetycznego z uwzględnieniem aspektu onkologicznego, a jednocześnie ułatwić zrozumienie mechanizmu działania 2-dezoksy-D-glukozy na komórki.

Celem pracy było:

1. Przebadanie wpływu 2-dezoksyglukozy na współzależności między zachowaniem się stężeń nukleotydów adeninowych a oddychaniem i glikolizą materiału prawidłowego i nowotworowego ze zwróceniem szczególnej uwagi na dynamikę rozwoju

zmian w metabolizmie energetycznym pod wpływem 2-dezoksyglukozy.

2. Przebadanie działania 2-dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny komórek na poziomie odpowiednich struktur subkomórkowych.
3. Podjęcie próby weryfikacji hipotez sugerujących udział nukleotydów sdeninowych, a zwłaszcza ATP w mechanizmie hamującego działania 2-dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny komórek nowotworowych i prawidłowych.

2. M A T E R I A Ł I M E T O D Y

2.1. M a t e r i a ł d o ś w i a d c z a l n y .

Obiektem badań były: rak wysiękowy Ehrlicha, wątrobiak Morrisa, spontaniczny rak sutka myszy, kora mózgu świnki morskiej oraz prawidłowa wątroba szczura^{1/}.

Nosicielami raka wysiękowego Ehrlicha były myszy wsobnych szczepów: DBA/212 i C₃H. Nowotwór przeszczepiano na drodze dootrzewnowego wstrzykiwania 0,5 ml płynu wysiękowego rozcieńczonego roztworem 0,9% NaCl w stosunku 1:1. Okres wzrostu guza wynosił 7 do 9 dni. Nosicielami wątrobiaka Morrisa były szczury wsobnego szczepu Buffalo. Samcom w wieku 6-8 tyg. wstrzyknięto w mięśnie obu tylnych kończyn ok. 1 ml miazgi nowotworu zawieszanej w 0,9% NaCl w stosunku 1:1. Okres wzrostu guza wynosił ok. 8 tyg.

Spontaniczny rak sutka myszy rozwijał się na ok.1-rocznych myszach szczepu wsobnego C₃H. Do doświadczeń używane były guzy o średnicy 2-3 cm. Korę mózgu pobierano ze świnek morskich o wadze ok. 300 g.

1/ W tym miejscu pragnę podziękować doc.dr M.Chorażemu, Kierownikowi Zakładu Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii w Gliwicach za ofiarowanie doświadczalnego wątrobiaka Morrisa oraz szczurów wsobnego szczepu Buffalo, hodowanych dalej w zwierzętarni Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Dziękuję także mgr inż. Zofii Zaleskiej-Rutczyńskiej, Kierownikowi zwierzętarni w Zakładzie Histologii i Embriologii AM w Warszawie za ofiarowanie myszy szczepu C₃H ze spontanicznym rakiem sutka.

Wątroba pochodziła z białych szczurów wywodzących się ze szczepu Wistar. Do doświadczeń używano zwierząt o średnim wieku ok. 2 mies. i wadze ok. 200 g.

2.2. Przygotowanie materiału do doświadczeń.

Wszystkie czynności związane z pobieraniem i przygotowaniem do doświadczeń zarówno komórek nietkniętych oraz skrawków, jak i frakcji subkomórkowych prowadzono możliwie szybko w temp. 0-4°C. W preparatyce stosowano wirówkę z chłodzeniem MSE typu "Magnum" a frakcję mikrosomalną i cytoplazmatyczną otrzymywano przy pomocy ultrawirówki VAC-60 f. Janetki.

2.2.1. Komórki nietknięte i skrawki.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację lub zmiżdżenie szyjnego odcinka rdzenia kręgowego.

Płyn wysiękowy pobierano do 0,9% roztworu NaCl zawierającego 1mM EDTA p pH=7,0 i wirowano przy 225 g w ciągu 5 min, osad zawieszano w w.w. roztworze i wirowano 5 min. przy 1 500 g. Osadzone komórki raka wysiękowego Ehrlicha zawieszano następnie w środowisku Krebsa-Ringera z buforem fosforanowym /pH=7,4/ w stosunku wagowo-objętościowym 1:3 i dodawano do naczynek inkubacyjnych Warburga zawierających odpowiednie roztwory.

Lite guzy nowotworowe i tkanki prawidłowe pobierano natychmiast po zabiciu zwierzęcia, umieszczano w lodzie i oczyszczano z torebki łącznotkankowej, naczyń i ewentualnych ognisk martwiczych. Korę mózgu oddzielano dokładnie od istoty białej.

Tak przygotowany materiał cięto na skrawki o żądanej grubości za pomocą aparatu opisanego przez McIlwaina (80).

Skrawki wątroby i wątrobiaka Morrisa miały grubość 0,5 mm, spontanicznego raka sutka 0,3 mm a skrawki kory mózgu 0,2 mm. Skrawki umieszczano w naczynkach inkubacyjnych Warburga zawierających odpowiednie roztwory.

2.2.2. Homogenaty.

W celu otrzymania homogenatu komórek raka wysiękowego Ehrlicha płyn wysiękowy wirowano w roztworze 0,9% NaCl z 1mM EDTA /pH=7,4/ przy 225 g przez 5 min., komórki zawieszano w 0,25 M roztworze sacharozy z 1 mM EDTA /pH=7,4/ i po ponownym odwirowaniu przy podanych wyżej warunkach osadzano je wirując przy 1 500 g przez 5 min. Osadzone komórki zawieszano w wodzie podwójnie destylowanej i homogenizowano w szklanym homogenizatorze Pottera-Elvehema o małej "tolerancji", wykonując 8-10 przesuwów przy szybkich obrotach tłoka, a następnie dodawano do homogenatu 2 M roztwór sacharozy aż do uzyskania ostatecznego stężenia sacharozy 0,25 M w 20% homogenacie. Tak otrzymany homogenat komórek raka Ehrlicha używany był bezpośrednio do oznaczeń enzymatycznych. Homogenat przeznaczony do badania oddychania i glikolizy przygotowywano w 0,25 M mannitolu.

20% homogenaty guzów litych i tkanek prawidłowych przeznaczone do oznaczania aktywności heksokinazy uzyskiwano przez homogenizację tych tkanek w roztworze 0,25 M sacharozy /pH=7,4/ w homogenizatorze Pottera-Elvehema z teflonowym tłokiem o dużej "tolerancji", wykonując 10-15 przesuwów przy szybkich obrotach tłoka. Przed rozpoczęciem oznaczeń homoge-

naty pozostawiano przez ok. 30 min. w temp. 0-4°C dla oddzielenia strzępków tkanki łącznej i nie zhomogenizowanych fragmentów.

2.2.3. Frakcje mitochondrialne.

Frakcję mitochondrialną komórek wysiękowego raka Ehrlicha otrzymywano na drodze różnicowego wirowania homogenatu komórkowego wg. metody podanej przez Borsta (16). Homogenat komórek raka wysiękowego Ehrlicha otrzymany wg. procedury opisanej w rozdziale 2.2.2. rozcieńczano 1:1 0,25 M roztworem sacharozy i wirowano w ciągu 5 min. przy 700 g. Osad zawierający jądra i nierozbite komórki odrzucano, a supernatant wirowano w ciągu 10 min. przy 5 600 g. Supernatant zlewano a osad zawieszano w 7 ml 0,25 M sacharozy /pH=7,4/ i wirowano w ciągu 10 min. przy 12 500 g. Powierzchnię uzyskanego osadu mitochondriów przemywano kilkakrotnie małą ilością 0,25 M roztworu sacharozy, zawieszano w 0,25 M roztworze sacharozy i używano bezpośrednio do doświadczeń. Frakcje mitochondrialne prawidłowej wątroby szczura i wątrobiaka Morrisa otrzymywano wg. metody Schneidera w modyfikacji Myersa i Slatera (75). Z badanego materiału sporządzano 10% homogenat w 0,25 M roztworze sacharozy z 10 mM buforem Tris /pH=7,4/ i 1 mM EDTA w homogenizatorze Pottera-Elvehema z teflonowym tłokiem o dużej "tolerancji". Homogenizację prowadzono w ciągu 30 sek. przy wolnych obrotach tłoka. Po osadzeniu strzępków tkanek nierozbitych komórek oraz jąder przez wirowanie w ciągu 5 min. przy 800 g, supernatant wirowano w ciągu 10 min. przy 7000 g. Osadzone mitochondria

zawieszano w 0,25 M roztworze sacharozy i wirowano ponownie w ciągu 10 min. przy 18 000 g.

Po przemyciu powierzchni osadu małą ilością roztworu sacharozy uzyskane frakcje zawieszano w 0,25 M roztworze sacharozy i używano do doświadczeń.

Frakcje mitochondrialne kory mózgu świnki morskiej otrzymywano na drodze frakcjonowanego wirowania homogenatu wg. procedury zawierającej elementy metod opisanych przez Stahla i wsp. (93) i Ozawę i wsp. (84). Półkule mózgowe dwu świnek morskich, wydobyte natychmiast po dekapitacji zwierząt, umieszczano w 0,3 M roztworze mannitolu z 1 mM EDTA /pH=7,4/ o temp. 0°C i po odrzuceniu istoty białej homogenizowano w podanym wyżej środowisku /2 ml na 1 g tkanki/ w homogenizatorze z teflonowym tłokiem o dużej "tolerancji", wykonując 10 przesuwów przy wolnych obrotach tłoka. Następnie homogenat przelewano do szklanego homogenizatora o małej "tolerancji" i homogenizowano wykonując 10-15 przesuwów przy szybkich obrotach tłoka. Po rozcieńczeniu za pomocą opisanego wyżej roztworu mannitolu uzyskany 10% homogenat wirowano w ciągu 10 min. przy 1 000 g. Osad odrzucano, supernatant wirowano w ciągu 10 min. przy 10 000 g. Osadzone mitochondria zawieszano w 0,3 M roztworze mannitolu z 1 mM EDTA /pH=7,4/ i 0,3% albuminą bydlęcą /frakcja V/ i wirowano w ciągu 10 min. przy 5 000 g. Osad zawieszano w 0,3 M roztworze mannitolu z 1 mM EDTA, 0,3% albuminą i 8% ficollem /pH=7,4/ i wirowano w ciągu 30 min. przy 12 000 g. Osadzoną frakcję mitochondrialną przemywano kilkakrotnie 0,3 M roztworem mannitolu z 1 mM EDTA a następnie zawieszano w tym środowisku i używano do doświadczeń.

Frakcje mitochondrialne, a także komórki raka wysiękowego Ehrlicha z niektórych układów doświadczalnych poddane zostały badaniu w mikroskopie elektronowym. ^{1/}

Komórki oraz frakcje mitochondrialne uzyskane wg podanych wyżej metod utrwalano w 5 % roztworze aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym /pH - 7,3/ przez 1 godz a następnie w 2 % roztworze czterotlenku osmu z buforem fosforanowym /pH - 7,3/ przez 1,5 godz. Utrwalanie prowadzono w temp. 0-4°C. Materiał odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu i acetonie, zatapiano w Epon 812 i ultracienkie skrawki skrawano przy pomocy mikrotomu Rejchert Om U 2. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM-7 A przy 80 kV.

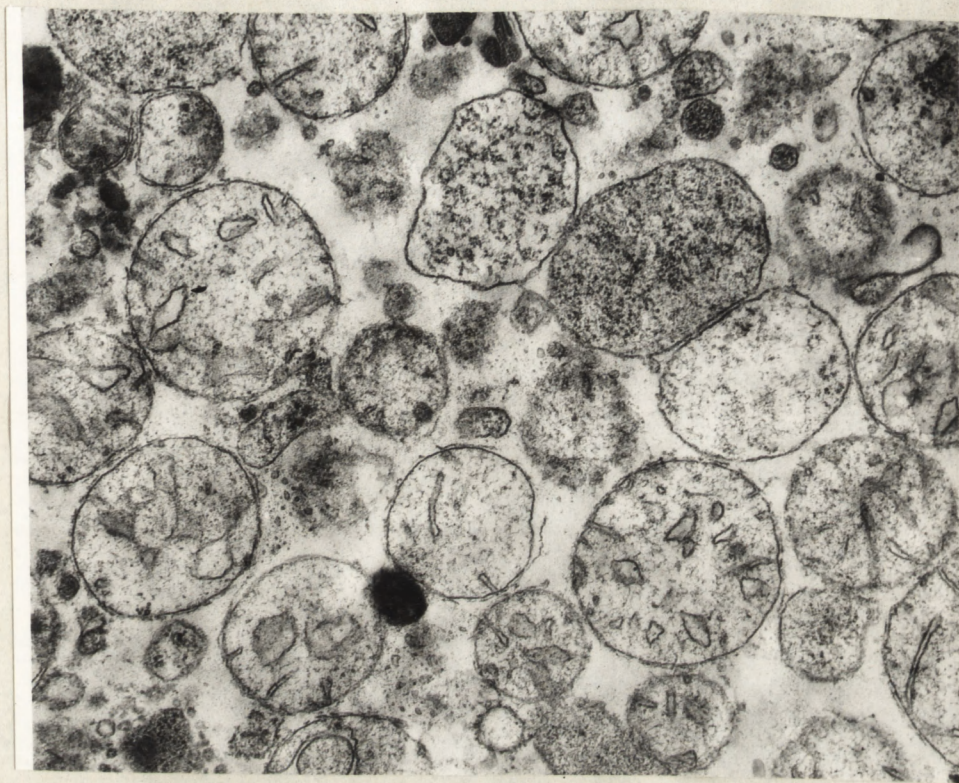
Ryc.1 -ilustruje frakcję mitochondrialną komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Widoczne są mitochondria wykazujące większe obrzmienie niż mitochondria wątroby, oraz dość liczne uszkodzenia błony zewnętrznej. Frakcja zawiera lizosomy i nieliczne mikrosomy.

Ryc.2 -ilustruje frakcję mitochondrialną prawidłowej wątroby szczura. Widoczne są liczne mitochondria o dość dobrze zachowanej strukturze, nieco obrzmiałe. W większości z nich zachowane są podwójne błony i grzebienie mitochondrialne. Frakcja zawiera nieliczne zanieczyszczenia - lizosomy i mikrosomy.

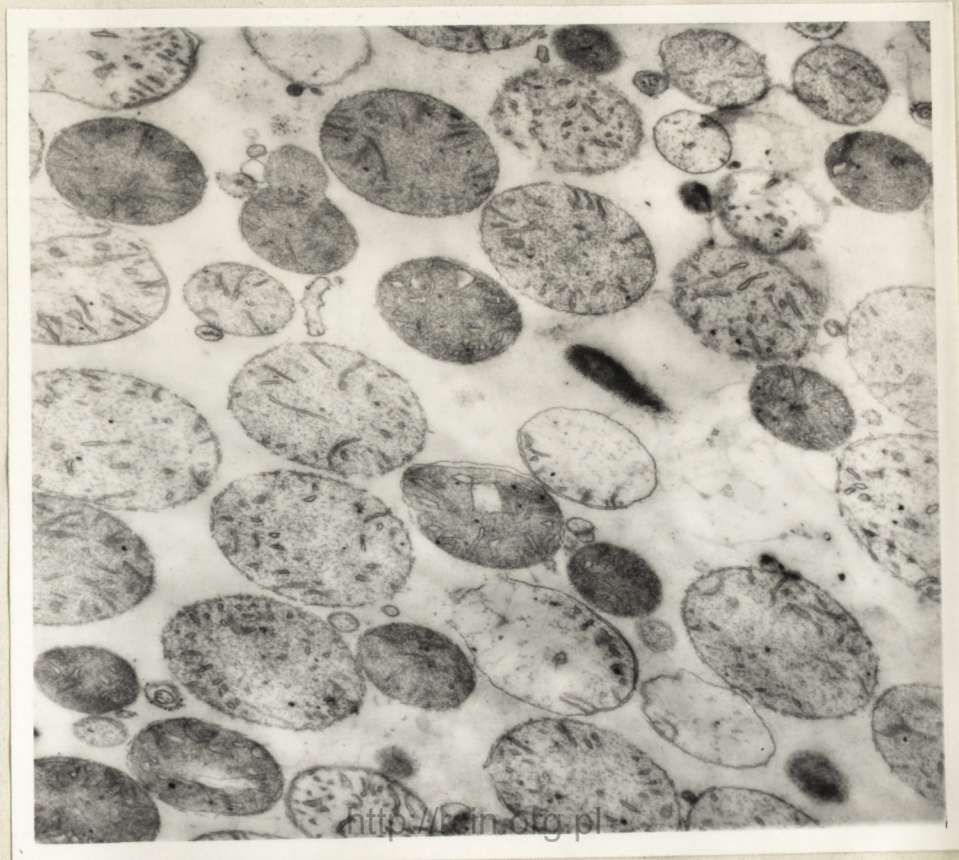
Ryc.3 -przedstawia frakcję mitochondrialną kory mózgu świnki morskiej. Widoczne liczne mitochondria wykazują bardzo znaczne uszkodzenia struktury. Nie widać błon otaczających / zewnętrznych i wewnętrznych / prawie we wszystkich

^{1/} Kontrolę w mikroskopie elektronowym łącznie ze zdjęciami wykonano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej CMDiK PAN w W-wie. W tym miejscu pragnę wyrazić podziękowanie doc.dr J.Borowiczowi za udostępnienie i pomoc w wykonywaniu kontroli mikroskopowej.

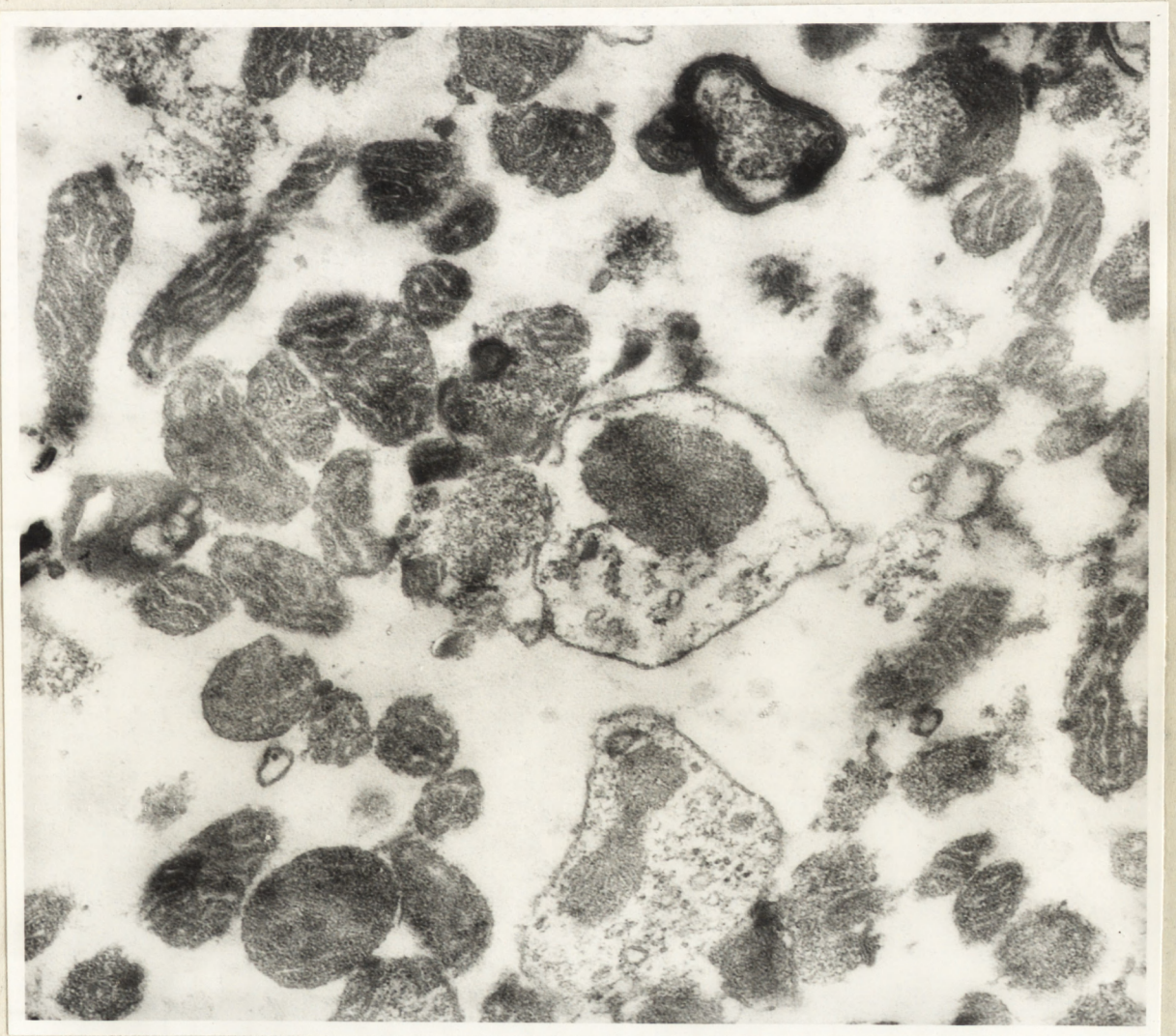
Ryc. 1 KONTROLA W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM
FRAKCJI MITOCHONDRIALNEJ KOMÓREK
RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA
(x 28 000)



Ryc. 2 KONTROLA W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM
FRAKCJI MITOCHONDRIALNEJ PRAWIDŁOWEJ WĄTROBY SZCZURA
(x 15 000)



Ryc. 3 KONTROLA W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM
FRAKCJI MITOCHONDRIALNEJ KORY MÓZGU ŚWINKI MORSKIEJ
(x 42 000)



mitochondriach. Bardzo gęsta matrix mitochondrialis markuje przebieg grzebieni b. licznych o niewidocznej błonie. Badana frakcja zawiera nieliczne zanieczyszczenia - struktury przypominające synaptosomy oraz fragmenty mieliny.

O zachowanej zdolności badanych mitochondriów do sprzężonej z oddychaniem aktywności fosforylacyjnej świadczą wyniki badania oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów zawarte w tabelach 13 - 16 /układy kontrolne bez heksoz/ oraz wykresy polarograficzne zużycia tlenu przez te mitochondria w czasie oksydacyjnej fosforylacji/Ryc. 6 /.

2.2.4. Układy cytoplazmatyczne.

W badaniu glikolizy cytoplazmy mózgu; komórek raka Ehrlicha posługiwano się frakcjami będącymi supernatantem uzyskanym po osadzeniu jąder, mitochondriów i większości lizosomów.

Komórki raka wysiękowego Ehrlicha dwukrotnie przemywane przez wirowanie w 0,9% NaCl z 1mM EDTA /pH=7,0/ a następnie osadzone przez wirowanie w ciągu 5 min. przy 1 500 g zawieszano w wodzie podwójnie destylowanej i homogenizowaną w szklanym homogenizatorze Pottera-Elvehjema o małej "tolerancji" wykonując 10 przesuwów przy szybkich obrotach tłoka. Następnie dodawano 1,4 M roztwór KCl aż do uzyskania ostatecznego stężenia KCl 0,140 M w 20% homogenacie.

Korę mózgu homogenizowano w 4 częściach objętościowych 0,175 M roztworu KCl na jedną część wagową kory, stosując homogenizator i warunki identyczne jak dla komórek raka Ehrlicha. Uzyskano w ten sposób 20% homogenat o ostatecznym stężeniu KCl - 0,140 M. Tak przygotowane homogenaty wirowano w ciągu

20 min. przy 15 000 g. Osad odrzucano, a zebrany supernatant używano do doświadczeń jako układ cytoplazmatyczny.

Podobnie uzyskaną frakcją posługiwała się w swoich badaniach Rossowska (93). Wykonana przez nią kontrola w mikroskopie elektronowym wykazała, prócz właściwej cytoplazmy, obecność fragmentów siateczki endoplazmatycznej.

2.2.5. Inne frakcje komórkowe raka wysiękowego Ehrlicha.

Frakcje jądrową otrzymywano z homogenatu komórek raka Ehrlicha w 0,25 M roztworze sacharozy, uzyskanego jak opisano wyżej /rozd.2.2.2./. Homogenat wirowano w ciągu 5 min. przy 700 g. Supernatant odrzucano, a osad zawierający jądra i nierozbite komórki zawieszano ponownie w wodzie podwójnie destylowanej i homogenizowano jak w czasie przygotowywania homogenatu pierwotnego. Po doprowadzeniu stężenia sacharozy do 0,25 M uzyskany homogenat ponownie wirowano w ciągu 5 min. przy 700 g. Osadzoną frakcję jądrową zawieszano w 0,25 M roztworze sacharozy i używano w doświadczeniach.

Frakcje mikrosomalną uzyskiwano po odwirowaniu homogenatu komórek raka Ehrlicha w 0,25 M sacharozie w ciągu 10 min. przy 15 000 g. Uzyskany supernatant wirowano w ciągu 1 godz. przy 105 000 g. Osadzoną frakcję mikrosomalną zawieszano w 0,25 M sacharozie i używano bezpośrednio w doświadczeniach.

Frakcje cytoplazmatyczną /sok komórkowy - cell sap/ otrzymywano z 20% homogenatu komórek raka wysiękowego Ehrlicha w 0,140 M roztworze KCl, uzyskanego jak opisano w rozdz. 2.2.4. przez wirowanie w ciągu 1 godz. przy 105 000 g. Uzys-

kany supernatant stosowano w doświadczeniach. Czystości trzech ostatnich frakcji nie sprawdzano metodami morfologicznymi ani biochemicznymi.

2.3. Metody badań

2.3.1. Pomiar oddychania komórek, skrawków i frakcji mitochondrialnych.

Oceny aktywności oddechowej dokonywano metodą manometryczną i polarograficzną.

Pomiary zużycia tlenu przy pomocy metody manometrycznej Warburga prowadzone były wg zasad opisanych przez Umbreit (105). Komórki, skrawki oraz homogenaty raka wąsłkowego Ehrlicha inkubowano w temp. 37°C przy stałym wytrząsaniu. W każdym naczynku, w 2 ml opisanego dalej środowiska inkubacyjnego zawarte było zwykle 83,3 mg wilgotnej masy komórek raka wąsłkowego Ehrlicha, ok. 100 mg wilgotnej masy skrawków tkanek prawidłowych lub guzów litych albo 6-8 mg białka homogenatów. Odczytów manometrycznych dokonywano co 10 lub 15 min. Czas inkubacji podano w opisie wyników dla każdego układu doświadczalnego oddzielnie.

Przy badaniu oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów metodą manometryczną inkubację prowadzono w temp. 25°C. Każde naczynko zawierało w końcowej objętości 2 ml odpowiedniego środowiska inkubacyjnego 3 do 5 mg białka mitochondrialnego. Po 10 lub 15 min. oddychania w nieobecności akceptora fosforanu dodawano z ramienia bocznego odpowiednią ilość roztworu ADP. Odczytów manometrycznych dokonywano co 2 lub 5 min.

Przed i po 40 min. inkubacji oznaczano w zawieszynie mitochon-

driów stężenia nukleotydów adeninowych. Współczynnik fosforylacji ATP/O wyznaczano dzieląc przyrost zawartości ATP w naczynku, wyrażony w μ molach przez ilość tlenu zużytego w czasie oksydacyjnej fosforylacji po dodaniu ADP /stan 3/ wyrażoną w ugatomach. Iloraz kontroli oddechowej RC wyliczano jako stosunek szybkości zużywania tlenu przez mitochondria w czasie oksydacyjnej fosforylacji - po dodaniu ADP /stan 3/ do szybkości zużycia tlenu pod nieobecność ADP /stan 4/.

Pomiary zużycia tlenu metodą polarograficzną z n a ^{1/} prowadzono przy użyciu elektrody tlenowej typu Clarka z zastosowaniem polarografów LP-55 /rejestracja na papierze światłoczułym/ lub LP-60 /rejestracja przy pomocy urządzenia samopiszącego/.

Oddychanie komórek raka Ehrlicha badano w temp. 37°C, a oksydacyjną fosforylację mitochondriów w temp. 25°C w termostatowanych naczynkach ze stałym mieszaniem zawartości. Ostateczna objętość płynu inkubacyjnego wynosiła 1,3 lub 1,5 ml. Elektroda Clarka, testowana wg zasad podanych przez Dawlesa (34) wykazywała płaskie plateau napięciowe w zakresie - 0,45 do - 0,95 V.

^{1/} W tym miejscu pragnę podziękować prof.dr L.Wojtczakowi za cenne rady dotyczące oznaczenia tlenu metodą polarografiiczną oraz za ofiarowanie specjalnej błony polietylenowej z ułatwioną dyfuzją tlenu, oddzielającej elektrodę od badanego środowiska. Przygotowanie i wprowadzenie omawianej metody w Zespole Biochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN przeprowadziliśmy wspólnie z lek.Joanną Strosznajder.

W czasie oznaczeń katoda platynowa była polaryzowana w stosunku do elektrody odniesienia /Ag/AgCl/ napięciem -0,6 V. Kalibrację elektrody oraz obliczanie szybkości zużycia tlenu i współczynnika ADP/O prowadzono metodą Chance'a (27).

2.3.2. Pomiar glikolizy

Oceny aktywności glikolitycznej badanego materiału dokonywano przez pomiar produkcji kwasu mlekowego. Inkubację prowadzono na aparacie Warburga w temp. 37° przy stałym wytrząsaniu. Za warunki tlenowe inkubacji przyjmowano obecność powietrza o normalnym składzie jako fazy gazowej naczynka inkubacyjnego. W warunkach beztlenowych fazę gazową stanowił azot. Czas inkubacji podano w opisie każdego z układów doświadczalnych. Oznaczenie kwasu mlekowego wykonywano przed i po inkubacji, przyjmując różnicę stężeń za produkcję w badanym czasie. Stężenie kwasu mlekowego badano metodą enzymatyczną wg Horna i Brunsza (51) przy pomocy dehydrogenazy mleczanowej /EC 1.1.1.27/ w reakcji sprzężonej z redukcją NAD. Białko strącano 6% kwasem nadchlorowym, a po odwirowaniu odbiżoną próbkę dodawano w ilości 100 ul do próbki zawierającej 0,41 M bufor glicynowy /pH=9,0/, 0,33M roztwór hydrazyny, 2,2mM NAD i 0,03 mg dehydrogenazy mleczanowej po czym inkubowano w ciągu 1 godz. w temp. 25°C. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczano wodą podwójnie destylowaną w stosunku 1:1 /ostateczna objętość 2,43 ml/ i oznaczano ekstynkcję powstałego zredukowanego NAD na spektrofotometrze Hilgera przy długości światła 340 mμ.

2.3.3. Oznaczanie nukleotydów adeninowych.

Oznaczanie stężeń nukleotydów adeninowych dokonywano metodami enzymatycznymi przy użyciu reakcji sprzężonych z utlenianiem zredukowanego NAD. Pomiarów ekstynkcji dokonywano na spektrofotometrze Hilgera przy 340 m μ .

Przy oznaczeniu stężeń ATP, ADP i AMP w środowiskach zawierających homogenaty, mitochondria lub układy cytoplazmatyczne badaną próbkę dodawano w stosunku 1:1 do 6% kwasu nadchlorowego, a po odwirowaniu i zubożeniu supernatantu 1,3 M K_2CO_3 i strąceniu powstałego nadchloranu potasu dodawano do kuwet pomiarowych.

Komórki raka wysiękowego Ehrlicha inkubowano przed oznaczeniem w nich stężeń nukleotydów adeninowych w postaci 8,33% zawiesiny /w/v/ w roztworze Krebsa-Ringera. Białko strącano przez dodanie do 3 ml zawartości naczynka 200 μ l 60% kwasu nadchlorowego.

Skrawki raka sutka myszy i wątroby w ilości 250 mg wilgotnej masy inkubowano w 2 ml roztworu Krebsa-Ringera, skrawki wątrobiaka Morrisa - 250 mg w 3 ml, a skrawki kory mózgu w ilości ok. 300 mg w 2,5 ml tego roztworu. Białko strącano przez dodanie do zawartości naczynka inkubacyjnego 150 μ l /a przy badaniu skrawków kory mózgu 200 μ l/ 60% kwasu nadchlorowego, a następnie homogenizowano ręcznie w szklanych mikrohomogenizatorach Dounce'a.

Po odwirowaniu w temp. 0°C w ciągu 10 min. przy 500 g /przy oznaczeniu stężeń nukleotydów w skrawkach kory mózgu - w ciągu 15 min. przy 10 000 g/, supernatant zubożniano 1,3 M roztworem K_2CO_3 , a nadchloran potasu wytrącano przez zamro-

żenie próbki i usuwano wirując w ciągu 10 min. przy 1 500 g. ATP oznaczano w otrzymanym ekstrakcie metodą Buchera opisaną przez Adama (4) z użyciem kinazy fosfoglicerynianowej /EC 2.7.2.3./ i dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego /EC 1.2.1.12./. Badaną próbkę dodawano do kuwety zawierającej 43,7 mM trójetanolaminę /pH=7,6/, 1,7 mM MgSO₄, 2,6 mM 3-fosfo-D-glicerynian i 0,1 mM zredukowany NAD w 2,75 ml objętości końcowej, a po oznaczeniu ekstynkcyj początkowej dodawano 0,1 mg dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego i 0,025 mg kinazy fosfoglicerynianowej. Zawartość ATP w próbce wyliczono ze spadku ekstynkcyj zredukowanego NAD.

Stężenia ADP i AMP w odbiałczonych i zobojętnionych próbkach oznaczano wg metody opisanej przez Adama (2) z użyciem kinazy pirogronianowej /EC 2.7.1.40./, dehydrogenazy mleczanowej /EC 1.1.1.27./ i kinazy adenylanowej /EC 2.7.4.3./. Badaną próbkę dodawano do kuwety zawierającej w 1,67 ml objętości końcowej 0,13 M trójetanolaminę /pH=7,5/, 0,45 mM fosfoenolopirogronian, 58,5 mM KCl, 18 mM MgSO₄, 0,18 mM zredukowany NAD i 0,015 mg dehydrogenazy mleczanowej. Po oznaczeniu ekstynkcyj początkowej dodawano 0,015 mg kinazy pirogronianowej i oznaczano spadek ekstynkcyj zredukowanego NAD, z którego wyliczano stężenie ADP w próbce. Spadek ekstynkcyj zredukowanego NAD po dodaniu 0,03 mg kinazy adenylanowej był miarą zawartości AMP w próbce.

2.3.4. Pomiary aktywności enzymów.

Aktywność heksokinazy w homogenatach i frakcjach mitochondrialnych oznaczano metodą spektrofotometryczną Benneta

i wsp. w modyfikacji Beattie i wsp. (9) opartą na pomiarze powstającego G-6-P z użyciem dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w reakcji sprzężonej z redukcją NADP.

Kuweta pomiarowa zawierała 15 mM ATP, 25 mM glukozę, 80 mM Tris /pH=8,0/, 3 mM EDTA, 19 mM MgCl₂, 1 mM NADP, 5 µg dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej i 10 ul badanej próbki /0,10 - 0,15 mg białka homogenatów lub 0,05 - 0,10 mg białka mitochondrialnego/ w ogólnej objętości 1,5 ml. Pomiarów szybkości przyrostu ekstynkcji powstającego zredukowanego NADP dokonywano w temp. pokojowej na spektrofotometrze Hilgera przy 340 mµ.

Aktywność kinazy adenylanowej w homogenatach komórek raka wsiękowego Ehrlicha oznaczano spektrofotometrycznie przez pomiar szybkości powstawania ATP opisaną już metodą wg Buchera. Pomiarów w temp. pokojowej na spektrofotometrze Hilgera przy 340 mµ dokonywano w kuwecie zawierającej 10 mM ADP, 90 mM trójetanolaminę /pH=7,6/, 3,5 mM MgSO₄, 5,3 mM 3-fosfo-D-glicerynian, 0,21 mM zredukowany NAD, 0,4 mg dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego, 0,1 mg kinazy fosfoglicerynianowej i 20 ul badanego homogenatu /0,15 - 0,20 mg białka/ w og. objętości 2,87 ml.

Aktywność ATPaz /EC 3.6.1.3./ mitochondriów komórek raka wsiękowego Ehrlicha i prawidłowej wątroby szczura oznaczano przez pomiar uwalnianego ortofosforanu wg zmodyfikowanej procedury Myersa i Slatera (75). Środowisko inkubacyjne zawierało w 1 ml 50 mM Tris /pH=7,0/, 2 mM EDTA, 15 mM KCl, 50 mM sacharozę, 5 mM ATP i zawiesinę mitochondriów w ilości 1-2 mg białka. Gdy badano wpływ Mg⁺⁺ i 2,4-dwunitrofenolu, dodawano je w stężeniach: MgCl₂ 7,5 mM i

DNP 0,1 mM.

Inkubację prowadzono w temp. 25°C w ciągu 15 min., po czym oznaczano stężenie fosforanu nieorganicznego przed i po inkubacji.

2.3.5. Inne oznaczenia ilościowe.

Oznaczenia stężeń g l u k o z y i 2 - d e z o k s y - g l u k o z y dokonywano metodą Huggetta i Nixona (52) przy zastosowaniu oksydazy glukozowej /EC 1.1.3.4./ i peroksydazy /EC 1.11.1.7/ z użyciem roztworów standartowych glukozy i 2-dezoksyglukozy dla każdej serii oznaczeń. Próbkę odbiałoną 3% kwasem nadchlorowym w ilości 0,1 ml dodawano do próbki zawierającej w 2,5 ml objętości 0,10 M bufor fosforanowy /pH=7,0/, 0,100 mg peroksydazy, 0,625 mg oksydazy glukozowej i 0,165 mg chlorowodoru o-dianizydy, po czym inkubowano 35 min. w temp. pokojowej. Ekstynkcję mierzono na fotokolorymetrze Collemena przy 340 mμ.

B i a ł k o oznaczano metodą Lowry wg przepisu Layne'a (69) z użyciem albuminy bydlęcej jako standartu, lub metodą Kjeldahla opisaną przez Kinga (60).

Stężenie f o s f o r a n u nieorganicznego oznaczano metodą Fiske i Subbarowa wg Kinga (60).

Przy oznaczaniu stężenia fosforanu nieorganicznego w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha komórki zawieszono w czasie doświadczenia w środowisku Krebsa-Ringera z buforem fosforanowym osadzano przez wirowanie w ciągu 10 min. przy 1 500 g w temp. 0 - 4°C, następnie zawieszano w 0,9% roztworze NaCl z 1 mM EDTA i ponownie osadzano. Białko strącone przez

homogenizację w 6% kwasie nadchlorowym oddzielano przez odwirowanie. W uzyskanym ekstrakcie po zobojętnieniu go K_2CO_3 oznaczano stężenie fosforanu nieorganicznego $[Pi]$, oraz absorpcję światła przy 260 m μ /maksimum absorpcji dla związków adeninowych/.

A b s o r p c j ę ś w i a t ł a przy 260 m μ $[E_{260}]$ przez opisany wyżej ekstrakt z komórek raka wsiękowego Ehrlicha jako orientacyjny wskaźnik zawartości związków adeninowych badano na spektrofotometrze Hilgera w kwarcowych kuwetach o drodze światła 1 cm. Wyniki przedstawiono w jednostkach ekstynkcji w przeliczeniu na 100% wyciąg komórkowy.

2.3.6. Środowiska inkubacyjne.

W doświadczeniach prowadzonych na skrawkach i komórkach nietkniętych /przy badaniu oddychania, glikolizy i stężeń nukleotydów adeninowych /badany materiał inkubowano w środowisku Krebsa-Ringera z buforem fosforanowym o pH=7,4 zawierającym 120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,6 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $MgSO_4$ i 15,6 mM bufor $Na_2HPO_4 - HCl$ /pH=7,4/.

Skrawki kory mózgu inkubowano w środowisku Krebsa-Ringera o zmodyfikowanym składzie, zawierającym 120 mM NaCl, 2,6 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $MgSO_4$, 1,2 mM KH_2PO_4 , 50 mM bufor Tris - HCl pH=7,4 oraz 4,8 lub 94,8 mM KCl. Sumaryczne stężenie jonów K^+ w środowisku inkubacyjnym wynosiło więc 6 lub 100 mM. Przy badaniu oddychania, glikolizy i zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych w czasie inkubacji homogenatów komórek raka wsiękowego Ehrlicha posługiwano się środowiskiem inkubacyjnym o składzie: 10 mM bufor $K_2HPO_4 - HCl$

/pH=7,4/, 50 mM bufor Tris-HCl /pH=7,4/, 15 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 116 mM mannitol, 5 mM bursztynian, 1,5 mM ATP, 0,2 mM NAD i 0,3 ml 20% homogenatu /6-8 mg białka/ w 0,25 M roztworze mannitolu. Ostateczna objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 2 ml.

W czasie badania oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów komórek raka wysiękowego Ehrlicha, wątrobiaka Morrisa i prawidłowej wątroby szczura stosowano środowisko inkubacyjne podane przez Bonsta (16) o składzie: 50 mM sacharoza, 50 mM bufor Tris-HCl /pH=7,4/, 20 mM bufor K₂HPO₄ - HCl /pH=7,4/, 15 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1% albumina bydlęca /frakcja V/, 60 mM bursztynian i ok. 2,5 mg białka mitochondrialnego. Przy inkubacji mitochondriów wątroby na aparacie Warburga środowisko inkubacyjne nie zawierało albuminy, a przy badaniu oddychania elektrodą Clarka stosowano bursztynian w stężeniu 5 lub 10 mM. Ostateczna objętość mieszaniny inkubacyjnej na aparacie Warburga wynosiła 2 ml, a w badaniach polarograficznych 1,3 ml.

Środowisko inkubacyjne stosowane przy badaniach oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów kory mózgu zbliżone do opisanego przez Ozawę i wsp. (84) zawierało 0,3 M mannitol, 10 mM bufor-Tris-HCl /pH=7,4/, 20 mM bufor K₂HPO₄-HCl /pH=7,4/, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,4% albuminę, 10 mM bursztynian lub glutaminian i ok. 2,5 mg białka mitochondrialnego w ostatecznej objętości 2 ml przy inkubacji na aparacie Warburga lub 1,3 ml przy badaniu metodą polarograficzną. Stężenie ADP stosowane przy badaniach oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów podano w opisie wyników dla każdego układu doświadczalnego oddzielnie.

Glikolizę układów cytoplazmatycznych komórek raka wysiękowego Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej badano w środowisku inkubacyjnym o składzie zbliżonym do podanego przez Beattie i wsp. (9) , zawierającym 0,4 mM ATP, 8 mM $MgCl_2$, 8 mM bufor K_2HPO_4-HCl /pH=7,4/, 24 mM amid kwasu nikotynowego, 0,4 mM NAD, 20 mM bufor Tris-HCl /pH=7,4/, 10 mM glukozę i 0,3 ml 20% układu cytoplazmatycznego w 0,14 M KCl, /3-5 mg białka/ w ostatecznej objętości 2,5 ml.

2.3.7. Odczynniki.

Dehydrogenaza mleczanowa, kinaza fosfoglicerynianowa, dehydrogenaza aldehydu fosfoglicerynowego, kinaza pirogronianowa, kinaza adenylanowa, oksydaza glukozowa, peroksydaza, dehydrogenaza glukozo-6-fosforanu oraz inne odczynniki do oznaczania kwasu mlekowego, nukleotydów adeninowych i glukozy pochodziły z firmy Boehringer.

2-dezoksyglukoza, glukozo-6-fosforan, 2-dezoksyglukozo-6-fosforan, ATP, ADP, NAD, NADP, bursztynian sodu, mleczan litu, pirogronian sodu, jodoocetan sodu, albumina bydlęca /frakcja V/ - z firmy Sigma.

Amid kwasu nikotynowego i kwas glutaminowy - z firmy BDH.

Fruktoza i 2,4-dwunitrofenol - z firmy Merck.

Ficoll - z firmy Pharmacia.

EDTA i pewna ilość albuminy bydlęcej /fr.V/ pochodziły z firmy Light-Colnbrook.

Tris - bufor - z firmy Fluka AG i Sigma.

Mannit - z firmy Chemapol /Praha/.

Glukoza, mannoza i galaktoza z firmy Motor /Warszawa/.

Pozostałe odczynniki pochodziły z Fabryki Odczynników Chemicznych w Gliwicach.

3. WYNIKI BADAŃ

KOMÓRKA

3.1. Zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych a oddychanie i glikoliza komórek nowotworowych i prawidłowych w obecności dezoksyglukozy.

W pierwszym etapie pracy badano wpływ dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w powiązaniu z działaniem na oddychanie i glikolizę komórek nie-
tkniętych. Badania te prowadzone przede wszystkim na komórkach raka wydzielniczego Ehrlicha obejmowały także skrawki guzów litych: wątrobiaka Morrisa i spontanicznego raka sutka myszy, oraz skrawki prawidłowej wątroby szczura i kory mózgu świnki morskiej.

W omawianych doświadczeniach oznaczano zawartość ATP, ADP i AMP w komórkach po inkubacji w określonych warunkach oraz zużycie tlenu i produkcję kwasu mlekowego przez ten sam materiał w czasie inkubacji.

Uzyskane wyniki zgrupowano w rozdziałach w zależności od pochodzenia badanego materiału.

3.1.1. Komórki raka wysiękowego Ehrlicha.

W omawianych badaniach poza pomiarem aktywności oddechowej i glikolitycznej i oznaczeniem zawartości nukleotydów adeninowych w komórkach raka Ehrlicha, w niektórych doświadczeniach dla uzyskania orientacyjnej oceny stężenia związków adeninowych oznaczano absorpcję światła przy 260 m μ w wyciągu z badanych komórek. W kilku doświadczeniach badano także wewnątrzkomórkowe stężenie fosforanu nieorganicznego.

Jak wynika z tabeli 1 w komórkach raka Ehrlicha w warunkach oddychania endogennego i podczas glikolizy tlenowej oraz beztlenowej utrzymywały się wysokie stężenia ATP, sumy nukleotydów adeninowych /charakterystyczna wysoka absorpcja światła przy 260 m μ / i fosforanu nieorganicznego. Także w obecności fruktozy, mannozy i galaktozy w warunkach tlenowych utrzymywało się prawidłowe stężenie nukleotydów adeninowych / Tab. 2 /. Obserwowano wyraźne hamowanie oddychania badanych komórek w czasie inkubacji z glukozą /efekt Crabtree/, fruktozą i mannozą. Heksozy te były równocennymi substratami ciągu glikolitycznego w warunkach tlenowych. Natomiast galaktoza pozostawała bez wpływu na oddychanie komórek raka Ehrlicha i była bardzo słabo glikolizowana. Jak wynika z tabeli 2 i 4 w badanych komórkach występował wyraźny efekt Pasteura.

Dezoksyglukoza wywoływała głębokie zaburzenia metabolizmu energetycznego, wyrażającego się różnego stopnia hamowaniem glikolizy, oddychania i zmianami stężeń nukleotydów adeninowych. W czasie inkubacji komórek raka Ehrlicha

Tabela 1

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych i fosforanu nieorganicznego w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha.

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkub. /10mM/	Stężenia nukleotydów adeninowych / μ mole/lg w.m./												Pi / μ mole/lg w.m./			E ₂₆₀					
		Przed inkubacją				Po 40 min. inkubacji								Przed inkub.	O ₂		Przed inkub.	N ₂				
		ATP	ADP	AMP	Σ	O ₂				N ₂					O ₂	N ₂		O ₂	N ₂			
1.	Bez substratu G DG	2,17	0,94	0,32	3,43	2,10	1,07	0,21	3,38													
						0,40	0,69	0,19	1,28													
2.	Bez substratu G DG G + DG	2,29	0,94	0,63	3,86	2,24	0,53	0,63	3,40					9,6	9,6		27,2	28,8				
						1,78	0,36	0,71	2,65	1,66	0,62	0,64	2,92	10,4	9,9		29,6	23,				
						0,44	0,51	0,48	1,43					6,1			16,9					
						1,69	0,37	0,35	2,41	1,54	0,44	0,79	2,77	5,4	5,9		17,0	19,				
3.	Bez substratu G DG G + DG	1,73	0,74	0,52	2,99	2,07	0,31	0,33	2,76					10,6	9,9		31,0	29,2				
						1,99	0,17	0,51	2,67	1,79	0,42	0,19	2,40	8,5	10,2		26,4	25,				
						0,31	0,33	0,50	1,14					5,6			14,1					
						1,45	0,22	0,25	1,94	1,50	0,36	0,39	2,25	4,0	6,2		19,8	18,				

Pi - fosforan nieorganiczny^Y

E₂₆₀ - absorpcja światła przy 260 m μ / w jednostkach ekstynkcji, przeliczona na 100 % ekstrakt./

O₂ - warunki tlenowe; N₂ - warunki beztlenowe.

Tabela 2

Wpływ 2-dezoksyglukozy na oddychanie, glikolizę i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach raka wydzielniczego Ehrlicha inkubowanych w obecności różnych heksoz w warunkach tlenowych (79)

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /10 mM/	Zużycie tlenu / μ mole/lg w.m./ 20 min/	Produkcja kwasu mlekowego / μ mole/lg w.m./ 20 min/	Stężenia nukleotydów adeninowych / μ mole/lg w.m./			
				ATP	ADP	AMP	Σ
1.	Bez substratu	18,9		1,95	1,58	1,30	4,83
	DG	14,2		0,39	1,08	1,31	2,78
	G	12,5	94,5	1,83	1,01	1,35	4,19
	G + DG	15,2	59,5	1,80	0,50	1,42	3,72
	F	11,1	96,1	2,57	0,57	1,34	4,48
	F + DG	13,1	0,0	0,44	0,72	1,12	2,28
	Man	10,6	100,1	1,75	0,55	1,46	3,76
	Man + DG	11,7	75,8	1,83	0,41	1,48	3,72
	Gal	21,0	5,1	2,65	0,75	1,35	4,75
	Gal + DG	12,1	7,8	0,28	0,47	1,46	2,21
2.	Bez substratu	21,6		2,84	0,52	0,24	3,60
	DG	13,9		0,48	0,49	0,24	1,21
	G	12,2	88,1	2,44	0,45	0,15	3,04
	G + DG	15,8	67,0	2,51	0,34	0,13	2,98
	F	13,9	78,0	3,05	0,31	0,17	3,53
	F + DG	13,4	2,2	0,83	0,42	0,20	1,45
	Man	12,4	87,5	2,30	0,00	0,42	2,72
	Man + DG	15,2	71,5	1,25	0,40	0,17	1,82
	Gal	22,0	2,8	2,93	0,46	0,18	3,57
	Gal + DG	11,5	1,7	0,53	0,47	0,14	1,14
3.	Bez substratu	13,4		1,85	0,81	0,17	2,83
	DG	9,6		0,36	0,32	0,67	1,35
	G	9,1	61,5	2,13	0,63	0,24	3,00
	G + DG	10,6	51,5	1,76	0,65	0,12	2,53
	F	10,0	60,0	2,14	0,53	0,24	2,91
	F + DG	8,9	5,3	0,36	0,35	0,51	1,22
4.	Bez substratu	13,6		1,04	0,53	0,16	1,73
	DG	9,1		0,41	0,00	0,39	0,80
	G	9,1	62,9	1,78	0,41	0,13	2,32
	G + DG	12,2	57,3	1,99	0,38	0,25	2,62
	F	11,2	56,0	1,62	0,44	0,18	2,24
	F + DG	10,0	0,8	0,05	0,12	0,65	0,82
5.	Bez substratu	19,0		2,00	0,76	1,15	3,91
	G	15,7	54,1				
	Man	14,0	47,4	2,24	0,17	0,97	3,38
	Man + DG	14,3	46,6	1,78	1,57	0,86	4,21
6.	Bez substratu	23,6		2,71	1,61	1,39	5,71
	G	13,7	54,3				
	Man	12,9	50,3	2,02	1,09	1,33	4,44
	Man + DG	13,0	52,8	1,77	0,58	1,17	3,52

G - glukoza
 DG - 2-dezoksyglukoza
 F - fruktoza

Man - mannoza
 Gal - galaktoza

w warunkach tlenowych w obecności 10 mM dezoksyglukozy następowało wybitne obniżenie stężenia ATP i sumy nukleotydów adeninowych, co wyrażało się także znacznym obniżeniem absorpcji światła przy 260 mμ /Tab. 1 /. Wewnątrzkomórkowe stężenie fosforanu nieorganicznego ulegało w takich warunkach wyraźnemu obniżeniu. W obecności DG dochodziło także do hamowania oddychania endogennego w podobnym stopniu jak w obecności glukozy, fruktozy i mannozy /Tab. 2 /. Wyniki przedstawione w tabeli 3 wskazują, że zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach inkubowanych w warunkach beztlenowych bez substratu glikolitycznego a w obecności DG nie odbiegało od stanu obserwowanego w komórkach kontrolnych /bez DG/. W obu wypadkach następowało obniżenie stężenia ATP z równoważnym przyrostem AMP. Stężenie sumy nukleotydów adeninowych ulegało w tych warunkach nieznacznemu tylko obniżeniu w porównaniu ze stanem wyjściowym. Badano także wpływ DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha glikolizujących kosztem glukozy i innych heksoz /Tab. 2 /. Jak wynika z tabeli 1 i 3 w obecności glukozy i dezoksyglukozy w stężeniach ekwimolarnych, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, dochodziło do mniejszego obniżenia stężenia ATP i sumy nukleotydów adeninowych niż w obecności samej tylko dezoksyglukozy. Podobny efekt wykazywała mannoza /Tab. 2 /. Natomiast stężenie fosforanu nieorganicznego w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha inkubowanych w obecności glukozy i DG było nawet niższe od stężenia Pi w komórkach poddanych działaniu samej tylko dezoksyglukozy. Dalsza analiza wyników tabeli 2 wskazuje na hamowanie przez DG

Tabela 3

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych i glikolizę komórek wysiękowego raka Ehrlicha w warunkach beztlenowych.

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /10mM/	Stężenie nukleotydów adeninowych / μ mole/lg w.m./								Produkcja kwasu mlekowego / μ mole/lg w.m./20min/
		Stan przed inkubacją				Stan po 20 min.inkubacji				
		ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	
1.	Bez substratu	1,43	0,85	0,64	2,92	0,16	0,42	1,78	2,36	—
	G					1,76	0,51	0,53	2,80	115,0
	DG					0,15	0,34	1,87	2,36	—
	G + DG					0,70	0,80	0,49	1,99	108,8
2.	Bez substratu	1,68	0,85	0,54	3,07	0,28	0,51	1,74	2,53	—
	G					1,73	0,29	0,58	2,60	124,3
	DG					0,17	0,27	1,85	2,29	—
	G + DG					0,75	0,65	0,51	1,91	120,5
3.	Bez substratu	1,87	0,75	0,10	2,72	—	—	—	—	—
	G					2,18	0,65	0,14	2,97	75,0
	G + DG					0,98	0,63	0,23	1,84	64,1
4.	Bez substratu	1,46	0,49	0,25	2,20	—	—	—	—	—
	G					1,57	0,14	0,23	1,94	83,4
	G + DG					1,09	0,23	0,14	1,46	68,6

G - glukoza; DG- 2-dezoksyglukoza

produkcji kwasu mlekowego w warunkach tlenowych kosztem glukozy w granicach 9 - 37%, a kosztem mannozy w zakresie 0 - 25%. Hamowanie glikolizy w warunkach beztlenowych przez dezoksyglukozę podaną w stężeniu ekwimolarnym z glukozą wahało się w granicach 3- 18%. Obserwowano także tendencję do obniżania przez DG efektu Crabtree wywołanego przez glukozę i mannozę. Dezoksyglukoza w obecności fruktozy i galaktozy wywoływała zmiany w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych, identyczne jak w wypadku działania samej DG. Dochodziło do niemal całkowitego zahamowania produkcji kwasu mlekowego kosztem fruktozy i do dalszego obniżenia i tak minimalnej produkcji kwasu mlekowego kosztem galaktozy. Obserwowano też tendencję do pogłębiania przez DG efektu Crabtree wywołanego przez fruktozę oraz do wystąpienia hamowania oddychania pod działaniem galaktozy wraz z dezoksyglukozą.

W związku z obserwowanym słabym wpływem DG na stężenie ATP w komórkach Ehrlicha inkubowanych w obecności glukozy, wyniknął poruszony już w założeniach pracy problem możliwości udziału obniżenia ATP w mechanizmie działania dezoksyglukozy na glikolizę. Interesujące wydawało się także dokładniejsze poznanie wpływu DG na efekt Crabtree wywołany przez glukozę. W rozwinięciu tych badań uwzględniono wpływ różnych stężeń DG na oddychanie, glikolizę i zachowanie się stężeń ATP w komórkach raka wsiękowego Ehrlicha inkubowanych w obecności 10 mM glukozy. Wyniki przedstawione są w tabeli 4 i na rycinie 4. Jak wynika z tych danych, zarówno obniżenie przez DG efektu Crabtree jak i hamowanie

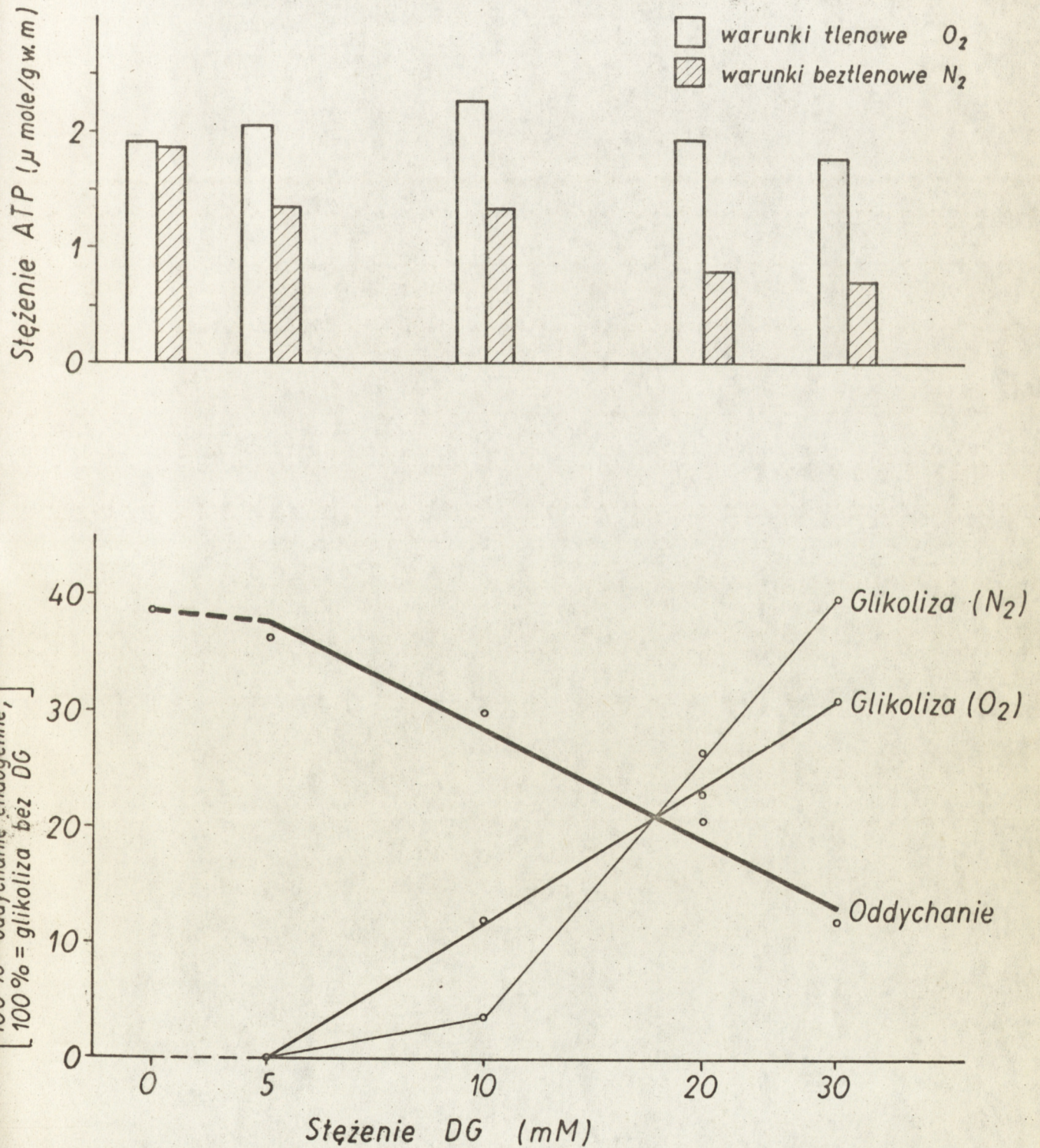
T a b e l a 4

Wpływ różnych stężeń 2-dezoksyglukozy na oddychanie, glikolizę i zachowanie się stężeń ATP w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha (102).

Nr. Dośw.	Stężenie glukozy /mM/	Stężenie 2-dezoksyglukozy /mM/	Zużycie tlenu / μ mole/lg w.m./20min/	Produkcja kwasu mlekowego / μ mole/lg w.m./20 min./		Stężenie ATP po 20 min. inkubacji / μ mole/lg w.m./	
				O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
1.	0	0	23,2		—		
	10	0	15,3	55,3	109,0	1,68	2,12
	10	5	16,6	55,3	108,5	1,23	1,79
	10	10	18,2	49,0	106,5	1,99	1,71
	10	20	17,0	43,5	77,0	2,14	0,89
	10	30	20,4	39,2	57,6	1,95	0,71
2.	0	0	23,3		—		
	10	0	14,4	56,0	103,0	2,13	2,04
	10	10	16,9	50,5	106,5	2,60	1,60
	10	20	18,1	45,5	82,5	1,97	0,84
	10	30	20,6	42,0	68,5	1,98	0,82
3.	0	0	20,1		—		
	10	0	13,1	63,4	100,7	1,93	1,52
	10	5	13,4	59,9	97,5	2,44	0,51
	10	10	13,0	54,4	88,6	2,21	0,83
	10	20	16,4	45,1	73,5	1,70	0,67
	10	30	18,4	39,1	61,9	1,44	0,60

O₂ - warunki tlenoweN₂ - warunki beztlenowe

Ryc. 4 WPLYW DEZOKSYGLUKOZY NA GLIKOLIZĘ, ODDYCHANIE I ZACHOWANIE SIĘ STĘŻEŃ ATP W KOMÓRKACH RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA *)



*) w środowisku inkubacyjnym obecna glukoza (10 mM)

glikolizy tlenowej było w badanym zakresie stężeń proporcjonalne do logarytmu stężenia DG. Jednocześnie w warunkach tlenowych dochodziło do nieznacznego tylko obniżenia stężenia ATP. Glikoliza beztlenowa w porównaniu z glikolizą tlenową była znacznie słabiej hamowana przez niższe stężenia DG. Ulegała ona natomiast silnemu hamowaniu przez DG stosowaną w stężeniach wyższych niż stężenie glukozy, czemu towarzyszyło znaczne obniżenie stężenia ATP w badanych komórkach.

3.1.2. Wątrobiak Morrisa.

Jednym z nowotworów litych wykorzystanych do badania wpływu dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny był wątrobiak Morrisa. Tabela 5 przedstawia wyniki doświadczeń dotyczących wpływu DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych, oddychanie i glikolizę skrawków wątrobiaka. Badany wątrobiak Morrisa jest nowotworem o dość niskiej aktywności oddechowej i glikolitycznej, wykazującym przy tym praktycznie brak efektu Pasteura i Crabtree. Cechuje go także niskie stężenie nukleotydów adeninowych, szczególnie ATP. Nie wykazano istotnego wpływu DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych i na oddychanie skrawków wątrobiaka. Stwierdzono natomiast wyraźne hamowanie glikolizy w warunkach tlenowych /w 28-54%/ i beztlenowych /w 41-61%/ przez DG zastosowaną w stężeniach równych stężeniu glukozy.

Tabela 5

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych, oddychanie i glikolizę skrawków wątrobiaka Morrisa (72).

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /10 ml/	Stężenie nukleotydów adeninowych w warunkach tlenowych / μ mole/lg w.m./								Zużycie tlenu / μ mole/lg w.m./ Godz/	Produkcja kwasu mlekowego / μ mole/lg w.m./ godz./	
		Stan przed inkubacją				Stan po 30 min. inkubacji					O ₂	N ₂
		ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ			
1.	Bez substratu	0,11	0,65	0,66	1,42	0,08	0,38	0,32	0,78	28,0	—	—
	G					0,07	0,44	0,45	0,96	26,8	15,5	16,0
	DG					0,15	0,30	0,38	0,83	27,0	—	—
	G + DG					0,17	0,61	0,45	1,23	25,8	11,2	9,4
2.	Bez substratu	0,15	0,75	0,39	1,29	0,16	0,97	0,52	1,65	31,6	—	—
	G					0,11	0,32	0,40	0,83	30,4	13,1	14,4
	DG					0,15	0,52	0,53	1,20	30,8	—	—
	G + DG					0,27	0,31	0,51	1,09	31,7	8,0	6,8
3.	Bez substratu	0,05	0,44	0,11	0,60	0,08	0,37	0,05	0,50	27,4	—	—
	G					0,06	0,38	0,06	0,50	26,8	8,0	7,1
	DG					0,09	0,42	0,07	0,58	28,3	—	—
	G + DG					0,09	0,35	0,05	0,49	27,3	3,7	2,8

G - glukoza; DG - 2-dezoksyglukoza; O₂ - warunki tlenowe; N₂ - warunki beztlenowe.

3.1.3. Spontaniczny rak sutka myszy.

Jak wynika z tabeli 6, która przedstawia wpływ DG na metabolizm energetyczny skrawków spontanicznego raka sutka myszy, nowotwór ten cechuje względnie wysoka glikoliza, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, wyraźny efekt Pasteura i zaznaczony efekt Crabtree. Stężenie ATP w skrawkach oddychających kosztem substratów endogennych było tylko nieznacznie niższe od stężenia ATP po inkubacji z glukozą w warunkach tlenowych. Inkubacja skrawków badanego nowotworu w środowisku zawierającym DG i w warunkach tlenowych prowadziła do wyraźnego obniżenia stężenia ATP w porównaniu z materiałem inkubowanym w obecności glukozy lub bez substratu. Suma stężeń nukleotydów adeninowych w skrawkach inkubowanych w obecności DG była niższa niż w skrawkach kontrolnych z glukozą, ale nie różniła się w sposób istotny od sumy stężeń nukleotydów adeninowych w kontroli bez heksoz.

Obserwowano hamujący wpływ DG na oddychanie spontanicznego raka sutka myszy. To hamowanie w każdym z doświadczeń było większe niż efekt Crabtree wywołany przez glukozę. Efekt Crabtree wahał się w granicach 1-18%, a hamowanie oddychania przez DG od 11 do 31%. W czasie inkubacji skrawków badanego nowotworu w obecności glukozy razem z DG /szczególnie przy stosunku tych heksoz 1:2/, obserwowano znacznie mniejsze hamowanie oddychania niż przy inkubacji z każdą z badanych heksoz oddzielnie. DG silnie hamowała glikolizę skrawków spontanicznego raka sutka myszy, zwłaszcza w warunkach beztlenowych.

Tabela 6

Wpływ 2-dezoksyglukozy na oddychanie, glikolizę i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w skrawkach spontanicznego raka sutka myszy.

Nr. Dośw.	Stężenie glukozy /mM/	Stężenie 2-dezoksy- glukozy /mM/	Zużycie tlenu /umole/lg w.m./godz/	Produkcja kwasu mlekowego /umole/lg w.m./godz/		Stężenie nukleotydów adeninowych w warunkach tlenowych /umole/lg w.m./				
				O ₂	N ₂	ATP	ADP	AMP	Σ	
1.	0	0	43,2	38,0	62,4	0,93	0,50	0,41	1,84	
	10	0	42,7			1,13	0,42	0,47	2,02	
	0	10	38,4	26,5	16,8	0,58	0,63	0,54	1,75	
	0	20				0,59	0,74	0,56	1,89	
	10	10	34,4			20,2	8,0			
	10	20	46,5							
2.	0	0	42,2	35,2	64,7	1,10	0,27	0,33	1,70	
	10	0	37,1			1,35	0,29	0,45	2,09	
	0	10	35,9	27,8	24,2	1,09	0,53	0,30	1,92	
	0	20				0,75	0,69	0,46	1,90	
	10	10	31,2			26,6	14,7			
	10	20	36,7							
3.	0	0	37,4	31,2	56,5	0,96	0,10	0,62	1,68	
	10	0	33,7			1,22	0,32	0,56	2,10	
	0	10	25,6	20,2	12,6	0,46	0,22	0,48	1,16	
	0	20				0,44	0,46	0,52	1,42	
	10	10	33,9			14,2	7,9			
	10	20	36,4							
4.	0	0	52,5	36,3	48,1	1,14	0,09	0,90	2,13	
	10	0	43,2			1,59	0,12	0,78	2,49	
	0	10	36,0	22,8	10,5	0,79	0,55	0,86	2,18	
	0	20				0,88	0,61	0,78	2,27	
	10	10	47,3			17,8	6,3			
	10	20	45,2							

O₂ - warunki tlenowe;N₂ - warunki beztlenowe.

3.1.4. Prawidłowa wątroba szczura.

Tabela 7 przedstawia wyniki badania wpływu DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych i oddychanie skrawków prawidłowej wątroby szczura. Glukoza pozostawała bez wpływu na oddychanie skrawków wątroby. W badanym materiale obserwowano dość niskie stężenia nukleotydów adeninowych, przy czym w czasie inkubacji zarówno w obecności glukozy jak i bez substratu dochodziło do obniżenia stężenia sumy nukleotydów adeninowych w porównaniu ze stanem wyjściowym. Dezoksyglukoza nie miała istotnego wpływu na oddychanie i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w skrawkach wątroby szczura.

3.1.5. Kora mózgu świnki morskiej.

Szerzej rozbudowano zagadnienie wpływu DG na metabolizm energetyczny skrawków kory mózgu. Przebadano wpływ DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych, oddychanie oraz glikolizę tlenową i beztlenową skrawków kory mózgu świnki morskiej z uwzględnieniem wpływu jonów K^+ . Jak wynika z tabeli 8, badane skrawki kory mózgu cechowało niskie stężenie ATP i sumy nukleotydów adeninowych, zarówno w czasie inkubacji w obecności glukozy, jak i bez substratów. W obecności chlorku potasu /100 mM/ uwidaczniało się dalsze obniżenie stężenia ATP, podczas gdy stężenia ADP i AMP pozostawały niezmiennione. W czasie inkubacji skrawków kory mózgu świnki morskiej, zarówno w obecności glukozy jak i bez substratu, dochodziło do obniżenia się sumy stężeń

T a b e l a 7

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych i oddychanie skrawków prawidłowej wątroby szczura.

Nr. Dośw.	Stężenie glukozy /mM/	Stężenie 2-dezoksy- glukozy /mM/	Stężenie nukleotydów adeninowych /umole/lg w.m./								Zużycie tlenu /umole/lg w.m./ 1 godz/
			Przed inkubacją				Po 1 godz.inkubacji				
			ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	
1.	0	0	0,41	1,03	1,50	2,94	0,62	0,74	0,85	2,21	47,2
	10	0					0,69	0,65	0,88	2,22	
	20	0									44,7
	0	5									41,5
	0	10					0,59	0,40	0,72	1,71	42,8
	0	20									42,3
	0	50					0,61	0,27	0,74	1,62	42,4
	10	10					0,63	0,39	0,76	1,78	
	10	50					0,54	0,31	0,77	1,62	
2.	0	0	0,39	0,69	1,47	2,55	0,74	0,34	0,54	1,62	38,5
	10	0					0,78	0,31	0,67	1,76	
	20	0									43,0
	0	5									36,3
	0	10					0,64	0,36	0,51	1,51	40,7
	0	20									41,2
	0	50					0,55	0,30	0,53	1,38	43,9
	10	10					0,73	0,27	0,58	1,58	
	10	50					0,56	0,31	0,30	1,17	
3.	0	0	0,41	0,52	1,41	2,34	0,62	0,35	0,30	1,27	48,3
	10	0					0,59	0,39	0,25	1,23	
	20	0									50,0
	0	5									52,4
	0	10					0,43	0,15	0,47	1,05	40,7
	0	20									39,3
	0	50					0,47	0,30	0,26	1,03	39,8
	10	10					0,56	0,57	0,17	1,30	
	10	50					0,44	0,32	0,35	1,11	
4.	0	0	0,52	0,69	1,46	2,67	0,55	0,20	0,41	1,16	
	10	0					0,62	0,39	0,35	1,36	
	0	10					0,42	0,38	0,18	0,98	
	0	50					0,45	0,54	0,28	1,27	
	10	10					0,49	0,39	0,34	1,22	
	10	50					0,52	0,27	0,38	1,17	

Tabela 8

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w skrawkach kory mózgu świnki morskiej (12)

Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym / 10 mM /	Stężenia nukleotydów adeninowych w warunkach tlenowych /umole/lg w.m./											
	Stan przed inkubacją				Stan po 30 min. inkubacji							
					KCl 6 mM				KCl 100 mM			
	ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ
Bez heksoz	0,17 ±0,09	0,40 ±0,13	0,68 ±0,17	1,25 ±0,35	0,22 ±0,09	0,27 ±0,17	0,47 ±0,16	0,96 ±0,41	0,12 ±0,06	0,33 ±0,15	0,47 ±0,18	0,93 ±0,38
Glukoza					0,33 ±0,11	0,30 ±0,16	0,39 ±0,12	1,03 ±0,36	0,13 ±0,08	0,33 ±0,15	0,47 ±0,17	0,94 ±0,37
2-dezoksyglukoza					0,09 ±0,05	0,31 ±0,17	0,42 ±0,18	0,82 ±0,35	0,08 ±0,02	0,32 ±0,15	0,45 ±0,18	0,85 ±0,30

Wartości podane w tabeli przedstawiają średnie z 5 doświadczeń ± przedziały ufności /wt_w/ obliczone wg skróconej metody Dean'a i Dixon'a / 35 /.

nukleotydów adeninowych. Po inkubacji skrawków kory mózgu w obecności dezoksyglukozy dochodziło do obniżenia się ATP i sumy nukleotydów adeninowych w porównaniu z zawartością ATP w skrawkach kontrolnych inkubowanych w obecności glukozy lub bez substratu. Ze względu na niskie stężenie ATP w układach kontrolnych w obecności 100 mM KCl, w tych warunkach wpływ DG był słabiej wyrażony.

Tabela 9 przedstawia wpływ DG na oddychanie skrawków kory mózgu świnki morskiej. Obecność substratu oddechowego nie miała wpływu na aktywność oddechową skrawków w obecności niskiego stężenia KCl. DG pozostawała bez wpływu na oddychanie w tych warunkach. W czasie inkubacji skrawków kory mózgu w obecności 100 mM KCl i odpowiednich substratów jak glukozy, fruktozy, mannozy, mleczanu i pirogronianu dochodziło do wyraźnego ^{pobudzenia} zużycia tlenu /w obecności glukozy dwukrotne pobudzenie oddychania/. W układach kontrolnych bez substratów oraz w obecności galaktozy nie obserwowano pobudzenia oddychania. W czasie inkubacji skrawków bez substratów a w obecności 100 mM KCl dezoksyglukoza wywoływała wyraźne zahamowanie oddychania w porównaniu z układami kontrolnymi.

Dezoksyglukoza nie wywierała istotnego wpływu na oddychanie skrawków kory mózgu inkubowanych w obecności glukozy oraz mannozy w stężeniach ekwimolarnych z DG. W przypadku oddychania kosztem mleczanu i pirogronianu DG obniżała oddychanie do poziomu kontroli bez substratu, natomiast w obecności fruktozy i galaktozy DG wywoływała bardzo wyraźne hamowanie oddychania. W tym wypadku wyniki zużycia tlenu zbliżone były do wartości uzyskanych przy zastosowaniu DG bez

T a b e l a 9

Wpływ 2-dezoksyglukozy /10 mM/ na oddychanie skrawków kory mózgu świnki morskiej w obecności różnych substratów(14)

Substraty obecne w środowisku inkubacyjnym /10 mM/	Zużycie tlenu / μ mole/lg w.m./30 min/	
	KCl 6 mM	KCl 100 mM
Bez substratu	24,1 \pm 2,5 /10/	24,9 \pm 1,2 /10/
DG	23,0 \pm 3,2 /10/	16,5 \pm 2,0 /10/
G	25,0 \pm 3,4 / 7/	50,3 \pm 7,8 / 7/
G + DG	23,3 \pm 2,7 / 7/	45,3 \pm 6,3 / 7/
F	24,4 \pm 3,4 / 8/	51,4 \pm 7,4 / 8/
F + DG	22,2 \pm 2,7 / 7/	19,0 \pm 4,6 / 6/
M	25,0 \pm 8,4 / 4/	47,2 \pm 13,2 / 4/
M + DG	26,0 \pm 3,6 / 6/	49,0 \pm 4,7 / 6/
Gal	25,3 \pm 3,3 / 5/	25,1 \pm 3,2 / 5/
Gal + DG	24,5 \pm 5,9 / 4/	17,1 \pm 5,4 / 4/
L	28,6 \pm 6,6 / 5/	48,9 \pm 7,2 / 5/
L + DG	26,8 \pm 6,1 / 5/	23,0 \pm 3,8 / 5/
P	32,8 \pm 6,5 / 4/	45,6 \pm 20,4 / 4/
P + DG	26,8 \pm 7,2 / 4/	21,6 \pm 8,6 / 4/

Wartości podane w tabeli przedstawiają średnie \pm przedziały ufności /wt_w/ obliczone wg skróconej metody Dean'a i Dixon'a(35)

Liczby w nawiasach przedstawiają ilość doświadczeń.

- G - glukoza
- DG ∇ 2-dezoksyglukoza
- F - fruktoza
- M - mannoza
- Gal - galaktoza
- L - mleczan
- P - pirogronian

substratów. Na Ryc. 5 przedstawiono wpływ różnych stężeń DG na oddychanie skrawków kory mózgu w obecności fruktozy. Każdy punkt na wykresie odpowiada wartości średniej z 3 doświadczeń. Jak wynika z wykresu, występowało hamowanie oddychania proporcjonalne do logarytmu stężenia dezoksyglukozy.

Tabela 10 i częściowo rycina 5 zawierają wyniki badania wpływu różnych stężeń dezoksyglukozy na glikolizę skrawków kory mózgu świnki morskiej. Produkcja kwasu mlekowego kosztem glukozy była pobudzana przez wysokie stężenia KCl w warunkach tlenowych, natomiast hamowana w warunkach beztlenowych. Skrawki inkubowane przy niskim stężeniu KCl wykazywały wyraźny efekt Pasteura. Hamowanie przez DG glikolizy tlenowej i beztlenowej skrawków kory mózgu świnki morskiej zarówno w obecności niskich jak i wysokich stężeń KCl było w przybliżeniu proporcjonalne do logarytmu zastosowanego stężenia DG.

Tabela 10

Wpływ różnych stężeń 2-dezoksyglukozy na produkcję kwasu mlekowego przez skrawki kory mózgu świnki morskiej w obecności glukozy lub fruktozy.

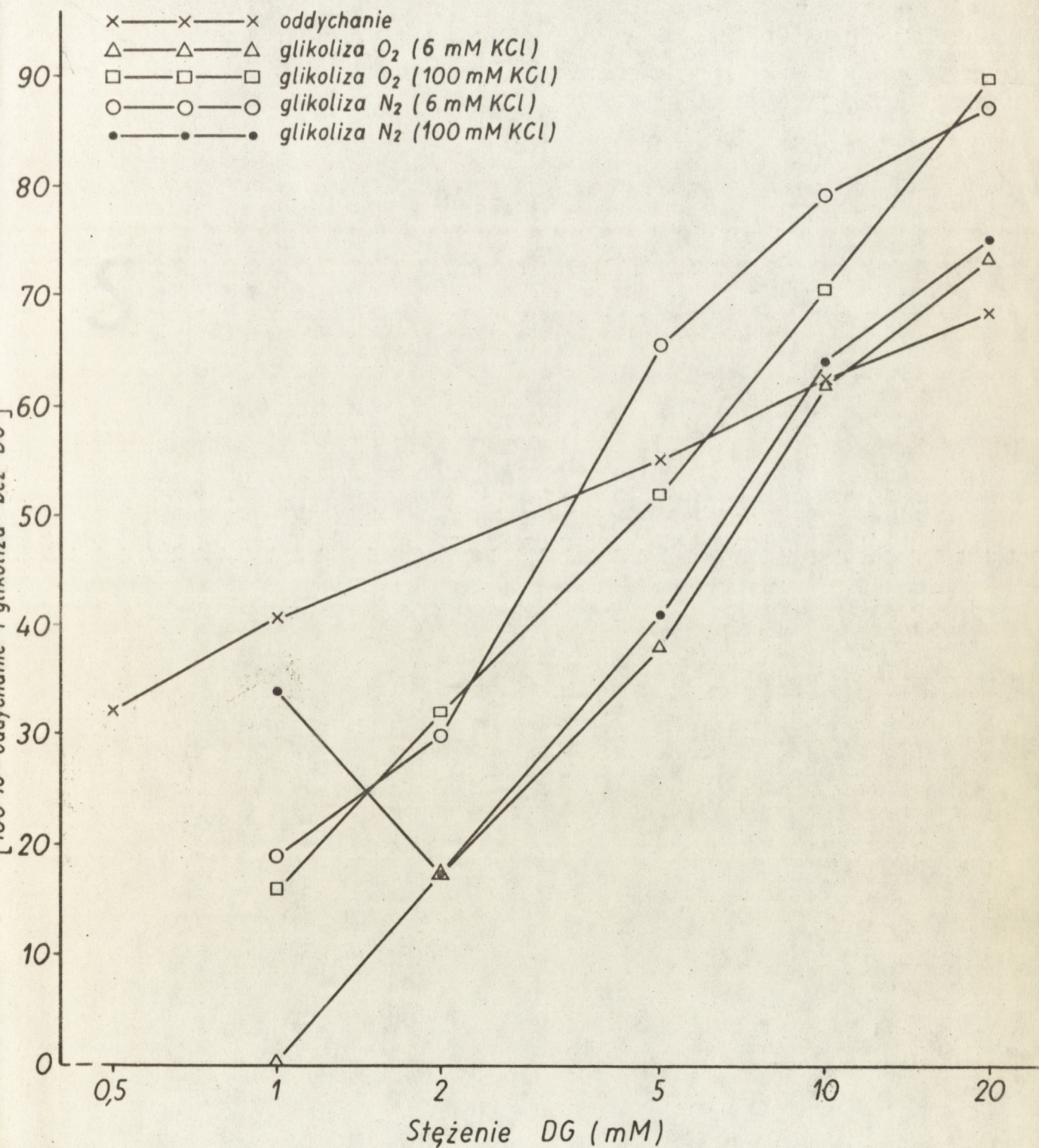
Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /mM/			Produkcja kwasu mlekowego /umole/ 1 g. w.m. / godz./			
			O ₂		N ₂	
G	F	DG	KCl 6 mM	KCl 100 mM	KCl 6 mM	KCl 100 mM
10	0	0	17,8 ± 2,9	31,6 ± 5,1	72,6 ± 22,6	19,0 ± 11,4
10	0	1	17,8 ± 6,4	26,6 ± 3,4	58,8 ± 17,3	12,5 ± 9,9
10	0	2	14,7 ± 3,4	21,6 ± 4,3	50,7 ± 14,4	15,7 ± 6,8
10	0	5	11,0 ± 3,2	15,1 ± 4,8	25,2 ± 9,9	11,2 ± 3,3
10	0	10	6,8 ± 5,0	9,3 ± 3,1	15,2 ± 7,2	6,8 ± 3,1
10	0	20	4,7 ± 2,7	6,2 ± 3,4	9,4 ± 6,3	4,8 ± 3,3
10	0	30	2,6 ± 2,7	1,5 ± 0,9	8,3 ± 0,4	3,1 ± 2,0
0	10	0	4,4 ± 3,0	4,6 ± 4,5		
0	10	1	-0,5 ± 0,8	-3,6 ± 1,9		

Wartości podane w tabeli przedstawiają średnio z 4 doświadczeń ± przedziały ufności /wt_w/obliczone wg skróconej metody Deana i Dixon'a /35/.

O₂ - warunki tlenowe; N₂ - warunki beztlenowe

G - glukoza; F - fruktoza; DG - dezoksyglukoza.

Ryc. 5 WPŁYW DEZOKSYGLUKOZY NA GLIKOLIZĘ *)
I ODDYCHANIE **) SKRAWKÓW KORY MÓZGU
ŚWINKI MORSKIEJ



*) w środowisku inkubacyjnym obecna glukoza 10 mM
**) w środowisku inkubacyjnym obecna fruktoza 10 mM

*FRAKCJE
SUBKOMÓRKOWE*

3.2. Dezoksyglukoza a nukleotydy adeninowe w homogenatach, mitochondriach i cytoplazmie.

Przedstawione wyżej badania wykazały istnienie znacznych różnic we wrażliwości na działanie dezoksyglukozy między poszczególnymi badanymi nowotworami i tkankami prawidłowymi. Stwierdzono szczególnie silne działanie dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny komórek raka wysiękowego Ehrlicha i skrawków kory mózgu świnki morskiej. W następnym etapie pracy przystąpiono do badań zmierzających do powiązania zaobserwowanych efektów z odpowiednimi strukturami subkomórkowymi i ich funkcją biochemiczną. Badania te dotyczyły głównie oddychania i oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów oraz glikolizy cytoplazmy wybranych nowotworów i tkanek prawidłowych.

3.2.1. Oksydacyjna fosforylacja.

Wyniki badania wpływu DG i innych heksoz na oddychanie homogenatów komórek raka Ehrlicha przedstawiono w tabeli 11. W tym układzie doświadczalnym nie wykazano wpływu żadnej z badanych heksoz na oddychanie homogenatów.

Dalsze badania objęły frakcje mitochondrialne komórek raka wysiękowego Ehrlicha, wątrobiaka Morrisa, prawidłowej wątroby szczura i kory mózgu świnki morskiej. Zdolność badanych frakcji do oksydacyjnej fosforylacji sprzężonej z oddychaniem była kontrolowana przy użyciu elektrody tlenowej Clarka. Ryc. 6 przedstawia przykładowe, typowe

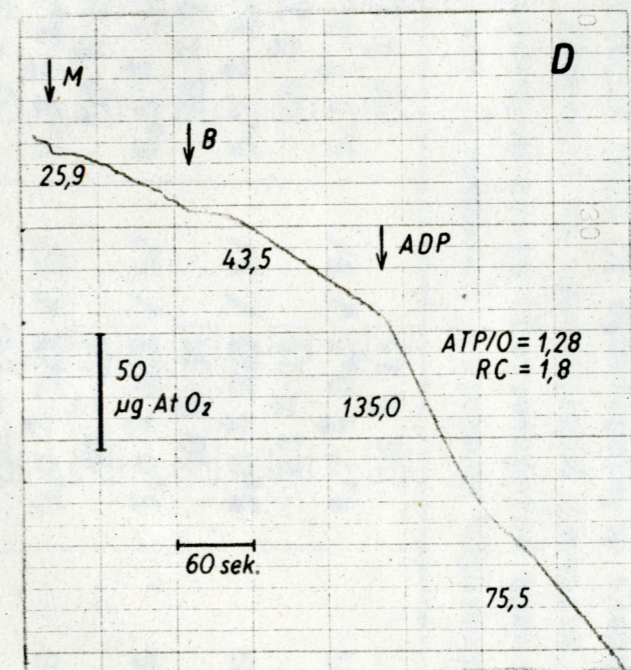
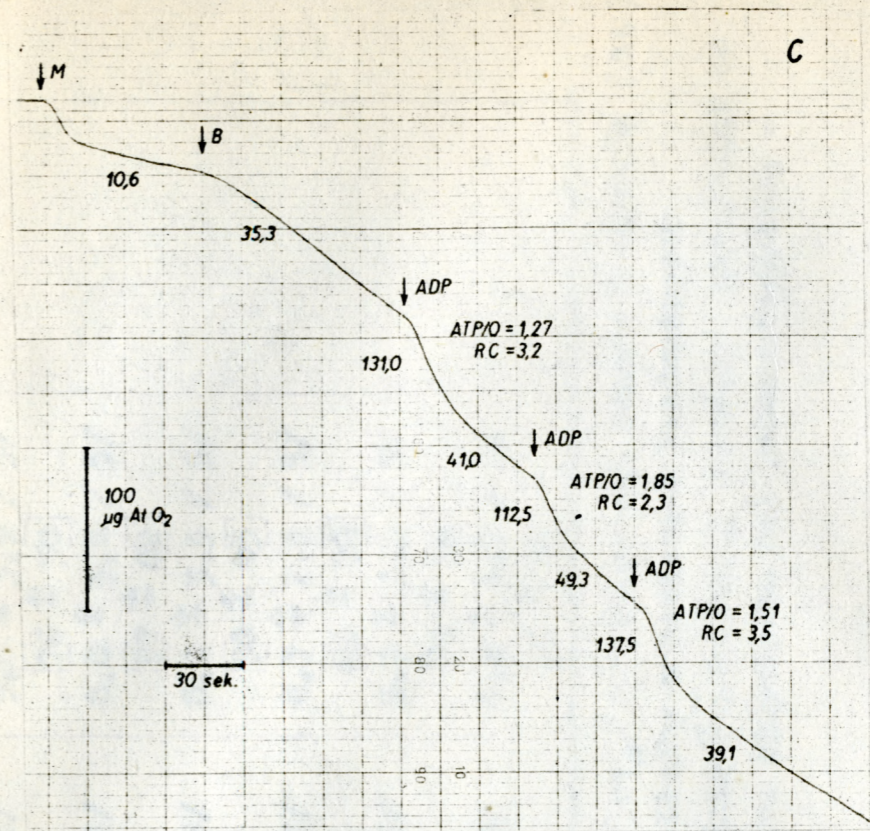
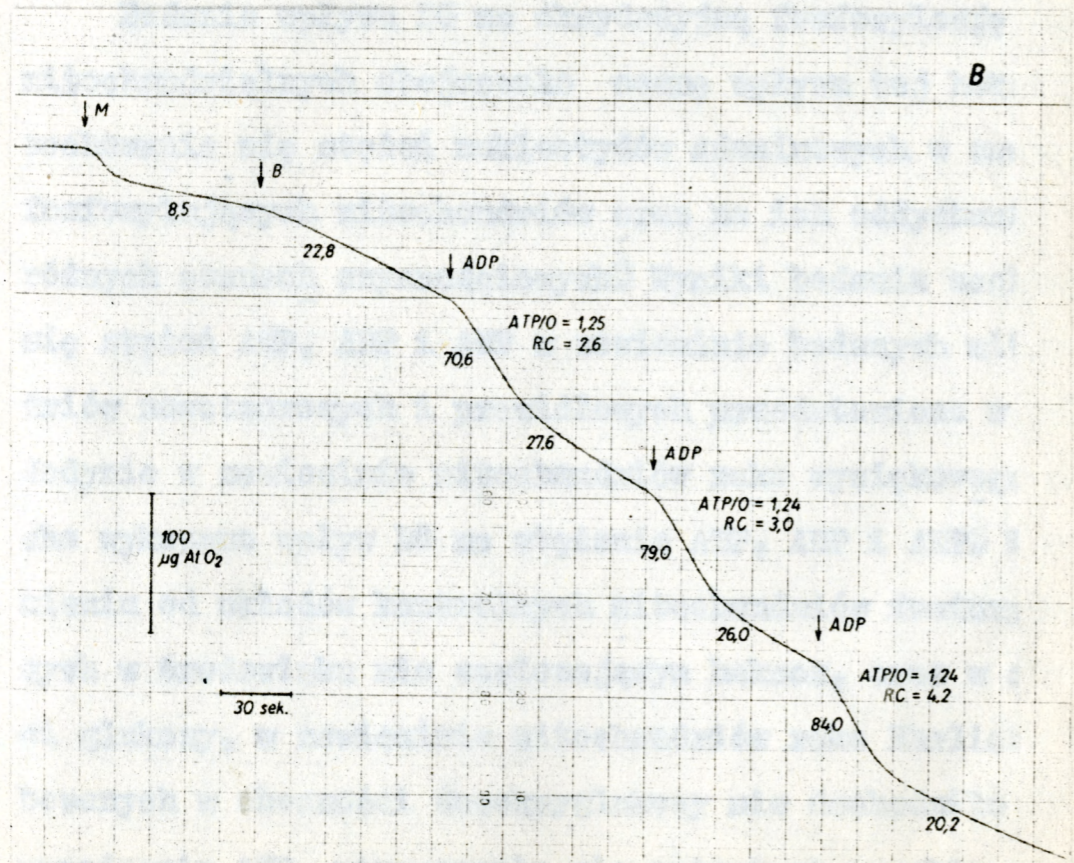
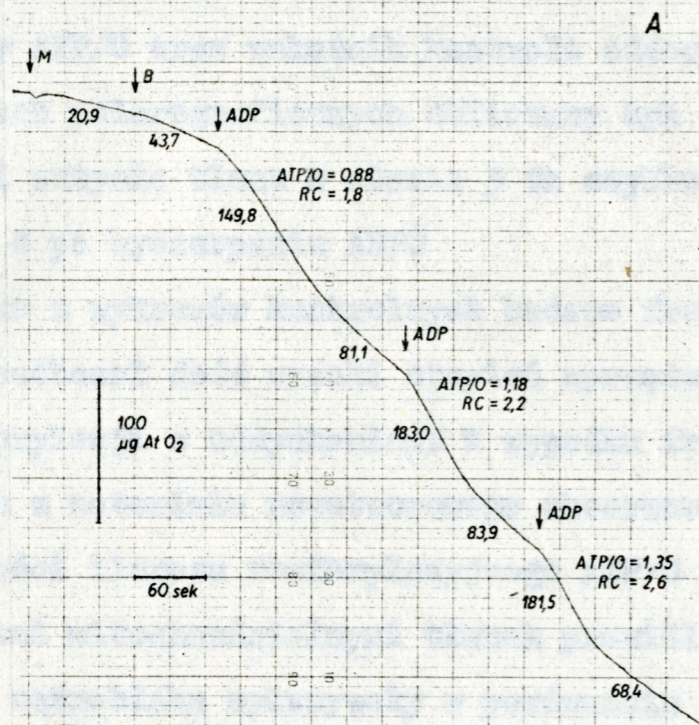
Tabela 11

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych, oddychanie i produkcję kwasu mlekowego w czasie inkubacji homogenatów komórek wysiękowego raka Ehrlicha w obecności różnych heksoz (72)

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /10mM/	Faza gazowa	Stężenie nukleotydów adeninowych /umole/2ml środowiska inkubacyjnego/								Produkcja kwasu mlekowego /umole/lmg białka/godz/	Zużycie tlenu /umole/lmg białka/godz/	
			Stan przed inkubacją				Stan po 1 godz. inkubacji						
			ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ			
1.	Bez heksoz	powietrze	2,58	0,40	0,35	3,33	2,37	0,46	0,92	3,75	1,41	0,52	
	DG						0,32	0,62	0,87	1,81		0,54	
	G						2,74	0,48	0,47	3,69		0,55	
2.	Bez heksoz	powietrze	2,80	0,65	0,09	3,54	3,33	0,37	0,07	3,77	1,72	0,63	
	DG						0,44	0,19	0,79	1,42		0,51	
	G						3,68	0,19	0,02	3,89		0,54	
	G + DG						2,86	0,31	0,14	3,31		1,64	0,52
	F						3,11	0,26	0,09	3,46		2,12	0,52
	F + DG						2,32	0,80	0,35	3,47		1,74	0,71
	Man						2,79	0,24	0,00	3,03		2,18	0,89
	Man + DG						3,47	0,27	0,00	3,74		2,22	0,69
	Gal						2,53	0,74	0,12	3,39		0,00	0,75
	Gal + DG						0,63	1,15	0,23	2,01		0,00	0,77
3.	Bez heksoz	powietrze	3,05	0,27	0,02	3,34	2,76	0,82	0,22	3,80	1,82	0,62	
	DG						0,00	0,34	0,43	0,77		0,51	
	G						3,03	0,45	0,13	3,61		0,47	
	G + DG						3,67	0,00	0,25	3,92		1,78	0,52
	F						3,69	0,36	0,06	4,11		2,12	0,43
	F + DG						2,41	0,83	0,17	3,41		1,72	0,58
	Man						3,26	0,47	0,06	3,79		1,88	0,50
	Man + DG						3,56	0,33	0,00	3,89		1,64	0,59
	Gal						2,77	0,88	0,27	3,92		0,10	0,62
	Gal + DG						0,25	0,33	0,61	1,19		0,12	0,63
4.	Bez heksoz	N ₂	3,46	0,27	0,25	3,98	0,63	1,63	1,45	3,71	1,18	0,62	
	DG						0,20	1,11	1,74	3,05		0,64	
	G						0,93	1,27	1,16	3,36		0,52	
	G + DG						1,08	1,35	1,42	3,85		0,06	
	F						1,18	1,25	1,26	3,69		0,52	
	F + DG						0,24	1,15	2,12	3,51		0,52	
	Man						0,91	1,46	1,57	3,94		0,08	
	Man + DG						0,95	1,24	1,52	3,71		0,15	
	Gal						0,90	1,54	1,38	3,82			
	Gal + DG						0,28	1,23	1,19	2,70			
5.	Bez heksoz	N ₂	3,47	0,61	0,32	4,40	0,36	0,86	2,19	3,41	1,78	0,36	
	DG						0,11	0,55	2,39	3,05		1,99	
	G						1,76	0,86	0,38	3,00		1,90	
	G + DG						0,73	1,25	2,10	4,08		1,88	
	F						0,63	1,29	2,21	4,13		0,36	
	F + DG						0,15	0,55	2,88	3,58			
	Man						0,43	1,00	2,46	3,89		1,53	
	Man + DG						0,49	1,25	2,48	4,22		0,00	
	Gal						0,36	0,91	2,57	3,84		0,00	
	Gal + DG						0,20	0,44	2,66	3,30		0,00	

G - glukoza
 DG - 2-dezoksyglukoza
 F - fruktoza
 Man - mannoza
 Gal - galaktoza

Ryc. 6 PRZYKŁADY POMIARÓW AKTYWNOŚCI ODDECHOWEJ I FOSFORYLACYJNEJ MITOCHONDRIÓW METODĄ POLAROGRAFICZNĄ



- A - Frakcja mitochondrialna komórek raka wsiękowego Ehrlicha. Stężenia: frakcja mitochondrialna - 0,7 mg, bursztynian - 10 mM, ADP - 125 μM .
 - B - Frakcja mitochondrialna wątrobiaka Morrisa. Stężenia: frakcja mitochondrialna - 2,6 mg, bursztynian - 10 mM, ADP - 125 μM .
 - C - Frakcja mitochondrialna prawidłowej wątroby szczura. Stężenia: frakcja mitochondrialna - 2,4 mg, bursztynian - 10 mM, ADP - 107 μM .
 - D - Frakcja mitochondrialna kory mózgu świnki morskiej. Stężenia: frakcja mitochondrialna - 0,5 mg, bursztynian - 10 mM, ADP - 87 μM .
- Zużycie tlenu: $\mu\text{gatomy O}_2 / \text{mg białka} / \text{min}$.

wykresy polarograficzne zużycia tlenu przez badane mitochondria. Przyrost ATP oznaczano w równoległej próbie kontrolnej. Dla każdego doświadczenia wyliczano iloraz fosforylacyjny ATP/O oraz wskaźnik kontroli oddechowej RC, który w badaniach polarograficznych obliczany był ze stosunku szybkości zużycia tlenu w stanie 3 do szybkości oddychania w stanie 4 po wyczerpaniu ADP.

Jak wynika z wykresów kontrolnych badane frakcje mitochondrialne cechował dość wysoki stopień sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji z oddychaniem. W wypadku frakcji mitochondrialnych z materiału nowotworowego obserwowano nieco niższe wartości ilorazu fosforylacyjnego ATP/O w porównaniu z frakcjami mitochondrialnymi tkanek prawidłowych. Mitochondria wątrobiaka wykazywały w porównaniu z innymi badanymi frakcjami niższą aktywność oddechową w stanie 3.

Badanie wpływu DG na oksydacyjną fosforylację frakcji mitochondrialnych obejmowało ocenę wpływu tej heksozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie fosforylujących mitochondriów oraz na ich oddychanie w różnych stanach czynnościowych. Wyniki badania zachowania się stężeń ATP, ADP i AMP w zawieszynie badanych mitochondriów nowotworowych i prawidłowych przedstawiono w tabeli 12. Jedynie w zawieszynie mitochondriów raka wysiękowego Ehrlicha wykazano wpływ DG na stężenie ATP, ADP i AMP. W odróżnieniu od układów kontrolnych mitochondriów fosforylujących w środowisku nie zawierającym heksoz, oraz w obecności glukozy, w zawieszynie mitochondriów raka Ehrlicha inkubowanych w obecności dezoksyglukozy nie dochodziło do nagromadzenia ATP, utrzymywało się natomiast wysokie stężenie

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie mitochondriów komórek wysiękowego raka Ehrlicha, wątrobiaka Morrisa, prawidłowej wątroby szczura i kory mózgu świnki morskiej⁽⁷²⁾.

Mitochondria /material/	Nr. Dośw.	Stężenie nukleotydów adeninowych / μ mole/2 ml środowiska inkubacyjnego/															
		Przed inkubacją				Po 40 minutach inkubacji											
						Bez heksoz				+ glukoza /20mM/				+2-dezoksyglukoza/20mM/			
		ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ
1/2 Wysiękowy rak Ehrlicha	1-6.	0,95	2,66	1,58	5,16	4,66	0,62	0,38	5,66	4,36	0,85	0,65	5,87	1,60	1,63	1,70	4,93
		0,67	0,26	0,10	0,71	1,23	0,72	0,28	1,28	1,60	0,85	0,58	0,86	0,84	0,38	0,62	0,79
Wątrobiak Morrisa	1.	0,15	4,51	1,12	5,78	5,70	0,64	0,55	6,89	5,54	0,60	0,59	6,73	5,64	0,57	0,52	6,73
	2.	0,15	4,51	1,12	5,78	5,69	0,11	0,50	6,30	5,76	0,21	0,46	6,43	5,67	0,28	0,52	6,47
	3.	0,33	4,27	0,84	5,44	5,39	0,09	0,32	5,80	6,05	0,15	0,30	6,50	5,78	0,28	0,34	6,40
	4.	0,38	4,14	0,86	5,38	5,38	0,20	0,14	5,72	5,22	0,22	0,22	5,66	5,49	0,00	0,22	5,71
1/ Prawidłowa wątroba szczura	1.	0,26	1,59	1,05	2,90	2,42	0,23	0,32	2,97	2,52	0,23	0,33	3,08	2,26	0,08	0,20	2,54
	2.	0,17	1,54	1,02	2,73	2,26	0,23	0,33	2,82	1,90	0,10	0,31	2,31	2,36	0,18	0,32	2,86
	3.	0,36	2,85	1,51	4,72	4,36	0,19	0,23	4,78	4,30	0,18	0,21	4,69	4,50	0,30	0,19	4,99
	4.	0,22	2,96	1,47	4,65	4,23	0,53	0,21	4,97	4,44	0,17	0,19	4,80	4,47	0,34	0,34	5,15
Kora mózgu świnki morskiej	1.	0,24	6,45	1,53	8,22	5,08	1,84	0,74	7,66	5,41	2,32	0,71	8,44	5,71	1,47	0,75	7,93
	2.	0,96	4,56	1,42	6,94	5,70	0,39	1,01	7,10	5,95	0,34	1,04	7,33	5,80	0,75	1,27	7,82
	3.	2,65	5,35	1,20	9,20	7,32	2,29	0,67	10,28	6,92	2,35	0,80	10,07	6,71	2,24	0,66	9,61
	4.	2,65	5,35	1,20	9,20	7,85	2,47	0,73	11,05	6,86	2,38	0,79	10,03	7,26	2,48	0,64	10,38

1/ J.Lazarewicz, J.Strosznajder, W.Bicz /73 /

2/ średnie z 6 doświadczeń \pm przedział ufności /wt_w/, obliczone wg Dean'a i Dixon'a (35)

dodanego ADP oraz AMP. Suma stężeń nukleotydów adeninowych ulegała przy tym nieznacznemu obniżeniu. DG pozostawała natomiast bez wpływu na stężenia nukleotydów adeninowych w czasie oksydacyjnej fosforylacji innych badanych frakcji mitochondrialnych /wątrobiak, wątroba, kora mózgu/.

Tabela 13 przedstawia wyniki z przebadania wpływu DG na zużycie tlenu przez frakcję mitochondrialną raka wąsiekowego Ehrlicha. W tabeli tej i następnych opisujących oddychanie mitochondriów podane szybkość zużywania tlenu w poszczególnych stanach czynnościowych oraz współczynnik kontroli oddechowej RG wyliczony ze stosunku szybkości oddychania w stanie 3 do szybkości w stanie 4 bez ADP. W tabelach przedstawiono także iloraz fosforylacyjny ATP/O. Frakcje mitochondrialne raka wąsiekowego Ehrlicha inkubowane w środowisku nie zawierającym heksoz oraz w obecności glukozy wykazywały prawidłową ewolucję przebiegu oddychania /względnie powolne oddychanie w stanie 4 bez ADP, pobudzenie oddychania w stanie 3 po dodaniu ADP oraz zwolnienie oddychania w stanie 4 po wyczerpeniu się ADP/. W obecności DG nie obserwowano zwolnienia oddychania po wyczerpaniu się ADP /przejście w stan 4/, natomiast utrzymywało się wzmożone zużycie tlenu po dodaniu ADP, charakterystyczne dla stanu 3. Temu zachowaniu się oddychania badanych frakcji mitochondrialnych w obecności DG odpowiada opisane już utrzymywanie się wysokiego stężenia ADP w badanym układzie doświadczalnym /Tab. 12 /. W przypadku frakcji mitochondrialnych pochodzących z wątrobiaka i wątroby nie obserwowano wpływu DG na przebieg oksydacyjnej fosforylacji /Tab. 14 i 15 /. Jedynie w przypadku frakcji mitochondrialnych

Tabela 13.

Wpływ 2-dezoksyglukozy na oksydacyjną fosforylację mitochondriów komórek
wsiękowego raka Ehrlicha (102).

Nr. Dośw.	Heksozy w środowisku inkubacyjnym /20 mM/	Zużycie tlenu /μgatomy/lmg białka/min/			Współczynnik kontroli oddechowej R.C.	Przyrost ATP /μmole/	Ilość tlenu zużytego w stanie 3 /μgatomy/	ATP /
		Stan 4 /bez ADP/	Stan 3 /fosforylacja/ ADP //	Stan 4 /wyczerpanie ADP/				
1.	Bez heksoz	107,0	203,0	125,0	1,90	3,44	3,22	1,07
	G	99,0	219,0	149,0	2,21	3,85	3,30	1,17
	DG	113,0	199,0		1,76			
2.	Bez heksoz	40,1	157,0	81,0	3,92	4,95	3,76	1,32
	G	50,0	165,0	83,8	3,30	4,64	3,96	1,17
	DG	62,3	179,0	154,5	2,87			
3.	Bez heksoz	154,0	235,0	173,0	1,53	5,54	3,81	1,45
	G	152,0	220,0	171,0	1,45	5,13	3,57	1,44
	DG	185,0	254,0		1,37			
4.	Bez heksoz	98,0	210,0	92,0	2,14	4,10	2,56	1,60
	G	99,0	206,0	88,0	2,08			
	DG	79,8	200,0		2,50			

G - glukoza; DG - 2-dezoksyglukoza.

Tabela 14

Wpływ 2-dezoksyglukozy na oksydacyjną fosforylację mitochondriów Morrisa (102).

Nr. Dośw.	Heksozy w środowisku inkubacyjnym /20mM/	Zużycie tlenu /μgatomy/lmg białka/min/			Współczynnik kontroli oddechowej R.C.	Przyrost ATP /μmole/	Ilość tlenu zużytego w stanie 3 /μgatomy/	ATP / O
		Stan 4 /bez ADP/	Stan 3 /fosforylacja ADP/	Stan 4 /wyczerpanie ADP/				
1.	Bez heksoz	33,6	105,0	45,0	3,12	5,55	4,25	1,31
	G	36,4	88,3	46,5	2,43	5,39	3,58	1,51
	DG	35,7	95,0	45,0	2,66	5,49	3,85	1,43
2.	Bez heksoz	26,4	77,0	37,0	2,92	5,54	3,18	1,74
	G	39,3	95,0	40,5	2,42	5,61	3,85	1,46
	DG	25,7	101,5	45,0	3,95	5,52	4,12	1,34
3.	Bez heksoz	38,6	67,8	39,8	1,76	5,06	3,72	1,36
	G	34,3	69,7	39,4	2,03	5,72	3,82	1,50
	DG	37,7	78,0	41,4	2,07	5,45	4,28	1,27
4.	Bez heksoz	30,3	66,5	34,8	2,19	5,00	4,57	1,09
	G	36,4	68,0	35,6	1,87	4,84	4,66	1,04
	DG	32,1	66,4	34,7	2,07	5,11	4,54	1,13

G - glukoza; DG - 2-dezoksyglukoza.

Tabela 15

Wpływ 2-dezoksyglukozy na oksydacyjną fosforylację mitochondriów prawidłowej wątroby szczura (102).

Nr. Dośw.	Heksozy w środowisku inkubacyjnym /20mM/	Zużycie tlenu /mgatomy/lwg białka/min./			Współczynnik kontroli oddechowej R.C.	Przyrost ATP /μmole/	Ilość tlenu zużytego w stanie 3 /μgatomy/	ATP / 0
		Stan 4 /bez ADP/	Stan 3 /fosforylacja ADP/	Stan 4 /wyczerpanie ADP/				
1.	bez heksoz	26,4	89,4	41,4	3,39	2,16	1,47	1,47
	G	31,0	96,7	53,2	3,12	2,26	1,62	1,39
	DG	24,4	74,0	44,7	3,03	2,00	1,21	1,65
2.	bez heksoz	27,7	99,0	36,5	3,57	2,09	1,00	2,09
	G	20,7	53,6	32,1	2,59	1,73	0,86	2,01
	DG	28,2	104,5	37,7	3,71	2,19	1,41	1,55
3.	bez heksoz	11,2	94,0	35,1	8,40	4,00	3,01	1,33
	G	14,5	86,0	39,6	5,93	3,94	3,45	1,14
	DG	13,4	88,0	39,1	6,57	4,14	3,08	1,34

G - glukoza ; DG - 2-dezoksyglukoza.

z kory mózgu w obecności DG obserwowano tendencję do szybszego zużycia t_lnu w stanie 4 po wyczerpaniu ADP w porównaniu z układami kontrolnymi /Tab. 16 /.

W dalszym etapie podjęto badania mające na celu poznanie szczegółów działania DG na mitochondria nowotworu wysiękowego.

Tabela 17 i rycina 7 przedstawiają wpływ DG na oksydacyjną fosforylację frakcji mitochondrialnej raka Ehrlicha w obecności glukozy, glukozy-6-fosforanu i dezoksyglukozy-6-fosforanu. W obecności glukozy i G-6-P następowało zniesienie efektu wywołanego przez DG zarówno w odniesieniu do oddychania jak i zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych. DG-6-P nie wywierał natomiast wpływu na wywołany przez DG, opisany wyżej efekt. W układzie doświadczalnym, w którym od początku eksperymentu frakcje mitochondrialne inkubowano w obecności dezoksyglukozy i ADP, obserwowano długotrwałe utrzymywanie się przyspieszonego oddychania o intensywności odpowiadającej oddychaniu w stanie 3 mitochondriów kontrolnych. Dodanie G-6-P powodowało szybkie zahamowanie oddychania do poziomu odpowiadającego stanowi 4 mitochondriów kontrolnych, czemu towarzyszyło, jak wynika z oznaczeń stężeń nukleotydów adeninowych, wyczerpanie się ADP.

Rycina 8 przedstawia wykresy polarograficzne zużycia tlenku przez frakcję mitochondrialną raka Ehrlicha w przebiegu oksydacyjnej fosforylacji z uwzględnieniem wpływu glukozy i DG. Heksozy podawano do zawiesiny frakcji mitochondrialnych znajdujących się w stanie 4 po wyczerpaniu ADP. Jak wynika z wykresu po dodaniu DG dochodziło do pobudzenia

Tabela 16

Wpływ 2-dezoksyglukozy na oksydacyjną fosforylację mitochondriów kory mózgu świnki morskiej (102)

Nr. Dośw.	Heksozy w środowisku inkubacyjnym /20 mM/	Zużycie tlenu /μgatomy/lmg białka/min/			Współczynnik kontroli oddechowej R.C.	Przyrost ATP /μmole/	Ilość tlenu zużytego w stanie 3 /μgatomy/	ATP /O
		Stan 4 /bez ADP/	Stan 3 /fosforylacja ADP/	Stan 4 /wyczerpanie ADP/				
1.	Bez heksoz	18,1	84,7	44,4	4,68	4,84	2,84	1,70
	G	12,3	87,5	48,5	7,10	5,17	2,93	1,76
	DG	23,0	102,0	74,0	4,43	4,42	3,45	1,30
2.	Bez heksoz	37,3	83,2	57,5	2,23	4,74	3,52	1,35
	G	27,2	84,2	55,0	3,10	4,99	3,54	1,41
	DG	36,4	91,4	76,0	2,51	4,84	3,63	1,33
3.	Bez heksoz	45,6	103,0	45,6	2,26	4,67	2,62	1,78
	G	46,5	113,4	51,8	2,44	4,27	2,84	1,50
	DG	49,0	93,5	69,5	1,91	4,06	3,26	1,24
4.	Bez heksoz	36,1	112,6	49,2	3,12	5,20	2,51	2,07
	G	24,7	77,5	39,0	3,14	5,21	2,71	1,92
	DG	39,1	118,0	55,7	3,02	4,61	2,72	1,70

G - glukoza; DG - 2-dezoksyglukoza.

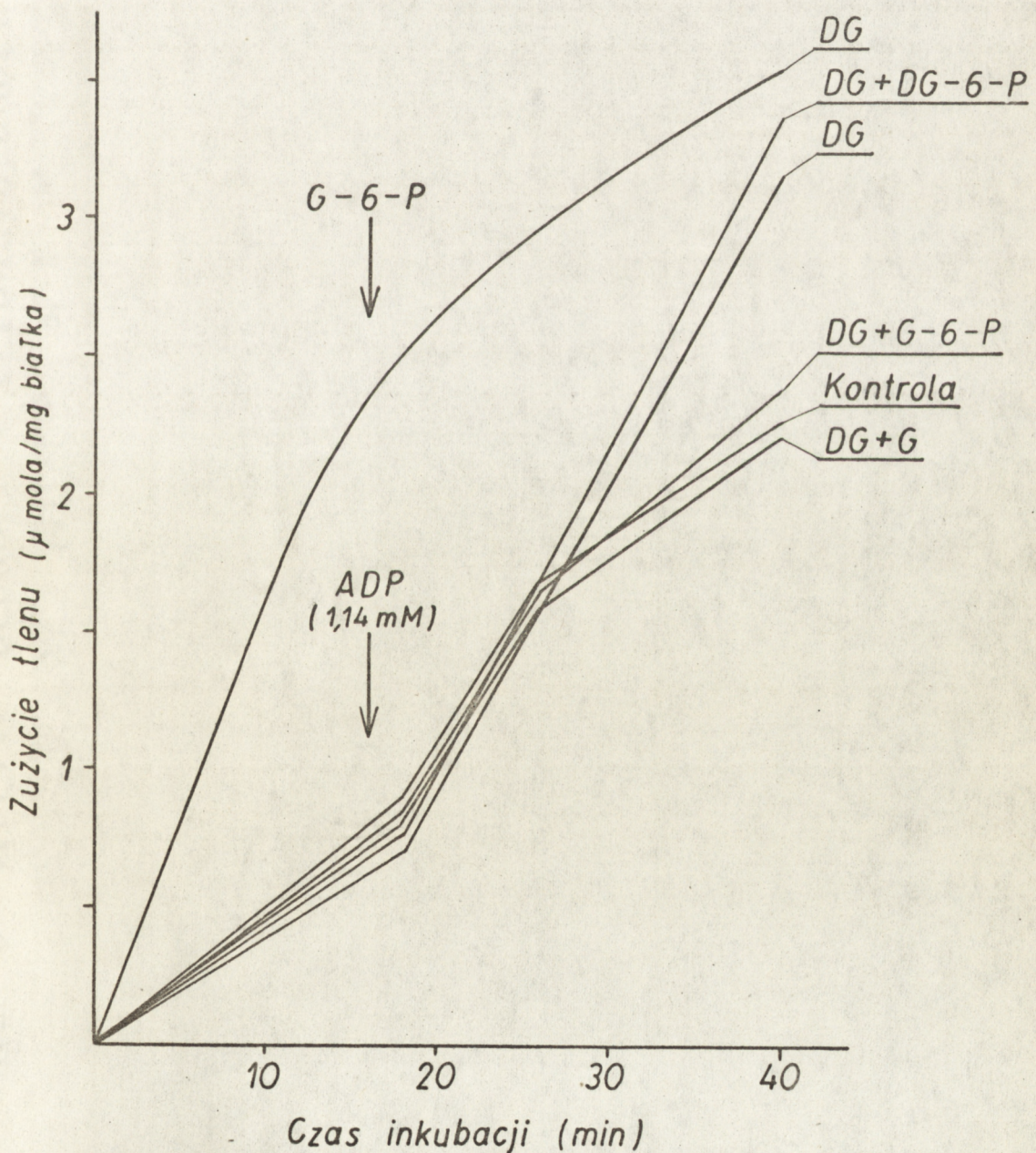
Tabela 17

Oksydacyjna fosforylacja i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie mitochondriów komórek wysiękowego raka Ehrlicha w czasie oksydacyjnej fosforylacji w obecności 2-dezoksyglukozy z uwzględnieniem wpływu glukozy, glukozo-6-fosforanu i dezoksyglukozo-6-fosforanu.

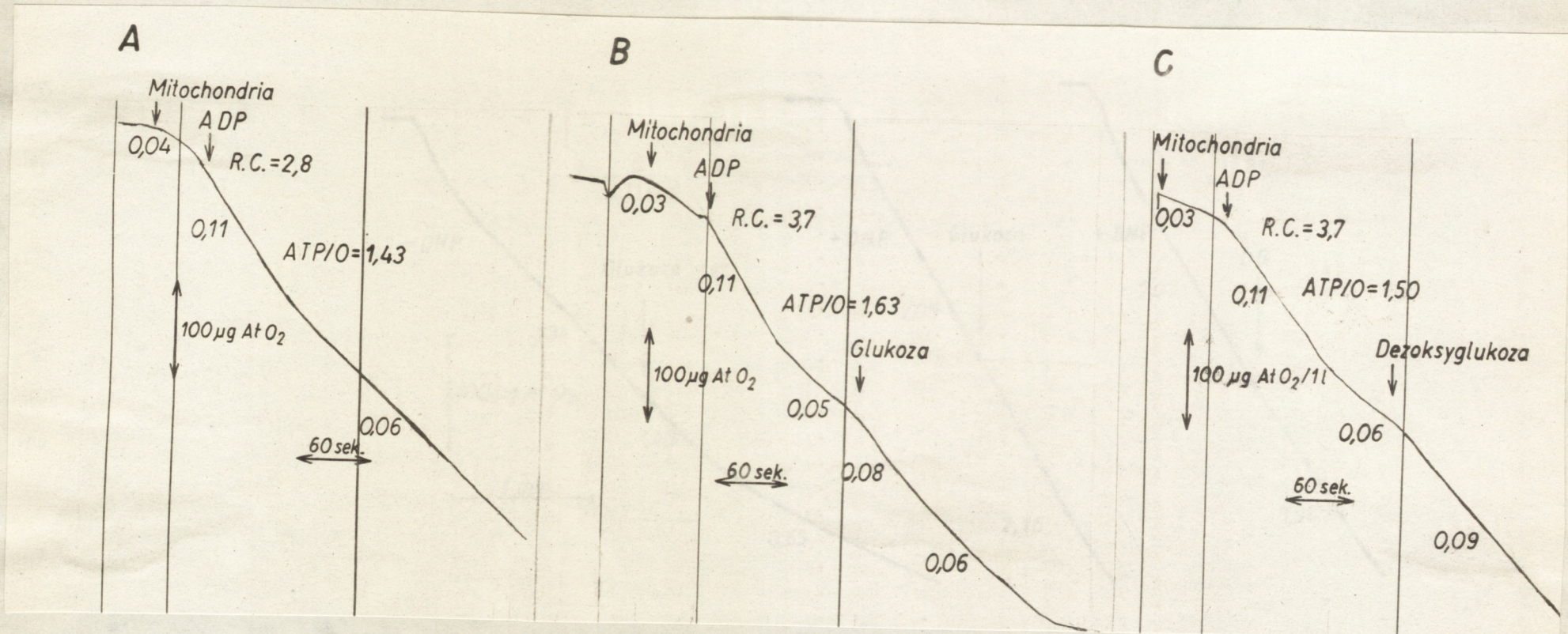
Nr. Doś.	Heksozy w środowisku inkubacyjnym	Stężenie nukleotydów adeninowych / μ mole/2 ml \acute rod.inkub./								Zużycie tlenu / μ gatomy/lmg białka/min/			Współczynnik kontroli oddechowej R.C.	Przyrost ATP / μ mole/	Ilość tlenu zużytego w stanie 3 / μ gatomy/	ATP / μ mole/
		Przed inkubacją				Po 40 min.inkubacji				Stan 4 bez ADP	Stan 3 fosforylacja ADP	Stan 4 wyczerpanie ADP				
		ATP	ADP	AMP		ATP	ADP	AMP								
1.	Bez heksoz	0,27	2,28	0,77	3,32	2,85	0,19	0,40	3,44	99,2	217,4	82,8	2,19	2,58	1,47	1,76
	DG					1,46	1,47	0,59	3,52	79,2	220,5	-	2,78	-	-	-
	DG+G					2,83	0,20	0,46	3,49	87,2	208,2	87,2	2,39	2,56	1,61	1,59
	DG+G-6-P					2,86	0,17	0,39	3,42	95,3	216,0	90,6	2,27	2,59	1,59	1,63
	DG/DG+G-6-P					1,44	1,53	0,47	3,44	84,4	228,2	80,0	2,70	-	-	-
2.	Bez heksoz	0,12	2,36	0,79	3,27	2,71	0,22	0,13	3,06	45,6	150,4	65,2	3,30	2,59	1,62	1,60
	DG					1,70	1,00	0,28	2,98	60,0	158,6	-	2,64	-	-	-
	DG+G					2,88	0,15	0,19	3,22	48,8	151,6	71,2	3,11	2,76	1,64	1,68
	DG+G-6-P					2,98	0,01	0,12	3,11	54,2	141,8	62,2	2,62	2,86	1,52	1,88
	DG/DG+G-6-P					2,00	0,92	0,25	3,17	51,2	142,2	55,6	2,78	-	-	-

G - glukoza - 10 mM
 DG - 2-dezoksyglukoza - 20 mM
 G-6-P - glukozo-6-fosforan - 0,5mM
 DG-6-P - 2-dezoksyglukozo-6-fosforan - 0,5mM

Ryc. 7 WPŁYW DEZOKSYGLUKOZY (20 mM)
NA OKSYDACYJNĄ FOSFORYLACJĘ MITOCHONDRIÓW
KOMÓREK RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA
W OBECNOŚCI GLUKOZY (10 mM),
G-6-P (0,5 mM) i DG-6-P (0,5 mM)



Ryc. 8 WPŁYW GLUKOZY I DEZOKSYGLUKOZY NA PRZEBIEG OKSYDACYJNEJ FOSFORYLACJI MITOCHONDRIÓW KOMÓREK RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA [102]



- A - Układ kontrolny bez heksoz
- B - Glukoza dodana w stanie 4
- C - Dezoksyglukoza dodana w stanie 4

Zużycie tlenu - $\mu\text{g atomy O}_2/\text{mg białka}/\text{min}$.

Stężenia: Frakcje mitochondrialne A-1,50; B-1,50; C-1,08 mg białka,
bursztynian - 5 mM, heksozy - 1 mM, Pi - 1 mM, ADP - 180 μM

oddychania do poziomu, jaki obserwowano w stanie 3. To pobudzenie oddychania trwało aż do pełnego zużycia tlenku ze środowiska inkubacyjnego. Po dodaniu glukozy dochodziło do przyspieszenia oddychania, szybko jednak następował powrót do powolnego oddychania jak w stanie 4.

Tabela 18 i rycina 9 przedstawiają wyniki badania wpływu frakcji jądrowej, mikrosomalnej i cytoplazmatycznej raka wysiękowego Ehrlicha na oksydacyjną fosforylację frakcji mitochondrialnej raka Ehrlicha w obecności DG. Nie wykazano wpływu wymienionych frakcji ani na charakter krzywych oddychania, ani też na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie badanych mitochondriów.

3.2.2. Glikoliza.

W tabeli 11 przedstawiono wyniki badania wpływu dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w czasie glikolizy homogenatów raka wysiękowego Ehrlicha inkubowanych w warunkach tlenowych i beztlenowych w obecności różnych heksoz. W badanych homogenatach utrzymywało się wysokie stężenie ATP w czasie inkubacji w warunkach tlenowych zarówno w środowisku nie zawierającym heksoz jak i w obecności glukozy, fruktozy, mannozy i galaktozy. Wszystkie te sukry, oprócz galaktozy, były substratami ciągu glikolitycznego i ulegały przemianie z wytworzeniem kwasu mlekowego. W obecności DG w warunkach tlenowych obserwowano wydatne obniżenie stężenia ATP i sumy stężeń nukleotydów adeninowych w homogenatach inkubowanych bez innych heksoz. Dezoksyglukoza w obecności glukozy, fruktozy i mannozy w nieznacznym

Tabela 18

Oksydacyjna fosforylacja i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie mitochondriów komórek wysiękowego raka Ehrlicha w obecności 2-dezoksyglukozy z uwzględnieniem wpływu różnych frakcji subkomórkowych.

Nr. Dośw.	Stężenie 2-dezoksyglukozy /mM/	Badane frakcje subkomórkowe	Stężenia nukleotydów adeninowych / μ mole/2 ml \acute rod.inkubacyjnego/								Zużycie tlenu / μ g atomy/mg białka mitochondrialnego/min/			Współczynnik kontrol. oddechowej R.C.
			Przed inkubacja				Po 40 min inkubacji				Stan 4 /bezADP/	Stan 3 /fosforylacja ADP/	Stan 4 /wyczerpanie ADP/	
			ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ				
1.	0	M	0,60	1,95	0,55	3,10	2,58	0,18	0,43	3,19	49,4	172,0	60,0	3,48
	10	M					1,36	0,88	0,56	2,80	53,4	169,0		3,16
	10	M+J					1,33	0,96	0,65	2,94	68,0	178,0		2,62
	10	M+Mo					0,98	1,05	0,88	2,91	53,4	167,0		3,13
	10	M+C					1,45	0,80	0,53	2,78	62,7	168,0		2,68
	10	M+J+Mo+C					1,04	1,05	0,80	2,89	89,3	185,0		2,07
2.	0	M	0,54	1,85	0,52	2,91	2,57	0,22	0,41	3,20	69,3	170,0	72,0	2,45
	10	M					1,80	0,39	0,79	2,98	69,3	212,2		3,06
	10	M+J					1,74	0,42	0,83	2,99	70,2	215,0		3,06
	10	M+Mo					1,15	0,50	1,04	2,69	66,7	210,5		3,16
	10	M+C					1,74	0,41	0,77	2,92	74,6	205,5		2,75
	10	M+J+Mo+C					1,03	0,53	1,24	2,80	89,4	193,0		2,16

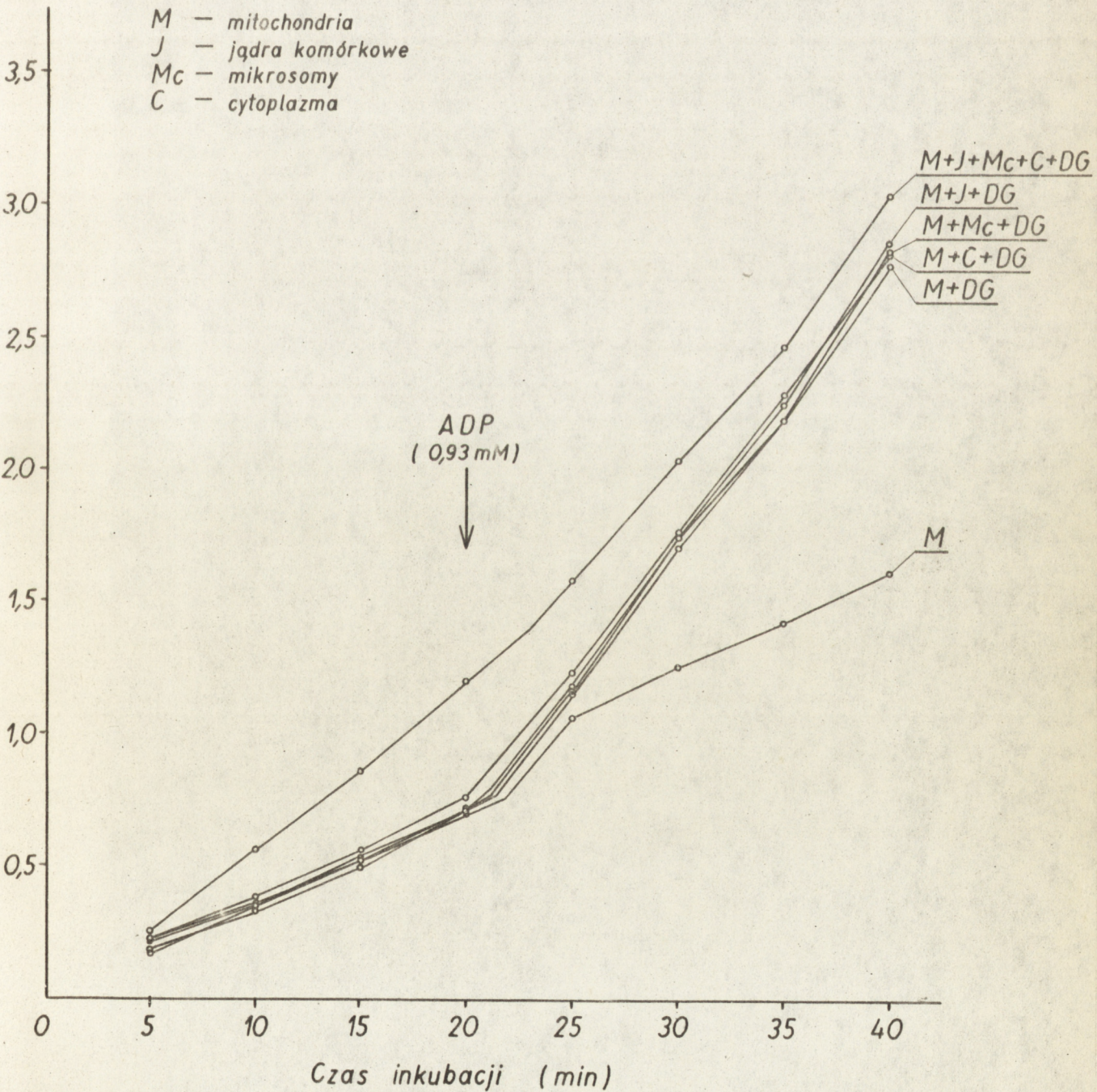
Nazwa frakcji:Ilość badanej frakcji /mg białka/2 ml środowiska inkubacyjnego/

M - mitochondrialna
 J - jądrowe
 Mo - mikrosomalna
 C - cytoplazmatyczna

	<u>Dośw.1</u>	<u>Dośw.2</u>
	2,25	1,75
	0,93	1,00
	3,91	2,33
	2,07	1,20

-
70
-

Ryc. 9 PRZEBIEG OKSYDACYJNEJ FOSFORYLACJI UKŁADÓW ZAWIERAJĄCYCH RÓŻNE FRAKCJE SUBKOMÓRKOWE RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA W OBECNOŚCI DEZOKSYGLUKOZY (10 mM)



tylko stopniu hamowała glikolizę i wywierała mały wpływ na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych. W obecności galaktozy dezoksyglukoza wywoływała wyraźne obniżenie stężenia ATP i sumy stężeń nukleotydów adeninowych.

Podczas inkubacji homogenatów w warunkach beztlenowych w układzie nie zawierającym heksoz, oraz w obecności galaktozy, utrzymywały się niskie stężenia ATP przy podwyższonych stężeniach AMP. W przebiegu glikolizy homogenatu kosztem glukozy, fruktozy i mannozy w warunkach beztlenowych obserwowano niższe stężenia ATP niż w warunkach tlenowych. Dezoksyglukoza dodana bez innych heksoz lub wraz z galaktozą powodowała dalsze obniżenie stężenia ATP przy nieznacznym tylko obniżeniu sumy stężeń wszystkich nukleotydów adeninowych. Dezoksyglukoza wywierała w warunkach beztlenowych mały wpływ na zachowanie się stężeń ATP i produkcję kwasu mlekowego kosztem glukozy i mannozy, hamowała natomiast intensywnie fruktolizę i wydatnie obniżała stężenia ATP w obecności fruktozy.

Dalsze badania nad wpływem DG na glikolizę i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych prowadzono na układach cytoplazmatycznych raka wąsикового Ehrlicha /Tab. 19 /, i kory mózgu świnki morskiej /Tab. 20 /. W obu przypadkach DG nie miała wpływu na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych i produkcję kwasu mlekowego kosztem glukozy, obniżała natomiast stężenie ATP i intensywnie hamowała produkcję kwasu mlekowego kosztem fruktozy.

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych oraz glikolizę i fruktolizę układów cytoplazmatycznych komórek wysiękowego raka Ehrlicha /warunki tlenowe/.

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /10mM/	Stężenie nukleotydów adeninowych / μ mole/2ml \acute{s} rod.inkub/								Produkcja kwasu mlekowego / μ mole/ μ g białka/godz/
		Przed inkubacją				Po 1 godz.inkubacji				
		ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	
1.	G	1,10	0,40	0,10	1,60	1,12	0,50	0,10	1,72	0,57
	G + DG					1,16	0,68	0,12	1,96	0,62
	F					1,37	0,50	0,12	1,99	0,63
	F + DG					0,32	0,70	0,22	1,24	0,17
2.	G	1,11	0,22	0,26	1,59	1,37	0,24	0,21	1,82	0,59
	G + DG					1,22	0,36	0,21	1,79	0,59
	F					1,59	0,20	0,21	2,00	0,71
	F + DG					0,14	0,45	1,50	2,09	0,07
3.	G	1,31	0,21	0,30	1,82	1,45	0,19	0,28	1,92	0,52
	G + DG					1,34	0,22	0,27	1,83	0,57
	F					1,49	0,27	0,29	2,05	0,57
	F + DG					0,15	0,50	1,08	1,73	0,08

G - glukoza; F - fruktoza; DG - 2-dezoksyglukoza.

Tabela 20

Wpływ 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych oraz glikolizę i fruktolizę układów cytoplazmatycznych kory mózgu świnki morskiej /warunki tlenowe/.

Nr. Dośw.	Heksozy obecne w środowisku inkubacyjnym /10mM/	Stężenia nukleotydów adeninowych /umole/2 ml środ.inkub./								Produkcja kwasu mlekowego /umole/1mg białka/ godz/
		Przed inkubacją				Po 1 godz.inkubacji				
		ATP	ADP	AMP	Σ	ATP	ADP	AMP	Σ	
1.	G	1,10	0,60	0,08	1,78	1,19	0,58	0,12	1,89	1,27
	G + DG					0,95	0,70	0,15	1,80	1,39
	F					1,13	0,80	0,15	2,13	1,34
	F + DG					0,32	0,45	0,96	1,73	0,38
2.	G	1,11	0,18	0,28	1,57	0,63	0,75	0,43	1,81	1,00
	G + DG					0,60	0,59	0,76	1,95	1,08
	F					0,59	0,53	0,79	1,91	1,13
	F + DG					0,08	0,30	1,23	1,61	0,36
3.	G	1,12	0,21	0,16	1,49	1,03	0,33	0,21	1,57	1,04
	G + DG					1,14	0,29	0,20	1,63	1,06
	F					1,03	0,38	0,17	1,58	1,38
	F + DG					0,12	0,33	1,00	1,45	0,24

G - glukoza; F- fruktoza; DG - 2-dezoksyglukoza.

3.2.3. Aktywność heksokinazy, kinazy adenylanowej i ATPaz.

W dalszym rozwoju pracy postanowiono przebadać aktywność niektórych enzymów mogących brać udział w mechanizmie działania dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny komórek.

Pomiary aktywności heksokinazy w homogenatach i frakcjach mitochondrialnych prawidłowej wątroby szczura, kory mózgu świnki morskiej, wątrobiaka Morrisa i komórek raka wysiękowego Ehrlicha oraz w homogenacie spontanicznego raka sutka myszy przedstawiono w tabeli 21. Homogenaty wątroby i wątrobiaka Morrisa cechowały się nieznaczną aktywnością heksokinazy, wyższą aktywność tego enzymu wykazano w homogenacie spontanicznego raka sutka myszy, natomiast najwyższą aktywność stwierdzono w homogenatach komórek raka Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej. Spośród badanych frakcji mitochondrialnych aktywność heksokinazy wykazano wyłącznie na mitochondriach kory mózgu i raka Ehrlicha. Wartości obrazujące aktywności tego enzymu były równe w przypadku obu frakcji mitochondrialnych.

Aktywność kinazy adenylanowej oznaczano tylko w homogenacie komórek wysiękowego raka Ehrlicha. Wykazano wysoką aktywność kinazy adenylanowej /Tab. 22 /.

Tabela 21

Aktywność heksokinazy w homogenatach i w mitochondriach niektórych tkanek prawidłowych i nowotworów doświadczalnych.

Materiał	Nr. Dośw.	Aktywność heksokinazy		
		Homogenat		Mitochondria
		μmole G6P/min na 1 g w.m.	μmole G6P/min na 1 mg białka	μmole G6P/min na 1 mg białka
Prawidłowa wątroba szczura	1.	1,09	5,52	0,00
	2.	1,13	5,72	0,00
	3.	1,18	5,60	0,00
	4.	1,10	5,84	0,00
Prawidłowa tkanka mózgu winki morskiej	1.	11,45	116	0,49
	2.	11,80	130	0,48
	3.	11,50	118	0,48
Komórki nerkowego ciała chrząstki	1.	14,88	102	0,49
	2.	14,63	112	0,48
	3.	13,73	104	0,48
Wątrobiak Morrisa	1.	0,28	2,42	0,00
	2.	0,26	2,33	0,00
	3.	0,21	1,69	0,00
	4.	0,25	1,70	0,00
Nowotworowy karcynoma sutka	1.	5,36	28,1	
	2.	4,37	28,3	
	3.	4,12	21,3	
	4.	3,82	26,6	
	5.	4,68	28,1	

-6-P - glukoza-6-fosforan.

T a b e l a 22

Aktywność kinazy adenylanowej w homogenacie komórek raka
wysiękowego Ehrlicha.

Nr. Dośw.	Aktywność kinazy adenylanowej	
	umole powst. ATP/min na 1 g w.m.	umole powst. ATP/min na 1 mg białka
1.	6,05	76
2.	5,97	59
3.	4,74	51

W tabeli 23 przedstawiono wyniki pomiarów aktywności ATPazy we frakcjach mitochondrialnych komórek raka wysiękowego Ehrlicha i prawidłowej wątroby szczura z uwzględnieniem wpływu jonów Mg^{++} , DNP i dezoksyglukozy. W mitochondriach raka Ehrlicha stwierdzono wysoką aktywność wolnej ATPazy i latentnej ATPazy zależnej od Mg^{++} . Aktywność ATPazy uzależnionej od DNP była nieznaczna. W obecności DG w badanych frakcjach mitochondrialnych obserwowano niższe uwalnianie fosforenu nieorganicznego z ATP w porównaniu z grupą kontrolną bez DG. Aktywność wolnej ATPazy we frakcji mitochondrialnej wątroby szczura była znacznie niższa w stosunku do aktywności enzymu we frakcji mitochondrialnej raka Ehrlicha. W wypadku wątroby stwierdzono nieznaczną tylko aktywność latentnej ATPazy pobudzanej przez Mg^{++} , a wysoką aktywność ATPazy uzależnionej od DNP. Dezoksyglukoza nie miała wpływu na aktywność ATPaz mitochondriów wątroby.

T a b e l a 23

Aktywność ATPaz w mitochondriach komórek raka włośniowego Ehrlicha i prawidłowej wątroby szczura.

Obecność dodatkowych substancji w środowisku inkubacyjnym			Aktywność ATPaz $\mu\text{mole uwaln. P}_i / 1 \text{ mg białka / min}$	
Mg ⁺⁺ /7,5 mM/	DNP /10 ⁻⁴ M/	DG /20 mM/	Rak Ehrlicha	Wątroba szczura
-	-	-	0,56 ± 0,11	0,17 ± 0,09
+	-	-	1,36 ± 0,76	0,71 ± 0,36
-	+	-	0,69 ± 0,27	3,69 ± 0,95
+	+	-	1,66 ± 1,37	3,74 ± 1,28
-	-	+	0,59 ± 0,43	0,31 ± 0,13
+	-	+	1,00 ± 0,42	0,74 ± 0,55
-	+	+	0,71 ± 0,14	3,55 ± 1,12
+	+	+	1,17 ± 0,59	3,52 ± 1,17

Wartości podane w tabeli przedstawiają średnie \pm przedziały ufności /wt_w/ obliczone wg skróconej metody Deana i Dixona / 35 /. W przypadku mitochondriów raka Ehrlicha średnie wyliczono z 4 dośw. a mitochondriów wątroby szczura z 5 dośw.

DG - 2-dezoksyglukoza

DNP - 2,4-dwunitrofenol.

KINETYKA EFEKTÓW

3.3. Działanie dezoksyglukozy w świetle współzależności nukleotydy adeninowe - oddychanie w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha

W poprzednich rozdziałach przedstawiono wyniki badań dotyczących działania dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny badanych komórek oraz informacje pozwalające odnosić pewne elementy działania DG na komórki do aktywności biochemicznej odpowiednich struktur subkomórkowych. Brakowało natomiast opisu dynamiki rozwoju zmian metabolizmu pod wpływem DG, których bliższe poznanie, a zwłaszcza kolejności występowania poszczególnych elementów efektu, może być szczególnie pomocne przy ustalaniu mechanizmu działania DG na komórki. W części pracy poświęconej tym zagadnieniom obiektem badań były wyłącznie nietknięte komórki raka wysiękowego Ehrlicha.

3.3.1. ATP/ADP/AMP na tle sprzężenia glikoza - oddychanie.

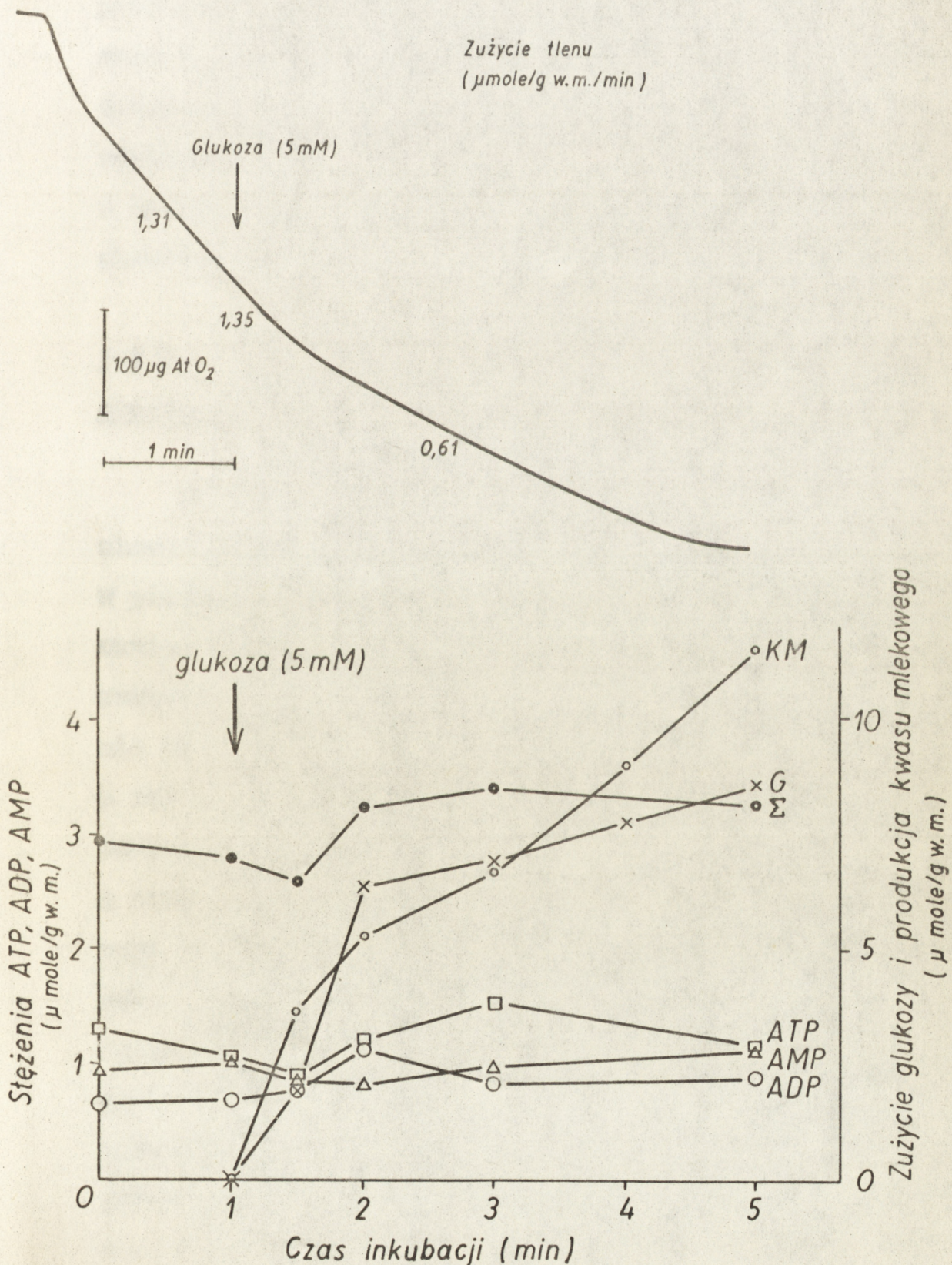
Tabela 24 i rycina 10 przedstawiają wyniki badania zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych, oddychania i glikolizy komórek raka wysiękowego Ehrlicha w pierwszych minutach po dodaniu glukozy do zawiesiny badanych komórek inkubowanych w warunkach tlenowych. W czasie 1 min. inkubacji początkowej w warunkach oddychania kosztem substratów endogennych w badanych komórkach utrzymywało się wysokie stężenie ATP. W następstwie dodania glukozy, po krótkim

Tabela 24

Aktywność glikolityczna w warunkach tlenowych oraz zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha /glukoza 5 mM/.

Czas inkubacji /min/	Nr. Dośw.	Zużycie glukozy /umole/lg w.m./	Produkcja kwasu mlekowego /umole/lg w.m./	Stężenie nukleotydów adeninowych /umole/lg w.m./			
				ATP	ADP	AMP	Σ
0	1.			0,58	1,04	1,75	3,17
	2.			1,32	0,65	0,96	2,93
1.	1.			0,86	0,62	1,15	2,63
	2.			1,07	0,69	1,04	2,80
1,5	1.	2,4	3,6	1,27	1,16	1,30	3,73
	2.	2,2	2,7	0,94	0,77	0,87	2,58
2	1.	5,6	5,8	1,18	0,85	1,38	3,41
	2.	6,4	5,3	1,22	1,17	0,84	3,23
3.	1.	6,4	8,0	1,19	0,95	1,15	3,29
	2.	6,9	6,7	1,55	0,86	1,00	3,41
4	1.	6,4	9,0				
	2.	7,8	9,0				
5.	1.	7,8	11,5	1,70	0,59	1,08	3,37
	2.	8,6	11,5	1,18	0,89	1,17	3,24

Ryc. 10 ZUŻYCIE TLENU, PRZEBIEG GLIKOLIZY
ZACHOWANIE SIĘ STĘŻEŃ NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH
W KOMÓRKACH WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA



wstępnym okresie nieznacznego pobudzenia oddychania, obserwowano hamowanie zużycia tlenu /efekt Crabtree/Ryc. 10 /. Zużycie glukozy i produkcja kwasu mlekowego, intensywne w pierwszej minucie po dodaniu glukozy, osiągały następnie stan równowagi na nieco niższym poziomie. W omawianych doświadczeniach, w których próbki do oznaczeń pobierano w odstępach co 1/2 - 1 min. nie stwierdzono istotnych zmian w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych po dodaniu glukozy.

3.3.2. Zależności pomiędzy zużywaniem dezoksyglukozy a zachowaniem się stężeń ATP, ADP, AMP i oddychaniem.

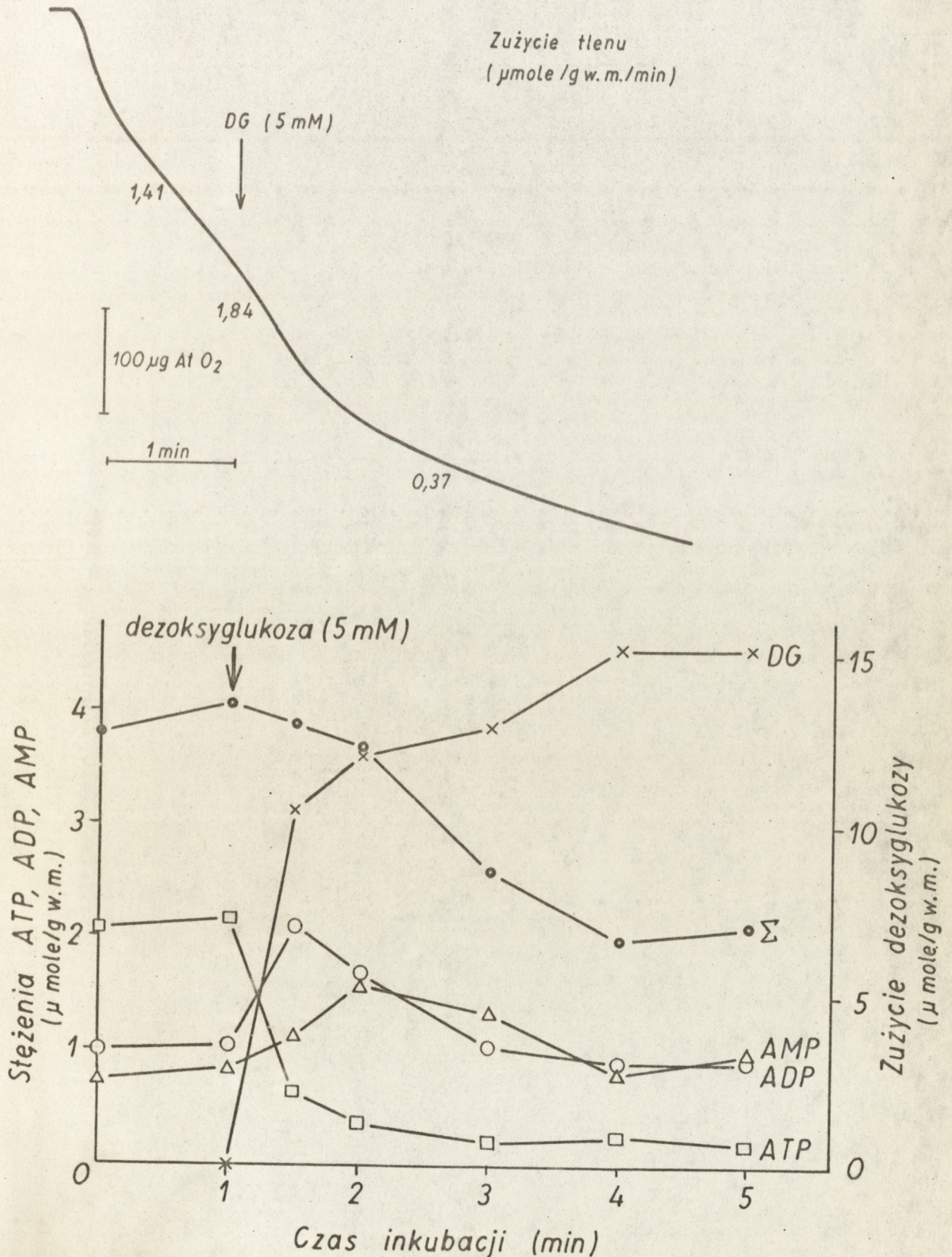
Dane przedstawione w Tab. 25 i na Ryc. 11 i 12 dotyczą zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych i oddychania w pierwszych minutach po dodaniu DG w powiązaniu ze zużyciem dezoksyglukozy przez badane komórki inkubowane w warunkach tlenowych. Po 1 min. inkubacji w warunkach oddychania kosztem substratów endogennych dodawano DG w stężeniu 5 mM. W ciągu pierwszych 30 sek. obserwowano bardzo szybkie zużycie DG, które ulegało zahamowaniu w ciągu następnych 2 min. Szybkość zużycia DG osiągała następnie stan równowagi na bardzo niskim poziomie /Ryc. 12 /. Już w ciągu 30 sek. po dodaniu DG w okresie szybkiego jej zużycia dochodziło do obniżenia się stężenia ATP w komórkach. Po następnych 30 sek. stężenie ATP osiągało b. niski poziom, na którym utrzymywało się dalej niezmiennie. Temu obniżeniu stężenia ATP towarzyszył przejściowy wzrost ADP, który utrzymywał się ok. 2 min., a także utrzymujący się nieco dłużej przyrost

Tabela 25

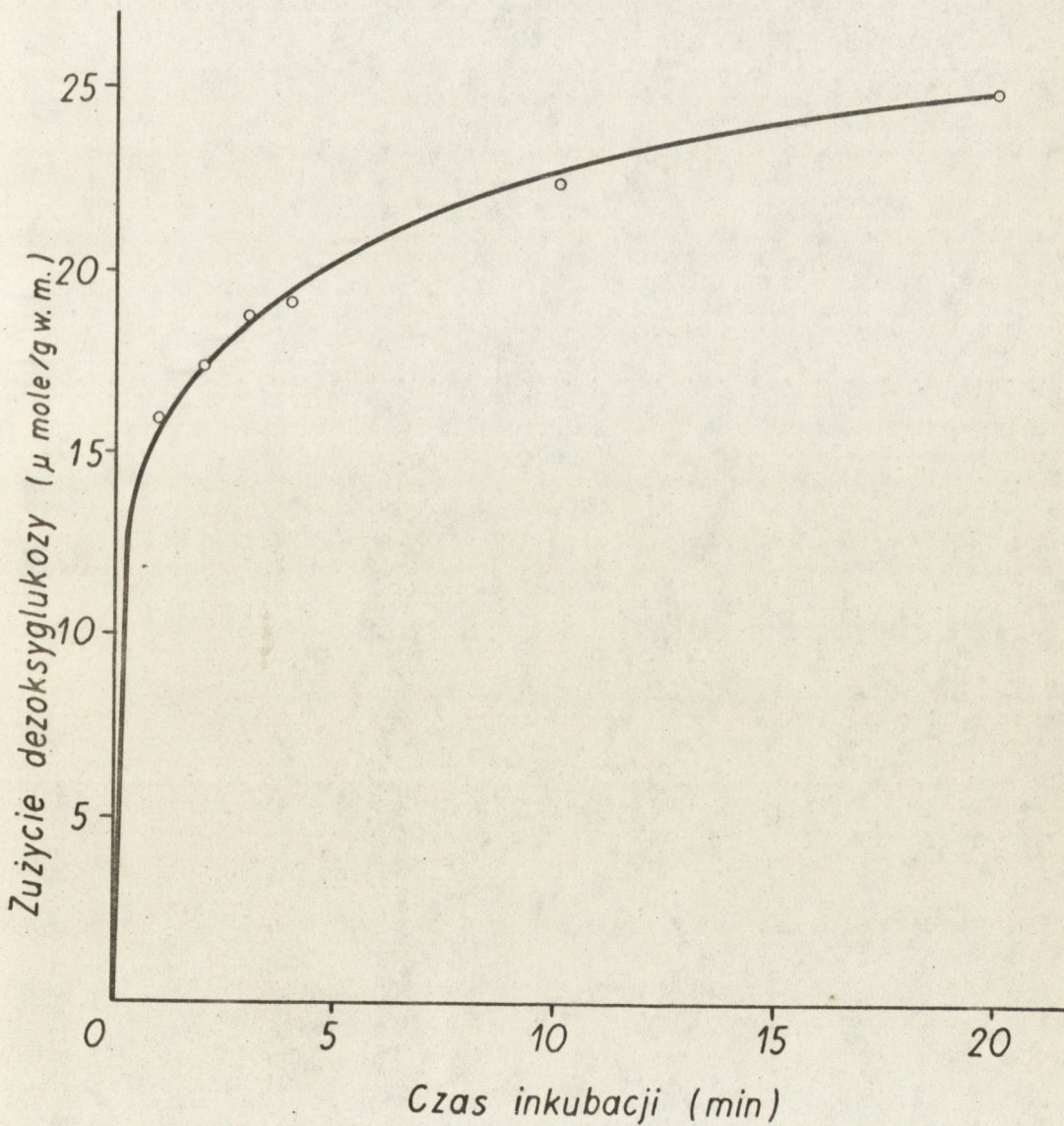
Zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha w obecności 2-dezoksyglukozy 5 mM /warunki tlenowe/.

Czas inkubacji /min/	Nr. Dośw.	Stężenia nukleotydów adeninowych / μ mole/lg w.m./				Zużycie 2-dezoksyglukozy / μ mole/lg w.m./
		ATP	ADP	AMP	Σ	
0	1.	1,47	1,11	1,14	3,72	
	2.	2,07	1,00	0,74	3,81	
1	1.	1,27	0,86	1,54	3,67	
	2.	2,16	1,04	0,85	4,05	
1,5	1.	0,52	2,05	1,75	4,32	11,5
	2.	0,64	2,10	1,13	3,87	10,4
2	1.	0,05	1,80	2,37	4,22	15,4
	2.	0,38	1,70	1,59	3,67	12,0
3	1.	0,21	1,26	2,16	3,63	18,2
	2.	0,21	1,04	1,34	2,59	12,8
4	1.	0,16	0,88	1,95	2,99	20,0
	2.	0,27	0,91	0,82	2,00	15,2
5	1.	0,11	0,89	1,77	2,77	20,8
	2.	0,20	0,94	0,97	2,11	15,2

Ryc. 11 WPŁYW DEZOKSYGLUKOZY NA ZUŻYCIĘ TLENU I ZACHOWANIE SIĘ STĘŻEŃ ATP, ADP i AMP W KOMÓRKACH WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA



Ryc. 12 ZUŻYCIE DEZOKSYGLUKOZY PRZEZ KOMÓRKI
WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA
(POCZĄTKOWE STĘŻENIE DG - 5 mM; WARUNKI TLENOWE)



AMP. Suma stężeń nukleotydów adeninowych ulegała szybkiemu obniżeniu. Po pierwszych 4 min. doświadczenia stężenia nukleotydów adeninowych w badanych komórkach osiągały poziom, który utrzymywał się dalej w niezmiennym stanie. Bardzo wyraźnie rysowała się zależność pomiędzy szybkością zużycia DG a zachowaniem się stężeń nukleotydów adeninowych, a zwłaszcza ATP i ADP w komórkach.

Równolegle przeprowadzone oznaczenia szybkości zużycia tlenu przy pomocy elektrody Clarka wykazały dwufazowy charakter dodaniu DG. Po trwającym ok. 30 sek. przyspieszeniu oddychania ter krzywej oddychania /okres ten odpowiada szybkiemu zużyciu DG i wysokiemu stężeniu ADP wewnątrz komórek/, dochodziło do zwolnienia szybkości zużycia tlenu. To hamowanie oddychania rozwijało się w momencie wyczerpania ATP przy utrzym^{ym}aniu się wysokiego stężenia ADP /Ryc. 11 /.

3.3.3. Ocena zależności nukleotydy adeninowe - oddychanie z uwzględnieniem wpływu DNP i jodooctanu.

Dla dokładniejszego zbadania związków pomiędzy zachowaniem się stężeń ATP a szybkością zużycia heksoz przez komórki raka wsiękowego Ehrlicha, a także dla poznania wpływu DG na oddychanie komórek w obecności rozpręgacza oksydacyjnej fosforylacji, przeprowadzono odpowiednie badania z zastosowaniem 2,4-dwunitrofenolu /DNP/.

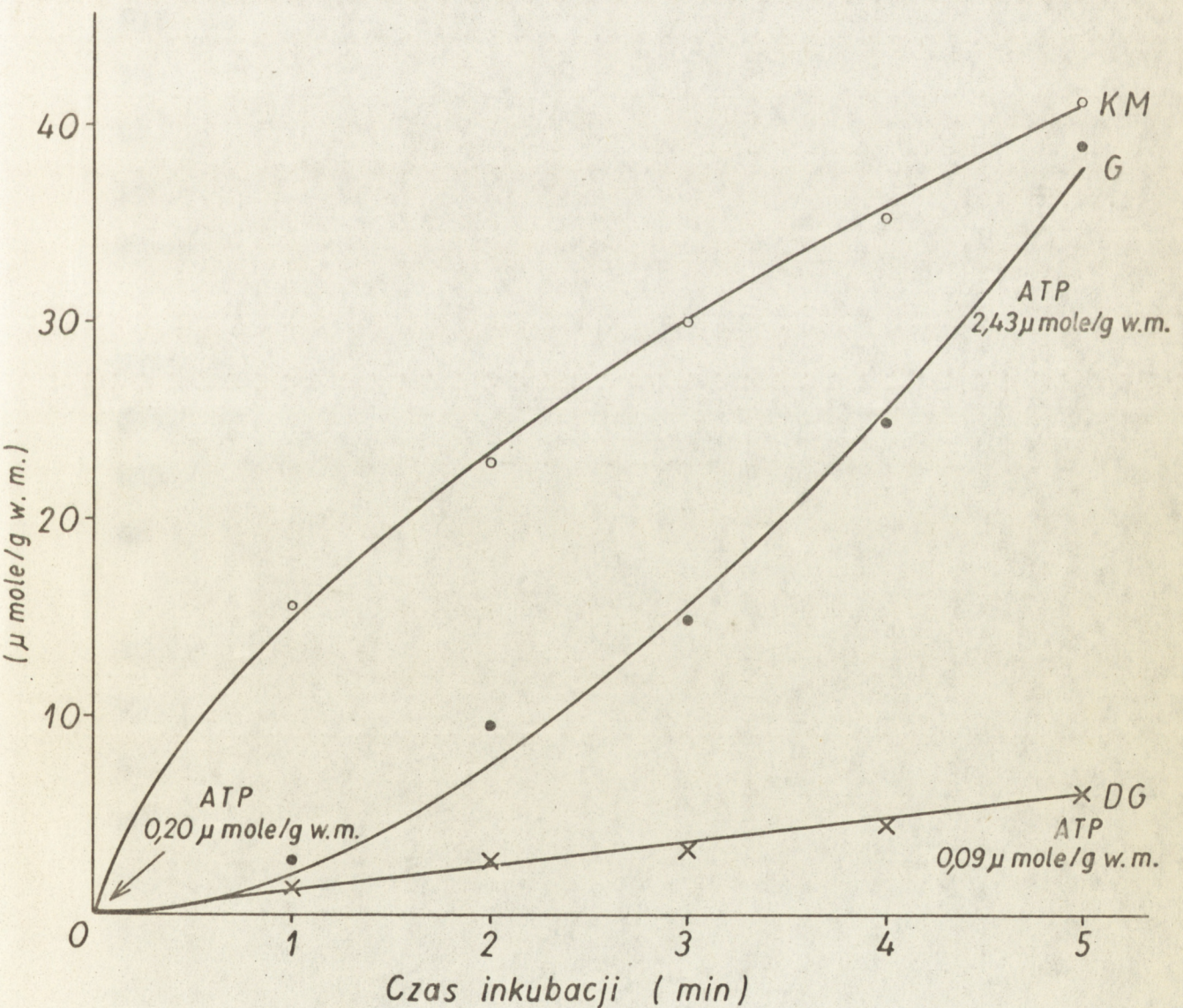
Jak wynika z tabeli 96 i Ryc. 13 komórki raka Ehrlicha inkubowane bez heksoz w warunkach tlenowych w obecności DNP zawierały znikome tylko stężenie ATP. Szybkość zużycia DG przez badane komórki utrzymywała się na bardzo niskim poziomie, a stężenie ATP po inkubacji ulegało dalszemu obniżeniu. W tych samych warunkach zużywanie glukozy, początkowo

Tabela 26

Aktywność glikolityczna i zużycie 2-dezoksyglukozy przez komórki wysiękowego raka Ehrlicha w obecności 2,4-dwunitrofenolu 10^{-4} M /warunki tlenowe, glukoza 5mM, dezoksyglukoza 5 mM/.

Czas inkubacji /min/	Nr. Dośw.	Zużycie 2-dezoksyglukozy / μ mole/lg w.m./	Zużycie glukozy / μ mole/lg w.m./	Produkcja kwasu mlekowego / μ mole/lg w.m./	Stężenie ATP / μ mole/lg w.m./	
					w obecności glukozy	w obecności 2-dezoksyglukozy
1	1.	1,9	2,4	13,5	0,33	0,19
	2.	0,7	3,4	17,6	0,15	0,12
2	1.	1,9	12,0	20,9		
	2.	3,6	7,2	25,0		
3	1.	3,1	19,9	28,9		
	2.	3,6	9,8	31,2		
4	1.	3,1	28,1	34,1		
	2.	6,2	21,8	36,6		
5	1.	4,6	42,0	38,8	2,35	0,11
	2.	7,7	35,8	43,4	2,51	0,07

Ryc. 13 ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY ZUŻYCIEM GLUKOZY*) (DEZOKSYGLUKOZY**), PRODUKCJĄ KWASU MLEKOWEGO A ZACHOWANIEM SIĘ STĘŻEŃ ATP W KOMÓRKACH RAKA EHRLICHA W OBECNOŚCI DNP ($10^{-4}M$)



*) **, początkowe stężenia - 5 mM

wolne, ulegało następnie bardzo znacznemu przyspieszeniu. Obserwowano także wysoką produkcję kwasu mlekowego. Po 5 min. inkubacji komórek w obecności glukozy i DNP dochodziło do ustalenia wysokiego stężenia ATP.

Rycina 14 przedstawia polarograficzne wykresy oddychania komórek raka wysiękowego Ehrlicha poddanych działaniu DNP w obecności glukozy i DG. Łatwo zauważyć, że rozprężeniu oksydacyjnej fosforylacji przez DNP towarzyszyło przyspieszenie oddychania endogennego. Po dodaniu DG obserwowano nieznaczne zwolnienie szybkości zużywania tlenu, natomiast po dodaniu glukozy następowało dalsze przyspieszenie oddychania.

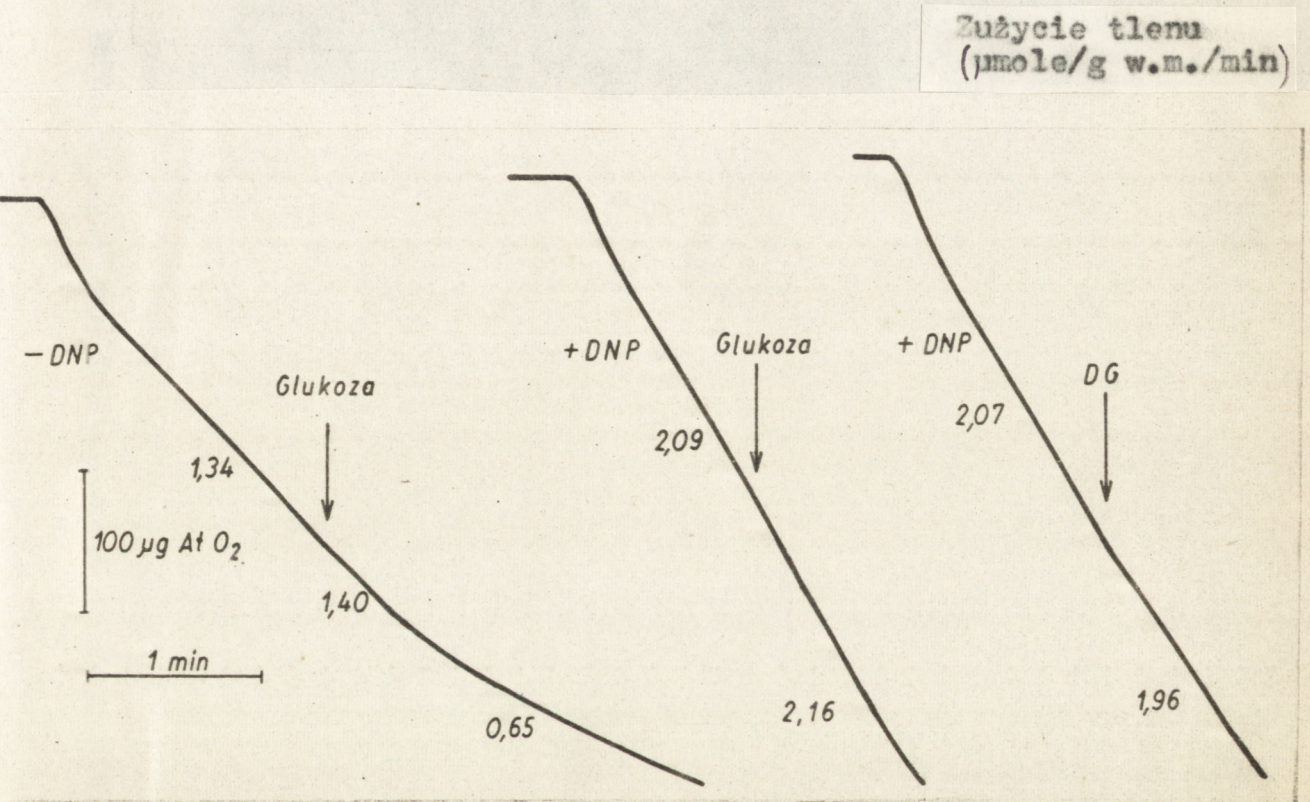
Wyrażane przez licznych badaczy przypuszczenia, że mechanizm działania DG na oddychanie komórek raka Ehrlicha jest zbieżny z działaniem glukozy w obecności jodooctanu, uzasadniają celowość badania wpływu glukozy i jodooctanu na metabolizm tlenowy badanych komórek. Jak wynika z tabeli

27 i ryciny 15 jodooctan nie wpływał na oddychanie endogenne ani na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach raka Ehrlicha. Natomiast po dodaniu glukozy dochodziło do rozwoju zmian w stężeniach nukleotydów adeninowych i oddychaniu ściśle odpowiadającym pod względem ilościowym i jakościowym zmianom wywołanym przez DG /Ryc. 11/. Produkcja kwasu mlekowego była w obecności jodooctanu całkowicie zahamowana.

3.3.4. Zagadnienie optymalnych stężeń DG w zależnościach nukleotydy adeninowe - oddychanie.

Obserwacje dotyczące powiązań pomiędzy zużywaniem DG, wyczerpywaniem się ATP w komórkach i hamowaniem oddychania

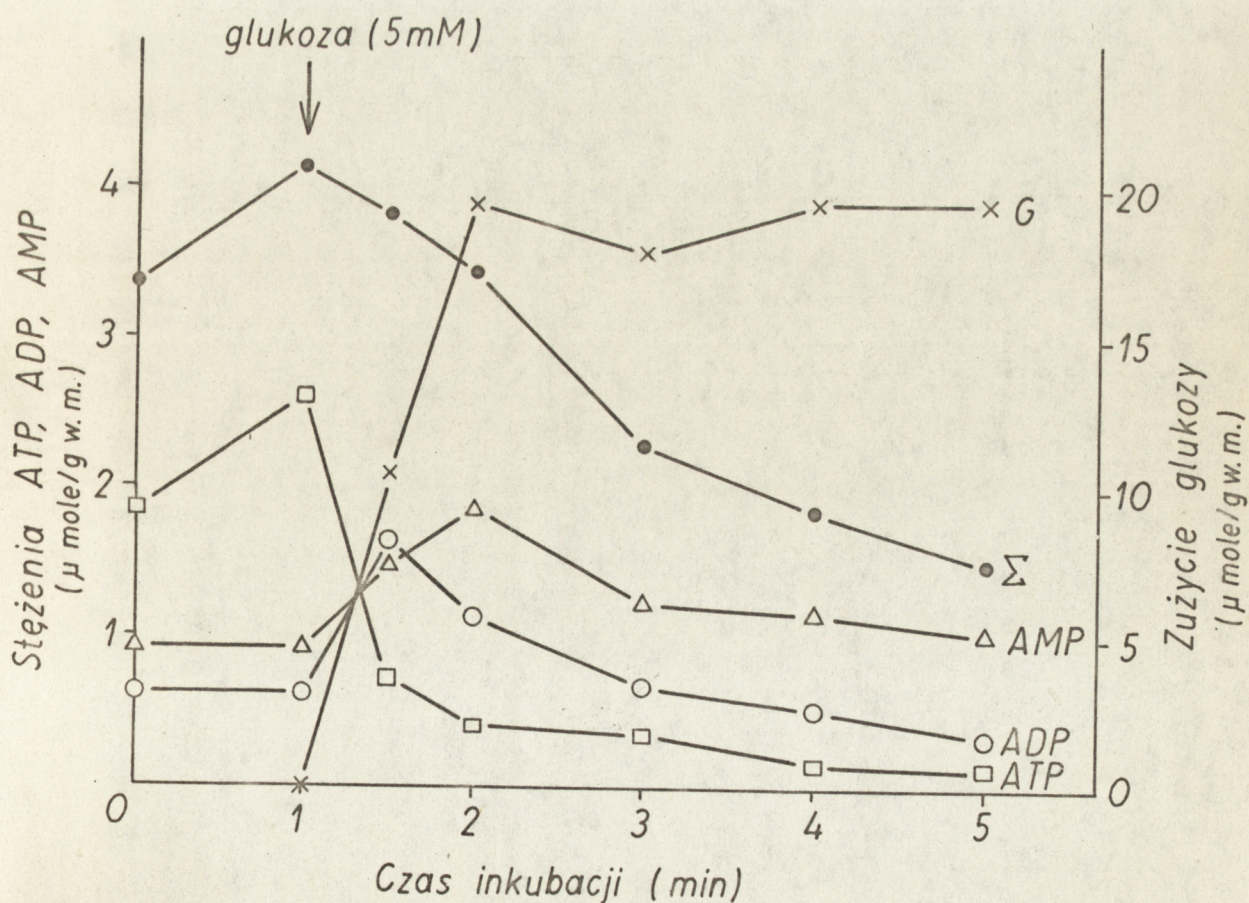
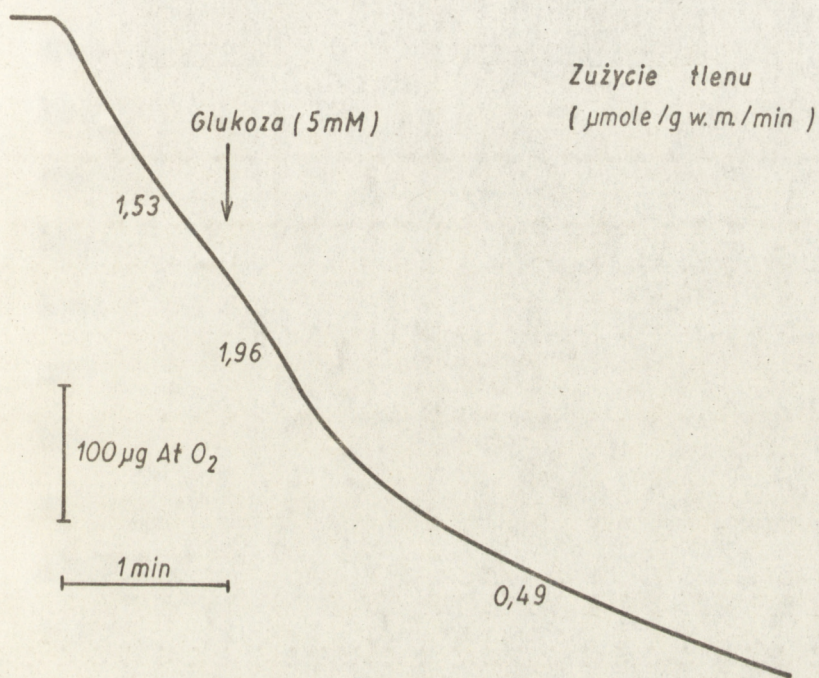
Ryc. 14 WPŁYW DNP ($10^{-4}M$) NA ODDYCHANIE
KOMÓREK WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA
W OBECNOŚCI GLUKOZY (5 mM) i DEZOKSYGLUKOZY (5 mM)



Zachowanie się nukleotydów adeninowych w komórkach wysiękowego reka Ehrlicha w obecności glukozy 5 mM i jodooctanu 10^{-4} M /warunki tlenowe/.

Czas inkubacji /min/	Nr. Dośw.	Stężenia nukleotydów adeninowych / μ mole/lg w.m./			Σ	Zużycie glukozy / μ mole/lg w.m./	Stężenie kwasu mlekowego / μ M/
		ATP	ADP	AMP			
0	1.	2,08	0,68	0,96	3,72		36,5
	2.	1,85	0,61	0,92	3,38		53,8
1.	1.	2,13	0,76	1,06	3,95		47,3
	2.	2,61	0,61	0,92	4,14	9,6	64,5
1,5	1.	0,84	2,04	1,87	4,75	10,5	
	2.	0,71	1,64	1,47	3,82	12,8	
2	1.	0,43	1,24	1,72	3,39	19,6	
	2.	0,42	1,15	1,86	3,43	16,0	
3	1.	0,37	1,25	1,27	2,89	17,9	
	2.	0,37	0,68	1,23	2,28	12,8	
4	1.	0,33	1,19	1,44	2,96	19,6	
	2.	0,17	0,51	1,18	1,86	12,8	23,6
5	1.	0,43	0,85	1,27	2,55	19,6	45,2
	2.	0,14	0,34	1,02	1,50		

Ryc. 15 ODDYCHANIE, ZUŻYCIE GLUKOZY ORAZ ZACHOWANIE SIĘ STĘŻEŃ NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH W KOMÓRKACH WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA W OBECNOŚCI JODOOCTANU ($10^{-4}M$)



nasunęły potrzebę przebadania wpływu różnych niskich stężeń DG na oddychanie badanych komórek. Miało to na celu stwierdzenie istnienia ewentualnych progowych lub optymalnych stężeń DG hamujących oddychanie. Przyjmując zużycie DG w okresie szybkiego jej fosforylowania przez badane komórki /ok. 20 μ moli na g w.m. komórek/ za ilość, która wywołuje całkowite wyczerpanie związków wysokoenergetycznych komórki, można przypuścić, że stężenie DG w zawieszynie komórek równe ok. 20 μ moli/g w.m. może być progowym, najniższym stężeniem DG wywołującym ^{obniżeniu} stężenia ATP, a w konsekwencji zahamowanie oddychania. Tabele 28 i 29 oraz rycina¹⁶ przedstawiają wyniki badania wpływu szeregu niskich stężeń DG na oddychanie i poziom ATP, ADP i AMP. Mierzono także zużycie DG przez komórki.

Przy stosowaniu zawiesiny komórek w stężeniu 4,16% w/v, trwałe hamowanie oddychania wywoływało podanie DG w stężeniu co najmniej 24 x 41,6 μ M, co odpowiadało 24 μ molem DG na 1 g w.m. komórek. Zastosowanie DG w stężeniu 32 μ moli/g w.m. powodowało pogłębienie hamowania, a dalsze zwiększenie stężenia DG nie zmieniało jej obserwowanego efektu /Tab. 28 Ryc. 16 /. Dezoksyglukoza w stężeniu minimum 24 μ mole na g w.m. wywoływała też trwałe obniżenie stężenia ATP i sumy stężeń nukleotydów adeninowych komórek /Tab. 29 /. Charakterystyczne, że maksymalne zużycie DG przez badane komórki wynosiło 26-27 μ moli w ciągu 30 min. bez względu na wysokość zastosowanego stężenia DG.

Wyniki badania wpływu różnych stężeń DG na oddychanie komórek raka Ehrlicha w zawieszynie o stężeniu 2,08% w/v /dwukrotnie niższym niż omówione poprzednio/ wykazało, że

Oddychanie komórek wysiękowego raka Ehrlicha w obecności bardzo małych stężeń 2-dezoksyglukozy (102).

Stężenie komórek /% w/v/	Stężenie 2-dezoksyglukozy / μ M/	1/ Zużycie tlenu/ μ mole/lg w.m./10 min/ w okresie inkubacji			2/ Zużycie 2-dezoksyglukozy / μ mole/lg w.m./30 min/	
		0 min-10 min	10 min-20 min	20 min-30 min		
4,16	0	9,4 \pm 1,2 /12/ 95 \pm 10	9,2 \pm 0,5 /12/ 94 \pm 7	8,0 \pm 0,5 /12/ 82 \pm 10	1	
	41,6	9,9 \pm 1,0 / 8/ 102 \pm 9	9,6 \pm 0,7 / 8/ 100 \pm 15	8,3 \pm 0,8 / 8/ 87 \pm 10		
	2 x 41,6	9,7 \pm 0,8 / 8/ 104 \pm 3	9,2 \pm 0,7 / 8/ 100 \pm 12	8,8 \pm 0,8 / 8/ 96 \pm 15		2
	4 x 41,6	9,4 \pm 1,2 / 8/ 96 \pm 10	9,5 \pm 1,0 / 8/ 97 \pm 11	8,5 \pm 0,9 / 8/ 87 \pm 14		4
	8 x 41,6	10,0 \pm 1,7 / 7/ 106 \pm 16	9,7 \pm 1,2 / 7/ 104 \pm 15	8,7 \pm 0,5 / 7/ 93 \pm 7		8
	16 x 41,6	8,4 \pm 3,4 / 5/ 89 \pm 27	9,1 \pm 1,3 / 5/ 96 \pm 10	8,1 \pm 1,0 / 5/ 87 \pm 11		15,1
	24 x 41,6	7,1 \pm 4,2 / 4/ 72 \pm 27	6,9 \pm 2,5 / 4/ 72 \pm 14	7,2 \pm 1,8 / 4/ 75 \pm 17		22,7
	32 x 41,6	7,8 \pm 2,3 / 4/ 75 \pm 11	5,4 \pm 0,8 / 4/ 53 \pm 14	5,7 \pm 2,0 / 4/ 56 \pm 25		26,6
	48 x 41,6	6,8 \pm 2,9 / 4/ 66 \pm 24	5,1 \pm 1,5 / 4/ 49 \pm 13	5,1 \pm 1,8 / 4/ 49 \pm 17		26,5
	80 x 41,6	7,3 \pm 3,7 / 4/ 71 \pm 24	5,4 \pm 1,2 / 4/ 53 \pm 14	5,1 \pm 1,2 / 4/ 50 \pm 12		27,5
2,08	0	8,8 \pm 1,8 / 5/ 88 \pm 16	9,3 \pm 0,4 / 5/ 97 \pm 32	9,0 \pm 3,9 / 5/ 76 \pm 50		
	4 x 41,6	9,2 \pm 2,7 / 5/ 92 \pm 24	9,5 \pm 1,7 / 5/ 99 \pm 38	8,8 \pm 3,4 / 5/ 97 \pm 62		
	8 x 41,6	9,0 \pm 3,3 / 5/ 93 \pm 18	9,3 \pm 1,7 / 5/ 97 \pm 11	8,4 \pm 3,3 / 5/ 90 \pm 45		
	16 x 41,6	5,0 \pm 4,1 / 5/ 48 \pm 31	6,6 \pm 1,5 / 5/ 66 \pm 7	6,3 \pm 1,9 / 5/ 63 \pm 20		
	24 x 41,6	5,8 \pm 2,3 / 5/ 64 \pm 19	5,7 \pm 1,2 / 5/ 64 \pm 17	5,9 \pm 3,3 / 5/ 72 \pm 58		
	32 x 41,6	4,7 \pm 0,3 / 5/ 52 \pm 13	5,3 \pm 2,1 / 5/ 59 \pm 19	6,2 \pm 1,7 / 5/ 70 \pm 24		

1/ Wartości przedstawiają średnie \pm przedziały ufności / wt_w/ obliczone wg. Dean'a i Dixon'a (35)

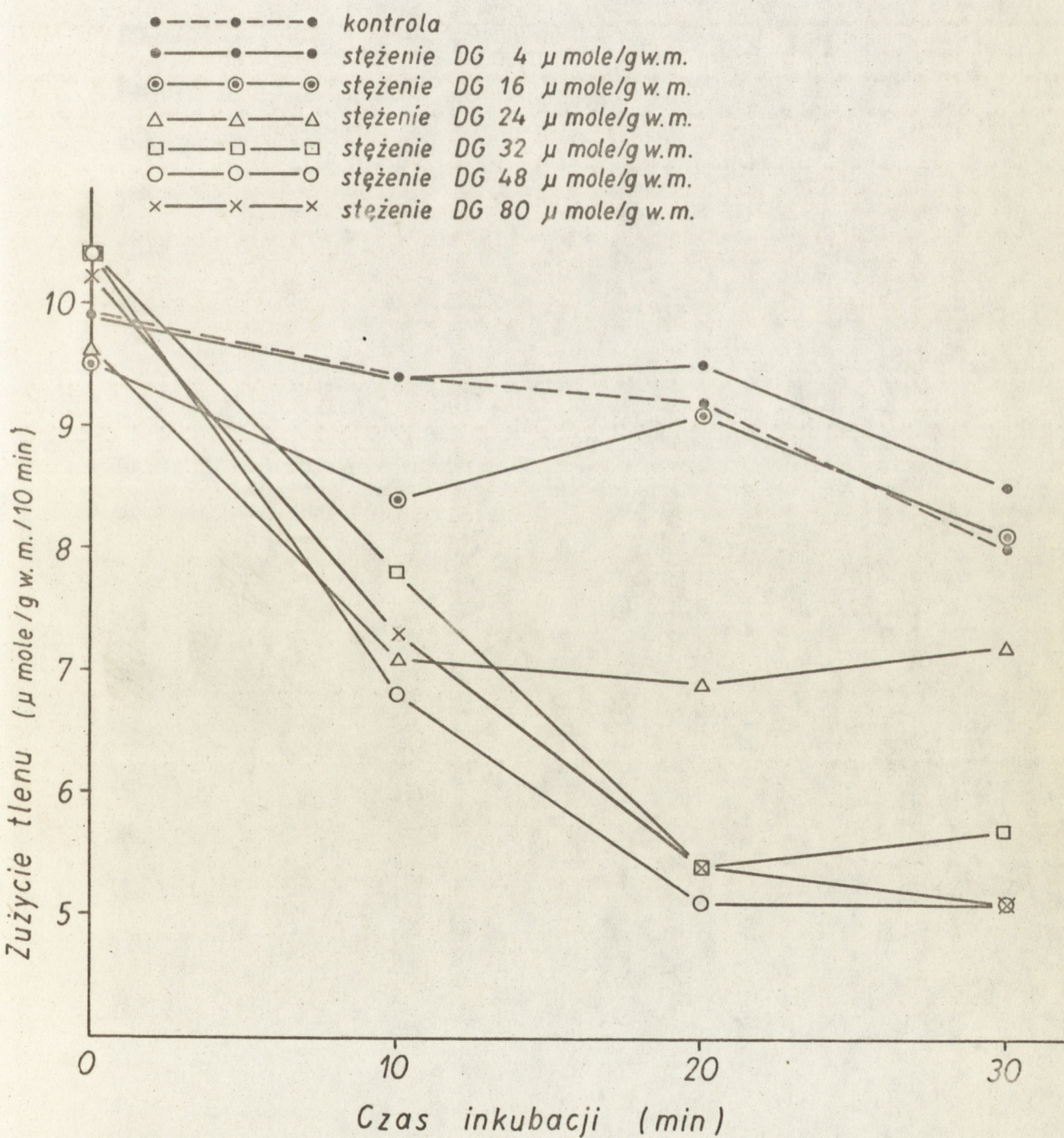
Liczby w nawiasach przedstawiają ilość doświadczeń. Liczby w nawiasach kwadratowych przedstawiają wartości przeliczone na procenty /średnie \pm przedziały ufności/ przyjmując za 100 % dla każdego doświadczenia 10 min. wstępny okres oddychania bez 2-dezoksyglukozy - średnio 9,8 \pm 0,20 /94/.

2/ Średnie z dwu doświadczeń.

Zwartość nukleotydów adeninowych w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha inkubowanych w obecności bardzo małych stężeń 2-dezoksyglukozy.

Nr. Dośw.	Stężenie 2-dezoksy- glukozy /μM/	Stężenia nukleotydów adeninowych /μmole/1g w.m./									
		po 2 min. inkubacji					po 20 min. inkubacji				
		ATP	ADP	AMP	Σ		ATP	ADP	AMP	Σ	
1.	0						2,70	1,18	1,25		5,13
	41,6	2,17	0,97	1,27	4,41	2,74	0,75	1,07		4,56	
	4 x 41,6	2,36	0,75	1,48	4,59	2,84	0,60	1,17		4,61	
	16 x 41,6	1,26	1,09	1,50	3,85	1,42	0,75	1,08		3,25	
	24 x 41,6	0,28	1,05	1,68	3,01	0,35	0,74	1,31		2,40	
32 x 41,6	0,39	0,96	1,77	3,12	0,58	0,74	1,27		2,59		
2.	0						3,35	0,97	0,89		5,21
	41,6	3,34	1,00	0,93	5,27	2,50	0,82	0,72		4,04	
	4 x 41,6	3,04	0,91	1,02	4,97	2,31	1,13	0,82		4,26	
	16 x 41,6	1,70	1,66	1,03	4,39	1,83	1,51	0,72		4,06	
	24 x 41,6	0,60	1,10	2,18	3,88	0,91	0,42	1,54		2,87	
32 x 41,6	0,45	1,12	2,38	3,95	0,54	0,76	1,63		2,93		
3.	24 x 41,6	0,70	1,15	1,96	3,81	0,93	0,69	1,57		3,19	
	32 x 41,6	0,64	1,10	2,30	4,04	0,74	0,58	1,58		2,90	

Ryc. 16 PRZEBIEG ODDYCHANIA KOMÓREK
WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA W OBECNOŚCI
MAŁYCH STĘŻEŃ DEZOKSYGLUKOZY



trwale zahamowanie oddychania występuje poczynając od stężenia DG $16 \times 41,6 \mu\text{M}$, co odpowiada $32 \mu\text{molom/g w.m.}$ komórek /Tab. 28 /.

W związku z przedstawionymi wynikami nasunęło się pytanie, jak dalece trwałe i nieodwracalne jest obniżenie stężenia ATP i zahamowanie oddychania pod wpływem dezoksyglukozy. Postanowiono przebadać wpływ 15 min. preinkubacji komórek raka Ehrlicha w środowisku zawierającym 5 mM DG na oddychanie i zachowanie się stężenia ATP w tych komórkach po odwirowaniu, przemyciu i przeniesieniu ich do środowiska nie zawierającego DG /badanie kontrolne nie wykazało obecności DG w zawieszynie tych komórek/. Stwierdzono, że komórki uprzednio poddane działaniu DG wykazywały trwałe obniżenie zawartości ATP i zahamowanie oddychania w porównaniu z komórkami kontrolnymi preinkubowanymi bez heksoz lub w obecności glukozy /Tab. 30 /.

Przeprowadzono także badanie komórek raka wysiękowego Ehrlicha w mikroskopie elektronowym.^{1/} Szczególną uwagę zwrócono przy tym na strukturę mitochondriów tych komórek poddanych działaniu DG /5mM/ a także inkubowanych w obecności glukozy /5 mM/ lub DNP / 10^{-4}M /. Komórki inkubowano w środowisku Krebsa-Ringera w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez okres 20 min.

Mitochondria komórek raka Ehrlicha inkubowanych w środowisku kontrolnym /Ryc. 19^{str. 122.} / wykazują prawidłową strukturę, regularny kształt, prawidłowo zarysowane grzebienie i dobrze wysyconą

^{1/} Badanie wykonane zostało wspólnie z Doc.dr J. Borowiczem w Pracowni Mikroskopii Elektronowej CMDiK PAN w Warszawie.

T a b e l a 30

Wpływ preinkubacji komórek wysiękowego raka Ehrlicha w obecności glukozy i 2-dezoksyglukozy na oddychanie i zachowanie się stężeń ATP.

Wzrost	Komórki preinkubowane w obecności:	Zużycie tlenu /umole/lg w.m./1 godz/	Stężenie ATP /umole /1 g w.m. /	
			Stan początkowy	Po 30 min. inkubacji
	Bez substratu	45,7	1,74	1,97
	G 5 mM	45,0	1,63	1,70
	DG 5 mM	37,4	0,44	0,84
	Bez substratu	38,2	1,97	2,35
	G 5 mM	41,5	1,93	1,37
	DG 5 mM	32,4	0,39	0,55
	Bez substratu	54,7	2,70	2,29
	G 5 mM	56,5	1,53	2,08
	DG 5 mM	44,9	0,41	0,66
	Bez substratu	45,5	2,36	2,66
	G 5 mM	46,4	1,91	2,12
	DG 5 mM	36,9	0,49	0,86
4/	Bez substratu	46,0	2,19	2,32
	G 5 mM	47,3	1,75	1,82
	DG 5 mM	37,9	0,43	0,73

- glukoza

- 2-dezoksyglukoza

- średnie arytmetyczne z 4-ch doświadczeń

substancję podstawową. Komórki inkubowane w obecności glukozy /Ryc. 20^{str. 122}/ zawierają mitochondria nieco powiększone, z przejaśnieniami w obrębie substancji podstawowej i poszerzeniem grzebieni. Mitochondria komórek inkubowanych w obecności DNP /Ryc. 22^{str. 123}/, nieregularnego kształtu, zawierają balonowate rozdęcia w obrębie grzebieni. Zmiany struktury mitochondriów komórek inkubowanych w obecności DG /Ryc. 21, ~~str. 123~~/, wydają się być jeszcze bardziej nasilone. Stwierdza się zwłaszcza ich spęcznienie, nieregularny kształt i zanik grzebieni.

4. D Y S K U S J A

Zadania postawione przed tą pracą obejmują badanie wpływu dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny materiału nowotworowego i prawidłowego, z uwzględnieniem zależności tego wpływu na oddychanie i glikolizę od zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych. Przewidywano konfrontację rezultatów badań prowadzonych na komórkach nietkniętych z wynikami uzyskanymi przy użyciu odpowiednich struktur subkomórkowych. Wymagało to odpowiedniego doboru materiału doświadczalnego i określonych metod pomiaru metabolizmu energetycznego.

W badaniach posługiwano się materiałem nowotworowym i prawidłowym o różnej aktywności glikolitycznej. Większość doświadczeń prowadzono na komórkach raka wysiękowego Ehrlicha. Jest to nowotwór doświadczalny cechujący się wysoką glikolizą tlenową, wybitnie wyrażonym efektem Crabtree (65, 124) i wyraźnym efektem Pasteura. Stosowanie zawiesiny tych komórek umożliwiło badanie szybko zachodzących procesów metabolicznych i wykorzystanie metody polarograficznej do pomiaru zużycia tlenu. Badania te zostały uzupełnione doświadczeniami prowadzonymi na guzach litych - spontanicznym raku sutka myszy, szybko rosnącym i cechującym się wysoką glikolizą oraz wątrobiaku Morrisa dość wolno rosnącym i słabo glikolizującym (108). Spośród narządów prawidłowych wybrano do badań wątrobę szczura, jako przykład tkanki słabo glikolizującej (5), a przy tym homologicznej do badanego wątrobiaka

Morrisa oraz korę mózgu świnki morskiej ze względu na jej wysoką aktywność glikolityczną i charakterystyczną lokalizację heksokinazy na błonach mitochondrialnych / 3 /.

Wyniki tej pracy potwierdziły występowanie w użytym materiale nowotworowym i prawidłowym opisanych cech metabolizmu, służących jako kryterium wyboru tych tkanek do badań.

We wszystkich doświadczeniach stosowane były komórki raka wysiękowego Ehrlicha oddzielone od płynu wysiękowego na drodze wirowania w fizjologicznym roztworze chlorku sodu z EDTA. Możliwa przy tym postępowaniu utrata wewnątrzkomórkowego fosforanu i niektórych kationów wydaje się nie mieć istotnego znaczenia ze względu na dużą zawartość tych składników w stosowanym środowisku Krebsa-Ringera. Poza doświadczeniami prowadzonymi na komórkach nietkniętych i skrawkach tkanek, obiektem badań w tej pracy były też frakcje subkomórkowe, a przede wszystkim odgrywające kluczową rolę w metabolizmie energetycznym frakcje mitochondrialne i cytoplazmatyczne. Frakcje mitochondrialne z wątroby i wątrobiaka otrzymywano metodą klasyczną / 75 /.

Mitochondria komórek raka wysiękowego Ehrlicha uzyskano wg metody Borsta / 16 / z użyciem szoku osmotycznego. Wybrano tę metodę pomimo pewnych zastrzeżeń /możliwość ujemnego wpływu hipotonii na mitochondria/ ze względu na jej stosunkowo wysoką wydajność, czego nie zapewniają inne dostępne metody preparatyki / 24, 95 /.

Jak wykazała kontrola w mikroskopie elektronowym /Rozdz. 2.2.3., str. 14 / uzyskano oczyszczoną frakcję mitochondrialną bez istotnych uszkodzeń struktury. Mitochondria te cechowały się dostatecznie wysokim stopniem sprzężenia fosforylacji z oddychaniem /Rozdz. 3.2.1., str. 58 /,

co jest zgodne z wynikami Borsta / 16 , 17 /. Trudności nastęcało natomiast otrzymanie frakcji mitochondrialnej kory mózgu świnki morskiej, cechującej się zachowaną strukturą i nie zawierającej zanieczyszczeń. Zastosowano zmodyfikowaną metodę w oparciu o prace Ozawy / 84 / i Stahla / 33 /. Uzyskana frakcja, zawierająca niewielką ilość zanieczyszczeń wykazywała w mikroskopie elektronowym bardzo znaczne uszkodzenia struktury /Rozdz.2.2.3., str. 17 /. Pomimo tych uszkodzeń oraz zastosowania w środowisku inkubacyjnym jonów magnezu niezbędnych do aktywacji heksokinazy, które działają jednocześnie na mitochondria mózgu jako czynnik rozprzegający, uzyskana frakcja wykazywała cechy sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji z oddychaniem /Rozdz.3.2.1., str. 58 /. W badaniach aktywności glikolitycznej posługiwano się układami cytoplazmatycznymi komórek raka wysiękowego Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej. Użycie tych frakcji, nie będących czystym sokiem komórkowym, odpowiadało założeniom pracy, w myśl których rozważania zależności regulujących metabolizm energetyczny dotyczyły dwu przestrzeni komórkowych - mitochondrialnej i cytoplazmatycznej. Uzyskane preparaty układu cytoplazmatycznego reprezentowały istniejącą w komórkach przestrzeń cytoplazmatyczną / 36 , 125 /. Stosowane w niektórych doświadczeniach frakcje subkomórkowe raka wysiękowego Ehrlicha - jądrowa, mikrosomalna i cytoplazmatyczna /sok komórkowy/ otrzymywane były wg klasycznych metod nie wymagających dyskusji.

Przy badaniu oddychania, zarówno komórek, jak i frakcji mitochondrialnych, obok klasycznej metody pomiaru zużycia tlenu metodą manometryczną Warburga, stosowano polarograficzną

metodę pomiaru przy pomocy elektrody Clarka. Stosowanie tej metody było niezbędne przy badaniu szybko zachodzących procesów i umożliwiała ciągły zapis intensywności zużycia tlenu. Niedogodność metody polarograficznej polega na konieczności stosowania materiału w postaci jednorodnej zawiesiny komórek lub struktur subkomórkowych, co w praktyce ograniczyło jej zastosowanie w tej pracy do komórek raka wysiękowego Ehrlicha oraz frakcji mitochondrialnych.

Przy badaniu oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów iloraz fosforylacyjny obliczano jako stosunek ATP/O przy czym przyrost ATP był mierzony w każdym doświadczeniu. Zanieczyszczenia stosowanego preparatu ADP przez znaczne ilości ATP i AMP uniemożliwiły obliczenie ilorazu fosforylacyjnego ze stosunku ADP/O / 97 /. W kontrolnych badaniach mitochondriów z użyciem elektrody tlenowej Clarka współczynnik kontroli oddechowej RC obliczono ze stosunku szybkości zużycia tlenu w stanie 3 do zużycia tlenu w stanie 4 po wyczerpaniu ADP. Natomiast w badaniach dotyczących wpływu dezoksyglukozy i glukozy na oksydacyjną fosforylację mitochondriów, prowadzonych techniką manometryczną, kontrolę oddechową wyliczano ze stosunku szybkości zużycia tlenu w stanie 3 do szybkości oddychania mitochondriów przed dodaniem ADP. Umożliwiło to prześledzenie zachowania się kontroli oddechowej w obecności DG choć w tym układzie doświadczalnym w przypadku mitochondriów komórek raka Ehrlicha nie obserwuje się przejścia w stan 4.

Badanie aktywności glikolitycznej komórek, skrawków i układów cytoplazmatycznych polegało na pomiarze produkcji kwasu

mlekowego. W tabelach zawierających wyniki badania wpływu DG na glikolizę/^{nie}przedstawiono produkcji kwasu mlekowego kosztem samej dezoksyglukozy. W odpowiednich doświadczeniach kontrolnych wykazano bowiem znikome tylko wartości przyrostu kwasu mlekowego, powstałego zapewne kosztem nagromadzonych w komórkach związków pośrednich ciągu glikolitycznego/ 30 /.

Podobne obserwacje poczyniła także Broniszewska / 19 /.

Stężenia nukleotydów adeninowych oznaczano w tej pracy metodami enzymatycznymi, które okazały się dostatecznie czułe dla dokonywania pomiarów w badanym materiale. W przypadku oznaczeń zawartości ATP w komórkach poddanych działaniu jodooctanu istniało niebezpieczeństwo hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego w kuwecie pomiarowej przez jodoctan zawarty w badanej próbce. Jednakże oznaczenie wysokich stężeń ATP w badanych komórkach w obecności jodoctanu przed dodaniem glukozy /Rozdz.3.3.3., str.89/ świadczy o tym, że stężenie inhibitora w próbce było zbyt niskie dla zahamowania reakcji zachodzącej w kuwecie pomiarowej i nie wpływało na wyniki.

Przy oznaczaniu aktywności heksokinazy i kinazy adenylanowej posługiwano się metodami spektrofotometrycznymi ze względu na ich wysoką czułość. Inne oznaczenia ilościowe /stężenia kwasu mlekowego, glukozy, dezoksyglukozy, fosforanu i białka/ wykonywano specyficznymi metodami enzymatycznymi lub metodami klasycznymi, nie wymagającymi odrębnej dyskusji.

Badanie wpływu dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w różnych komórkach i tkankach nowotworowych i prawidłowych wykazało, że istnieją między nimi wybitne różnice we wrażliwości na działanie tego dezoksy-

cukru. Nie wykazano bowiem żadnego istotnego wpływu DG na zawartość ATP, ADP i AMP w skrawkach wątroby /co obserwowano także Elzina (123)/ oraz wątrobiaka Morrisa. Natomiast w wypadku komórek raka wysiękowego Ehrlicha oraz skrawków spontanicznego raka sutka myszy i kory mózgu świnki morskiej stwierdzono znaczne zmiany w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych. Zmiany te są szczególnie demonstratywne w komórkach raka Ehrlicha, na tym więc materiale przeprowadzono większość badań /Rozdz. 3.1.1. i 3.3./. W komórkach tego nowotworu wysiękowego utrzymuje się stałe stężenie ATP w różnych warunkach metabolicznych /oddychanie kosztem substratów endogennych, glikoliza w warunkach tlenowych i beztlenowych/. Wyniki przedstawione na str. 35 i str 38 stanowią potwierdzenie spostrzeżeń innych autorów /12, 54, 122/. Natomiast w obecności DG już w ciągu 1 min. dochodzi do trwałego obniżenia się stężenia ATP w badanych komórkach. Obniżeniu się stężenia ATP początkowo towarzyszy przyrost ADP a następnie AMP, jednak wkrótce ich stężenia obniżają się. W ciągu kilku minut następuje spadek zawartości całej puli nukleotydów adeninowych w komórkach, o czym świadczy też obniżenie absorpcji światła przy 260 mμ /str. 38/. Natomiast w warunkach beztlenowych, chociaż dochodzi do głębokiego spadku stężenia ATP, nagromadzają się równoważne ilości AMP i suma stężeń nukleotydów adeninowych nie ulega istotnemu obniżeniu /str. 38/. Obserwacje te są zgodne z danymi opisanymi w literaturze i interpretowanymi jako wynik aktywności heksokinazy, kinazy adenylanowej i dezaminazy AMP / 53 , 70 , 71 , 83 , 123 /. Wg tych poglądów dezoksyglukoza szybko przenikająca do komórek ulega tam ufosforylo-

waniu, przy czym następuje zużywanie znacznych ilości ATP. Po wyczerpaniu wewnątrzkomórkowego ATP ulegają wykorzystaniu zapasy innych związków wysokoenergetycznych. W warunkach nadmiaru ADP i niedoboru ATP dochodzi do odtwarzania pewnych ilości ATP w reakcji z udziałem kinazy adenylanowej, co w konsekwencji prowadzi do nagromadzenia się w komórce AMP. Obniżenie się sumy nukleotydów adeninowych w obecności DG będące jak wiadomo wynikiem działania dezaminazy AMP, ma miejsce jak wykazała m.inn. Strosznajder, wyłącznie w warunkach tlenowych przy niezakłóconej aktywności oddechowej i fosforylacyjnej komórek / 83 , 101 /. Dalsze badania wykazały, że aktywność heksokinazy i kinazy adenylanowej w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha /Rozdz.3.2.3., str.75 / są dostatecznie wysokie aby zapewnić przebieg opisanych reakcji. Wyniki te są zbliżone do uzyskanych przez innych autorów / 78 , 126 /. O tym, że aktywność heksokinazy odgrywa kluczową rolę w obserwowanych zjawiskach, świadczyć może w pierwszym rzędzie porównanie aktywności tego enzymu w różnych komórkach i tkankach z zachowaniem się w nich nukleotydów adeninowych w obecności DG. W skrawkach wątroby i wątrobiaka, w których nie obserwuje się zmian w stężeniach nukleotydów adeninowych pod wpływem DG, aktywność heksokinazy jest znacznie niższa niż w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha, a także kory mózgu i raka sutka myszy. Jak wiadomo obniżenie aktywności heksokinazy w komórkach wrażliwych na działanie dezoksyglukozy lub podobnie działających heksoz powoduje utratę tej wrażliwości / 7 , 118 /.

W komórkach raka wysiękowego Ehrlicha cechujących się wysoką aktywnością heksokinazy można oczekiwać trwałego obniże-

nia stężenia ATP dopiero po zastosowaniu odpowiednio wysokiego stężenia dezoksyglukozy, aby jej ilość dostępna dla komórki przekraczała wewnątrzkomórkowe zapasy związków wysokoenergetycznych. Istotnie, jak wykazano /str. 93 / trwałe zmiany w stężeniach ATP występują w komórkach poddanych działaniu DG w stężeniu co najmniej ok. 25 μ mol/g w.m. komórek. Wykazano też /Rozdz. 3.3.2., str. 86 /, że w okresie, gdy dochodzi do szybkiego spadku stężenia ATP, jednocześnie ma miejsce bardzo szybkie zużywanie DG przez komórki. Po wyczerpaniu się ATP zużywanie DG ulega wyraźnemu zwolnieniu. Tę zależność szybkości zużywania DG od wewnątrzkomórkowego stężenia ATP ilustrują wyniki doświadczeń przedstawione w Rozdz. 3.3.3., str. 86 /. W komórkach zatrutych DNP /zawierających znikome tylko ilości ATP/ zużywanie DG jest bardzo powolne, dochodzi też do dalszego obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia ATP. W tych samych warunkach zużycie glukozy, początkowo powolne, ulega szybko przyspieszeniu wraz z przyrostem wewnątrzkomórkowego stężenia ATP. Wyniki te są zgodne z opisanymi już w literaturze / 33, 116 /. Zwraca uwagę, że glukoza podana wraz z jodoocetanem wywiera identyczny wpływ na zachowanie się stężeń ATP, ADP i AMP, co i DG /Rozdz. 3.3.3., str. 89 /. Istotnie, po zablokowaniu przez jodoocetan dalszych reakcji ciągu glikolitycznego, wykorzystywane są znaczne ilości ATP do fosforylowania glukozy, nie dochodzi przy tym do odnowy ATP w ciągu glikolitycznym. Mechanizm zmian w stężeniach nukleotydów adeninowych jest tu więc taki sam, jak w przypadku działania dezoksyglukozy.

Opisany silny wpływ DG na zachowanie się stężeń nukleotydów

adeninowych w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha ulega istotnej modyfikacji w wypadku stosowania DG wraz z niektórymi innymi heksozami /Rozdz.3.1.1., str. 38/. O ile fruktoza i galaktoza nie miały wpływu na obserwowane zjawisko, to glukoza lub mannoza zastosowane w stężeniach równych z DG znosiły wywołane przez DG obniżenie stężenia ATP w komórkach. Wydaje się, że tłumaczenia tego zjawiska szukać należy w różnym powinowactwie badanych heksoz do heksokinazy. Galaktoza, nie ulegająca fosforylowaniu w komórkach raka Ehrlicha (53) oraz fruktoza, dla której K_m jest znacznie wyższa niż dla DG, nie mogą stanowić istotnej przeszkody w fosforylowaniu DG (76). K_m dla glukozy i mannozy są z kolei niższe niż dla DG, ich obecność może więc znacznie obniżać szybkość fosforylowania DG. W przypadku glukozy może mieć też znaczenie mechanizm sugerowany przez Nirenberga (82) oraz Wicka (110), wg których blokowanie przez dezoksyglukozo-6-fosforan izomerazy glukozofosforanowej ma z kolei powodować nagromadzenie się glukozo-6-fosforanu i zwrotne hamowanie heksokinazy. Możliwe, że konkurencja między DG a innymi heksozami o transport do komórek odgrywa pewną rolę w mechanizmie obserwowanych zjawisk. Badanie wpływu DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w homogenatach komórek raka Ehrlicha /Rozdz.3.2.2., str. 63/ nie wniosło nowych elementów mogących wyjaśnić mechanizm działania tego dezoksycukru. Otrzymane wyniki zasadniczo odpowiadały danym uzyskanym z badania komórek nietkniętych. Wyjątek stanowi działanie dezoksyglukozy w obecności fruktozy w warunkach tlenowych. W tym wypadku utrzymuje się wysokie stężenie ATP, czego nie obserwowano w warunkach beztlenowych. Być może w tym wypadku słaba nawet konkuren-

cja między fruktozą a DG hamuje fosforylowanie DG na tyle, że oksydacyjna fosforylacja jest w stanie skompensować zużycie ATP.

Badanie wpływu DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w skrawkach spontanicznego raka sutka myszy /Rozdz. 3.1.3./ wykazało istnienie zmian w stężeniach ATP, ADP i AMP o podobnym charakterze, jak w przypadku komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Wyniki te są zgodne z danymi Elziny⁽¹²³⁾ uzyskanymi w badaniach na innych guzach litych. W przypadku raka sutka myszy obserwowano także wysoką aktywność heksokinazy, niższą jednak niż w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha /Rozdz. 3.2.3., str. 75/.

Odrębnego omówienia wymaga zagadnienie wpływu DG na zawartość nukleotydów adeninowych w skrawkach kory mózgu świnki morskiej. ^{/Rozdz. 3.1.5/} W materiale tym wykazano wysoką aktywność heksokinazy. Sytuację skomplikowała w tym wypadku konieczność badania tego pobudliwego materiału zarówno w warunkach spoczynkowych jak i w stanie pobudzenia, zgodnie z postulatami Webba⁽¹⁰⁶⁾. Dość niskie stężenie ATP, które utrzymywało się w badanym materiale w warunkach spoczynkowych /przy niskim stężeniu KCl/ w obecności glukozy lub bez heksoz, w obecności DG ulegało obniżeniu. W stanie pobudzenia / w obecności 100 mM KCl/ dochodziło do znacznego obniżenia się stężenia ATP, które ulegało pogłębieniu w obecności DG. Dezoksyglukoza wywierała więc na skrawki kory mózgu wyraźny wpływ obniżający stężenie ATP. Efekt ten jest zgodny z obserwacjami poczynionymi przez Towera⁽¹⁰⁴⁾. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu DG na sumę stężeń nukleotydów adeninowych.

Dalszym krokiem w badaniu wpływu DG na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych, a zwłaszcza w analizie mechanizmu tego wpływu, było podjęcie doświadczeń z użyciem frakcji subkomórkowych - mitochondrialnej i cytoplazmatycznej. Jak wykazano w Rozdz.3.2.1. dezoksyglukoza wywiera istotny wpływ na zachowanie się stężeń ATP, ADP i AMP wyłącznie w zawieszynie fosforylujących mitochondriów raka wysiękowego Ehrlicha, pozostając bez wpływu na aktywność fosforylacyjną mitochondriów wątroby, wątrobiaka Morrisa i kory mózgu. W obecności DG w zawieszynie mitochondriów raka wysiękowego Ehrlicha w przebiegu oksydacyjnej fosforylacji nie dochodziło do nagromadzenia się ATP i zużycia ADP i AMP, jak to miało miejsce w układach kontrolnych i w obecności glukozy. Wytwarzał się natomiast stan równowagi między tymi nukleotydami, przy czym utrzymywały się równe stężenia ATP, ADP i AMP. Suma stężeń nukleotydów adeninowych ulegała przy tym nieznacznemu tylko obniżeniu, a dodanie innych frakcji subkomórkowych nie miało wpływu na te efekty. Dezoksyglukoza dodana wraz z glukozą lub G-6-P nie wywierała natomiast istotnego wpływu na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie badanych mitochondriów. Interpretację uzyskanych wyników ułatwił znany z literatury fakt, że heksokinaza w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha zlokalizowana jest głównie na błonach mitochondrialnych^(3,76,90,126). Wysoką aktywność heksokinazy na mitochondriach raka Ehrlicha potwierdziły też wyniki uzyskane w tej pracy /Rozdz.3.2.3., str. 75/. Sam fakt, że opisany wpływ na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych ma dezoksyglukoza, a glukoza i G-6-P znoszą ten efekt, przemawia za udziałem

heksokinazy w omawianym zjawisku. Jak wiadomo heksokinaza ssaków, w tym także enzym z komórek raka Ehrlicha, ulega niekompetytywnemu hamowaniu przez glukozo-6-fosforan (32, 46).

W interpretacji działania DG na oksydacyjną fosforylację mitochondriów raka Ehrlicha brano także pod uwagę możliwość rozprzęgnięcia procesów fosforylacji i aktywacji ATPaz mitochondrialnych. Koncepcji tej przeczy fakt, że aktywność ATPaz mitochondrialnych komórek raka Ehrlicha nie jest pobudzana przez DG, obserwuje się nawet nieznaczne zmniejszenie uwalniania fosforanu nieorganicznego z ATP w obecności DG /Rozdz.3.2.3., str. 77/, spowodowane zapewne konkurencją o ATP między heksokinazą a ATPazami.

Ponadto dodanie G-6-P do zawiesiny mitochondriów komórek raka Ehrlicha inkubowanych w obecności DG powoduje powrót stężeń nukleotydów adeninowych do stanu obserwowanego w układach kontrolnych /Rozdz.3.2.1., str. 64/, czego nie obserwowanoby w przypadku rozprzęgnięcia oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów. ATPazy zlokalizowane są zdaniem Aesa i wsp. (4) głównie na błonach komórkowych raka Ehrlicha. W związku z bezspornym udziałem heksokinazy mitochondrialnej w obserwowanym zjawisku, nieobecność jej na mitochondriach wątroby i wątrobiaka Morrisa w pełni tłumaczy brak wpływu DG na oksydacyjną fosforylację tych mitochondriów. Natomiast tym bardziej niezrozumiały jest brak wpływu DG na oksydacyjną fosforylację mitochondriów mózgu. Jak wynika z oznaczeń enzymatycznych oraz licznych danych z literatury heksokinaza na mitochondriach mózgu jest niemniej aktywna niż na mitochondriach raka wysiękowego Ehrlicha /Rozdz.3.2.3.

str. 75/(9, 74). Być może ta zagadkowa rozbieżność wiąże się z uszkodzeniem struktury mitochondriów mózgu, stwierdzonym w mikroskopie elektronowym i solubilizacją oraz dezaktywacją heksokinazy mitochondrialnej lub też ze zbyt niskim stężeniem w środowisku inkubacyjnym niezbędnych aktywatorów heksokinazy - jonów magnezu.

Badanie zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych w układach cytoplazmatycznych komórek raka wysiękowego Ehrlicha, a także kory mózgu świnki morskiej przyniosło wyniki podobne do uzyskanych w doświadczeniach prowadzonych na materiale nietkniętym i na homogenatach komórek raka Ehrlicha w warunkach beztlenowych. Wykazano obniżenie się stężenia ATP z równoważnym przyrostem AMP w obecności DG wraz z fruktozą, a brak wpływu dezoksyglukozy na stężenia ATP, ADP i AMP w obecności glukozy. W badaniach wpływu dezoksyglukozy na frakcje mitochondrialne /z wyjątkiem mitochondriów mózgu/ i na układy cytoplazmatyczne wykazano więc istnienie warunków do wystąpienia pod wpływem dezoksyglukozy zmian w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych obserwowanych na komórkach nietkniętych.

Opisanych właściwości zachowania się stężeń ATP, ADP i AMP w komórkach nie można jednak traktować w sposób izolowany od całokształtu metabolizmu energetycznego, a zwłaszcza oddychania i glikolizy. Normalny poziom tych nukleotydów w komórkach uzależniony jest od intensywności wewnątrzkomórkowych przemian energetycznych, a jednocześnie zmiany w stężeniach ATP, ADP i AMP mogą wpływać na te przemiany. Zgodnie z założeniami pracy w poszczególnych układach doświadczalnych pomiary stężeń nukleotydów były w miarę możli-

wości łączone z badaniami aktywności oddechowej i glikolitycznej badanego materiału. Pozwoliło to na uzyskanie poglądu na współzależności nukleotydy adeninowe - oddychanie i nukleotydy adeninowe - glikoza. Okazało się to szczególnie owocne w badaniu mechanizmu działania DG na oddychanie komórek raka wysiękowego Ehrlicha.

Jak wynika z danych przedstawionych w Rozdz.3.1.1. szereg heksoz jak glukoza, fruktoza i mannoza oraz dezoksyglukoza wywołuje hamowanie oddychania komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Efektu tego nie wykazuje galaktoza. Hamujący wpływ DG na oddychanie komórek raka Ehrlicha tym m.inn. różni się od hamowania wywieranego przez inne heksozy, że towarzyszy mu spadek stężeń ATP i sumy nukleotydów adeninowych. Dodanie glukozy do zawiesiny badanych komórek powoduje szybkie rozwinięcie się hamowania oddychania, poprzedzonego b.słaboznaczonym krótkim okresem pobudzenia. Nie obserwowano przy tym żadnych istotnych zmian w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych/Rozdz.3.3.1./ . Nie uchwycono nawet znanego faktu krótkotrwałego obniżenia się stężenia ATP tuż po dodaniu glukozy, z jednoczesnym przyrostem ADP, odpowiadającym w czasie wstępnemu pobudzeniu oddychania (49) . Taki brak zmian w stężeniach ATP i ADP obserwuje się po podaniu niewielkich stężeń glukozy (30) . W tym wypadku, gdy glukozę stosowano w stężeniu 5 mM, krótkotrwałe zmiany wewnątrzkomórkowej zawartości ATP i ADP zostały zapewne przeoczone ze względu na zbyt małą częstość pobierania próbek/co 1/2 min./ . Suma stężeń nukleotydów adeninowych w czasie inkubacji komórek z glukozą także nie uległa obniżeniu, wbrew wynikom obserwowanym przez Overgaard-Hansena(83).

Inaczej przedstawia się natomiast powiązanie oddychania - nukleotydy adeninowe w przypadku działania dezoksyglukozy /Rozdz.3.3.2./ . Po dodaniu DG obserwuje się wyraźnie zaznaczony okres przyspieszenia oddychania, któremu odpowiada wzrost stężenia ADP uwalnianego w komórkach w reakcji heksokinazowej. Następnie mimo utrzymywania się wysokiego stężenia ADP, rozwija się hamowanie oddychania. Początek tego hamowania odpowiada w czasie osiągnięciu przez ATP bardzo niskiego stężenia, które utrzymuje się dalej w komórce niezmiennie. Wtedy też dochodzi do zwolnienia szybkości zużycia DG, co wskazuje na wyczerpanie się wewnątrzkomórkowych zasobów energetycznych. O tym, że zużycie ATP przy fosforylowaniu dezoksyglukozy może być bezpośrednią przyczyną hamowania oddychania, świadczą też wyniki badania wpływu bardzo niskich stężeń DG. Wykazano mianowicie /Rozdz.3.3.4., str. 33 /, że najniższe stężenie DG wywołujące trwałe hamowanie oddychania /t.j. ok.25 μ moles/ g w.m. komórek/ odpowiada stężeniu wywołującemu wyczerpanie ATP w komórkach /str. 33 /. Mniejsze stężenia DG powodują, jak wynika z badań polarograficznych, przedłużenie okresu wzmożonego zużycia tlenu (56 , 101) . Zwraca uwagę fakt, że ilość DG, jaka ulega ufosforylowaniu, wynosi ok.25 μ moles/g w.m. komórek, co odpowiada stężeniom wywołującym trwałe zahamowanie oddychania. Przedstawione wyniki świadczą za słusnością poglądu, że hamowanie oddychania przez DG wiąże się przyczynowo ze spadkiem stężenia ATP. Analiza krzywej oddechowej oraz wykresu zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha poddanych działaniu glukozy wraz z jednoczynnikiem /Rozdz.3.3.3./ wykazuje identyczność tych wyników z uzyska-

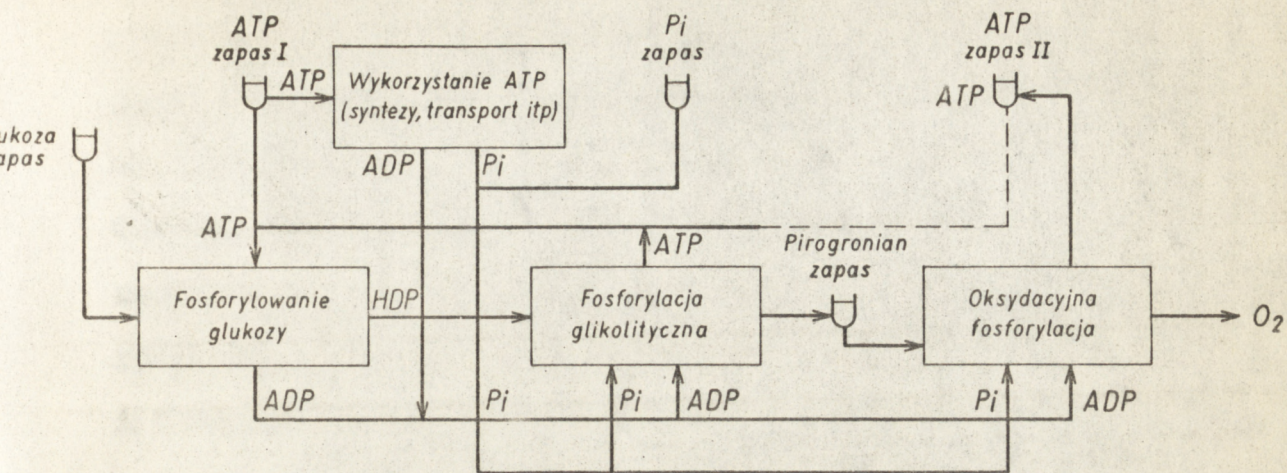
nymi w doświadczeniach z użyciem dezoksyglukozy. Pozwala to przyjąć, że w obu wypadkach mechanizm hamowania oddychania jest podobny, a różni się od klasycznego efektu Crabtree wywołanego przez glukozę. Zdania badaczy w tej sprawie są jednak podzielone (25, 53, 83, 86, 108).

Przedstawiony związek pomiędzy wewnątrzkomórkowym niedoborem ATP w czasie fosforylowania DG, a hamowaniem oddychania przez ten dezoksycukier nie tłumaczy jednak samego mechanizmu hamowania. Jak wynika z danych przedstawionych w Rozdz.3.3.4. hamowanie oddychania, oraz obniżenie zawartości ATP w komórkach utrzymują się nawet po usunięciu badanych komórek ze środowiska zawierającego DG. Fakt nieodwracalności hamowania oddychania przez DG wydaje się przemawiać przeciwko udziałowi w tym zjawisku jakichś subtelnych mechanizmów regulujących oddychanie. Dotyczyć to może zwłaszcza hipotez przedstawionych przez Chance'a i wsp. (49, 127) oraz Ibsena (53) i Overgaard-Hansena (83).

Poglądy Chance'a rozwinięte szeroko dla przypadku wpływu glukozy na metabolizm energetyczny komórek raka wsiękowego Ehrlicha, dotyczą też innych heksoz fosforylowanych w reakcji heksokinazowej, a więc glukozy w obecności jodooctanu i dezoksyglukozy (25). Zakładają więc wspólny mechanizm hamowania oddychania przez te heksozy. W myśl omawianej hipotezy u podstaw mechanizmów regulacji metabolizmu energetycznego w komórkach raka wsiękowego Ehrlicha leży oddzielnie ciągu glikolitycznego od oksydacyjnej fosforylacji przez błonę mitochondrialną mało przenikliwą dla ATP. Dodana glukoza ulega fosforylowaniu w cytoplazmie badanych komórek z uwolnieniem znacznych ilości ADP. W procesach

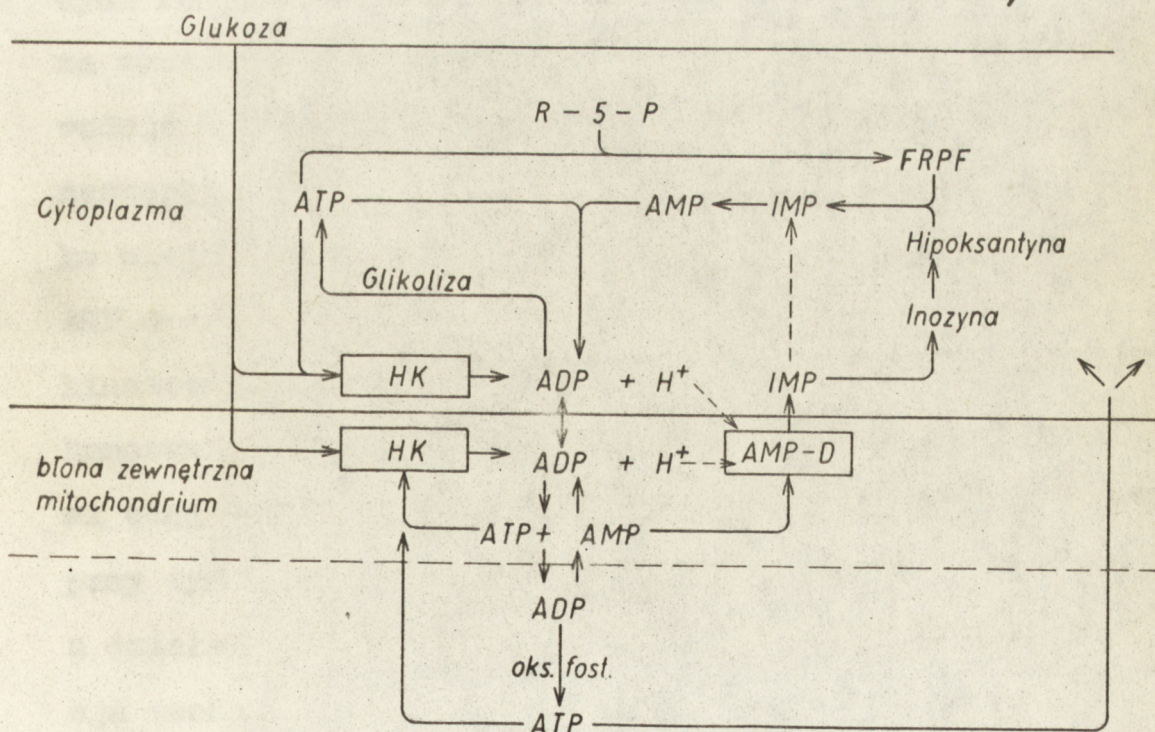
fosforylacji sprzężonych z glikolizą część ADP ulega w cytoplazmie przekształceniu w ATP, który jest dalej wykorzystywany dla podtrzymania fosforylowania glukozy. Część ADP przechodzi natomiast do mitochondriów, gdzie następuje odnowa ATP w procesach oksydacyjnej fosforylacji. W tym okresie oddychanie ulega przyspieszeniu. Zgodnie z przedstawionym na wstępie założeniem, ATP jest zatrzymywany w mitochondriach. Większość wewnątrzkomórkowego ATP ulega przemieszczeniu do mitochondriów. Brak ATP w cytoplazmie prowadzi do zwolnienia zużycia glukozy, hamowania glikolizy, a przy braku uwalnianego w reakcji heksokinazowej ADP do hamowania oddychania. Omawiany mechanizm regulacyjny, przedstawiony w postaci schematycznej na Ryc.17, stał się podstawą dla konstrukcji przez Chance'a, Hessa i Garfinkela matematycznych modeli na elektronicznych maszynach cyfrowych, które wyrażają postulowane mechanizmy współzależności glikolizy i oddychania w komórkach raka Ehrlicha (22, 42, 120, 121). Łatwo zauważyć, że w myśl hipotezy Chance'a po dodaniu DG miałyby dojść, podobnie jak w przypadku glukozy, po wyczerpaniu się cytoplazmatycznych zapasów ATP, do nagromadzenia ATP wewnątrz mitochondriów, przy czym całkowita zawartość ATP w badanych komórkach nie uległaby obniżeniu. Ten wynik jest jednak całkowicie sprzeczny z doświadczeniem. Jak pamiętamy, w obecności DG stężenie ATP w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha ulega wybitnemu obniżeniu. Wymieniano też i inne sprzeczności modelu Chance'a z wynikami doświadczalnymi (77). Model Chance'a i wsp., chociaż dość wiernie oddaje przebieg oddychania badanych komórek w obecności różnych heksoz, nie obrazuje jednak zachowania się stężeń nukleotydów adeninowych, jakie

Ryc. 17 SCHEMAT WSPÓLZALEŻNOŚCI METABOLICZNYCH
POMIĘDZY ODDYCHANIEM I GLIKOLIZĄ W KOMÓRKACH RAKA
WYSIĘKOWEGO EHRLICHA



wg Chance [22]

Ryc. 18 SCHEMAT PROPOWANEJ MECHANIZMU WSPÓLZALEŻNOŚCI
POMIĘDZY AKTYWNOŚCIĄ HEKSOKINAZY NA BŁONACH MITOCHONDRIALNYCH
A HAMOWANIEM ODDYCHANIA PRZEZ GLUKOZĘ



HK -heksokinaza

AMP-D-dezaminaza AMP

R-5-P-rybozo-5-fosforan

FRPF -fosfo-rybozylo-pirofosforan

wg Overgaard - Hansena [83]

realnie ma miejsce w komórkach w obecności DG. Przemawia to przeciwko założeniom hipotezy Chance'a i uniemożliwia przyjęcie ich za podstawę rozważań nad mechanizmem działania DG na metabolizm energetyczny komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Odmienną hipotezę mającą tłumaczyć hamowanie oddychania komórek raka wysiękowego Ehrlicha przez heksozy ulegające fosforylowaniu w reakcji heksokinazowej przedstawili Ibsen (53) i Overgaard-Hansen (83). Według tych poglądów kluczową rolę w mechanizmie efektu Crabtree odgrywa aktywność heksokinazy, kinazy adenylanowej i dezaminazy AMP na błonach mitochondrialnych tych komórek /Rys.18/. Autorzy przyjmują, że ATP i AMP łatwo przenikają przez błony mitochondrialne, a ADP dostaje się z cytoplazy do miejsc oksydacyjnej fosforylacji dzięki aktywności kinazy adenylanowej. W obecności heksoz ulegających fosforylowaniu zlokalizowana na mitochondriach heksokinaza skutecznie konkuruje z kinazą adenylanową o ATP, co powoduje unieczynnienie tego mechanizmu transportu ADP, a w następstwie hamowanie oddychania. Nagromadzający się AMP szybko ulega dezaminacji dzięki pobudzeniu aktywności dezaminazy AMP w środowisku zakwaszonym przez uwalniane w reakcji heksokinazowej jony wodorowe. Omawiana hipoteza łączy więc ściśle hamowanie oddychania przez różne heksozy z pierwszymi reakcjami ciągu glikolitycznego - fosforylowaniem heksoz, stawiając przy tym znak równości pomiędzy mechanizmem efektu Crabtree, a działaniem innych heksoz, w tym dezoksyglukozy. Interpretacja mechanizmów współzależności glikoliza-oddychanie przedstawiona przez Ibsena i Overgaard-Hansena - posiadają jednak słabe punkty. Nie uwzględniono w niej stosunku postulowanego mechanizmu transportu ADP do miejsc oksydacyjnej fosforylacji

w mitochondriach wobec uznanego mechanizmu z udziałem translokazy wrażliwej na działanie atraktylozydów.

Badania Klingenberga i innych autorów wykazały, że heksokinaza i kinaza adenylanowa zlokalizowane są na zewnątrz od translokazy (47, 63, 90). Konieczne jest jednak dokładniejsze poznanie współzależności omawianych enzymów. Innym brakiem wspomnianej hipotezy jest fakt, że chociaż wiąże ona hamowanie oddychania ze zmianami stężeń nukleotydów adeninowych, nie uwzględnia istnienia głębokich różnic pomiędzy zachowaniem się stężeń nukleotydów adeninowych w badanych komórkach w obecności glukozy i dezoksyglukozy, co może przeciwnie w istotny sposób wpływać na oddychanie komórek. Ponadto w myśl tej hipotezy hamowanie oddychania wiąże się ściśle z jednoczesnym fosforylowaniem heksoz w reakcji heksokinazowej. Nie tłumaczy to wykazanego doświadczalnie /Rozdz.3.3.4., str. 37 / utrzymywania się hamowania oddychania po przeniesieniu komórek do środowiska nie zawierającego DG. Mimo tych zastrzeżeń nic nie stoi na przeszkodzie aby przyjąć, że mechanizm przedstawiony przez Ibsena i Overgaard-Hansena może odgrywać pierwszoplanową rolę w początkowym okresie działania DG na komórki. Dalej dochodzi jednak do nieodwracalnych zaburzeń metabolizmu energetycznego, które nie dają się wyjaśnić w oparciu o tę hipotezę.

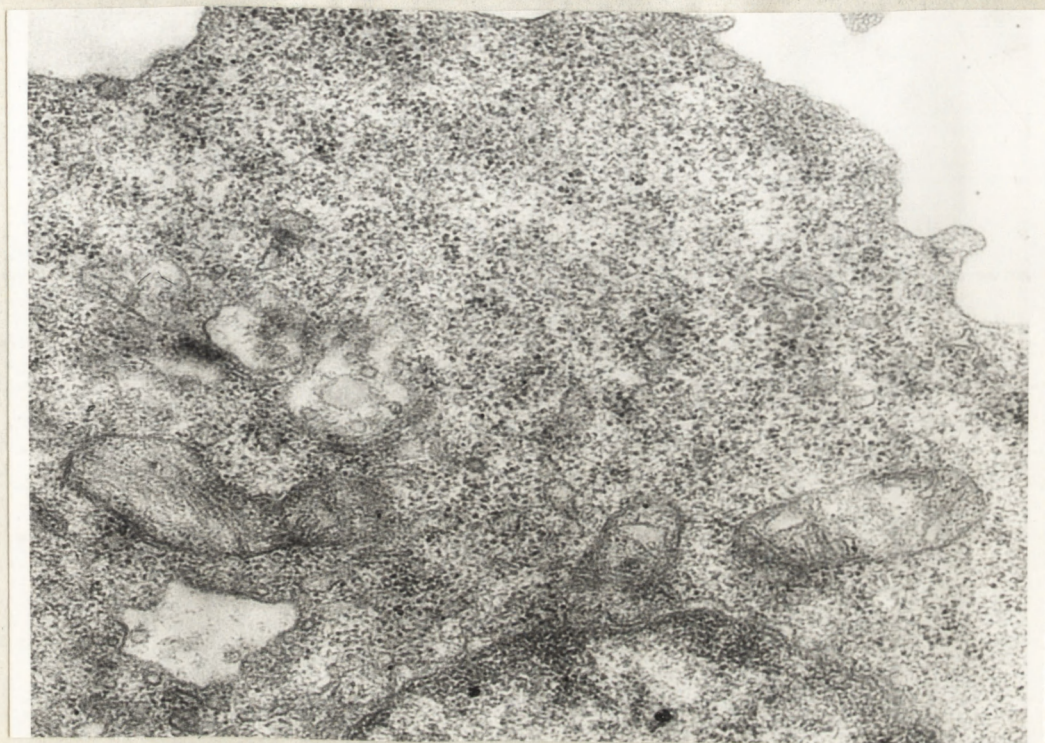
Trwałe hamowanie oddychania przez dezoksyglukozę można tłumaczyć wg. Letnanskyego (70, 71) znacznym obniżeniem się stężenia ADP w komórkach. Jednakże wyniki uzyskane z własnych badań /Rozdz.3.1.1. i 3.3.2. / nie wykazały spadku ADP poniżej wartości obserwowanych w komórkach inkubowanych bez DG.

Znane z piśmiennictwa (59) i obserwowane w tej pracy /Rozdz.3.1.1., str.38 / obniżenie wewnątrzkomórkowej zawartości fosforanu nieorganicznego w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha w obecności DG, wysuwano jako przyczynę hamowania oddychania (77) . Jak wykazały jednak badania Ibsena (53, 55) napływ fosforanu ze środowiska inkubacyjnego jest dostateczny dla utrzymania oddychania na prawidłowym poziomie. Endogennym substratem oddechowym komórek są kwasy tłuszczowe, które wymagają przed utlenianiem aktywacji. Wobec tego nasuwa się przypuszczenie, że obniżenie się stężeń związków wysokoenergetycznych w komórkach po zadziałaniu DG może powodować hamowanie oddychania w wyniku zmniejszonej aktywacji substratów endogennych (107) . Wiadomo bowiem, że do aktywacji kwasów tłuszczowych niezbędna jest obecność ATP lub GTP (11, 92), których stężenia ulegają wybitnemu obniżeniu w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha w obecności DG (70) . Jak wynika z badań Sauermana (96) w obecności DG dochodzi istotnie do obniżenia utleniania kwasów tłuszczowych, co mogłoby popierać hipotezę o niedoborze endogenego substratu oddechowego. Brak wpływu DG na utlenianie octanu egzogenego podważa z kolei tę hipotezę. Także wysunięty przez Wojtezaka (111) pogląd, że aktywacja kwasów tłuszczowych może zachodzić kosztem wysokoenergetycznych, nieufosforylowanych związków pośrednich oksydacyjnej fosforylacji bez udziału ATP i GTP, nie popiera powyższego przypuszczenia. Jednakże w obecnej chwili w literaturze nie ma zgodności poglądów w kwestii udziału związków pośrednich oksydacyjnej fosforylacji w aktywacji kwasów tłuszczowych (87)

Elzina (123) wskazała na możliwość innego mechanizmu hamowania oddychania przez DG. Lokalizacja heksokinazy na błonach mitochondrialnych raka wsiękowego Ehrlicha upoważnia do przypuszczenia, że w czasie fosforylowania DG dochodzi w pierwszym rzędzie do wyczerpania się wewnątrzmitochondrialnego stężenia ATP, co wobec znacznej labilności mitochondriów nowotworowych /Emelot - (39) /może prowadzić do uszkodzenia struktury mitochondriów i hamowania ich aktywności oddechowej i fosforylacyjnej. Istotnie, badania Packera (85) wykazały, że w obecności DG dochodzi do pewnych zmian strukturalnych mitochondriów raka Ehrlicha, z którymi mogą się wiązać zmiany funkcji fosforylacyjnej (114). Podkreślano też duży wpływ nukleotydów adeninowych na własności struktur błoniastych komórki (58). O możliwości istnienia uszkodzeń struktury mitochondriów badanych komórek poddanych działaniu DG świadczą też wyniki kontroli w mikroskopie elektronowym /Rozdz.3.3.4. i str. 122 i 123/.

Ostatecznie należy stwierdzić, że mechanizm hamowania oddychania przez DG pozostaje nieznany. Wydaje się, że to zjawisko jest związane z obniżeniem się wewnątrzkomórkowego stężenia ATP i, że różni się w istotny sposób od klasycznego efektu Crabtree wywołanego przez glukozę. To ostatnie stwierdzenie nie jest jednak powszechnie przyjęte (53, 83, 107). Mimo to wskazać można na inne liczne fakty różniące oba te zjawiska. Jak wynika z danych przedstawionych w Rozdz.3.3.3., str. 83, dezoksyglukoza wywołuje hamowanie oddychania komórek raka wsiękowego Ehrlicha zatrutych DNP, podczas gdy w obecności glukozy dochodzi do pobudzenia oddychania (56, 83). O ile glukoza podana w bardzo nawet niskim stężeniu

Ryc. 19 KOMÓRKI WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA
PO INKUBACJI W ŚRODOWISKU KONTROLNYM.
ZDJĘCIE W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM.
(x 31600)



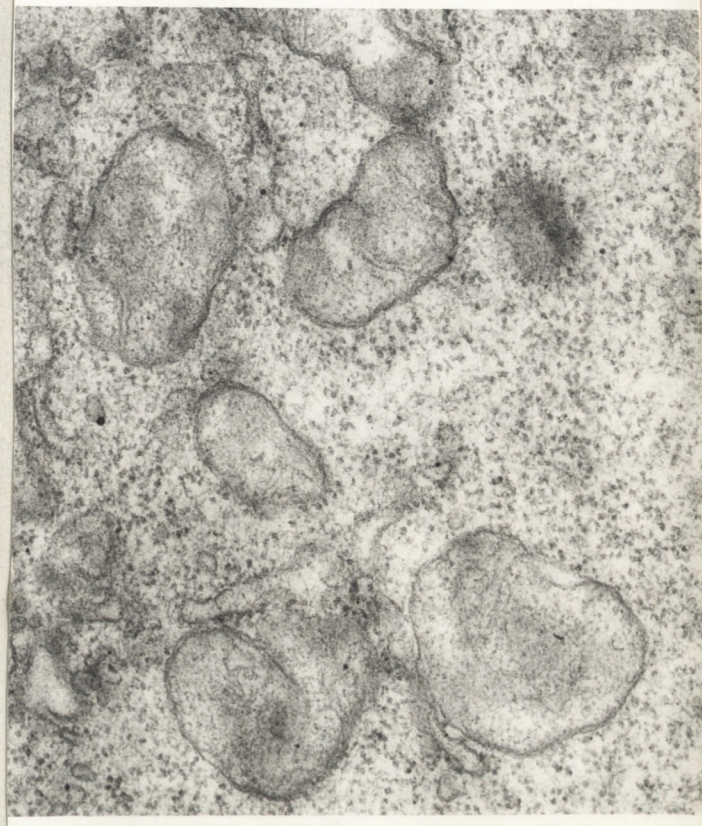
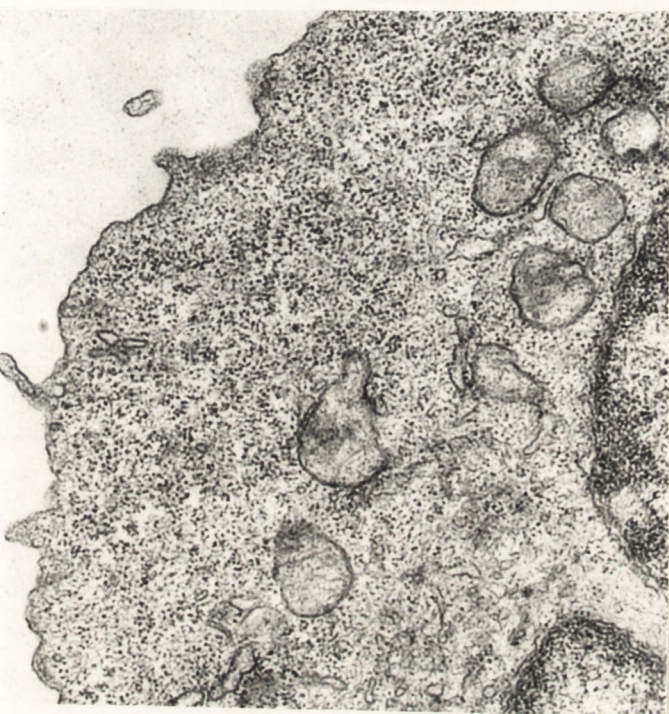
Ryc. 20 KOMÓRKI WYSIĘKOWEGO RAKA EHRLICHA
PO INKUBACJI W OBECNOŚCI GLUKOZY.
ZDJĘCIE W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM.
(x 28000)



Ryc. 21 KOMÓRKI RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA
PO INKUBACJI W OBECNOŚCI DEZOKSYGLUKOZY.
ZDJĘCIE W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM.

A-(x 17200)

B-(x 37200)



Ryc. 22 KOMÓRKI RAKA WYSIĘKOWEGO EHRLICHA
PO INKUBACJI W OBECNOŚCI DWUNITROFENOLU.
ZDJĘCIE W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM.

(x 59200)



wywołuje efekt Crabtree utrzymujący się do jej pełnego zużycia, do hamowania oddychania przez DG dochodzi dopiero po dodaniu jej w odpowiednio wysokim stężeniu /Rozdz.3.3.4., str. 33/, (23, 56) . Natomiast zagadnienie, czy obserwowane w tej pracy obniżanie przez DG efektu Crabtree, a także obniżanie przez glukozę hamującego wpływu DG na oddychanie może być argumentem na rzecz odrębności mechanizmów działania glukozy i dezoksyglukozy, wydaje się wysoce dyskusyjne. Zjawisko to, opisane poprzednio, było także i negowane (28, 89) . Wydaje się, że istotną rolę w opisanym zjawisku może odgrywać wzajemne hamowanie szybkości fosforylowania glukozy i dezoksyglukozy na drodze konkurencji o heksokinazę oraz opisanego poprzednio /str. 108 / mechanizmu hamowania heksokinazy przez G-6-P nagromadzający się w komórce w wyniku hamowania przez DG-6-P izomeraży glukozofosforanu. O tym, że szybkość fosforylowania glukozy ma istotny wpływ na głębokość efektu Crabtree świadczą badania Gumińskiej (45), która stwierdziła pogłębienie hamowania oddychania komórek przez glukozę w obecności insuliny. Przy takim ujęciu zagadnienia, wzajemne hamowanie obu heksoz na wejściu do ciągu przemian nic nam nie mówi o charakterze dalszych przemian i nie może być argumentem na rzecz odrębności mechanizmów działania obu tych heksoz.

Pomimo tak wyraźnego działania glukozy i dezoksyglukozy oraz innych heksoz na oddychanie nietkniętych komórek raka wysiękowego Ehrlicha nie wykazano żadnego wpływu tych heksoz na oddychanie homogenatów badanych komórek. Wyniki te wydają się świadczyć o niezbedności zachowania nietkniętej struktury komórek dla utrzymania prawidłowych mechanizmów regula-

cji metabolizmu energetycznego. Być może przyczyna leży w nieodpowiednim doborze składu środowiska inkubacyjnego, które w niedostateczny sposób imituje środowisko wewnętrzne komórki.

Jak wynika z dyskutowanych wyżej hipotez mających tłumaczyć istotę działania DG na oddychanie komórek raka wysiękowego Ehrlicha, bez względu na sprzeczności między nimi, kluczową rolę w mechanizmie działania przypisuje się zmianom w stężeniach nukleotydów adeninowych oraz działaniu heksokinazy, jedyne go enzymu biorącego bezpośredni udział w przemianie DG. W oparciu o te kryteria można rozpatrzeć efekty działania DG na oddychanie innych tkanek nowotworowych i prawidłowych. Na tak poszerzonym materiale dało się potwierdzić istnienie równoległości między wpływem DG na oddychanie i zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych, a stopniem aktywności heksokinazy.

I tak więc nie obserwowano wpływu dezoksyglukozy na oddychanie skrawków wątroby i wątrobiaka Morrisa, w których nie zanotowano także zmian w stężeniach nukleotydów adeninowych, a aktywność heksokinazy była bardzo niska. Natomiast w przypadku skrawków spontanicznego raka sutka myszy oraz kory mózgu świnki morskiej, cechujących się wysoką aktywnością heksokinazy, w których dochodzi w obecności DG do znacznych zmian w stężeniach nukleotydów adeninowych, dezoksyglukoza wywołuje hamowanie oddychania. Na skrawkach spontanicznego raka sutka myszy obserwowano efekt Crabtree oraz hamujące działanie dezoksyglukozy na oddychanie, a także wzajemne obniżanie tych efektów przez obie heksozy/Rozdz.3.1.3., str. 45/. Wydaje się, że mechanizm tych zmian metabolizmu nie różni się od obserwowanego w przypadku komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Badania wpływu DG na oddychanie skrawków kory mózgu świnki

morskiej prowadzono przy niskich i wysokich stężeniach KCl. Występował tu znany wpływ pobudzający wysokiego stężenia KCl na oddychanie badanego materiału w obecności odpowiednich substratów oddechowych przy jednoczesnym obniżeniu stężenia ATP. Wzmocniony rozpad ATP ma być zdaniem McIlwaina i wsp. (103) przyczyną tego pobudzenia oddychania. Dezoksyglukoza nie miała wpływu na oddychanie skrawków kory mózgu przy niskim stężeniu KCl, natomiast przy wysokim stężeniu K^+ obserwowano w określonych warunkach głębokie hamowanie zużycia tlenu. Podobny efekt wywierają wg McIlwaina (79) inne inhibitory /np. malonian/. Hamujące działanie DG na oddychanie skrawków kory mózgu ma jednak dość złożony charakter. Z jednej strony, ze względu na niezbędność endogennego substratu oddechowego, gdy substratem takim jest heksoza, DG może wywoływać hamowanie oddychania poprzez konkurencję z tymi heksozami w reakcji heksokinazowej. Ma to zapewne miejsce w przypadku fruktozy /Rozdz. 3.1.5., str. 52 /. Brak wpływu DG na oddychanie skrawków kory mózgu w obecności glukozy i mannozy świadczy o wysokim powinowactwie obu tych heksoz do heksokinazy. Istotnie, jak wynika z prac Crane'a (32) K_m heksokinazy dla DG jest znacznie wyższa niż dla glukozy i mannozy. Tower (104) wykazał hamowanie oddychania skrawków kory mózgu inkubowanych w obecności glukozy przez DG stosowaną w wysokich stężeniach. Dezoksyglukoza wywołuje także hamowanie oddychania skrawków inkubowanych w obecności mleczanu i pirogronianu. Ten efekt może być odpowiednikiem hamowania oddychania komórek raka wysiękowego Ehrlicha przez DG, do czego w przypadku kory mózgu istnieją wszystkie warunki - wysoka aktywność heksokinazy zlokalizo-

wanej głównie na błonach mitochondrialnych i obniżenie stężenia ATP w obecności DG. Czy istotnie mechanizm działania DG na oddychanie komórek raka Ehrlicha i skrawków kory mózgu świnki morskiej jest w obu wypadkach taki sam, trudno jednak w tej chwili wyrokować.

Działanie DG na oddychanie komórek nietkniętych i skrawków było porównywane z wpływem tego dezoksycukru na oksydacyjną fosforylację mitochondriów /Rozdz.3.2.1./.

W przypadku mitochondriów komórek raka Ehrlicha wykazano, że w przebiegu oksydacyjnej fosforylacji badanej frakcji mitochondrialnej w obecności DG następuje linijne przedłużenie oddychania w stanie 3 w porównaniu z mitochondriami inkubowanymi bez heksoz lub w obecności glukozy. Obrazowi temu odpowiadało omówione poprzednio /str. 110/ zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych - utrzymywanie się wysokiego stężenia ADP i AMP, co jest przyczyną wzmożonego zużycia tlenu. Efekt ten wiązać należy z obecnością na błonach badanych mitochondriów heksokinazy /Rozdz.3.2.3., str. 75 / silnie hamowanej przez G-6-P (3,76, 90, 126) .

Tym tłumaczy się brak wpływu glukozy na oksydacyjną fosforylację mitochondriów. Dowodem słuszności tej interpretacji są wyniki badania wpływu DG na oksydacyjną fosforylację mitochondriów raka Ehrlicha w obecności glukozy i G-6-P.

Zaobserwowano w tym wypadku zniesienie wpływu DG na oddychanie i stężenia nukleotydów adeninowych w zawieszynie badanych mitochondriów. Badania metodą polarograficzną pozwoliły wykazać, że glukoza wywołuje także pobudzenie oddychania mitochondriów raka Ehrlicha, które ulega jednak szybkiemu zahamowaniu wraz z nagromadzeniem się odpowiedniego stęże-

nia G-6-P, Przyjmując, że 1 cząsteczce nagromadzonego G-6-P odpowiada 1 cząsteczka uwalniającego ADP, można z Ryc.8 wyliczyć, że zahamowanie reakcji heksokinazowej i hamowanie zużycia tlenu przez mitochondria ma miejsce przy stężeniu G-6-P równym około 230 μ M. Efekt ten, opisany także przez Sauera (94), a w nieco innym układzie doświadczalnym przez Koobsa (64), porównywany był do efektu Crabtree obserwowanego w komórkach nietkniętych.

W obecności DG nie obserwowano żadnych zmian w przebiegu oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów wątroby i wątrobianka Morrisa /Rozdz.3.2.1., str. 110/, co wydaje się zrozumiałe w związku z brakiem wpływu tego dezoksycukru na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w zawieszynie badanych frakcji mitochondrialnych przy braku heksokinazy na błonach tych mitochondriów. W przypadku mitochondriów kory mózgu, w zawieszynie których, mimo wysokiej aktywności heksokinazy /Rozdz.3.2.3./ nie wykazano zmian w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych w obecności DG /Rozdz.3.2.1./, Obserwowano nieznaczne tylko przyspieszenie oddychania w stanie 4 /po wyczerpaniu ADP/ w porównaniu z układami kontrolnymi. Może to być śladowym efektem aktywności heksokinazy. Wydaje się, że w przypadku działania DG na oddychanie mitochondriów kory mózgu można zastosować rozważania dyskusyjne, podane wcześniej /str.111/ przy omawianiu wpływu DG na stężenia nukleotydów adeninowych. Wydaje się więc, że wyniki badań wpływu DG na oksydacyjną fosforylację mitochondriów prawidłowych i nowotworowych z pewnymi wyjątkami potwierdziły poglądy wiążące wpływ DG na oddychanie komórek nietkniętych z aktywnością i lokalizacją wewnątrzkomórkową

heksokinazy.

Zgodnie ze wstępnymi założeniami tej pracy badano wpływ dezoksyglukozy na glikolizę materiału prawidłowego i nowotworowego, ze szczególnym zwróceniem uwagi na udział zmian w stężeniach nukleotydów adeninowych w mechanizmie hamowania glikolizy przez DG.

Badania glikolizy komórek raka wąsłkowego Ehrlicha /Rozdz. 3.1.1., str. 35 / wykazało, że glukoza, fruktoza i mannoza sà równocennymi substratami ciàgu glikolitycznego w przeciwieństwie do galaktozy. W badanym materiale obserwowano wyraźny efekt Pasteura, a takżę silne pobudzenie glikolizy tlenowej w obecności DNP /Rozdz. 3.3.3./ . Dezoksyglukoza bardzo silnie hamowała produkcję kwasu mlekowego kosztem fruktozy, czemu towarzyszyło wybitne obniżenie stężenia ATP. Natomiast w obecności glukozy i mannozy hamowanie produkcji kwasu mlekowego przez DG było znacznie słabiej wyrażone, a wewnątrzkomórkowe stężenie ATP nie ulegało istotnemu obniżeniu. Tę różnicę w działaniu dezoksyglukozy na glikolizę i fruktolizę wykazał już Nirenberg (88) . Interesujące wyniki przyniosło badanie wpływu różnych stężeń dezoksyglukozy na produkcję kwasu mlekowego kosztem glukozy /Rozdz. 3.1.1./ . W warunkach tlenowych hamowania glikolizy proporcjonalnemu do logarytmu stężenia DG nie towarzyszyło obniżenie się zawartości ATP w komórkach. Natomiast w warunkach beztlenowych przy stosowaniu wyższych stężeń DG hamowaniu glikolizy towarzyszyło obniżenie się stężenia ATP. Badanie glikolizy homogenatów komórek raka wąsłkowego Ehrlicha przyniosło wyniki w zasadzie podobne do uzyskanych przy badaniu komórek nietkniętych. Zwraca natomiast uwagę fakt, że w warun-

kach tlenowych hamowanie przez DG produkcji kwasu mlekowego kosztem fruktozy było słabo zaznaczone, przy tym utrzymywało się wysokie stężenie ATP, natomiast w warunkach beztlenowych obserwowano silne hamowanie fruktolizy przez DG, czemu towarzyszyło obniżenie się stężenia ATP.

Dezoksyglukoza silnie hamowała wysoką glikolizę, zwłaszcza beztlenową, skrawków spontanicznego raka sutka myszy /Rozdz. 3.1.3./ . Także w przypadku skrawków wątrobiaka Morrisa, który jest nowotworem słabo glikolizującym, stwierdzono znaczne hamowanie przez DG produkcji kwasu mlekowego kosztem glukozy, bez zmian w zachowaniu się stężeń ATP /Rozdz. 3.1.2./ . Badanie skrawków glikolizy kory mózgu świnki morskiej /Rozdz. 3.1.5./ potwierdziło znaną zależność produkcji kwasu mlekowego od stężenia KCl w środowisku inkubacyjnym. Występowało pobudzenie glikolizy w warunkach tlenowych, a hamowanie w warunkach beztlenowych przez wysokie stężenie KCl (104) . Dezoksyglukoza hamuje glikolizę w przybliżeniu proporcjonalnie do logarytmu stężenia inhibitora, przy czym hamowanie jest procentowo podobne bez względu na obecność tlenu i stężenie KCl w środowisku inkubacyjnym. Fruktoliza skrawków kory mózgu jest bardzo silnie hamowana już przy niskich stężeniach DG. Badanie wpływu DG na produkcję kwasu mlekowego prowadzono także na układach cytoplazmatycznych komórek wysiękowego raka Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej. W obu wypadkach uzyskano podobne wyniki. Wykazano brak wpływu DG na glikolizę układów cytoplazmatycznych i na stężenie ATP w środowisku inkubacyjnym, natomiast fruktoliza była silnie hamowana, a stężenie ATP ulegało w tych warunkach znacznemu obniżeniu.

Ogólnie przyjęte hipotezy tłumaczą hamowanie produkcji kwasu mlekowego przez DG konkurencją między tym inhibitorem a heksozami - substratami ciągu glikolitycznego o transport do komórek i o heksokinazę, a także zwrotnym hamowaniem heksokinazy przez G-6-P nagromadzający się w komórkach wobec zablokowania izomeryazy glukozofosforanowej przez DG-6-P (82). Ponadto Wick (110) i Tower (104) sugerowali możliwość udziału dodatkowego mechanizmu, w którym obniżenie stężenia ATP pod wpływem DG może powodować hamowanie reakcji heksokinazowej. Wydaje się, że uzyskane w tej pracy wyniki ujawniły możliwość występowania w określonych warunkach wszystkich wymienionych tu mechanizmów. Mniejsza niż w przypadku komórek nietkniętych i skrawków tkanek wrażliwość glikolizy homogenatów i układów cytoplazmatycznych raka wysiękowego Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej na działanie DG nasuwa przypuszczenia, że nie uszkodzona błona komórkowa może być istotnie miejscem konkurencji między glukozą a dezoksyglukozą o dostęp do komórki. Fakt, że produkcja kwasu mlekowego kosztem glukozy i mannozy - heksoz cechujących się większym niż DG powinowactwem do heksokinazy, jest słabiej hamowana niż produkcja kwasu mlekowego kosztem fruktozy, która ma niższe powinowactwo do heksokinazy niż DG, świadczy o znaczeniu konkurencji między DG a innymi heksozami o heksokinazę. Najmniejsze znaczenie ma, jak się wydaje, mechanizm hamowania reakcji heksokinazowej w związku ze spadkiem stężenia ATP. Zjawisko to może występować w materiale cechującym się wysoką aktywnością heksokinazy /rak Ehrlicha, kora mózgu/ w przypadku hamowania fruktolizy, a także przy hamowaniu glikolizy w warunkach ^{bez} tlenowych przez wysokie

stężenia DG, nie ma natomiast znaczenia przy hamowaniu glikolizy w komórkach o małej aktywności heksokinazy / wątrobiak Morrisa/.

Jak wynika z przedstawionych danych DG wywiera szczególnie silne działanie na metabolizm komórek nowotworowych inkubowanych w nieobecności glukozy / w warunkach oddychania kosztem substratu endogennego/, co wyraża się wybitnym obniżeniem stężenia ATP i sumy nukleotydów adeninowych oraz hamowaniem oddychania. Natomiast w obecności glukozy wraz z DG stężenia nukleotydów adeninowych utrzymują się w zasadzie na normalnym poziomie, efekt Crabtree ulega obniżeniu, a hamowanie glikolizy przy równych stężeniach glukozy i DG nie jest zbyt silnie wyrażone. Komórki raka wysiękowego Ehrlicha inkubowane w obecności glukozy wraz z dezoksyglukozą po przeszczepieniu nosicielom zdolne są do prawidłowego namnażania się (10). Poruszona sprawa wydaje się szczególnie istotna w związku z próbami stosowania DG w terapii nowotworów (37, 66, 67, 68, 98). Po podaniu DG do organizmu nieuniknione jest bowiem działanie jej w obecności glukozy. W doświadczeniach *in vivo* obserwowano nieznamy hamowanie przez DG wzrostu nowotworów doświadczalnych i przedłużenie czasu przeżycia zwierząt - nosicieli guzów (67, 98). Przyczyną zwolnienia wzrostu nowotworów jest, jak się wydaje, hamowanie przez DG syntezy DNA i RNA w komórkach nowotworowych w związku z hamowaniem zużycia glukozy i wchodzenia jej do cyklu pentozowego, a w następstwie obniżeniem syntezy nukleotydów (62, 98). Natomiast stosowanie DG w klinice zakończyło się niepowodzeniem z powodu braku efektów terapeutycznych i wystąpienia u pacjentów

ogólnych objawów ubocznych zbliżonych do obserwowanych w hipoglikemii (66, 104). Ten ostatni efekt jest zrozumiały, gdy uwzględnimy dużą wrażliwość kory mózgu na działanie DG. Elzina⁽¹²³⁾ proponowała stosowanie DG w ograniczonych przypadkach z użyciem techniki krótkotrwałych perfuzji narządów lub kończyn roztworem dezoksyglukozy nie zawierającym glukozy. Skuteczność tego sposobu kuracji także wzbudzać może wątpliwości, gdyż jak wykazały badania, DG nie wywiera działania cytotoksycznego. Komórki nowotworowe utrzymują swoje własności żydowe po 3 godz. inkubacji w obecności dezoksyglukozy, a obserwowane w tym okresie hamowanie mitoz cofa się po dodaniu glukozy (38, 68). Ten sposób stosowania dezoksyglukozy mógłby być teoretycznie skuteczny wyłącznie w przypadku nowotworów o wysokiej aktywności heksokinazy. W praktyce zastosowanie dezoksyglukozy ogranicza się więc do prac eksperymentalnych, zwłaszcza dotyczących regulacji metabolizmu energetycznego. W tej pracy na przykład użycie DG pozwoliło na badanie związków pomiędzy zachowaniem się stężeń nukleotydów adeninowych a oddychaniem i glikolizą na materiale nowotworowym i prawidłowym. Takie postawienie problemu siłą rzeczy odwróciło uwagę od innych aspektów działania DG na metabolizm komórek, wychodzących poza ramy celu niniejszej pracy. W zasadzie pominięto szczegółowe badania dotyczące mechanizmu hamowania przez dezoksyglukozę ciągu glikolitycznego i cyklu pentozowego z uwzględnieniem działania DG na niektóre kluczowe enzymy przemiany węglowodanowej /izomeraza glukozy-6-fosforanowa, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa/. Z drugiej strony uzyskane w tej pracy informacje dotyczące mechanizmów regulacji metabolizmu

energetycznego zawężone są do niektórych aspektów roli ATP/ADP/AMP. Pozostawiono natomiast na uboczu inne ciekawe mechanizmy, w których nukleotydy adeninowe nie są bezpośrednio zaangażowane np. sprawę roli dehydrogenazy glicero-3-fosforanowej /EC 1.1.1.8/ w regulacji aktywności glikolitycznej (18) . Jednakże, po uwzględnieniu tych zastrzeżeń należy stwierdzić, że w zakresie problematyki ograniczonej do reakcji DG - nukleotydy adeninowe - oddychanie i glikoliza, problem mechanizmu działania DG na metabolizm komórek splótł się w nierozzerwalny sposób z zagadnieniami regulacji metabolizmu energetycznego. Wykazano więc, że działanie DG uzależnione jest od aktywności heksokinazy w badanym materiale, w przypadku komórek raka wysiękowego Ehrlicha i niektórych innych tkanek nowotworowych i prawidłowych, wyraża się obniżeniem stężeń ATP i sumy nukleotydów adeninowych a także hamowaniem oddychania. W obecności glukozy nie dochodzi pod wpływem DG do obniżenia stężenia ATP, choć obserwuje się mierne stopnia hamowanie glikolizy, natomiast hamowanie fruktolizy i obniżenie się stężenia ATP w obecności fruktozy jest wybitnie wyrażone. Badania prowadzone na odpowiednich frakcjach subkomórkowych wykazały istnienie warunków do wystąpienia pod wpływem DG zmian w metabolizmie energetycznym, obserwowanych na komórkach nietkniętych. Nie przyczyniły się one jednak w istotny sposób do wyjaśnienia mechanizmu działania DG. Dla dalszego rozwoju pracy pomocne okazało się wskazanie Rackera (44) , który podsumowując wyniki swoich badań nad mechanizmem efektu Pasteura prowadzonych na układach rekonstruowanych stwierdził, że "prawdziwy efekt Pasteura pozostaje badać tam, gdzie

on przede wszystkim występuje, w komórkach". Zdanie to dotyczy oczywiście i innych mechanizmów regulacji metabolizmu komórek, w tym także mechanizmu działania dezoksyglukozy. Istotnie, badania przeprowadzone na komórkach nietkniętych, w których uwzględniono przede wszystkim dynamikę rozwoju zmian obserwowanych pod wpływem DG pozwoliły na wykazanie ścisłych powiązań między hamowaniem oddychania przez tę heksosę a obniżeniem się stężenia ATP w komórkach, co wskazuje na wielką rolę ATP w utrzymaniu prawidłowej aktywności oddechowej i fosforylacyjnej mitochondriów. Zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych wydaje się natomiast nie odgrywać istotnej roli w hamowaniu glikolizy przez dezoksyglukozę - choć w pewnych warunkach /hamowanie glikolizy bez-tlenowej przez DG w wyższych stężeniach/ można wykazać wpływ zawartości ATP w komórkach na ten efekt. Tak przeprowadzone badania mają jednak istotny brak - nie uwzględniają kompartmentacji komórek, a więc wyniki badania stężeń nukleotydów adeninowych i fosforanu nieorganicznego stanowią średnie ze stężeń we wszystkich przestrzeniach komórki. Powstaje więc problem, czy takie wyniki mogą stanowić podstawę do rozważań nad możliwymi mechanizmami regulacji wewnątrzkomórkowej, bez uwzględnienia całej złożoności struktury wewnętrznej komórki, co jest oczywiście w obecnej chwili niemożliwe. Opierając się na opinii Engelhardta można na to pytanie odpowiedzieć pozytywnie. Badacz ten pisał: "Doświadczenie uczy, że termin "struktura" bywa zazwyczaj parawanem zasłaniającym naszą niewiedzę, a przy tym bardzo wygodnym parawanem, ponieważ można za nim ukryć niewiedzę każdego stopnia. /.../ Nie jesteśmy przeto zbyt

skłonni często posługiwać się koncepcją struktury. Nie negując jej znaczenia na wyższym poziomie, nie dostrzegamy szczególnej konieczności uwzględnienia struktury w wypadku stanów elementarnych". Według Rackera (88) należy, zdając sobie sprawę z faktu, że nasze wyniki obciążone są licznymi błędami, zbierać je i wykorzystywać "mając nadzieję, że pewnego dnia, gdy zdołamy nagromadzić dodatkową ilość artefaktów, będziemy mogli uzyskać z nich istotną informację dotyczącą zjawisk zachodzących wewnątrz komórki". Nie ulega wątpliwości, że uzyskane wówczas informacje zbliżają nas do zrozumienia istoty powiązań struktury i funkcji zgodnie z nowoczesną koncepcją Hopkinsa.

5. STRESZCZENIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW

Wykazano, że dezoksyglukoza wywołuje wybitne obniżenie stężenia ATP w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha oraz skrawkach spontanicznego raka sutka myszy i kory mózgu świnki morskiej. Nie obserwowano natomiast wpływu DG na zawartość ATP w skrawkach wątroby szczura i wątrobiaka Morrisa. Pomiarzy aktywności heksokinazy w badanym materiale wykazały, wysoką aktywność tego enzymu w komórkach i tkankach, w których obserwowano obniżenie stężenia ATP w obecności DG, natomiast małą aktywność heksokinazy w materiale, w którym DG nie miała wpływu na zawartość ATP.

W komórkach raka wysiękowego Ehrlicha inkubowanych w obecności DG w warunkach tlenowych dochodziło do obniżenia się sumy stężeń ATP, ADP i AMP, natomiast w warunkach beztlenowych obniżenie się stężenia ATP było kompensowane przyrostem AMP i nie obserwowano istotnego obniżenia sumy stężeń nukleotydów adeninowych. Podobny efekt obserwowano na homogenatach komórek raka wysiękowego Ehrlicha.

Dezoksyglukoza wywierała hamujący wpływ na oddychanie komórek raka wysiękowego Ehrlicha oraz skrawków spontanicznego raka sutka myszy i kory mózgu świnki morskiej. W przypadku komórek raka wysiękowego Ehrlicha hamowanie oddychania przez DG poprzedzone było okresem wzmożonego zużycia tlenu, któremu towarzyszyły przesunięcia w stężeniach ATP, ADP i AMP. Hamowanie oddychania rozwija się po osiągnięciu przez

ATP bardzo niskiego stężenia w komórkach, pomimo utrzymywania się jeszcze przez pewien czas podwyższonego stężenia ADP. DG powodowała utrzymujące się hamowanie oddychania komórek raka wsiękowego Ehrlicha i obniżenie stężenia ATP dopiero po zastosowaniu jej w odpowiednio wysokim stężeniu, które odpowiada maksymalnemu zużyciu DG przez badane komórki. Obniżenie zużycia tlenu i niskie stężenie ATP w komórkach raka Ehrlicha poddanych działaniu DG utrzymywało się także po przeniesieniu ich do środowiska inkubacyjnego nie zawierającego DG.

Hamowaniu oddychania badanych komórek raka Ehrlicha przez glukozę nie towarzyszyły żadne zmiany w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych. Glukoza podana wraz z jodooctanem wywierała podobny do DG wpływ na oddychanie i zachowanie się stężeń ATP, ADP i AMP.

Badanie wpływu DG na oksydacyjną fosforylację frakcji mitochondrialnej raka wsiękowego Ehrlicha wykazało przedłużenie oddychania w stanie 3, któremu towarzyszyło utrzymywanie się wysokiego stężenia ADP i AMP w zawieszynie badanych mitochondriów. Efekt ten nie występował w obecności DG podanej wraz z glukozą lub G-6-P. DG nie wykazywała wpływu na oksydacyjną fosforylację mitochondriów wątroby i wątrobiaka Morrisa, a działanie jej na zużycie tlenu przez frakcję mitochondrialną kory mózgu było bardzo słabo wyrażone. Wykazano wysoką aktywność heksokinazy na błonach mitochondrialnych raka wsiękowego Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej, a nieobecność heksokinazy na mitochondriach wątroby i wątrobiaka Morrisa. DG nie miała wpływu na aktyw-

ność ATPaz mitochondriów raka wysiękowego Ehrlicha. DG hamowała glikolizę komórek i tkanek nowotworowych oraz kory mózgu w warunkach tlenowych i beztlenowych. W przypadku komórek raka wysiękowego Ehrlicha działaniu DG na glikolizę w warunkach tlenowych nie towarzyszyły zmiany w zachowaniu się stężeń nukleotydów adeninowych, natomiast w warunkach beztlenowych obserwowano obniżenie stężenia ATP w komórkach. Fruktoliza w warunkach tlenowych i beztlenowych była silniej hamowana niż glikoliza, przy czym obserwowano wybitne obniżenie stężenia ATP w komórkach. W układach cytoplazmatycznych komórek raka wysiękowego Ehrlicha i kory mózgu świnki morskiej dezoksyglukoza nie hamowała glikolizy i nie miała wpływu na stężenia ATP. Silnemu hamowaniu fruktolizy przez DG towarzyszyło obniżenie stężenia ATP.

6. WNIOSKI

1. Dezoksyglukoza zmienia stosunki stężeń nukleotydów adeninowych w niektórych komórkach nowotworowych i prawidłowych. Istnieje ścisła korelacja pomiędzy aktywnością heksokinazy w komórkach, a działaniem dezoksyglukozy obniżającym stężenie ATP, przy czym wrażliwym na działanie DG okazał się materiał cechujący się wysoką aktywnością heksokinazy. Wiele danych wskazuje, że w ewolucji zmian stężeń ATP, ADP i AMP biorą udział także kinaza adenylanowa i dezaminaza AMP.
2. Istnieje wyraźna zależność między wysoką aktywnością heksokinazy i jej lokalizacją głównie na błonach mitochondrialnych, a hamowaniem przez DG oddychania szeregu komórek i tkanek nowotworowych i prawidłowych. Wydaje się, że hamowanie oddychania przez DG wiąże się przyczynowo z obniżeniem stężeń ATP w komórkach. Dokładny mechanizm hamowania oddychania nie jest znany. Uzyskane dane wskazują, że istnieją różnice w mechanizmach hamowania oddychania przez DG i efektu Crabtree.
3. Wyłącznie w materiale cechującym się wysoką aktywnością heksokinazy hamowanie glikolizy i fruktolizy przez DG jest uwarunkowane obniżeniem się stężenia ATP w komórkach. Podczas fruktolizy ten dodatkowy mechanizm występuje w warunkach tlenowych i beztlenowych, natomiast podczas glikolizy ma miejsce wyłącznie w warunkach beztlenowych.

7. P I S M I E N N I C T W O

1. Adam H.

Adenosine-5'-triphosphate Determination with Phosphoglycerate Kinase.,

w Methods of Enzymatic Analysis, red. Bergmayer H.U.,
Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstr., Academic Press New
York and London, 1963, str. 539-543.

2. Adam H.

Adenosine-5'-diphosphate and Adenosine-5'-monophosphate.,
ibid. str. 573-577.

3. Ács G., Garzó T., Grosz G., Molnár J., Stephaneck O.,
Straub F.B.

Eine Erklärung des Fehlens des Pasteur-Effektes bei den
Ehrlischen Aszites-Karzinomzellen.

Acta Physiol. Acad. Sc. Hungar., 8, 269-278, 1955.

4. Ács G., Ostrowski W., Straub F.B.

Über die Adenylpyrophosphatase-Aktivität an der Oberfläche
der Aszites-Krebszellen.

Acta Physiol. Hungar., 6, 261-263, 1954.

5. Aisenberg A.G.

The Glycolysis and Respiration of Tumors, Academic Press
New York and London, 1961, str. 16.

6. Atkinson D.E.

Biological Feedback Control at the Molecular Level/Interaction
Between Metabolite-Modulated Enzymes Seems to be
a Major Factor in Metabolic Regulation/.

Science, 150, 851-857, 1965.

7. Barban S.
Mechanism of Resistance to 2-Deoxy-D-glucose in Hela Cells.
Biochim. Biophys. Acta, 47, 604-605, 1961.
8. Barban S., Schultze H.O.
The Effect of 2-Deoxyglucose on the Growth and Metabolism
of Cultured Human Cells.
J. Biol. Chem., 236, 1887-1890, 1961.
9. Beattie D.S., Sloan H.R., Basford R.E.
Brain Mitochondria II. The Relationship of Brain Mitochon-
dria to Glycolysis.
J. Cell Biol., 19, 309-316, 1963.
10. Bekesi J.G., Molnar Z., Winzler J.L.
Inhibitory Effect of d-Glucosamine and Other Sugar Ana-
logs on the Viability and Transplantability of Ascites
Tumor Cells.
Cancer Res., 29, 353-359, 1969.
11. Van den Bergh S.G.
The Oxidation of Fatty Acids by Intact Rat-Liver Mito-
chondria.,
w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria.,
red. Tager J.M., Papa S., Quagliariello E., Slater E.C.,
Elsevier Amsterdam London New York, 1966, str. 125-133.
12. Bickis I.J., Quastel J.H.
Effects of Metabolic Inhibitors on Energy Metabolism of
Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Nature, 205, 44-46, 1965.
13. Bicz W., Broniszewska-Ardelt B.
The Effect of 2-Deoxy-D-Glucose on Aerobic and Anaerobic
Glycolysis in Neoplastic Cells and Tissues.

Acta Biochim.Polon., 9, 197-202, 1964.

14. Biczowa B., Strosznajder J., Łazarewicz J., Bicz.W.
Oddychanie kory mózgu świnki morskiej w obecności różnych heksoz i 2-dezoksyglukozy.
Praca w przygotowaniu do druku.
15. Biely P., Bauer S.
The Formation of Guanosine Diphosphate-2-deoxy-D-glucose in Yeast.
Biochim.Biophys. Acta 156, 432-434, 1968.
16. Borst P.
Preparation and Properties of Mitochondria from Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J.Biophys.Biochem.Cytol., 7, 381-383, 1960.
17. Borst P., Colpa-Boonstre J.P.
The Pyridine Nucleotide Content of Mitochondria Isolated from Ehrlich Ascites Tumour Cells.
Biochim.Biophys.Acta, 56, 216,226, 1962.
18. Boxer G.E., Shonk C.E.
Low Levels of Soluble DFN-Linked α -Glycerophosphate Dehydrogenase in Tumors.
Cancer Res., 20, 85-91, 1960.
19. Brzniszewska-Ardelt B.
Działanie 2-dezoksyglukozy na glikolizę, oddychanie oraz na wzrost nowotworów doświadczalnych.
Praca doktorska /maszynopis/. Warszawa, 1967 r., Biblioteka CMDiK PAN w Warszawie.
20. Broniszewska-Ardelt B.
The Influence of 2-desoxyglucose on Glycolysis of Homogenates and Cytoplasmatic Systems of Cells and Tumor Tissues.

Arch. Immun. Therap. Exptl., 17, 245-252, 1969.

21. Broniszewska-Ardelt B. Bicz. W.

The Effect of 2-Deoxy-D-glucose on the Respiration of Tumour Cells and Tissues.

Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. sci. biol., 12, 535-540, 1964.

22. Chance B., Garfinkel D., Higgins J., Hess B.

Metabolism Control Mechanisms V. A Solution for the Equations Representing Interactions Between Glycolysis and Respiration in Ascites Tumor Cells.

J. Biol. Chem., 235, 2426-2439, 1960.

23. Chance B., Hess B.

Metabolic Control Mechanisms I. Electron Transfer in the Mammalian Cell.

J. Biol. Chem., 234, 2404-2412, 1959.

24. Chance B., Hess B.

Metabolism Control Mechanisms II. Crossover Phenomena in Mitochondria of Ascites Tumor Cells.

J. Biol. Chem., 234, 2413-2415, 1959.

25. Chance B., Hess B.

Metabolic Control Mechanisms III. Kinetics of Oxygen Utilization in Ascites Tumor Cells.

J. Biol. Chem., 234, 2416-2420, 1959.

26. Chance B., Hess B.

Metabolic Control Mechanisms IV. The Effect of Glucose Upon the Steady State of Respiration Enzymes in the Ascites Cell.

J. Biol. Chem., 234, 2421-2427, 1959.

27. Chance B., Williams G.R.

Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation I.

Kinetics of Oxygen Utilization

J.Biol.Chem., 217, 383-393, 1955.

28. Christiansen E., Brooks J.L., Stewart C.J., Wick A.N.
Inhibition of the Crabtree Effect in Ascites Carcinoma Cells by 2-Deoxy-D-glucose.
Biochem.Biophys.Res.Commun., 5, 209-212, 1961.
29. Coe E.L.
Correlation of Glycolytic and Respiratory Events After Addition of Small Amount of Glucose to Ehrlich Ascites Carcinoma.
Cancer Res., 26, 269-275, 1966.
30. Coe E.L., Ibsen K.H., Dixon M., McKee R.W.
Glycolysis of Small Amounts of Glucose by Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Cancer Res., 26, 276-281, 1966.
31. Crabtree H.G.
Observations on the Carbohydrate Metabolism of Tumors.
Biochem. J., 23, 536-545, 1929.
32. Crane R.K., Sols A.
Animal Tissue Hexokinases.,
w Methods in Enzymology, red.Colowick S.P., Kaplan N.D.
Academic Press New York, 1955, tom I. str.277-286.
33. Creaser E.H., Scholefield P.G.
The Influence of Dinitrophenol and Fatty Acid on the P³² Metabolism of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Cancer Res., 20, 257-263, 1960.
34. Davies P.W.
The Oxygen Catode.,
w Physiological Techniques in Biological Research, red.

Nastuk W.L., Academic Press New York London 1962, tom IV,
str.137-179.

35. Dean R.B., Dixon W.J.

Simplified Statistics for Small Numbers of Observations.
Analyt.Chem., 23, 636-638, 1951.

36. Delbrück A., Zebre E., Bücher Th.

Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie Liefernden
Stoffwechsels in Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper
von *Locusta migratoria* und ihre cytologische Zuordnung.
Bioche., Z., 331, 273-296, 1959.

37. Ely J.O.

2-Deoxy-D-glucose as an Inhibitor of Cancerous Growth in
Animals.

J.Franklin Inst., 258, 157-160, 1954.

38. Ely J.O., Tull F.A., Hard J.A.

The Influence of 2-Desoksy-D-glucose on the Growth of
Embryonic Chicken-Heart Fibroblasts in Tissue Culture.

J.Franklin Inst., 253, 361-365, 1952.

39. Emmelot P., Bos C.J., Brombacher P.J., Hampe J.F.

Studies on Isolated Tumour Mitochondria: Biochemical Pro-
perties of Mitochondria from Hepatomas with Special Refe-
rence to a Transplanted Rat Hepatoma of the Solid Type.

Brit.J.Cancer, 13, 348-379, 1959.

40. Engelhardt W.A.

Swoistość biologicznej przemiany materii.,

w O istocie życia, red.Frank G.M., Książka i Wiedza W-wa,
1967, str.56-77./ Tłumaczenie z języka rosyjskiego/.

41. Estes F.L., Smith S., Gast J.H.

Metabolism of Polymorphonuclear Leucocytes.

- Federation Proc., 16, 178, 1957.
42. Garfinkel D., Hess B.
Metabolism Control Mechanismus VII. A Detailed Computer Model of the Glycolytic Pathway in Ascites Cells.
J.Biol.Chem., 239, 971-983, 1964.
43. Gatt S., Racker E.
Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism I. Crabtree Effect in Reconstructed Systems.
J.Biol.Chem., 234, 1015-1023, 1959.
44. Gatt S., Racker E.
Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism II. Pasteur Effect in Reconstructed Systems.
J.Biol.Chem., 234, 1024-1028, 1959.
45. Gumińska M.
Studies on the Crabtree Effect II. Factors Inhibiting and Enhancing the Crabtree Effect in Human Neoplastic Cells.
Acta Biochim.Polon., 9, 245-252, 1962.
46. Gromek A., Domańska K., Szumańska G., Broniszewska-Ardelt B.
Wpływ 2-dezoksy-D-glukozy na aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu i dehydrogenazy kwasu mlekowego w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha oraz L-fibroblastów hodowanych in vitro. - Dane przedstawione podczas V Krajowego Sympozjum Biochemicznego, Kraków 1967. Streszczenie komunikatu w Materiałach Sympozjum, str.45.
47. Held H.W.
The Participation of Endogenous Nucleotides in Mitochondrial Phosphate-Transfer Reactions.,
in Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, red.

- Tager J.M., Papa S., Quagliariello E., Slater E.C.,
Elsevier - Amsterdam London New York, 1966, str.51-64.
48. Hess B., Boiteux A.
Control of Glycolysis.,
w Regulatory Functions of Biological Membranes, red. Jär-
nefelt J., BBA Library, Elsevier Publ.Comp. Amsterdam
London New York, 1968, str.148-162.
49. Hess B., Chance B.
Metabolic Control Mechanisms VI. Chemical Events After
Glucose Addition to Ascites Tumor Cells.
J.Biol.Chem., 236, 239-246, 1961.
50. Hopkins F.G.
Cytat za Baldwin E.
Biochemia dynamiczna.
PWRiL Warszawa, 1969, str.60.
Tłumaczenie z oryginału angielskiego.
Dynamic Aspects of Biochemistry, Cambridge At the Univer-
sity Press, 1957.
51. Horn H.D., Bruns F.H.
Quantitative Bestimmung von L/+/-Milchsäure mit Milchsäu-
redehydrogenase.
Biochim.Biophys.Acta, 21, 378-380, 1956.
52. Huggett A. St G., Nixon D.A.
Enzymic Determination of Blood Glucose.
Biochem. J., 66, 12p, 1957.
53. Ibsen K.H., Coe E.L., McKee R.W.
Interrelationships of Metabolic Pathways in the Ehrlich
Ascites Carcinoma Cells I. Glycolysis and Respiration
/Crabtree Effect/.

- Biochim. Biophys. Acta, 30, 384-400, 1958.
54. Ibsen K.H., Coe E.L., Mc Kee R.W.
Energy Compensation in the Crabtree Effect with Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Nature, 183, 1471, 1959.
55. Ibsen K.H., Coe E.L., McKee R.W.
Some Factors Influencing Respiration and Glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Cancer Res., 20, 1399-1407, 1960.
56. Ibsen K.H., Coe E.L., McKee R.W.
A Comparison of the Respiratory Inhibitions Induced by D-Glucose and 2-Deoxy-D-Glucose in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Cancer Res., 22, 182-186, 1962.
57. Ibsen K.H., Fox J.P.
Substrate Modification of the Crabtree Effect in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Arch.Biochem.Biophys., 112, 580-585, 1965.
58. Karjalainen E.
Adenine Nucleotides and Membrane Conformation.,
w Regulatory Functions of Biological Membranes, red. Järnefelt J., BBA Library, Elsevier Publ.Comp. Amsterdam London New York, 1968, str.107-115.
59. Kiesow L.
"Über Orthophosphorsäure und Kohlensäure bei der Chinonkatalyse in der Lebenden Zelle.
Z.Naturforsch., 15b, 293-297, 1960.
60. King E.J., Wootton I.D.P.
Micro-analysis in Medical Biochemistry. Churchill Ltd.
London 1956.

61. Kipnis D.M., Cori C.F.

Studies of Tissue Permeability VI. The Penetration and Phosphorylation of 2-Deoxyglucose in the Diaphragm of Diabetic Rats.

J.Biol.Chem., 235, 3070-3075, 1960.

62. Klenow H.

Inhibition by Cardycepin and 2-Deoxyglucose of the Incorporation of ^{32}P -Ortophosphate into the Nucleic Acids of Ehrlich Ascites-Tumor Cells in vitro.

Biochim.Biophys.Acta, 76, 354-365, 1963.

63. Klingenberg M., Pfaff E.

Structural and Functional Compartmentation in Mitochondria.

W Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Tager

J.M., Papa S., Quagliariello E., Slater E.C., Elsevier

Amsterdam London New York, 1966, str.180-201.

64. Koobs D.H., McKee R.W.

Inorganic
Relation of ^{32}P -Ortophosphate and Adenine Dinucleotide Phosphate to the Crabtree Effect in Mitochondria Isolated from Ehrlich Ascites Tumor Cells.

Arch.Biochem.Biophys., 115, 523-535, 1966.

65. Kun E., Talalay P., Williams-Ashman H.G.

Studies on the Ehrlich Ascites Tumor I. The Enzymic and Metabolic Activities of the Ascites Cell and the Ascitic Plasma.

Cancer Res., 11, 855-863, 1951.

66. Landau B.R., Laszlo J., Stengle J., Burk D.

Certain Metabolic and Pharmacologic Effects in Cancer Patients Given Infusion of 2-Deoxy-D-Glucose.

J.Natl.Cancer Inst., 21, 485-494, 1958.

67. Laszlo J., Humphreys S.R., Goldin A.
Effects of Glucose Analogues /2-Deoxy-D-glucose; 2-Deoxy-D-galactose/ on Experimental Tumors.
J.Natl.Cancer Inst., 24, 267-281, 1960.
68. Laszlo J., Landau B., Wight K., Burk D.
The Effect of Glucose Analogues on the Metabolism of Human Leukemic Cells.
J.Natl.Cancer Inst., 21, 475-483, 1958.
69. Layne E.
Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins II. Protein Estimation with the Folin-Ciocalteu Reagent.,
w Methods in Enzymology, red.Colowick S.P., Kaplan N.O., Academic Press New York, 1957, tom III, str.448-450.
70. Letnansky K.
The Influence of 2-Deoxy-D-Glucose on the Nucleotide Content of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Biochim.Biophys.Acta, 87, 1-8, 1964.
71. Letnansky K.
Der Einfluss von Glucose auf die Phosphorylierung von 2-Deoxy-D-Glucose und den Gehalt an Adeninnucleotiden in Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen.
Biochem.Z., 341, 74-84, 1964.
72. Łezarewicz J., Strosznajder J.
Działanie 2-dezoksyglukozy na zachowanie się stężeń nukleotydów adeninowych w nowotworach doświadczalnych i narządach przewodzących.
Praca w przygotowaniu do druku.

73. Lazarewicz J., Strosznajder J., Bicz. W.
Oxydative Phosphorylation of Mitochondria of Ehrlich Ascites Tumor Cells and Normal Rat Liver in the Presence of 2-Deoxy-D-Glucose.
Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. sci. biol., 16, 131-137, 1968.
74. Moore C.L.
Purification and Properties of Two Hexokinases from Beef Brain.
Arch. Biochem. Biophys., 128, 734-744, 1968.
75. Meyers D.K., Slater E.C.
The Enzymic Hydrolysis of Adenosine Triphosphate by Liver Mitochondria I. Activities at Different pH Values.
Biochem. J., 67, 558-572, 1957.
76. McComb R.B., Yushok W.D.
Properties of Particulate Hexokinase of the Krebs-2 Ascites Tumor.
Biochim. Biophys. Acta, 34, 515-526, 1959.
77. McComb R.B., Yushok W.D.
Metabolism of Ascites Tumor Cells III. Effect of 2-Deoxyglucose Phosphorylation on Phosphorus Metabolism.
Cancer Res., 24, 193-197, 1964.
78. McComb R.B., Yushok W.D.
Metabolism of Ascites Tumor Cells IV. Enzymatic Reactions Involved in Adenosinetriphosphate Degradation Induced by 2-Deoxyglucose.
Cancer Res., 24, 198-206, 1964.
79. McIlwain H.
Cytat wg Webb. J.L.
Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press New York

and London, 1963, tom I, str.480.

80. McIlwain H., Buddle H.L.

Techniques of Tissue Metabolism I. A.Mechanical Chopper.

Biochem. J., 53, 412-420, 1953.

81. Nakada H.I., Wick A.N.

The Effect of 2-Deoxyglucose on the Metabolism of Glucose, Fructose and Galactose by Rat Diaphragm.

J.Biol.Chem., 222, 671-676, 1956.

82. Nirenberg M.W., Hogg J.F.

Inhibition of Anaerobic Glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells by 2-Deoxy-D-glucose.

Cancer Res., 18, 518-521, 1958.

83. Overgaard-Hansen K.

Metabolic Regulation of the Adenine Nucleotide Pool I.

Studies on the Transient Exhaustion of the Adenine Nucleotides by Glucose in Ehrlich Ascites Tumor Cells.

Biochim.Biophys. Acta, 104, 330-347, 1965.

84. Ozawa K., Seta K., Takeda H., Ando K., Handa H., Araki C.

On the Isolation of Mitochondria with High Respiratory Control from Rat Brain.

J.Biochem., 59, 501-510, 1966.

85. Packer L., Golder R.H.

Correlation of Structural and Metabolic Changes Accompanying the Addition of Carbohydrates to Ehrlich Ascites Tumor Cells.

J.Biol.Chem., 235, 1234-1240, 1960.

86. Papaconstantinou J., Colowick S.P.

The Role of Glycolysis in the Growth of Tumor Cells I.

Effects of Oxamic Acid on the Metabolism of Ehrlich

- Ascites Tumor Cells in vitro.
J.Biol.Chem., 236, 278-284, 1961.
87. Pullman M.E., Schatz G.
Mitochondrial Oxidations and Energy Coupling.
Ann.Rev.Biochem., 36, 539-610, 1967.
88. Racker E.
Regulation of Adenosine Triphosphate Utilization in Multi-Enzyme Systems.,
w Mechanisms in Bioenergetics, Academic Press New York and London, 1965, str.193-253.
89. Ram D., Kelner H.S., Bloch-Frankenthal L.
Inducers of the Crabtree Effect and Its Release by Uncouplers and Other Agents.
Cancer Res., 23, 600-606, 1963.
90. Rose I.A., Warms J.V.B.
Mitochondrial Hexokinase. Release, Rebinding and Location.
J.Biol.Chem., 242, 1635-1645, 1967.
91. Rosenthal O., Bowie M.A., Wagoner G.
On the Independence of Respiration and Glycolysis.
Science, 92, 382-383, 1940.
92. Rossi C.R., Galzigna L., Gibson D.M.
Fatty Acid Activation and Oxidation in Rat-Liver Mitochondria.
w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, red. Tager J.M., Papa S., Quagliariello E., Slater E.C., Elsevier Amsterdam London New York, 1966, str.143-152.
93. Rossowska-Taracha M.
Zależności pomiędzy mitochondriami a glikolizą prawidłowej wątroby i raka sutka myszy.

Praca doktorska /maszynopis/. Warszawa, 1965, Biblioteka
CMDiK PAN Warszawa.

94. Sauer L.A.
A Crabtree-Like Effect with Isolated Ascites Tumor Mitochondria.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 17, 297-333, 1964.
95. Sauer L.A., Martin A.P., Stotz E.
Oxidative Phosphorylation in Ascites Tumor Mitochondria.
Cancer Res., 22, 632-636, 1962.
96. Sauermann G.
The Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Substrate Oxidation
of Ascites Tumor Cells.
Arch.Biochem.Biophys., 104, 208-214, 1964.
97. Slater E.C.
Oxidative Phosphorylation.,
w Comprehensive Biochemistry tom 14, Biological Oxidations,
red.Florkin M., Stotz E.H., Elsevier Amsterdam, New York,
1966, str.327-396.
98. Sokoloff B., Saelhof C., Kato S., Chamelin I., Beach J.
Effect of a Glucose Analog on Nucleic Acid in Tumor Tissue.
Growth, 20, 265-273, 1956.
99. Stahl W.L., Smith J.C., Napolitano L.M., Basford R.E.
Brain Mitochondria I. Isolation of Bovine Brain Mitochondria.
- J.Cell.Biol., 19, 293-307, 1963.
100. Von Staveninck J.
Transport and Transport-Associated Phosphorylation of
2-Deoxy-D-glucose in Yeast.
Biochim.Biophys.Acta, 163, 386-394, 1968.-
101. Strosznajder J.
Efekt Crabtree a działanie 2-dezoksyglukozy na metabolizm

tlenowy komórek nowotworowych i elementów subkomórkowych.
Praca doktorska /maszynopis/. Warszawa, 1969, Biblioteka
CMDiK PAN, Warszawa.

102. Strosznajder J., Łazarewicz J.

Wpływ 2-dezoksyglukozy na metabolizm energetyczny komórek
nowotworowych i narządów prawidłowych.

Praca w przygotowaniu do druku.

103. Tobin R.B., McIlwain H.

The Effect of Oligomycin on the Respiration and Glycolysis
of Electrically-Stimulated Brain Slices.

Biochim.Biophys.Acta, 105, 191-192, 1965.

104. Tower D.B.

The Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Metabolism of Slices
of Cerebral Cortex Incubated in vitro.

J.Neurochem., 3, 185-205, 1958.

105. Umbreit W.W., Burris R.H., Stauffer J.F.

Manometric Techniques.

Burgess Publishing Co., 1957.

106. Webb J.L.

The Functional State of the Tissue.,

w Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press New York
London, 1963, tom I, str.480.

107. Webb J.L.

Effects of 2-Deoxy-D-Glucose on Carbohydrate Metabolism.,

w Enzyme and Metabolism Inhibitors, Academic Press New
York and London, 1966, tom II, str.386-403.

108. Weinhouse S.

Glycolysis, Respiration, and Enzyme Deletions in Slow-
Growing Hepatic Tumors.,

wBiological and Biochemical Evaluation of Malignancy in Experimental Hepatomas, Japanese Cancer Association, Tokyo 1966.

109. Wenner C.E., Careijo-Santalo R.
A Crabtree Effect in Amytal - or Progesterone-Treated Ascites Tumor Cells.
Arch.Biochem.Biophys., 98, 67-76, 1962.
110. Wick A.N., Drury D.R., Nakada H.I., Wolfe J.B.
Localization of the Primary Metabolic Block Produced by 2-Deoxyglucose.
J.Biol.Chem., 224, 963-969, 1957.
111. Wojtczak L., Drahota Z., Zeluska H., Zborowski J.
Activation of Fatty Acids in Liver Mitochondria by Intermediates of Oxidative Phosphorylation.,
w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, red. Tager J.M., Papa S., Quagliariello E., Slater E.C., Elsevier Amsterdam London New York, 1966, str.134-142.
112. Woodward G.E.
2-Desoksy-D-glucose as an Inhibitor in the Aerobic Glucose Metabolism of Yeast.
J.Franklin Inst., 254, 553-555, 1952.
113. Woodward G.E., Hudson M.T.
The Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Glycolysis and Respiration of Tumor and Normal Tissue.
Cancer Res., 14, 599-605, 1954.
114. Wrigglesworth J.M., Packer L.
Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroism Studies on Mitochondria: Correlation of Ultrastructure and Metabolic State with Molecular Conformational Changes.

Arch.Biochem.Biophys., 128, 790-801, 1968.

115. Wu R. Racker E.

Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism III.
Limiting Factors in Glycolysis of Ascites Tumor Cells.
J.Biol.Chem., 234, 1029-1035, 1959.

116. Wu R., Racker E.

Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism IV.
Pasteur Effect and Crabtree Effect in Ascites Tumor Cells.
J.Biol.Chem., 234, 1036-1041, 1959.

117. Yushok W.D.

Metabolism of Ascites Tumor Cells II. Inhibition of Respiration by Glycolyzable and Nonglycolyzable Sugars Phosphorylated by Hexokinase.
Cancer Res., 24, 187-192, 1964.

Piśmiennictwo w języku rosyjskim:

118. Безвершенко И.А., Петренко М.Г.
Некоторые особенности влияния кортизона на энергетический обмен асцитических опухолей., в Вопросы экспериментальной онкологии. Здоров'я, Киев, 1966, стр. 149-158.
119. Белоусова А.К.
Биохимические подходы к химиотерапии опухолей.
Медицина, Ленинград, 1965, стр. 84.
120. Гарфинкель Д.
Метод моделирования на вычислительных машинах в биохимии и экологии.,
в Теоретическая и математическая биология. Мир, Москва, 1968, стр. 317-336.
Tłumaczenie z oryginału angielskiego:
Theoretical and Mathematical Biology. Waterman T.H., Morowitz H.J. ed., Blaisdell Publ. Comp., New York - Toronto-London, 1965.
121. Гарфинкель Д.
Моделирование биохимических систем.,
в Вычислительные устройства в биологии и медицине. Мир, Москва, 1967, стр. 346-372.
Tłumaczenie z oryginału angielskiego:
Computers in Biomedical Research. Stacy R.W., Waxman B.D. ed., Academic Press, New York and London, 1965.
122. Ельцина Н.В.
Энергетический обмен раковых клеток.
Биохимия, 25, 135-142, 1960.
123. Ельцина Н.В., Вересотская Н.А.
О механизме действия дезоксиглюкозы на опухолевые клетки.
Биохимия, 27, 452-457, 1962.
124. Ельцина Н.В., Сейц И.Ф.
Дыхательное и гликолитическое фосфорилирование в раковой клетке.
Докл. АН СССР, 77ч 653-656, 1951.

125. Покровский А.А., Арчаков А.И.

Методы разделения и ферментной и^дентификации субклеточных фракций.,

в Современные методы в биохимии. Ред. Орехович В.Н.,
Медицина, Москва, 1968.

126. Сорокин К.Н.

Распределение гексокиназы в асцитных раковых клетках Эрлиха.

Биохимия, 27, 105-108, 1962.

127. Чанс Б.

Нестационарные метаболические процессы.,

в Теоретическая и математическая биология. Мир, Москва, 1968, стр. 368-371.

Tłumaczenie z oryginału angielskiego:

Theoretical and Mathematical Biology. Waterman T.H.

Morowitz H.J. ed., Blaisdell Publ. Comp., New York-Toronto-London, 1965.