

72131

Post. biochem.

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY
BIOCHEMII

KWARTALNIK

TOM IV

1958

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA



<http://rcin.org.pl>

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLÓW

1. AMP — adenozyjodjednofosforan
2. ADP — adenozyjnodwufosforan
3. ATP — adenozyjnotrójfosforan
4. CMP — cytydinojednofosforan
5. CDP — cytydinozwufosforan
6. CTP — cytydinoত্রójfosforan
7. CoA lub CoASH — koenzym A
8. ac-SCoA — acetylokoenzym A
9. DN (kwas) — kwas dezoksyrybonukleinowy
10. DPN — nukleotydz dwufosfopirydynowy
11. DPNH — postać zredukowana DPN
12. FAD — dwunukleotydz flawinoadenilowy
13. FADH₂ — postać zredukowana FAD
14. FMN — monokleotydz flawinowy
14. GMP — guanozyjodjednofosforan
16. GDP — guanozyjnodwufosforan
17. GTP — guanozyjnotrójfosforan
18. GSH — postać zredukowana glutationu
19. GSSG — postać utleniona glutationu
20. IMP — inozyjodjednofosforan
21. IDP — inozyjnodwufosforan
22. ITP — inozyjnotrójfosforan
23. P — ortofosforan
24. PP — pirofosforan
25. PAPS — adenozyjno-3'-fosforano-5'-sulfosforan
26. RN (kwas) — kwas rybonukleinowy
27. TPN — nukleotydz trójfosfopirydynowy
28. TPNH — postać zredukowana TPN
29. UMP — urydinojednofosforan
30. UDP — urydinozwufosforan
31. UTP — urydinoত্রójfosforan
32. UDPG — urydinozwufosforan glikozy
33. UDPGal — urydinozwufosforan galaktozy

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
K O M I T E T B I O C H E M I C Z N Y

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM IV

1958

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Józef Heller

Zastępcy red. nacz. — Irena Chmielewska i Jerzy Meduski

Sekretarz — Maria Piechowska

Adres Redakcji:

INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN

Warszawa, Krak. Przedmieście 26/28, tel. 613-66

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1958

Nakład 810 (693 + 117)	Oddano do składania 29.IX.58.
Ark. wyd. 6,75. Ark. druk. 5,5 + 0,5	Podpisano do druku 2.XII.58.
Papier druk. sat. kl. V, 70 g 70×100	Druk ukończono w grudniu 1958.
Cena zł 20.—	Zam. 1464/58. A-31.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JERZY KRAWCZYŃSKI*

Białka systemu nerwowego

Wstęp

Wydaje się, że jednym z najważniejszych zadań, jakie ma do rozwiązania neurochemia jest znalezienie materialnej osnowy dla różnorodnych i skomplikowanych czynności tkanki nerwowej. Zadanie to jest dziś dalekie od rozwiązania i być może dopiero radykalne zmiany w metodyce badań, idące w kierunku możliwie najdoskonalszego jej wysubtelnienia, przyniosą konkretny postęp w tej dziedzinie.

Wyniki badań neurochemicznych, jakimi dzisiaj dysponujemy, pozwalają tylko na tworzenie uogólnień o charakterze hipotez roboczych. Jedną z nich jest hipoteza, wg której materialną osnową czynności tkanki nerwowej są niezwykle nietrwałe i cechujące się niezwykle szybką przemianą substancje białkowe. W krańcowej swej postaci hipoteza ta przedstawiona jest jako tzw. „teoria engramów” (86).

W żadnym innym dziale biochemii nie ma takiej gmatwaniny pojęć i takiego zamieszania w zakresie terminologii, jak w biochemii białek systemu nerwowego. W żadnym innym dziale nie ciąży dzisiaj jeszcze tak silne piętno tradycji, sięgającej czasów Hoppe-Seylera i Mitschera. Przyczyną tego jest bez wątpienia słaby stosunkowo rozwój neurochemii jako nauki, a szczególnie słaby rozwój biochemii białek mózgu. W r. 1937 Page pisał: (cyt. za Rossiterem, 111) „Stosunkowo małe zainteresowanie budzi zagadnienie białek mózgu. Z ułamkowych faktów, jakimi dysponujemy, niemożliwe jest stworzenie jakiegoś usystematyzowanego obrazu, który by odzwierciedlał możliwie przejrzyście dynamikę przemiany białkowej w mózgu”. Cytując te słowa Rossiter (111) dodaje: „To samo możemy powiedzieć i w r. 1952”. W r. 1957 sytuacja

* Doc. dr med. kierownik Centralnego Laboratorium K-licznego PSK Nr 1 w Lublinie.

jest jednak nieco lepsza i pewną próbę nakreślenia takiego obrazu można już podjąć.

Przedstawienie pewnych faktów z historii danej nauki ułatwia zawsze wprowadzenie czytelnika w meritum zagadnienia. Z historii biochemii białek systemu nerwowego należy bezwzględnie wspomnieć następujące fakty:

W r. 1873 *Pietrowskij* (102) wydzielił z mózgu dwie frakcje białkowe nazwane przez niego albuminą i glutyną oraz stwierdził, że w substancji szarej mózgu znajduje się ich więcej niż w białej.

W r. 1878 *Ewald i Kuhne* (40) wyodrębnili z mózgu nierozpuszczalną w wodzie i odporną na działanie enzymów proteolitycznych frakcję białkową, którą nazwali neurokeratyną.

W r. 1894 *Halliburton* (57) przeprowadzając ekstrakcję tkanki mózgowej fizjologicznym roztworem soli kuchennej wyodrębnił dwie frakcje globulinowe i nukleoproteid.

W r. 1907 *Steel i Gies* (127) stwierdzili, że niektóre nukleoproteidy mózgu występują w postaci kompleksów z lipidami.

W r. 1916 *Mac Gregor* (55) wyizolował z tkanki mózgowej rozpuszczalny w wodzie fosfoproteid oraz fosfoproteid rozpuszczalny w rozcienionych alkaliach.

W r. 1919 *Danilewskij* (29) otrzymał frakcję białkową, którą nazwał neuroglobuliną, zawierającą 0,5% fosforu, oraz frakcję rozpuszczalną w słabym roztworze NaOH, nazwaną przez niego neurostrominą. Znacznie później okazało się, że neuroglobulina jest desoksyrybonukleoproteidem (105a), a neurostromina rybonukleoproteidem (95).

W r. 1941 *Lewry, Gilligan i Katersky* (82) wyodrębnili z mózgu szczura collagen i elastynę.

W r. 1948 *Tarver i Morse* (131) po raz pierwszy zastosowali do badań nad przemianą białek systemu nerwowego radioaktywne izotopy.

W 1951 roku *Folch i Lees* (45) wyizolowali z tkanki mózgowej proteolipidy.

W r. 1954 *Kaps* (65) przeprowadził po raz pierwszy elektroforetyczne badanie białek mózgu pomocy elektroforezy bibułowej.

W latach 1954 — 1956 *Lowry i współ.* (82, 83, 107, 108, 109) przeprowadzili badania histochemiczne, pozwalające określić ilość i częściowo jakość białek w poszczególnych warstwach cytoarchitektonicznych różnych odcinków kory mózgowej.

W r. 1956 *Hofmann i Schinke* (60) próbowali zlokalizować niektóre własności enzymatyczne w obrębie frakcji białkowych, otrzymanych z mózgu przy pomocy elektroforezy bibułowej.

Systematyka białek układu nerwowego

A. Białka tkanki nerwowej

Usystematyzowanie białek tkanki nerwowej jest jeszcze zadaniem bardzo trudnym — każdy prawie autor pracujący nad systematyką białek tkanki nerwowej posługiwał się własną płaszczyzną podziału.

Rozważania przedstawione w niniejszym rozdziale są próbą podciągnięcia wyników, uzyskanych przez różnych autorów, różnymi metodami pod wspólny mianownik.

Punktem wyjścia tych rozważań jest schemat frakcjonowania tkanki mózgowej wg Mirsky'ego i Pollistera (85) z pewnymi dokonanymi przez nas modyfikacjami — Krawczyński i wsp. (71).

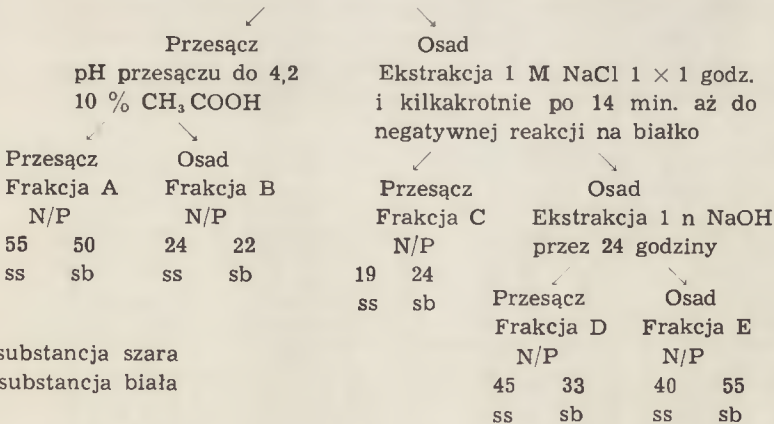
Sam schemat przedstawia się następująco:

Schemat I

Schemat frakcjonowania tkanki mózgowej wg zmod. met. Mirsky'go i Pollistera.

TKANKA MOZGOWA
(substancja szara, biała, mózdzek)

Ekstrakcja 0,14 M NaCl 1 × 1 godz. i kilkakrotnie po 15 min. aż do negatywnej reakcji na białko w ekstrakcie.



ss — substancja szara

sb — substancja biała

Frakcje A i B reprezentują rozpuszczalne w 0,14 M roztworze NaCl białka cytoplazmatyczne, frakcja C rozpuszczalne w 1 M roztworze NaCl białka jądrowe. Frakcja D i E są nierozpuszczalnymi w wodzie i roztworach solnych białkami cytoplazmy i jądra. Stosunki ilościowe między tymi frakcjami przedstawiono w poniższej tabeli (71).

Zawartość białka w substancji szarej i białej mózgu oraz w mózdzku królika, określona metodą wagową, jest w przybliżeniu jednakowa. Wyraźne różnice między substancją szarą i białą mózgu i między mózdzkiem występują natomiast w zawartości poszczególnych frakcji białkowych.

Wyodrębnione przez nas frakcje białkowe mózgu i mózdzku można w przybliżeniu scharakteryzować w sposób następujący:

Frakcja A: Frakcja ta w największej ilości występuje w substancji szarej mózgu, w mniejszej w substancji białej. Mózdzek zajmuje pośrednie miejsce. Ilość fosforu, jak wynika ze stosunku N/P, jest niewielka, co może świadczyć, że frakcja ta nie zawiera większych ilości nukleoproteidów. W skład tej frakcji może wchodzić też i fosfoproteid, otrzymany przez Mc Gregora, oraz otrzymane przez Halliburtona (57) neuroglobulina A (temp. koagulacji 47°) i neuroglobulina B (temp. koagulacji 70—75°) (133).

Frakcja B: jest cytoplazmatycznym kompleksem nukleoproteidowym o słabo, jak można to sądzić z danych Biełozierskiego (11) Orłowa i Mamoiłowa (84), związanym kwasie nukleinowym. We frakcji tej występuje przeważnie kwas rybonukleinowy (RN), ale występuje też i kwas dezoksyrybonukleinowy (DN). W największej ilości frakcja ta występuje w mózdzku, a prawie w tych samych ilościach w substancji szarej i białej mózgu.

Frakcję A i B udało się rozdzielić za pomocą elektroforezy bibułowej.

Tabela I

Stosunki ilościowe (w rel. %) między frakcjami białkowymi substancji szarej i substancji białej mózgu oraz mózdzku królika otrzymanymi wg zmodyfikowanej metody Mirsky'ego i Pollistera (85) (wg Krawczyńskiego i wspł.) (71)

Frakcja	Substancja szara rel. %	Substancja biała rel. %	Mózdzek rel. %
Białka całkowite	10,42*)	11,00*)	10,15*)
A	19,29	14,76	16,33
B	36,91	37,48	44,78
C	20,87	17,66	15,95
D	20,26	23,32	19,46
E	2,67	0,78	3,38

*) — rel. % wyliczony w stosunku do wagi świeżej tkanki

Kaps (65) wyodrębnił 6 frakcji: albuminową, α_1 , α_2 globulinowe, β_1 , β_2 globulinowe oraz γ globulinową. Stosunków ilościowych w jakich występują te frakcje nie podał.

Z *lobus parietalis* człowieka udało się wyodrębnić 5 a nawet 7 frakcji białkowych (16). Znalaziono tam oprócz frakcji albuminowej i globulinowych, frakcje leżące poza obszarem odpowiadającym globulinom surowiczym, wędrujące jeszcze wolniej niż γ -globuliny, lub wędrujące już do katody. Frakcje te nazwano X_1 i X_2 .

K r e u p (75) otrzymał z tkanki mózgowej 6 frakcji, z których 3 posiadały większą ruchliwość niż albumina surowicza. Jedną z tych frakcji udaje się czasem rozłożyć na 2 podfrakcje, inną nawet na trzy podfrakcje. Stosunki ilościowe między tymi frakcjami są różne w różnych odcinkach mózgu.

P a ł ł a d i n i P o ł a k o w a (99) przeprowadzili ekstrakcję mózgow szczyrzych przy pomocy 0,9 % roztworu NaCl z równoczesnym zamrażaniem tkanki i ekstraktu ciekłym powietrzem. W otrzymanym ekstrakcie wyodrębnili przy pomocy elektroforezy bibułowej 6 frakcji, a w substancji białej nawet 7. P o ł a k o w a (103) w substancji szarej i białej mózgu, w mózdzku, rdzeniu przedłużonym i rdzeniu kręgowym krowy wyodrębniła 7—8 frakcji białkowych, głównie globulin i niewielką ilość białek wędrujących jak albumina surowicza. W substancji białej rdzenia kręgowego znalaziono frakcję wędrującą do katody. W nerwie obwodowym ilość białek o ruchliwości takiej jak albuminy jest większa.

K r a w c z y ń s k i i D r e w n o w s k a (70) stosując ekstrakcję tkanki mózgowej myszy fizjologicznym roztworem NaCl i kilkakrotnie zamrażanie tkanki i ekstraktu do temp. suchego lodu i ogrzewanie do 37°C. wykazali obecność w ekstrakcie 9 frakcji białkowych, między którymi była i frakcja wędrująca szybciej niż albumina surowicza i frakcja leżąca poza obszarem globulin surowicznych, odpowiadająca prawdopodobnie wspomnianej przez B o o i j a (16) frakcji X_1 lub X_2 . Pozostałe frakcje odpowiadały ruchliwością frakcji albuminowej surowicy i frakcją globulinowym.

D e m l i n g, K i n z l m e i e r i H e n n i g (32) badali stosunki ilościowe, w jakich występują w mózgu szczura wyodrębnione elektroforetycznie frakcje białkowe. Autorzy ci znaleźli w tkance mózgowej 2—3 frakcje odpowiadające albuminom (15 rel. %), dwie frakcje odpowiadające α globulinom (47,5%), z których frakcja α_2 jest z reguły większa, frakcję odpowiadającą β globulinom (27,8%) oraz małą frakcję odpowiadającą γ globulinom surowiczym (9,4%).

Najbardziej systematyczne badanie elektroforetyczne białek mózgu przeprowadzili H o f m a n n i S c h i n k o (60). Autorzy ci stosując ekstrakcję buforem weronalowym i równocześnie zamrażanie stałym CO_2 otrzymali z mózgu człowieka (8 — 9 godzin po śmierci) i z mózgu świnki morskiej 9 frakcji białkowych wędrujących z różną

szybkością w polu elektrycznym na pasku bibuły. Są to: frakcja przedalbuminowa (PA), albuminy (A), dwie frakcje α -globulinowe (α_1 α_2), trzy frakcje β -globulinowe (β_1 , β_2 , β_3) i dwie frakcje γ -globulinowe (γ_1 , γ_2). Autorzy ci nie stwierdzili znacznych różnic między składem białkowym substancji szarej i białej mózgu człowieka.

Barwieniem wykazano istnienie trzech frakcji lipoproteidowych w proporcjach ilościowych: 14,5%, 70,0%, 15,5%. Wartości te są dość zmienne. Barwieniem stwierdzono również obecność frakcji glikoproteidowej.

Wykazano związek esteraz z frakcjami: PA, A i γ -globulinową, zaś amylazy i fosfatazy z frakcjami α i β -globulinowymi.

W obrębie frakcji określonych przez nas jako frakcje A i B można by jeszcze umiejscowić rozpuszczalny w wodzie nukleoproteid wyizolowany przez Brik (18), rozpuszczalne w roztworze fizjologicznym i w wodzie nukleoproteidy otrzymane przez Brouna (20), będące mieszaniną rybo- i dezoksyrybonukleoproteidów, rozpuszczalne w wodzie białko o PI przy pH — 4,2 wyodrębnione przez Pałladina (95) i prawdopodobnie neuroglobulinę Danilewskiego (29).

Tabela II

Stosunki ilościowe między frakcjami białkowymi mózgu człowieka i świnki morskiej wyodrębnionymi przy pomocy elektroforezy bibułowej (wg Hofmanna i Schinko) (60)

Frakcja	Człowiek		Świnka morska
	Kora mózgowia (substancja szara) rel. %	Substancja biała rel. %	Mózg rel. %
PA	0,66	1,14	1,22
A	1,94	2,95	3,59
α_1	4,17	7,19	7,56
α_2	7,81	11,69	11,95
β_1	25,85	15,99	15,27
β_2	26,20	24,23	19,68
β_3	14,60	13,41	15,37
γ_1	8,79	9,77	13,65
γ_2	10,10	13,63	11,34

Frakcja C występująca w największej ilości w substancji szarej mózgu powinna odpowiadać chromozynie Mirsky'ego i Pollistera (85) wyizolowanej przez nich między innymi i z tkanki mózgowej. Chromozyna uważana jest za kompleks składający się z kwasu dezoksyrybonukleinowego, histonu i białka niehistonowego. Frakcja C może też odpowiadać frakcji „A” Clouet i Richtera (27) oraz frakcjom rozpusz-

czalnym w stężonych roztworach soli otrzymanym przez Brik (18) i Palladina (95). (Białko o PI przy pH 5,6).

Fracja D występująca w największej ilości w substancji białej mózgu odpowiadać może frakcji „B” Clouet i Richtera (27) będącej według autorów kompleksem nukleoproteidowym. W obrębie frakcji D powinna znajdować się również przeważna część fosfoproteidów, których ilość w mózgu obliczana jest na 5,5 mg⁰/. Struktura tych białek i ich własności są w zasadzie nieznanne. Od czasu badań Mc Gregora (55) który, jak wspomniano wyżej izolował z tkanki mózgowej frakcję białkową zawierającą fosfor niedializujący a nie będącą nukleoproteidem, większość badaczy (Engelhardt, Lisowska (37, 38, 79, 80), Heald (58), Findlay, Strickland, Rossiter (42) zajmowała się wyłącznie przemianą fosforu fosfoproteidów odszczepiającego się podczas hydrolizy tkanki mózgowej prowadzonej w zasadowym środowisku (hydroliza 1 n NaOH przy 37° w ciągu 20 godz.). Fakt, że fosfoproteidy występują w mózgu w drobnych ilościach i że spotyka się je przeważnie w substancji szarej, pozwala przypuszczać, że odgrywają one rolę katalizatorów (2). Według Baasa (6) fosfoproteidy wchodzą w skład systemów transfosforylujących.

Folch i Lees (45) określili jako proteolipidy substancje składające się z komponenty białkowej i lipidowej, ale w odróżnieniu od lipoproteidów nierozpuszczalne w wodzie ani w roztworach solnych a dobrze rozpuszczalne w mieszaninach: chloroform-metanol-woda. Substancje te wykazują więc własność lipidów, do których dołączone jest białko.

Folch i Lees (45) rozróżnili 3 frakcje proteolipidowe: proteolipid A: ekstrahujący się mieszkanką chloroform — metanol w temp. —10°, proteolipid B: wytrącający się z mieszaniny chloroformo-metanolowej nadmiarem acetonu i zawierający 50% białka i 50% materiału lipidowego (fosfolipidy i cerebrozydy), proteolipid C: zawiera 75% białka i jest rozpuszczalny w samym chloroformie. Proteolipid C zawiera lipoidy w postaci fosfolipidów typu fosfoglicerydów.

Proteolipidy w szczególnie dużych ilościach występują w substancji białej mózgu a w znacznie mniejszych ilościach w szarej (2,0 g i 0,6 g w 100 g świeżej tkanki) (Folch, Lees).

W czasie przeprowadzonych przez nas badań stwierdziliśmy, że największa ilość proteolipidów (45), szczególnie zaś proteolipidu B jest związana z naszą frakcją D. Znacznie mniej wiąże się ich z frakcją C. W pozostałych frakcjach można stwierdzić tylko ich ślady.

W hydrolizacie proteolipidów jest przewaga aminokwasów kwaśnych Waksman, Porter, Lees, Adams i Folch (140) wykazali też, że proteolipidy A i B otrzymane z substancji białej mózgu byka wywierają patogenne działanie po podaniu ich królikom, przejawiające się w wy-

woływaniu uczuleniowego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (*encephalomyelitis allergica*). Proteolipid C nie jest patogenny.

Dość łatwo można oddzielić część białkową kompleksu proteolipidowego od jego części lipidowej. Z roztworu proteolipidów w mieszaninie chloroform-metanol należy usunąć rozpuszczalnik przez destylację próżniową i z suchej pozostałości ekstrahować lipidy tymi samymi rozpuszczalnikami. Białko pozostaje w formie nierozpuszczalnego osadu. Komponenta białkowa poszczególnych frakcji proteolipidowych jest w zasadzie jednakowa i cechuje się tym samym stosunkiem N/S. Zawartość siarki wynosi około 2^o/. Własności komponenty białkowej proteolipidów są identyczne z własnościami neurokeratyny wyizolowanej jeszcze w r. 1878 przez Ewald a, Kuhn e (40) i opisanej później przez Argin is (4), Nelson a (89) i Błock a (12). Neurokeratyna podobnie jak właściwa keratyna jest nierozpuszczalna w wodzie po działaniu na nią pepsyny i trypsyny, a więc jest niewrażliwa na działanie tych enzymów. Od właściwej keratyny różni się nieco składem aminokwasowym w odniesieniu do histydyny, lizyny i argininy. Aminokwasy te w keratynie występują w proporcjach 1 : 4 : 12 a w neurokeratynie w proporcjach 1 : 2 : 2 (14).

Folch i Baron (46) opisali w r. 1951 kompleks proteolipidowy odporny na działanie trypsyny, występujący przede wszystkim w substancji białej mózgu, ale nie będący jednak proteolipidem. Komponenta białkowa tego kompleksu wykazywała również własności klasycznej neurokeratyny. W skład tego kompleksu wchodzi fosfolipid podobny lub identyczny z dwufosfoinozytolem.

Władimirow i wspł. (147) wydzielili z tkanki mózgowej białych szczurów frakcję lipoproteidową zawierającą fosfor i rozpuszczalną w mieszaninie chloroform-metanol, którą nazwali frakcją X. Frakcja ta w największej ilości występuje w rdzeniu przedłużonym i kręgowym. Znacznie mniej spotyka się jej w substancji szarej. W odróżnieniu od wspomnianego wyżej kompleksu proteolipidowego Folcha i Barona (46) „frakcja X” nie zawiera inozytolu.

Frakcja E odpowiada frakcji C Clouet i Richtera (27) oraz prawdopodobnie kollagenowi i elastynie, otrzymanym z mózgu przez L o w r y'e go Gilligana i K a t e r s k y'e go (82). Chociaż histochemicznie nie wykazano w centralnym systemie nerwowym (csn.) obecności kollagenu, wspomniani autorzy twierdzą, że mózg zawiera go w ilości 0,3 g na 100 g świeżej tkanki. Logani i wspł. (81) znaleźli nieco mniejsze ilości kollagenu w csn. z tym, że więcej jego jest w substancji szarej niż białej. A b e r c r o m b i e i J o h n s o n (1) określili zawartość kollagenu w nerwie obwodowym królika na 3,2^o/. Należy przypuszczać, że kollagen i elastyna pochodzą głównie z elementów łącznotkankowych związanych

z tkanką nerwową i z tkanki gliowej. Frakcja E również występuje w większej ilości w substancji szarej niż białej a najwięcej w mózdku. Jest ona najmniejszą ze wszystkich wyizolowanych przez nas frakcji.

Uzupełnieniem do przedstawionej wyżej systematyki białek tkanki nerwowej będą dane dotyczące lokalizacji niektórych frakcji białkowych (głównie przy pomocy metod histochemicznych i przy pomocy mikrospektrografii).

W nukleoproteidach tkanki nerwowej występują kwasy nukleinowe zarówno typu RN jak i DN. Kwasy typu RN zawierają w cząsteczce pentozę, adeninę, guaninę, cytozynę i uracyl (30), zaś kwasy typu DN dezoksypentozę, adeninę, gwaninę, cytozynę, tyminę i małe ilości metylcytozyny. Histochemiczne badania z użyciem rybonukleazy wykazały, że w cytoplazmie komórek nerwowych kwas RN jest związany prawdopodobnie z ciałkami Nissla, które zawierają jeszcze i kwaśne i zasadowe białko — Brachet (19), Gersh, Bodian (52). Histochemicznie wykazano też, że jądro komórki nerwowej zawiera kwas nukleinowy typu DN, a jąderko typu RN (62).

Badania Hydena (62) wykonane metodą spektrografii przy 260 m μ . wykazały, że jąderko komórki nerwowej zawierające kwas nukleinowy typu RN otoczone jest tworami strukturalnymi zawierającymi kwas nukleinowy typu DN. Całość tworzy tzw. „aparat jąderkowy komórki” szczególnie czynny podczas procesu syntezy białka w komórce. Hyden (62) próbował ilościowo określić zawartość kwasu nukleinowego typu RN w różnych komórkach nerwowych. Wykazał on, że np. w komórkach nerwowych przednich rogów rdzenia zawartość kwasu RN wynosi 1,7%, a w komórkach zwojowych ślimaka około 2%. W dużych komórkach piramidalnych zawartość kwasu RN jest tego samego rzędu. Między komórkami Purkinjego w mózdku spotyka się komórki bogate i ubogie w kwas RN. Edström (35) metodami mikrochemicznymi określił zawartość kwasu RN w komórkach zwojowych rdzenia na 1,1%. Robins i współ. (107) badali rozmieszczenie białka w poszczególnych warstwach cytoarchitektonicznych mózgu. Stwierdzili oni, że w korze ośrodków ruchowych mózgu następuje obniżenie zawartości białka w komórkach, jeśli postępować będziemy od warstw zewnętrznych ku środkowi. W korze analizatora wzrokowego, do V warstwy (warstwa dużych komórek piramidalnych), zawartość białka w komórkach pozostaje bez zmian.

Wydaje się wątpliwe, czy omówione przez nas poszczególne frakcje białkowe stanowią formę, w jakiej białka tkanki nerwowej występują *in vivo*. Być może są to tylko sztucznie otrzymane fragmenty większych jednostek strukturalnych i to fragmenty, których budowa i skład zależą od użytej metody frakcjonowania.

Ze wszystkich metod frakcjonowania białek tkanki nerwowej może najbardziej łagodną jest metoda elektroforezy bibułowej, ale niestety zakres jej stosowalności ograniczony jest raczej do białek prostszych. Pewną przyszłość mogą mieć przed sobą metody mikrospektrografii i metody ilościowej histochemii, stosowane przez *Robins* i współ. (107), umożliwiające opracowanie mikrotopografii białek w tkance nerwowej.

B. Białka płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR)

Badanie białek PMR od początku napotykało na duże trudności metodyczne. Dopiero w r. 1939 zastosowano do badania białek płynu mózgowo-rdzeniowego wolną elektroforezę (50). Badanie tego rodzaju mogło być jednak przeprowadzone tylko w wyjątkowych okolicznościach, ponieważ ilość PMR potrzebnego do jednorazowego badania wynosiła od 100 do 200 ml. (2 ml. 50 krotnie lub 100 krotnie zagęszczonego płynu). Tym niemniej przy pomocy wolnej elektroforezy wykazano po raz pierwszy obecność w PMR frakcji albuminowej oraz frakcji α , β i γ globulinowych.

Kabat, Moor i Landow (64) wykryli w niektórych PMR frakcję białkową wędrującą w polu elektrycznym szybciej od albumin surowiczych, którą nazwali „frakcją X”.

Przy pomocy wolnej mikroelektroforezy wykonanej na aparacie *Antweilera* wyodrębniono w PMR albuminy, α globuliny, β_1 i β_2 globuliny, γ globuliny oraz frakcję wędrującą między β i γ globulinami, którą nazwano frakcją τ globulinową.

Wprowadzenie do badań białek PMR elektroforezy bibułowej usunęło częściowo te trudności, ponieważ ilość PMR potrzebnego do jednorazowego badania zmniejszyła się do 5—10 ml.

W 1951 r. *Schneider i Wallenius* (116) pierwsi zastosowali elektroforezę bibułową do badania składu białkowego PMR.

Wspomniani autorzy stwierdzili obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym następujących frakcji białkowych: frakcji przedalbuminowej (PA), albumin, α_1 i α_2 globulin, β globulin, τ globulin i γ globulin.

Opierając się na badaniach różnych autorów *Booij* (16) podaje szczegółowe dane ilościowe dotyczące składu białkowego PMR człowieka. Dane te ujęte zostały w tabeli III.

Fisk, Chanutini, Klingman (155) znaleźli w PMR jeszcze jedną komponentę białkową wędrującą szybciej niż frakcja przedalbuminowa. Komponentę tę nazwali „frakcją X₁”. *Schurch* i współ. (117) uważają frakcję PA za kompleks glikoproteidowy składający się z białka i kwasu hialuronowego. *Uzman i Berin*g (134) badali własności frakcji PA i „frakcji X₁”. Zawartość obydwu tych frakcji stanowi 4,4—9,6%

Tabela III

Skład białkowy normalnego płynu mózgowo-
-rdzeniowego wg Booijsa (16)

Frakcja	Zawartość w rel. %	Szybkość wędrowania w polu elektrycznym $\text{cm}^2 \text{sek}^{-1} \text{V}^{-1} \cdot 10^5$
PA	4,6	8,3
A	51,6	6,7
α_1	5,1	5,7
α_2	8,2	4,9
β	16,0	3,7
τ (teta)	6,4	1,3
γ	7,6	0,2

albumin. „Frakcja X_1 ” stanowi znowu 13—35% frakcji PA. Przy pH 5,8 i 4,9 frakcje PA i X_1 rozdzielają się na 5 nowych frakcji, z których dwie nie barwią się błękitem bromofenolowym i czernią amidową a reagują z ninhydryną. We frakcjach tych brak jest aromatycznych aminokwasów, natomiast w dużej ilości występują w nich: kwas asparaginowy, glutaminowy i leucyna. Są to wg ww. autorów mieszaniny kwaśnych peptydów z wysoką zawartością kwaśnych aminokwasów.

Frakcja τ globulinowa jest przez większość badaczy uważana za identyczną z frakcją β_2 globulinową. Frakcja ta, jak sugerują niektórzy autorzy, ma odgrywać dużą rolę w immunologicznych reakcjach ustroju.

Rozkład glikoproteidów w PMR jest podobny do ich rozkładu w surowicy, tj. znajdują się one we wszystkich frakcjach białkowych.

Lipoproteidy są związane przede wszystkim z frakcją α_1 globulinową. Z frakcją β globulinową w odróżnieniu od surowicy wiąże się bardzo mała ilość lipoproteidów. Bauer (9) przypuszcza na tej podstawie, że β -globuliny PMR mają inne własności niż β -globuliny surowicy.

Ogólną zawartość białek w PMR nie jest jednakowa w całej przestrzeni podpajęczynówkowej. Szczególnie zmienną jest zawartość frakcji PA. Ilość tej frakcji maleje, jeżeli pobieramy PMR kolejno z coraz niżej położonych odcinków przestrzeni podpajęczynówkowej. W płynie komorowym jest ona w ilości 13—20 mg⁰%, w płynie otrzymanym z *cisterna cerebri* zawartość jej wynosi 7—13 mg⁰% a w płynie pobranym z okolicy łądzwiowej, mniej niż 7 mg⁰%. Wg Wyma z a l a (154) frakcja PA występuje w ilości 2,5 raza większej w płynie otrzymanym z okolicy podpotylicznej niż w PMR otrzymanym z okolicy łądzwiowej. Przypuszcza się, że podczas krążenia PMR w przestrzeni podpajęczynówkowej frakcja ta ulega wchłonięciu przez komórki opon lub też ulega rozpadowi. Frakcja PA i „frakcja X_1 ” oraz swoista dla PMR esteraza cholinowa, a więc białka nie występujące w surowicy, a spotykane natomiast jako białka tkankowe tkanki

nerwowej, stanowiąc mogą dowód przynajmniej częściowego pochodzenia białek PMR z tkanek centralnego systemu nerwowego.

Porównując skład białkowy PMR ze składem białkowym surowicy można zauważyć, że w PMR jest znacznie większy odsetek β globulin a mniejszy odsetek γ globulin niż w surowicy.

L a c i g a (76) podaje, że u niektórych osobników normalnych w PMR spotyka się znacznie mniejszą ilość β -globulin, a większą ilość albumin. Przyczyna tego zjawiska nie jest jasna. Być może, że wchodzi tu w grę czynniki dziedziczne.

U schizofreników po wyjściu z szoku insulinowego zaobserwowano spadek współczynnika A/G, oraz wzrost odsetkowy β i τ globulin, przy spadku zawartości białek całkowitych (110).

W gruźliczym zapaleniu opon mózgowych stwierdzono wzrost zawartości albumin i β globulin w PMR, a spadek zawartości γ globulin przy braku wszelkich korelacji z obrazem cytologicznym PMR (28). W ostrym stadium zapalenia opon mózgowych następuje wzrost poziomu nukleoproteidów dochodzący do 200 mg % (norma 0,40—0,50 mg %). W okresie zdrowienia zawartość nukleoproteidów w PMR spada (41). B a u d o u i n i L e w i n (8) badali zmiany w obrębie lipoproteidów PMR, u chorych na gruźlicze zapalenie opon mózgowych. Stwierdzili oni, że oprócz lipoproteidu związanego z frakcją α_1 globulinową i lipoproteidu związanego z „frakcją X” występuje β lipoproteid i lipoproteid związany z albuminami. W zapaleniach opon mózgowych skład białkowy PMR bardziej zbliża się do składu białkowego surowicy. K n a p p (66) tłumaczy to uszkodzeniem bariery mózgowo-rdzeniowej.

W syfilisie systemu nerwowego w PMR następuje wzrost zawartości białka (10), a przede wszystkim albumin. To samo potwierdza F l o d o n (44), który zaobserwował jednak jeszcze i wzrost globulin. W wyniku leczenia obraz białkowy PMR normalizuje się.

W stwardnieniu rozsianym V o l k, S a i f e r i R a b i n e r (135) stwierdzili wzrost zawartości γ globulin w PMR, oraz wzrost współczynnika γ globuliny / białka całkowite.

U epileptyków B a u d o u i n i wspł. (7) zauważyli wyraźnie zaznaczony spadek γ globulin i albumin. Z frakcji glikoproteidowych najsilniejsze zabarwienie dawała frakcja związana z β globulinami. Znaleziono też w PMR swoisty glikoproteid wędrujący w polu elektrycznym szybciej od albumin.

Nowe perspektywy elektroforetycznego badania białek PMR otwiera wprowadzona przez F o s s a (47) metoda umożliwiająca badanie składu białkowego płynów o małej zawartości białek (od 1 mg %). Metoda ta oparta jest na jodowaniu białek radioaktywnym jodem (^{131}J) przed podaniem ich badaniu elektroforetycznemu i następnie na wywoływaniu

otrzymanych proteinogramów metodą radioautografii. Metoda ta usuwa więc największą ciągle jeszcze trudność metodyczną, jaką jest duża ilość PMR potrzebna do badania.

Mechanizm powstawania płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniony (33), można jednak przypuszczać, że istnieje pewien stan równowagi chemicznej między PMR, a płynem pozakomórkowym csn (PPK) w ścisłym tego słowa znaczeniu. Tego rodzaju równowaga musi również istnieć między białkami tkankowymi csn a białkami PMR. Dlatego też ze zmian zachodzących w białkach PMR można wysnuć pewne wnioski dotyczące ew. zmian zachodzących w białkach tkanki nerwowej csn, pamiętając jednak, że białka PMR znajdują się również w stanie pewnej równowagi i z białkami surowicy.

Przyjmując częściowe pochodzenie białek PMR z centralnego systemu nerwowego, a więc tym samym dość ścisły ich związek z białkami tkanki nerwowej, co dotyczy zwłaszcza frakcji niespotykanych w surowicy (Frakcja PA i „frakcja X”), można powiedzieć, że badania składu białkowego PMR jest właściwie jedynym sposobem (niedoskonałym zresztą) pośredniego badania niektórych białek csn i zachodzących w nim zmian u człowieka, w warunkach przyżyciowych.

Białka enzymatyczne tkanki nerwowej i płynu mózgowo-rdzeniowego

W mózgu wykryto już od dawna szereg enzymów takich jak amylaza, maltaza, laktaza, sacharaza, fosforylaza, fosfatazy, lipaza, lecytynaza, esteraza cholinowa, anhydraza węglanowa, katalaza, peroksydaza, enzymy proteolityczne, rybo i dezoksyrybonukleaza, enzymy wchodzące w skład systemu cytochromowego, dehydrogenazy, enzymy katalizujące proces glikolizy itp. (124).

Większość z nich znajduje się w szarej substancji. W PMR spotyka się zwiększoną zawartość enzymów najczęściej w stanach patologicznych. Są to enzymy pochodzące bądź z rozpadłych leukocytów i erytrocytów, bądź też z uszkodzonej rozpadającej się tkanki nowotworów systemu nerwowego. Oznaczania aktywności niektórych enzymów w PMR przeprowadza się w celach diagnostycznych. Szczególne znaczenie diagnostyczne przede wszystkim w rozpoznawaniu charakteru nowotworów csn (pierwotne czy wtórne) ma wg Wróblewskiego (153) oznaczenie aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego w PMR. Pewne znaczenie praktyczne może też mieć oznaczenie aktywności transaminaz w PMR.

Mówiąc o lokalizacji enzymów w obrębie systemu nerwowego, należy wspomnieć w pierwszym rzędzie o badaniach Pope'ego i Anfinse-
na (104) nad rozmieszczeniem peptydazy w csn. Autorzy ci wykazali, że

największe nagromadzenie peptydazy ma miejsce w korze półkul mózgowych i korze mózdzku, a więc tam, gdzie jest duże nagromadzenie komórek nerwowych. W rdzeniu przedłużonym, w spoidle wielkim mózgu i w rdzeniu kręgowym zawartość peptydazy jest znacznie niższa. Na tej podstawie można przypuszczać, że peptydaza jako jeden z enzymów proteolitycznych odgrywać może szczególną rolę w procesach dysymilacji białek w centralnym systemie nerwowym.

Próby zlokalizowania w poszczególnych frakcjach białkowych mózgu amylazy, esterazy i fosfatazy podejmowane przez Hofmann i Schinkego (60) zostały omówione już wyżej.

Na uwagę zasługują próby zlokalizowania niektórych enzymów w korze mózgowej, dokonywane metodami histochemicznymi.

Robins E., Smith D., Eydt K., Mc Camam F. (108) zdołali ustalić lokalizację w korze mózgowej małpy (*macacca mulata*) następujących 9 enzymów: kwaśnej i zasadowej fosfatazy, ATP-azy, fosforylaza nukleozydów purynowych, dehydrogenazy kwasu glutaminowego, fumarazy, dehydrogenazy kwasu malonowego, aldolazy i dehydrogenazy kwasu mlekowego. Rozmieszczenie 6 enzymów, a więc fosfatazy, ATP-azy, fumarazy, aldolazy i dehydrogenazy kwasu mlekowego jest mniej więcej takie same jak rozmieszczenie białek w korze mózgowej (107).

W korze ośrodka ruchowego najwięcej tych enzymów jest zlokalizowanych w zewnętrznej warstwie architektonicznej kory (warstwa drobinowa). Począwszy od III warstwy (zewnętrzna warstwa piramidalna) następuje stopniowy spadek aktywności enzymatycznej. W korze analizatora wzrokowego mniej więcej stały poziom aktywności enzymatycznej odnoszącej się do ww. 6 enzymów utrzymuje się do warstwy V-ej (warstwa wielkich komórek piramidalnych Betza), a nawet do warstwy VI-ej (warstwa wielokształtna). Poniżej tej warstwy aktywność enzymatyczna szybko maleje.

W rozmieszczeniu poszczególnych enzymów są jednak pewne różnice. Fosforylaza nukleozydów purynowych największą aktywność wykazuje w I-ej warstwie (warstwa drobinowa) kory ośrodków ruchowych i analizatora wzrokowego. W korze analizatora wzrokowego jest ponowny wzrost aktywności tego enzymu na poziomie warstwy IV-ej (warstwa ziarnista wewnętrzna).

Dehydrogenaza kwasu glutaminowego (DKG) najwyższą aktywność wykazuje również w warstwie I-ej (warstwa drobinowa), szczególnie w korze analizatora wzrokowego. Aktywność tego enzymu w substancji białej jest znacznie mniejsza. Najbardziej bogatą w dehydrogenazę kwasu glutaminowego jest warstwa I-sza (warstwa drobinowa) kory rogu Ammona (128). Aktywność dehydrogenazy kwasu glutaminowego w korze ośrodków ruchowych stopniowo spada w głębszych warstwach kory, ale

znów nieco się podnosi w warstwie V-ej (warstwa wielkich komórek piramidalnych B e t z a). W warstwach VI a i b (warstwa wielokształtna) oraz w warstwie VI-ej (warstwa najniższa) aktywność dehydrogenazy kwasu glutaminowego jest niska. W korze analizatora wzrokowego stopniowy spadek aktywności tego enzymu postępuje aż do warstwy V-ej (warstwa ziarnista wewnętrzna). Ponowny wzrost aktywności daje się zauważyć w warstwach V-ej (warstwa wielkich komórek piramidalnych B e t z a) i VI-ej (warstwa wielokształtna). Dopiero w warstwie VI-ej obserwujemy spadek aktywności enzymu.

Różnice aktywności poszczególnych enzymów w korze ośrodków ruchowych i korze analizatora wzrokowego nie są duże, za wyjątkiem aktywności ATP-azy, która jest o około 33% wyższa w korze analizatora wzrokowego.

Przemiana białkowa w tkance nerwowej

Komórka nerwowa jest komórką nie dzielącą się i, jak się na ogół przyjmuje, nie produkującą żadnej wydzieliny. Można więc przyjąć, że intensywne syntezy białek w komórce nerwowej za wyjątkiem procesu regeneracji nerwu jest związana z niemniej szybkim ich rozpadem i że procesy te są ściśle związane z czynnością komórki nerwowej.

O istnieniu intensywnej biosyntezy białek można było wnosić badając histochemicznie i mikrochemicznie rozmieszczenie kwasu rybonukleinowego w komórkach nerwowych różnych odcinków csn. Kwas ten wydaje się być wskaźnikiem funkcjonalnego stanu komórki nerwowej, grupując się przede wszystkim w komórkach ośrodków filogenetycznie najmłodszych i najbardziej czynnych (120, 121, 125, 126). Kwas ten jest ściśle związany z biosyntezą białka w komórce (5, 17, 24, 51).

Bezpośrednie dowody potwierdzające istnienie intensywnej przemiany białkowej w systemie nerwowym uzyskano jednak dopiero po wprowadzeniu do badań radioaktywnych izotopów, co pozwoliło bezpośrednio określać szybkość odnowy białek i kwasów nukleinowych w tkance nerwowej.

Badania intensywności przemiany białkowej w tkance nerwowej przy pomocy radioaktywnych izotopów są prowadzone w trzech kierunkach:

1. Dążą do określania szybkości odnowy kwasów nukleinowych i fosfoproteidów. W badaniach tych szerokie zastosowanie znajduje radioaktywny izotop fosforu ^{32}P .
2. Dążą do określania szybkości odnowy białek tkanki nerwowej głównie przy pomocy aminokwasów znakowanych ^{35}S i ^{14}C .
3. Zmierzają do określenia szybkości odnowy białkowej komponenty nukleoproteidowych kompleksów.

1. Przy pomocy radioaktywnego fosforu (^{32}P) można śledzić szybkość przemiany 3 rodzajów substancji białkowych, zawierających w cząsteczce fosfor i występujących w tkance nerwowej: rybonukleoproteidów, dezoksyrybonukleoproteidów i fosfoproteidów.

Szybkość włączania się radioaktywnego fosforu w rybonukleoproteidy jest zależna od stanu rozwoju czynnościowego poszczególnych odcinków csn i może być większa w mózdzku u zwierząt znajdujących się na tym stopniu rozwoju ewolucyjnego, kiedy czynnościowo mózdzek dominuje jeszcze nad korą półkul mózgowych. Skwirskaja i Silicz (121) zaobserwowały to u królików a Krawczyński i współ. (70) u białych myszek. Substancja biała cechuje się również intensywną przemianą kwasu rybonukleinowego, co może wg Pałładina (97) być dowodem na to, że nie jest ona tylko inertną częścią csn. Władimirow (145) kwestionuje niektóre dane Pałładina i jego współ. (94a) odnoszące się do szybkości odnawiania się fosforu w kwasie dezoksyrybonukleinowym (DN) w tkance nerwowej. Uważa on, że przemiana dezoksyrybonukleoproteidów w mózgu jest bardzo powolna i wynosi wszystkiego 0,7% w ciągu 24 godzin. Pałładin i współ. (94a) twierdzą natomiast, że wyraźną ich odnowę (sądząc po szybkości włączania ^{32}P) można zauważyć już po 4 godzinach.

Szczególnie wysoką szybkością odnowy fosforu cechuje się frakcja fosfoproteidów. Szybkość odnowy fosforu tejże frakcji jest rzędu szybkości odnowy fosforu tak labilnych połączeń jak w ATP i fosforeaktywna (145).

Badania nad przemianą fosfoproteidów w csn. prowadzą m. in. Lisowska, Engelhardt (37, 38, 79, 80), oraz Heald (58).

Engelhardt i Lisowska ustalili, że szybkość odnowy fosforu w fosfoproteidach jest większa niż w nukleoproteidach, i że przemiana fosfoproteidów zależy od prawidłowego przebiegu procesów utleniania w komórce, a przede wszystkim od oksydatywnej fosforylacji. Istnieje współzależność między przemianą ATP a przemianą fosfoproteidów. Wszystkie substancje powodujące rozpad ATP w komórce hamują przemianę fosfoproteidów. Ostatnio Heald (58) wykazał, że drażnienie skrawków mózgu świnki morskiej impulsami elektrycznymi powoduje wzrost odnowy fosforu fosfoproteidów. Inne połączenia zawierające fosfor wchodzący w skład tzw. frakcji fosforu nierozpuszczalnego w kwasach nie wykazują w tych warunkach żadnych zmian szybkości odnowy ich fosforu. Opisane przez Healda zmiany zachodzą już w ciągu 10 sek.

Włączenie radioaktywnego fosforu w fosfoproteidy musi być zabezpieczone jak już wspomniano, normalnym przebiegiem procesów metabolicznych dostarczających energii. Proces glikolizy ze względu na małą

jego wydajność energetyczną nie jest wystarczającym zabezpieczeniem energetycznym dla przemiany fosfoproteidów (80).

Władimirow i współ. (146) kwestionują dane uzyskane przez Engelhardta i Lisowską (37, 38, 79, 80). Wg nich wyizolowanie fosfoproteidów metodą Schmidta i Thannhausera (115) z następowym wytrąceniem pochodzącego z fosfoproteidów fosforu nieorganicznego met. Delory (31) prowadzi do uzyskania wyższych aktywności właściwych skutkiem obecności w osadzie radioaktywnych organicznych połączeń fosforowych nie związanych z fosfoproteidami. Istotną aktywność właściwą fosfoproteidów można określić przez wyekstrahowanie fosforu fosfoproteidów izobutanołem, po uprzednim przeprowadzeniu go w błękit molibdenowy. Względna aktywność właściwa po upływie 2 godzin od chwili wprowadzenia izotopu jest o połowę niższa niż względne aktywności właściwe podawane przez Engelhardta i Lisowską (37, 38, 79, 80) oraz Skwirską (121) i wynosi zamiast 80—100% tylko 30—40%.

Władimirow i współ. (147) przy pomocy ^{32}P określali szybkość odnowy fosforu w otrzymanej przez nich frakcji X. Stwierdzili oni, że szybkość odnowy P w tejże frakcji będącej lipoproteidem jest rzędu szybkości odnowy fosfoproteidów i zależy od stanu czynnościowego systemu nerwowego. (Jest obniżona w śnie narkotycznym, a podwyższona przy pobudzeniu systemu nerwowego).

Szybkość włączania radioaktywnego fosforu w kwasy nukleinowe i fosfoproteidy w różnych odcinkach csn i w różnych stanach funkcjonalnych określały Skwirskaja i Silicz (121). Autorki te wykazały m. in., że w stanie długotrwałego pobudzenia csn prądem elektrycznym (u szczura) lub też spowodowanego sztuczną bezsennością, włączanie radioaktywnego fosforu w kwas rybonukleinowy jest wolniejsze w porównaniu z kontrolą. Obniżenie intensywności włączania ^{32}P najsilniej występuje w ciągu pierwszych godzin po podaniu izotopu. Powyższe fakty świadczą o tym, że nadmierne pobudzenie csn doprowadza do obniżenia jego aktywności czynnościowej („hamowanie ochronne” Pawłowa), co znajduje również odbicie i w natężeniu metabolizmu kwasów nukleinowych.

Obniżenie szybkości włączania ^{32}P w kwasy nukleinowe i fosfoproteidy zaobserwowały też Skwirskaja i Silicz (122, 122a) i u zwierząt znajdujących się w stanie snu zimowego. Sztuczne przebudzenie susłów zwiększyło szybkość włączenia się ^{32}P , która jednak nie osiągała normalnego poziomu. W śnie narkotycznym wywołanym mieszaniną medinalu i uretanu Skwirskaja i Silicz (123) obserwowały zmniejszenie szybkości włączenia ^{32}P w kwasy nukleinowe i fosfoproteidy. Zaobserwowano też w tych warunkach obniżenie o 15—30% przenikania ^{32}P przez barierę mózgowo-rdzeniową. Zmiany szybkości włączania ^{32}P w kwas rybonukleinowy przebiegają równoległe ze zmianami aktywności

rybonukleazy. Aktywność dezoksyrybonukleazy nie ulega natomiast w tych warunkach zmianie, co pozwala wyprowadzić wniosek (121), że rozpad kwasu DN nie jest procesem znamionym dla jego udziału w metabolizmie tkanki nerwowej.

S m i r n o w (125, 126) przeprowadzał na psach badania mające na celu ustalenie wpływu, jaki wywierać może sen fizjologiczny na proces odnowy fosforu w kwasie RN w różnych okolicach kory mózgowej. Stwierdził on, że w czasie snu we wszystkich przebadanych okolicach kory (okolica ruchowa, wzrokowa, słuchowa i rdzeń przedłużony) szybkość odnowy jest obniżona, przy czym największe obniżenie daje się zauważyć w okolicy ruchowej (kora ośrodków ruchowych) i w rdzeniu przedłużonym. Obniżenie szybkości odnowy fosforu w kwasie RN w korze analizatorów słuchowych i wzrokowych w czasie snu fizjologicznego jest niewielkie. Odpowiada to w pełni stanowi lekkiego zahamowania tych ośrodków w czasie fizjologicznego snu u psa. Pobudzenie dźwiękowe analizatora słuchowego powoduje wzrost szybkości odnowy fosforu w kwasie RN wyizolowanym z odpowiadającego analizatorowi słuchowemu odcinka kory mózgowej.

K r e p s (74) metodą mikrospektografii stwierdził, że w stanach hypoksji (kamera barometryczna) w komórkach kory mózgowej następuje spadek zawartości rybonukleoproteidów zarówno jądrowych jak i cytoplazmatycznych.

Jedynym procesem, w którym synteza białek w komórce nerwowej doprowadza do wzrostu masy białkowej jest proces regeneracji nerwu. Ilość zregenerowanego w czasie tego procesu białka we włóknie osiowym może przewyższać o około 1000 razy ilość wszystkich białek cytoplazmy. Po przecięciu nerwu następuje daleko idące zmniejszenie zawartości kwasu RN w komórce nerwowej przy równoczesnym obniżeniu zawartości białka całkowitego. W następnym stadium regeneracji wzrasta zawartość kwasu RN w komórce, w mniejszym stopniu kwasu DN (25). Następnie wzrasta ilość białek całkowitych i nukleoproteidów we włóknie nerwowym. Istnieje pogląd, że są to białka wyprodukowane w komórce nerwowej, które następnie wywędrują do włókna. To samo ma dotyczyć i kwasów nukleinowych (39, 15, 142).

2. Szybkość syntezy i rozpadu właściwych białek można określić znając radioaktywnymi izotopami związku, wchodzące bezpośrednio w skład cząsteczki białka, a więc najlepiej aminokwasy.

Aminokwasy znakowane radioaktywnym izotopem siarki ^{35}S (metionina, cysteina), oraz radioaktywnym węglem ^{14}C (glicyna, tyrozyna) były często stosowane w tego rodzaju badaniach.

Miarą szybkości syntezy białka w ustroju mogą być tzw. krzywe odnowy białka, znane od czasów badań prowadzonych przez S c h o e n h e i m e r a i jego szkołę. Krzywe takie wykreślone na układzie współrzędnych,

uwzględniającym zależność aktywności właściwej badanego białka od czasu, jaki upłynął od chwili wprowadzenia izotopu do ustroju zwierzęcia, składają się zwykle z dwu ramion: ramienia wstępującego, zakończonego, maximum i ramienia zstępującego. Ramię wstępujące odpowiada procesowi gromadzenia się znakowanego aminokwasu w białku, w wyniku jego wbudowywania się w nowopowstające cząsteczki białka. Ramię zstępujące odpowiada procesowi wydalania znakowanego aminokwasu w wyniku rozpadu cząsteczek białka, zawierających ten aminokwas.

Tarver i Morse (131) pierwsi badali szybkość włączenia się znakowanej metioniny w białka mózgu. Stwierdzili oni, że u szczura włącza się ona w białka mózgu, znacznie wolniej niż w białka wątroby czy też nerek. Podobne wyniki osiągnęli stosując znakowaną radioaktywnym izotopem węgla ^{14}C , tyrozynę Winnick, Friedberg i Greenberg (144). Wprowadzono stąd wniosek, że białka mózgu cechują się znacznym stopniem inertności. Wniosek ten okazał się całkowicie fałszywym, ponieważ nie wzięto pod uwagę wpływu bariery mózgowo-rdzeniowej decydującej o szybkości przechodzenia aminokwasu z krwi do płynu pozakomórkowego csn. Gaitonde i Richter (48, 49) uważają, że o inertności białek mózgu można by mówić tylko wtedy, jeżeli radioaktywność frakcji rozpuszczalnej w kwasach będącej rezerwuarem, z którego komórki mogą pobierać znakowany aminokwas, byłaby duża. Natomiast mała aktywność właściwa białek mózgu przy małej aktywności właściwej frakcji rozpuszczalnej w kwasach (a tak jest przy dootrzewnowym i dożylnym podaniu aminokwasu) nie jest wcale dowodem inertności białek, a raczej świadczy o ograniczeniu dowozu aminokwasów z krwi do płynu pozakomórkowego centr. systemu nerwowego poprzez barierę mózgowo-rdzeniową.

Gaitonde i Richter (48, 49) w latach 1955 i 1956 wykonali badania nad aktywnością metaboliczną białek mózgu uwzględniając m.in. zagadnienie bariery mózgowo-rdzeniowej. W jednej serii doświadczeń metionina znakowana ^{35}S była podawana szczurom dootrzewnowo. Stwierdzono wówczas, że istotnie włączanie metioniny w białka mózgu zachodzi powoli i w mniejszym stopniu niż w białka nerek, czy też wątroby. Aktywność właściwa frakcji rozpuszczalnej w kwasach początkowo wyższa niż aktywność białek mózgu stopniowo spada, podczas gdy aktywność białek mózgu rośnie, co świadczy o pobieraniu metioniny przez komórki nerwowe z tejże frakcji. Zmiany aktywności właściwej białek mózgu są bardzo niewielkie w ciągu dość długiego czasu. (WAW po 6 godzinach — 120, po 24 godzinach — 132; WAW — względna aktywność właściwa).

Przy podaniu radioaktywnej metioniny docysternowo uzyskano szybki wzrost aktywności właściwej białek mózgu, z wysokim maksimum odpowiadającym okresowi około 3 godzin od chwili podania izotopu. W porów-

naniu z innymi tkankami szybkość włączania radioaktywnej metioniny w tkankę mózgową przy docysternowym jej podaniu jest największa. U młodych zwierząt włączanie w białka mózgu jest szybsze i spada z wiekiem (100). Po podaniu barbituranów fenaminy i insuliny (szok insulinowy), jak również po silnym drażnieniu zwierzęcia prądem elektrycznym następuje obniżenie włączania metioniny w białka mózgu. Ten wpływ insuliny Gaitonde i Richter (48, 49) tłumaczą tym, że do włączania metioniny ^{35}S w białka mózgu potrzebna jest glikoza. Spadek szybkości włączania metioniny po silnym drażnieniu prądem elektrycznym nasuwa na myśl stan „pozagranicznego hamowania” Pawłowa.

Pałladin i Wertimer (96) badali proces włączania metioniny znakowanej ^{35}S w różne odcinki centralnego systemu nerwowego kotów. Badania te wykazały, że największą aktywnością cechuje się substancja szara półkul mózgowych i mózdzek, a więc najmłodsze filogenetycznie odcinki systemu nerwowego. Znacznie mniejszą aktywnością białek cechuje się rdzeń przedłużony i substancja biała. Awitaminoza *E* obniża szybkość włączania znakowanej metioniny w białka substancji szarej o około 50%. Rozengardt i Masłowa (112) stwierdzili, że po wywołaniu wstrząsu kardiazolem następuje spadek szybkości włączania znakowanej metioniny w białka mózgu. Mechanizm tych zmian może być podobny jak w przypadku podawania insuliny (niedobór glikozy zużytej podczas skurczów mięśniowych), albo też może być to stan „pozagranicznego hamowania”. Nieczajewa (90, 91, 92) oraz Pałladin, Bielik i Kraczkó (100) nie stwierdzili, ażeby narkotyczny sen wywierał jakikolwiek wpływ na szybkość włączania znakowanej metioniny w białka mózgu szczurów i królików. Działanie prądu elektrycznego na receptory skóry powoduje natomiast zwiększenie szybkości włączania metioniny w tkankę mózgową szczura. Fischer, Kalouszek i Lodin (43) badali stopień włączania metioniny ^{35}S w białka mózgu psa, po upływie 24 godzin od chwili wprowadzenia izotopu. Okazało się, że dwa razy więcej metioniny włączyło się w białka substancji szarej i rdzenia niż w białka substancji białej. Największą aktywnością (szybkością odnowy) cechują się białka mózdzku i kolejno coraz mniejszą aktywnością białka substancji szarej półkul mózgowych, mostu, rdzenia kręgowego i nerwu obwodowego.

Władimirow i Urinson (148) są zdania, że badanie włączania tylko jednego aminokwasu może dać ograniczony i jednostronny obraz procesu odnowy białka.

Proces odnowy białka śledzono również przy pomocy znakowanej radioaktywnym izotopem węgla (^{14}C) glicyny, będącej prekursorem wielu aminokwasów, a m. in. kwasu glutaminowego, aminokwasu niezmiernie ważnego dla prawidłowego funkcjonowania csn. (3, 77, 78, 113, 140). Sa-

dikowa i Skorcewicz (113) ustaliły, że w ciągu 2 godzin po wprowadzeniu szczurom ^{14}C glicyny następuje wzrost aktywności właściwej białek mózgu przy równoczesnym obniżeniu aktywności właściwej frakcji rozpuszczalnej w kwasach. Radioaktywność białek mózgu, jak stwierdzono chromatograficznie, jest spowodowana obecnością w ich cząsteczce nie tylko znakowanej glicyny, ale i innych znakowanych aminokwasów takich jak: seryna, asparagina, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, zsyntetyzowanych już w ustroju z glicyny. Sen farmakologiczny (148) wywołuje zwolnienie procesu włączania się radioaktywności pochodzącej ze znakowanej glicyny w białka mózgu o około 40%, nie wpływając zupełnie, jak wspomniano już wyżej, na proces włączania metioniny. Można przypuszczać, że punktem zaczepienia dla hamującego działania narkotyku jest raczej cykl przemian jakim po wprowadzeniu do ustroju podlega glicyna, niż sam proces włączania aminokwasów w białka.

Szczególne zainteresowanie budzą przeprowadzane ostatnio badania nad gromadzeniem w tkankach organizmu siarczanów znakowanych przy pomocy ^{35}S (34, 106). Wprowadzona dootrzewnowo radioaktywna siarka w formie $\text{Na}_2\ ^{35}\text{S}\text{O}_4$ już po 3 godzinach daje się stwierdzić w mózgu. Po 96 godzinach jest jej w mózgu więcej niż we krwi. Część siarki wprowadzonej w formie siarczanów (około 5%) wchodzi w skład białek mózgu jako składnik aminokwasów siarkowych. Mechanizm procesów prowadzących do redukcji nieorganicznej siarki w tkance mózgowej jest dziś całkowicie nieznan.

3. Jak już wspomniano wyżej w badaniach nad metabolizmem kompleksów nukleoproteidowych posługiwano się przede wszystkim radioaktywnym fosforem (^{32}P), co pozwalało *de facto* określić tylko natężenie metabolizmu kwasu nukleinowego wchodzącego w skład kompleksu. Zastosowanie w charakterze radioaktywnych indykatorów aminokwasów pozwala położyć główny nacisk na przebadanie procesu odnowy białkowej komponenty nukleoproteidowego kompleksu. Krawczyński i Silicz (69) posługując się ^{35}S metioniną badali szybkość włączania się tego aminokwasu we frakcje białkowe otrzymane wg zmodyfikowanej metody Mirskyego i Pollistera (85) odpowiadające jądrowym i cytoplazmatycznym nukleoproteidom. Stwierdzono, że podana podskórnie ^{35}S -metionina (badania przeprowadzano na kotach) po upływie 24 godzin włącza się przede wszystkim w te kompleksy nukleoproteidowe, które dają się ekstrahować roztworami soli. Frakcje białkowe substancji szarej wykazują większą aktywność niż frakcje wyizolowane z substancji białej mózgu. Aktywność białek wyizolowanych z nerwu obwodowego (nerw kulszowy) jest bardzo niska (118). Względna aktywność właściwa białek substancji szarej mózgu wynosi 34,5%, substancji białej mózgu 22,6%, a białek nerwu obwodowego tylko 5,5%.

Kontynuacją tych badań są badania prowadzone przez Krawczyńskiego, Drewnowską, Fleszyńskiego i Rycaja (70), mające na celu otrzymanie krzywych odnowy poszczególnych frakcji białkowych odpowiadających nukleoproteidom wyodrębnionych z mózgu i mózdzku białych myszek. Badania te prowadzono stosując jako indykator podaną dootrzewnowo tyrozynę znakowaną ^{14}C w grupie karboksylowej. Uzyskano dane podobne do danych Gaitonde i Richtera (48, 49). Aktywność właściwa poszczególnych frakcji białkowych mózgu i mózdzku wzrastała powoli, znacznie wolniej niż aktywności analogicznych frakcji białkowych wątroby. Krzywe aktywności wykreślone na podstawie danych eksperymentalnych miały nieostre maksima odpowiadające okresowi 12, 24, 36 a nawet 48 godzin. Po 72 godzinach od chwili podania izotopu otrzymano stan zbliżony do stanu określanego jako „average isotope concentration”. I tutaj najbardziej aktywnymi okazały się frakcje rozpuszczalne w roztworach soli.

Nadzwyczaj wolne przenikanie wskaźnika radioaktywnego przez barierę mózgo-rdzeniową postawiło pod znakiem zapytania celowość tego rodzaju badań. Dlatego też w następnym cyklu badań prowadzonym ze znakowaną ^{35}S metioniną, indykator wprowadzono do-czaszkowo. Kontrolne doświadczenia wykazały, że po upływie 24 godzin aktywność właściwa białek mózgu jest około 60 razy większa, jeżeli izotop został wprowadzony doczaszkowo. Maksimum aktywności właściwej we frakcjach rozpuszczalnych w roztworach soli i w 1 N NaOH jest osiągnięte już po trzech godzinach. Najbardziej aktywne są frakcje odpowiadające nukleoproteidom rozpuszczalnym w 0,14 M NaCl i 1 N NaOH. Frakcje białkowe mózdzku są u królika na ogół bardziej aktywne niż analogiczne frakcje substancji szarej mózgu.

Podobne badania przeprowadzili w ostatnim czasie Clouet i Richter (27). Autorzy ci homogenat tkanki mózgowej rozdzielali ultrawiraniem na frakcje: jądrową, mitochondrialną i mikrosomalną.

Z frakcji tych przy pomocy 1 M NaCl i 1 N NaOH wydzielali poszczególne białka, które określali jako frakcje białkowe A, B, C. Po doczaszkowym podaniu znakowanej ^{35}S metioniny najwięcej radioaktywności nagromadza się w mikrosomalnym nukleoproteidzie rozpuszczalnym w 1 N NaOH (Frakcji B). Autorzy wysuwają interesującą hipotezę, że nukleoproteid ten koncentruje najpierw na sobie aminokwasy pochodzące z frakcji rozpuszczalnej w kwasach i dopiero potem przekazuje je innym białkom.

Z zestawienia wyników badań nad intensywnością przemiany kompleksów nukleoproteidowych uzyskanych przy zastosowaniu ^{32}P ^{35}S lub ^{14}C widać, że aczkolwiek korelacja wyników jest dość znaczna, to jednak są i rozbieżności. Np. znacznej inercji kwasu DN odpowiada duża stosun-

kowo aktywność naszej frakcji C, zawierającej przeważnie dezoksyrybonukleoid. Istnieje też znacznego stopnia heterochronizm przemiany nukleoproteidów określanej przy pomocy ^{32}P i ^{35}S lub ^{14}C po pozaczaskowym podaniu indykatora. Przemiana białkowej komponenty wydaje się opóźnioną w tych warunkach. Pozwala to przypuszczać, że albo znakowany nieorganiczny fosforan łatwiej przechodzi barierę mózgowo-rdzeniową niż znakowany aminokwas, albo też tempo przemiany obydwu komponent nukleoproteidu nie jest jednakowe. Prawdopodobniejszą jest pierwsza możliwość.

Z omówionych faktów widać, że przemiana białkowa w tkance nerwowej jest bardzo żywa. Istnieje też korelacja między natężeniem tej przemiany, a stanem funkcjonalnym systemu nerwowego. Odcinki systemu nerwowego najbardziej czynne i najmłodsze filogenetycznie cechują się najżywszą przemianą białkową. Zahamowanie czynności tkanki nerwowej, czy też jej pobudzenie pociąga za sobą zawsze zwolnienie lub przyspieszenie przemiany białkowej. Przemiana białkowa polegająca na ustawicznej syntezie i rozpadzie cząsteczek białka w komórkach nerwowych, nie pociągająca za sobą przyrostu masy białkowej, jest zabezpieczona energetycznie przez procesy oksydatywnej fosforylacji. Pozbawienie tkanki nerwowej dopływu tlenu czy też glikozy pociąga za sobą zahamowanie syntezy ATP, a po wyczerpaniu jego rezerw, szybki rozpad białek w komórce nerwowej i tym samym pojawienie się nieodwracalnych zmian struktury komórkowej (50).

Białka tkanki nerwowej w procesie ontogenezy

Mac Ilwain (63), Krepes i współpr. (73) rozróżniają 4 okresy ontogenetycznego rozwoju mózgu.

Okres I, który kończy się przejściem neuroblastów w niedojrzałe jeszcze neurony. W końcu tego okresu w korze mózgowej można już wyróżnić V warstw komórkowych (56, 101, 130).

Okres II cechujący się wzrostem rozmiarów neuronów i pojawieniem się wypustek komórkowych. W cytoplazmie pojawiają się ciała Nissla, których ilość stopniowo wzrasta.

Okres III, w którym postępuje dalszy wzrost i różnicowanie się komórek nerwowych i rozpoczyna się proces mielinizacji.

Okres IV zwany okresem mielinizacji, w którym zasadniczo kończy się rozwój komórki nerwowej.

Można by jeszcze wyróżnić okres V — starzenia się komórki nerwowej, cechujący się pojawieniem się w komórce barwników pterydowych: lipochromu i lipofuscyny (62, 129), oraz zmniejszeniem ilości kwasu RN.

Czas trwania każdego z tych okresów jest różny u różnych gatunków zwierząt. Np. w chwili urodzenia u szczura i gawrona kończy się I okres rozwojowy mózgu, u człowieka II okres, a u kurczęcia i świnki morskiej III — okres.

Zasadniczą cechą ontogenetycznego rozwoju mózgu jest spadek w nim zawartości wody (53). Spadek ten jest mniej więcej jednakowy we wszystkich odcinkach centralnego systemu nerwowego, tak że początkowo istniejące różnice uwodnienia zostają zachowane. Grawes i Himwich (53) uważają, że najmłodsze filogenetycznie odcinki csn, zawsze są w większym stopniu uwodnione niż oddziały filogenetycznie starsze.

Równoległe ze zmniejszeniem stopnia uwodnienia postępuje zmniejszenie względnej zawartości białek w tkance nerwowej.

Skwirskaja i Silicz (121) przebadaly zawartosci fosfoproteidów w mózgu w różnych okresach rozwoju ontogenetycznego królika. Najwyraźniej zaznaczony spadek zawartości fosfoproteidów — prawie pięciokrotny następował z końcem I okresu. Skwirskaja, Silicz i Czepinoga (119) przebadali też zawartość kwasów nukleinowych w mózgu w procesie ontogenezy. Stwierdzili oni, że wysoka w I okresie zawartość kwasów nukleinowych w tkance nerwowej szybko spada z końcem I okresu, przy czym spadek kwasu DN jest znacznie większy niż spadek kwasu RN. Spadek zawartości kwasów nukleinowych ma miejsce i w następnych okresach rozwojowych, jest już jednak wtedy stosunkowo nieznaczny.

Zmniejszenie zawartości białka i kwasów nukleinowych w tkance nerwowej jest związane z procesem dyferencjacji białek przejawiającej się we wzroście aktywności enzymatycznych. Z końcem II okresu następuje szybki wzrost aktywności niektórych enzymów takich jak: dehydrogenaza kwasu bursztynowego, oksydaza cytochromowa, ATP-aza, esteraza cholinowa. Maksimum aktywności tych enzymów zostaje osiągnięte dopiero u dorosłego zwierzęcia. Ciekawie zachowuje się dezoksyrybonukleaza. Aktywność tego enzymu jest szczególnie wysoka w I okresie rozwojowym (98, 121) następnie nieco spada i ponownie rośnie w okresie pojawienia się nowych funkcji systemu nerwowego (widzenie). Zupełnie odmiennie od innych enzymów zachowuje się kwaśna fosfataza, aktywność jej spada znacznie z końcem III okresu rozwojowego. Zjawisko to do chwili obecnej nie jest wyjaśnione.

Enzymy niższych odcinków centralnego systemu nerwowego zachowują się w procesie ontogenezy nieco inaczej. Wzrost ich aktywności następuje we wcześniejszych okresach rozwojowych. Z chwilą jednak, gdy enzymy kory mózgowej, czy też mózdkowej osiągną już odpowiednio wysoki stopień aktywności, aktywność enzymów w tych odcinkach (rdzeń przedłużony, rdzeń kręgowy) spada. (Dominowanie kory mózgowej (73)).

Intensywność przemiany białkowej w różnych organach w przebiegu ontogenezy była przedmiotem licznych badań (93, 114). Przemianą białek w centralnym systemie nerwowym w czasie ontogenezy zajmowali się Gaitonde i Richter (41, 49), Greenberg i współ. (54), Pałladin, Bielik, Kraczkó (100). Zgodnie stwierdzono, że we wcześniejszych okresach rozwojowych csn przemiana białek jest intensywniejsza i spada z wiekiem. Według Pałladina i współ. (100) mogą być pewne wahania w intensywności przemiany białkowej. Czasowy wzrost intensywności przemiany białkowej w tkance mózgowej jest zwykle związany z pojawieniem się nowych funkcji organizmu.

Przemiana białkowa w tkance nerwowej a jej funkcja

Od dawna znanym jest fakt, że w wyniku pobudzenia centralnego systemu nerwowego wzrasta w nim zawartość amoniaku (21, 22, 23, 87, 105, 132, 136, 137, 138, 139). Na podstawie szczegółowych badań Władimirowej (150) można twierdzić, że zawartość amoniaku w mózgu może być uważana za wskaźnik funkcjonalnego stanu csn. Najmniejszą zawartość amoniaku spotyka się w stanach zahamowania csn. Zmiany w zawartości amoniaku w mózgu towarzyszą nawet stanom warunkowego hamowania i pobudzenia (149, 151). Wyraźny (przeszło 10-krotny) wzrost zawartości amoniaku w mózgu ma miejsce po dekapitacji zwierzęcia.

W systemie nerwowym amoniak może powstawać w wyniku następujących procesów: a) przez dezaminację kwasu adenilowego, b) w wyniku działania glutaminazy powodującej przejście glutaminy w kwas glutaminowy, i c) w wyniku działania dehydrogenazy kwasu glutaminowego katalizującej przejście kwasu glutaminowego w kwas α -iminoglutarowy, z którego spontanicznie z uwolnieniem amoniaku powstaje kwas α -ketoglutarowy.

Żaden z tych procesów nie wyjaśnia jednak niezwykle szybkiego powstawania amoniaku w czasie czynnościowego pobudzenia tkanki nerwowej (141).

V r b a (136, 137, 138, 139) proces tworzenia amoniaku łączy z powstawaniem szybkich odwracalnych zmian w strukturalnych elementach tkanki nerwowej, a więc w białkach podając tzw. „hipotezę cyklu kwasu glutaminowego”.

Pobudzenie centralnego systemu nerwowego (zwane przez niego „pobudzeniem rozproszonym”) wywołał V r b a przez umieszczenie szczurów w naczyniu z wodą i zmuszenie ich w ten sposób do kilku godzinnego pływania. Biochemiczny obraz mózgu był utrwalony przez zanurzenie

żywego szczura w ciekłym powietrzu. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń V r b a stwierdził:

- a) zmniejszenie ilości grup amidowych w białkach mózgu,
- b) wzrost zawartości amoniaku w tkance mózgowej,
- c) wzrost stężenia wolnej glutaminy w mózgu,
- d) spadek stężenia kwasu glutaminowego w mózgu,

Na podstawie tych faktów przyjmuje, że tworzenie i usuwanie amoniaku z tkanki mózgowej w czasie pobudzenia i spoczynku centralnego systemu nerwowego zachodzi według następującego mechanizmu.

Amoniak odszczepia się w czasie czynności tkanki nerwowej z grup amidowych „związanej” w cząsteczce białka glutaminy, która tym samym przechodzi w „związany” kwas glutaminowy. Uwolniony amoniak będący czynnikiem toksycznym dla tkanki mózgowej wiąże się szybko z występującym w dużych ilościach w mózgu wolnym kwasem glutaminowym i w ten sposób przychodzi do powstania wolnej glutaminy. W okresie spoczynku centralnego systemu nerwowego zawartość wolnej glutaminy w mózgu spada. Glutamina jest bowiem według V r b y zużywana do re-syntezy białek tkankowych.

Omówiona hipoteza może budzić pewne zastrzeżenia, ale w zasadzie jest bardzo przekonująca.

Wielką zasługą V r b y jest eksperymentalne udowodnienie poglądu, że czynność nerwowa jest związana ze zmianami strukturalnymi białek tkanki nerwowej.

Aczkolwiek już wcześniej wypowiadał tego rodzaju poglądy N a s o n o w (88) formułując teorię t.zw. „paranekrozy”, oraz K o s z t o j a n c i wspł. (67) w swojej teorii o znaczeniu grup SH białek systemu nerwowego w przebiegu czynności tkanki nerwowej, to jednak nie umniejsza to pionierskiego znaczenia prac V r b y wyjaśniających dostatecznie dokładnie i wiarogodnie ogólnobiologiczne zjawisko jakim jest powstawanie amoniaku w tkance nerwowej i związane z tym zmiany strukturalne białek systemu nerwowego.

Zjawisko to zachodzi na wszystkich szczeblach rozwoju ewolucyjnego systemu nerwowego aż do człowieka włącznie (powstawanie amoniaku w stanach drgawkowych np. w rzucawce porodowej i usuwanie toksycznych skutków jego działania przez podawanie kwasu glutaminowego).

Hipoteza V r b y (136, 137, 138, 139) wymaga jednak pewnych uzupełnień. V r b a mówi wprawdzie o tym, że przy zwiększonej aktywności systemu nerwowego zachodzi rozpad cząsteczek białka w tkance nerwowej, a synteza nowych cząsteczek w stanie spokoju lub zahamowania systemu nerwowego to jednak stojąc na gruncie danych eksperymentalnych musi wypowiadać się dość ogólnikowo.

Nawiązując jednak do znanych obecnie faktów eksperymentalnych można sformułować pewne sugestie dotyczące całokształtu mechanizmu czynności nerwowej.

Modyfikacja struktury białek systemu nerwowego w sensie udowodnionym przez V r bę, polegająca na odszczepieniu amoniaku z grup amidowych związanej glutaminy, a więc na przejściu elektro-dodatnich grup $-\text{CONH}_2^+$ w grupy elektroujemne $-\text{COO}^-$ wydaje się być związana ze stanem doraźnego pobudzenia systemu nerwowego. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że w komórce nerwowej tego rodzaju przemianie nie podlegają na raz wszystkie grupy amidowe białka. Nie jest również wykluczone, że podobną rolę jak grupy amidowe związanej glutaminy mogą odgrywać i grupy amidowe związanej asparaginy i że w mechanizmie powstawania amoniaku w systemie nerwowym i jego usuwania może uczestniczyć i „cykl kwasu asparaginowego”. Tak więc stopień polaryzacji cząsteczek białka wywołany przez odszczepienie amoniaku z grup amidowych jest z jednej strony zależny od natężenia bodźca wywołującego pobudzenie (149, 150, 151, 152): więcej amoniaku tworzy się przy bezwarunkowym pobudzeniu, a mniej przy pobudzeniu odruchowo-warunkowym, a z drugiej strony od struktury elementarnej (skład aminokwasowy cząsteczki białka) i wreszcie od struktury przestrzennej cząsteczek białka. Ta ostatnia bowiem decyduje o ułożeniu w przestrzeni naładowanych elektrycznie bocznych ugrupowań a więc tym samym o natężeniu pól elektrycznych powstających między elektroujemnie i elektro-dodatnie naładowanymi grupami. Rozłożenie tych pól w obrębie tkanki nerwowej możnaby traktować, jako rzutowanie struktury przestrzennej tworzących ją białek i jako źródło prądów bioelektrycznych zarówno spontanicznych jak i pojawiających się w czasie czynności tkanki nerwowej.

Zmiana struktury cząsteczki białka wywołana przejściem grup amidowych w grupy karboksylowe może być pierwszym etapem rozpadu danej cząsteczki białka, który doprowadza do zaniku aktualnie istniejących pól elektrycznych. W wyniku natychmiastowej syntezy analogicznej cząsteczki białka tego rodzaju układ pól elektrycznych może tworzyć się od nowa i z kolejnym jej rozpadem ponownie zanikać. Przyjęty punkt widzenia potwierdzają wspomniane wyżej wyniki badań P o p e g o i A n f i n s e n a (104) ukazujących największe nagromadzenie się peptydaz w najbardziej czynnych ośrodkach systemu nerwowego. Przy działaniu ciągle tego samego bodźca zjawiska chemiczno-fizyczne związane z czynnością nerwową miałyby więc charakter pulsujący. Na ustawiczną syntezę białka komórka nerwowa musi zużywać wiązania wysokoenergetyczne, których ilość przy długotrwałym działaniu lub przy zadziałaniu bodźca zbyt silnego może ulec wyczerpaniu. W tym wypadku procesy syn-

tezy białka „funkcjonalnego” mogą ulec zwolnieniu, a następnie zahamowaniu z równoczesnym zahamowaniem tworzenia wolnego amoniaku. Odbiciem tych procesów może być stan hamowania poza-granicznego ze zmniejszoną produkcją amoniaku opisany przez Władimirową (149, 150, 151, 152). Analogicznie możnaby wyjaśnić i powstawanie zmęczenia.

Byłoby pożytecznym dla dalszych rozważań przeprowadzenie rozróżnienia między białkami strukturalnymi i białkami „funkcjonalnymi” systemu nerwowego, oraz między przemianą plastyczną i funkcjonalną białek mózgu, jak sugerują to Rosengard i Masłowa (112).

Pod pojęciem białek funkcjonalnych autorzy ci rozumieją białka, które ulegają rozpadowi i są syntetyzowane w wyniku czynności tkanki nerwowej. Przemiana tych białek byłaby więc „przemianą funkcjonalną”. Białka te miałyby charakter połączeń bardzo labilnych, niezmiernie szybko rozpadających się po śmierci zwierzęcia. Nawet w wypadku błyskawicznego utrwalenia struktury chemicznej mózgu (np. przez zamrożenie zwierzęcia ciekłym powietrzem lub ciekłym azotem) białka „funkcjonalne” ulegałyby rozpadowi podczas samego procesu ich izolowania. Uniemożliwiłoby to badanie ich przemiany nawet przy pomocy radioaktywnych izotopów. Wydaje się, że przy obecnym stanie rozwoju metodyki biochemicznej białka „funkcjonalne” systemu nerwowego (o ile oczywiście istnieją) nie mogą być dostępne bezpośrednio badaniu.

Moment pojawienia się białek „funkcjonalnych” w mózgu w rozwoju ontogenetycznym odpowiadałby momentowi pojawienia się samoistnej i czynnościowej aktywności elektrycznej mózgu, a więc miałyby miejsce w końcowym etapie I-go okresu rozwojowego.

Własności i struktura białek „funkcjonalnych” decydowałaby o „profilu funkcjonalnym” centralnego systemu nerwowego. U zwierząt znajdujących się na niższych szczeblach rozwoju filogenetycznego i w starszych filogenetycznie odcinkach układu nerwowego zwierząt wyższych i człowieka, struktura i własności białek „funkcjonalnych” byłyby w znacznym stopniu niezmiennie. Innymi słowy matryca nukleinowa determinująca ich strukturę byłaby jednakowa w ciągu całego życia danego osobnika. Odbiciem tego stanu byłoby mniej więcej jednakowe reagowanie organizmu na dany bodziec czynnością prostą lub zespołem czynności (działanie odruchowe i instynktowe).

W wyższych odcinkach centralnego systemu nerwowego szczególnie tam gdzie powstają nowe asocjacje i wytwarzają się odruchy warunkowe, matryce białek „funkcjonalnych” nie miałyby ustalonych raz na zawsze własności. W czasie wytwarzania się nowych odruchów warunkowych mogłyby powstawać nowe matryce z kwasów nukleinowych warunkujące powstawanie nowych białek „funkcjonalnych”.

Być może, że według podobnego mechanizmu, prawdopodobnie tylko znacznie bardziej skomplikowanego przebiegają najwyższe czynności systemu nerwowego, takie jak uczenie się, pamiętanie, myślenie itp.

Zdolność systemu nerwowego do możliwie różnorodnych zmian własności matryc nukleinowych lub do syntezy nowych matryc, decyduje być może o sprawności systemu nerwowego i o inteligencji osobnika.

O tym, że synteza nowych matryc nukleinowych jest możliwa w okolicznościach kiedy dla ustroju potrzebnym jest wytworzenie nowego białka świadczyć mogą wyniki jednej z ostatnich prac K r a m e r a i S t r a u b a (68). Autorzy ci stwierdzili, że u drobnoustroju *Bacillus cereus* syntezę nowego enzymu adaptacyjnego -penicylinyazy poprzedza synteza odpowiedniego kwasu nukleinowego.

Wiele faktów przemawia za tym, że psychozy są rezultatem zaburzeń w syntezie białek „funkcjonalnych” w najwyższych odcinkach centralnego systemu nerwowego. Świadczyć o tym mogą m. inn. dane H y d e n a i H a r t e l i u s a (61) o zmniejszeniu zawartości kwasu RN w komórkach zwojowych schizofreników. Autorzy ci stwierdzili też, że podanie nitrylu malonowego, wywierającego pewne działanie lecznicze w przebiegu schizofrenii powoduje wzrost zawartości kwasu RN w komórkach nerwowych i prawdopodobnie związaną z tym poprawę przebiegu procesów syntezy białek.

Doświadczalne udowodnienie przedstawionych wyżej poglądów na mechanizm funkcji nerwowej jest przy dzisiejszym poziomie metodyki badań biochemicznych w zasadzie niemożliwe, zwłaszcza gdy rozchodzi się o udowodnienie istnienia białek „funkcjonalnych” w csn.

Dlatego też poglądy te należy raczej traktować jako jedną z wielu możliwych hipotez roboczych, opartą w dużym stopniu na spekulacji i mogącą zaledwie służyć jako punkt wyjścia dalszych prac eksperymentalnych w dziedzinie „funkcjonalnej biochemii mózgu”.

LITERATURA

1. Abercrombie M., Johnson M. — J. Neurol., Neurosurg. Psychiatr. 9, 113, 1946.
2. Albert S. — cyt. wg. Lisowskiej, Diss., Moskwa 1954; Cancer Presarch 11, 772 1951.
3. Anderson E., Stekel J. — J. Biol. Chem. 202, 611, 1953.
4. Arginis A. — Z. f. Physiol. Chem. 54, 86, 1907, cyt. wg Rossitera (11).
5. Askonas B., Simkin J., Work T. — Biochem J. 62, 40P, 1956.
6. Baas — cyt. wg. Lisowskiej, Diss, Moskwa 1954.
7. Baudouin A. — Compt Rend. Soc. Biol. 148, 1033, 1954.
8. Baudouin A., Lewin J. — Compt. rend. Soc. Biol. 149, 1093, 1955.
9. Bauer H. — Klin. Wechschr. 32, 612, 1954.

10. Biadini R., Radicchi M. — *Rassogn. studi psych.* **44**, 674, 1955, R. Ż. 1956.
11. Biełozierskij A. — *Dissert, Moskwa 1944*, cyt. wg. Mamoiłowa (84).
12. Block R. — *J. Biol. Chem.* **94**, 643, 1932.
13. Blumson W. — *Biochem. Ż* **65**, 138, 1957.
14. Błock P., Bollind D. — *Aminokislótnyj sostaw białkow w puszczewych produktach*, 75, 77, 1949.
15. Bodian D., Mellors R. — *J. Biol. Chem.* **167**, 655, 1947.
16. Booiij J. — *Elektrophorese in der Neurologie w mon. Antwilera*, str. 190, Berlin 1957.
17. Borsook H., Dubnoff J. — *J. Biol. Chem.* **167**, 655, 1947.
18. Brik I. — *Wiestn. Leningr. Uniwers.* **10**, 57, 1955.
19. Brachet J. — *Symp. Soc. Exper. Biol.* **1**, 207, 1947.
20. Broun R. — *Wiestn. Leningr. Uniwers.* **10**, 67, 1955.
21. Budanowa A. — *DAN ZSRR* **75**, 875, 1950.
22. Budanowa A. — *Wopr. Med. Chim.* **1**, 190, 1955.
23. Budanowa A. — *Izw. AN ZSRR Ser. biol. Nr. 6*, 80, 1955.
24. Caldwell P. i wsp. — *J. Chem. Soc.* 3156, 1950.
25. Causey G., Stratmann C. — *Proc. Roy. Soc. (B)* **144**, 520, 1956.
26. Chatagnan C. i wsp. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 419, 1953.
27. Clouet D., Richter D. — *Biochem. J.* **65**, 20, 1957.
28. Cutronen A. — *Aggier. pediatr.* **6**, 333, 1955 RŻ. 19416, 1956.
29. Danilewskij A. — *Rusk. Fizjoł. Żurn.*, **2**, 128, 1919, cyt. wg. Pałładina (95).
30. Davidson J. — *Bull. Soc. Biol.* **35**, 49, 1952.
31. Delory G. — *Biochem. J.* **32**, 1161, 1938.
32. Demling L., Kinzlmeyer H., Henning N. — *Klin. Wchsch.* **31**, 435, 1103, 1953.
33. Demme H. — *Fortschr. d. Neurol. Psychiatr.* **18**, 169, 1950.
34. Deyrup I., Ussing H. — *J. Gen. Physiol.* **38**, 599, 1955.
35. Edstrom J., Bioch. Bipph. *Acta* **12**, 361, 1953.
36. Eiima Tatsunori — *Tahkoi J. Explt. Med.* **61**, 167, 1955. RŻ 13646, 1956.
37. Engelhardt W., Lisowskaja N. — *Biochm. Nierwn. Sistiemy* 77, 1954.
38. Engelhardt W., Lisowskaja N. — *Biochimia* **20**, 225, 1955.
39. Engstrom A., Luthy H. — *Explt. Cell. Res.* **1**, 81, 1950, cyt. wg. Hyde-na (62).
40. Ewald A., Kuhne W., cyt. wg. Rossitera (111).
41. Ferrante L., Cantarurri F. — *Minerwa pediatr.* **6**, 430, 1954, RŻ 14417, 1956.
42. Findley M., Strickland K., Rossiter R. — *Canad. J. Bioch. Physiol.* **32**, 504, 1954.
43. Fischer J., Kalousek J., Lodin Z. — *Ceskoslov. Morfol.* **4**, 297, 1956.
44. Flodon C. — *Acta derm. wener.* **35**, 184, 1955.
45. Folch J., Lees M. — *J. Biol. Chem.* **191**, 807, 1951.
46. Folch J., Baron F. — *Fed. Proc.* **10**, 183, 1952.
47. Foss O. — *Intern Congr. Clin. Chem. Summ.* 91, 1957.
48. Gaitonde M., Richter D. — *Biochem. J.* **59**, 690, 1955.
49. Gaitonde M., Richter D. — *Proc. Roy. Soc. (B)* **145**, 83, 1956.
50. Gajewskaja M. — *Bioch. Nierwn. Sistem.* 151, 1954.
51. Gale F., Folkes J. — *Biochem. J.* **55**, XI, 1953.
52. Gersh I., Bedian D. — *J. Cell. Comp. Physiol.* **21**, 253, 1943, cyt. wg. Rossitera (111).

53. Graves J., Himwich H. — Amer. J. Physiol. **180**, 205, 1955.
54. Greenberg D. i wsp. — Symp. quantit. Biol. **13**, 113, 1948.
55. Gregor Mc. H. — J. Biol. Chem. **28**, 403, 1916, cyt. wg. Healda (58).
56. Gutner J. — Biull. Eksper. Bioł. Med. **21**, 52, 1946.
57. Halliburton W., — J. Physiol. **15**, 90, 1894, cyt. wgł. Mc Ilwaina (63).
58. Heald P. — Biochem. J. **66**, 659, 1957.
59. Hesselvik L. — Acta med. scand. **101**, 461, 1939.
60. Hofmann G., Schinko H. — Klin. Wchschr. **34**, 86, 1956.
61. Hyden H., Hartelius H. — Acta Psycholog. et. Neurolog. Suppl. XLVIII, 1948.
62. Hyden H. — Neurochemistry 204, 1955 Springfield.
63. Ilwain Mc H. — *Biochemistry and the central nervous system*, London 1955.
64. Kabat E., Moor B., Landow H. — J. Clin. Invest. **21**. 571, 1942.
65. Kaps G. — Arch. f. Psych. u. Neurol. **192**, 115, 1954.
66. Knapp A. — Arch. Klin. exp. Derm. **20**, 446, 1955.
67. Kosztojan C. — Bioch. Nierwn. Systemy **231**, 1954.
68. Kramer M., Straub F. — Bioch. Bioph. Acta **21**, 401, 1956.
69. Krawczyński J., Silicz T. — Ukr. Bioch. Żurn. **29**, 25, 1957.
70. Krawczyński J., Drewnowska I., Fleszyński Z., Rycaj M. — Acta Physiol. Pol. **8**, 402, 1957 i Acta Bioch. Polon. **5**, 139, 1958.
71. Krawczyński J. i wsp. (dane niepublikowane).
72. Krawczyński J., Drewnowska I. (dane niepublikowane).
73. Kreps E. i wsp. — Żurn. Wyszej. Nierwn. Diejat. II, 46, 1952.
74. Kreps E., Czenykajewa E. — DAN ZSRR **104**, 276, 1955.
75. Kreup W. — Conf. Neurol. **15**, 73, 1955, RZ 1956.
76. Laciga Z. i wsp. — Česk. Neurol. **19**, 256, 1956.
77. Leepter L., Tulane Y., Friedberg F. — J. Biol. Chem. **203**, 513, 1953.
78. Lien O., Greenberg D. — J. Biol. Chem. **195**, 637, 1952.
79. Lisowskaja N. — Biochimia **19**, 626, 1954.
80. Lisowskaja N. — Biochimia **21**, 434, 1956.
81. Logan J., Mannoll W., Rossiter R., cyt. wg. Rossitera (111).
82. Lowry O., Gilligan D., Katersky E. — J. Biol. Chem. **139**, 795, 1941.
83. Lowry O. i wspł. — J. Biol. Chem. **207**, 34, 1954.
84. Mamoiłow S., Orłow A. — Biochimia **18**, 456, 1953.
85. Mirsky A., Pollister A. — J. Gen. Physiol. **30**, 117, 1946.
86. Monne L. — Wszechświat z 5, 146, 1948.
87. Muntz J. — J. Biol. Chem. **201**, 221, 1956.
88. Nasonow D., Aleksandrow B., cyt. wg Vrby (139).
89. Nelson B. — J. Amer. Chem. Soc. **38**, 2558, 1916 cyt. wg. Rossitera (111)
90. Nieczajewa G. — Dissert, Leningrad 1955.
91. Nieczajewa G. — Biochimia **21**, 723, 1956.
92. Nieczajewa G. — Biochimia **22**, 546, 1957.
93. Orechowicz W. i wsp. — DAN ZSRR **71**, 105, 1950.
94. Pałladin A., Sztutman C., Raszba E. — Ukr. Bioch. Żurn. **23**, 176, 1951.
- 94a. Pałladin A. — Biochimia **17**, 456, 1952; West. AN **10**, 373, 1952.
95. Pałladin A. — Usp. Bioł. Chimii **II**, 27, 1954.
96. Pałladin A., Wertheimer N. — DAN ZSRR **102**, 31, 1955.
97. Pałladin A. — Bioch. Gołown. Mozga. Dokł. na III Kongr. Bioch. 1955.
98. Pałladin A. — Bioch. of the develop. nerv syst. **177**, 1955.

99. Pałladin A., Polakowa N. — DAN ZSRR **107**, 868, 1956.
100. Pałladin A., Bielik J., Kraczkowski L. — *Biochimia* **22**, 359, 1957.
101. Peters V., Flexner L. — *AM. J. Anat.* **86**, 133, 1950.
102. Pietrowskij D. — *Pfl. Arch.* **7**, 367, 1973, cyt. wg Pałladina (95).
103. Polakowa N. — DAN ZSRR **109**, 1174, 1956.
104. Pope A., Anfinsen Ch. — *J. Biol. Chem.* **173**, 305, 1948.
105. Richter D., Dawson R. — *J. Biol. Chem.* **176**, 1199, 1948.
- 105a. Raszba E., Sztutman C. — *Ukr. Bioch. Żurn.* **23**, 100, 1951.
106. Ringertz N. — *Exptl. Cell. Res.* **10**, 230, 1956 RZ. 23375, 1956.
107. Robins E., Smith D., Eydt K. — *J. of Neurochem.* **1**, 54, 1956.
108. Robins E., Smith D., Eydt K., Mc Caman F. — *J. of Neurochem.* **1**, 68, 1956.
109. Robins E., Smith D., Eydt K. — *J. of Neurochem.* **1**, 77, 1956.
110. Romni G., Inesi G., De Risie C. — *Biol. Soc. Ital. Biol. Sper.* **32**, 217, 1956, RZ 1956.
111. Rossiter R. — *Neurochemistry* **11**, 1955 Springfield.
112. Rozengardt W., Masłowa M. — DAN ZSRR **107**, 1176, 1956.
113. Sadikowa N., Skworcowicz B. — *Wopr. Med. Chim.* **II**, 128, 1956.
114. Sałganik R. — *Biochimija* **19**, 641, 1954.
115. Schmidt G., Thannhauser S. — *J. Biol. Chem.* **161**, 83, 1945.
116. Schneider C., Walleuius G. — *Scand J. Clin. lab. Invest.* **3**, 145, 1951.
117. Schurch O. i wsp. — *Schw. Med. Wchschr.* **28**, 216, 1950.
118. Silicz T. — *Ukr. Bioch. Żurn.* **29**, 166, 1957.
119. Skwirskaja E., Czepinoga O. — DAN ZSRR **92**, 1007, 1953.
120. Skwirskaja E., Silicz T. — DAN ZSRR **93**, 1073, 1953.
121. Skwirskaja E., Silicz T. — *Bioch. Nierwn. Sist.* **36**, 1954.
122. Skwirskaja E., Silicz T. — *Ukr. Bioch. Żurn.* **27**, 385, 1955.
- 122a. Skwirskaja E., Silicz T. — *Ukr. Bioch. Żurn.* **29**, 3, 1957.
123. Skwirskaja E., Silicz T. — *Ukr. Bioch. Żurn.* **29**, 33, 1957.
124. Słowcow B., cyt. wg Zbarskiego „*Biatologiczeskaja Chimia*”, Moskwa 1954.
125. Smirnow A. — DAN ZSRR **101**, 913, 1955.
126. Smirnow A. — DAN ZSRR **105**, 185, 1955.
127. Steel M., Giexs W. — *Amer. J. Physiol.* **20**, 378, 1907 cyt. wgł. Mc Ilwaina (63).
128. Strominger J., Lowry O. — *J. Biol. Chem.* **213**, 635, 1955.
129. Sulkin N. — *J. Geront.* **10**, 135, 1955.
130. Tarchanow J. — cyt. wg. Krepsa (73).
131. Traver H., Morse L. — *J. Biol. Chem.* **173**, 53, 1948.
132. Tashiro S. — *Am. J. Physiol.* **60**, 519, 1922 cyt. wgł. Vrby (139).
133. Thomas P. — *Manuel de Biochimie* Paris 1946.
134. Uznam L., Bering E. — *Arch. Bioch.* **60**, 257, 1950.
135. Volk B., Saifer A., Rabiner A. — *AM NY Acad. Sc.* **58**, 602, 1954 RZ 17601, 1956.
136. Vrba R. — *Physiologia Bohemoslovenica* **IV**, 397, 1955.
137. Vrba R. — *Nature* **176**, 1258, 1955.
138. Vrba R. — *J. of Neurochemistry* **1**, 12, 1956.
139. Vrba R. — *Usp. Sowr. Biol.* **41**, 321, 1956.
140. Waksman P., Porter H., Lees M., Adams R., Folch J. — *J. Exp. Mer.* **100**, 451, 1954.

141. Weil — Malherbe H., Green R. — *Biochem. J.* **61**, 210, 1955.
142. Weiss B. — *Biol. Bull. Woods Hol.* **87**, 160, 1944, cyt. wg. Hydena (62).
143. Wertheimer N. — *Bul. Stiint. Soc. med.* **8**, 445, 1956 RZ 11107, 1957.
144. Winnick T., Friedberg F., Greenberg D. — *J. Biol. Chem.* **173**, 189, 1948.
145. Władimirow G. — *Funkcjonalnaja Biochimia mozga*, Moskwa 1954.
146. Władimirow G., Iwanowa T., Prawdina N. — *Biochimia* **21**, 155, 1956.
147. Władimirow G., Urinson P., Prawdina N. — *Biochimia* **22**, 351, 1957.
148. Władimirow G., Urinson P. — *Biochimia* **22**, 709, 1957.
149. Władimirowa E. — *DAN ZSRR* **90**, 1191, 1953.
150. Władimirowa E. — *Bioch. Nierwn. Sistemy* **47**, 1954.
151. Władimirowa E. — *DAN ZSRR* **95**, 905, 1954.
152. Władimirowa E. — *DAN ZSRR* **106**, 937, 1956.
153. Wróblewski F. — *Int. Congr. Clin. Chem. Summ.* **64**, 1957.
154. Wymazal J. — *Čas. Lek. Cesk.* **95**, 745, 1956.
155. Fish A., Chanutin A., Klingman N. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **78**, 1, 1951.

STEFAN ANGIELSKI*

Naturalne β -aminokwasy w związku z przemianą aminokwasów o łańcuchu rozgałęzionym

Przedmiotem tego artykułu jest omówienie dwóch naturalnych aminokwasów, a mianowicie kwasu β -aminoizomasłowego i β -alaniny, z którymi łączą się losy rozgałęzionych α -aminokwasów: waliny i izoleucyny, a także zasad pirymidynowych: tyminy i uracylu. Powstawanie kwasu β -aminoizomasłowego wiąże się z losami waliny i tyminy, natomiast wytwarzanie się β -alaniny z przemianami izoleucyny i uracylu. Obydwie grupy przemian wykazują punkty styczne ze sobą, dlatego sprawozdanie ujmuję w następujące rozdziały:

- I. Droga degradacji rozgałęzionych α aminokwasów,
- II. Przemiana waliny i tyminy z wytworzeniem semialdehydu kwasu metylomalonowego i kwasu β -aminoizomasłowego,
- III. Przemiana izoleucyny i uracylu z wytworzeniem kwasu propionowego i β -alaniny,
- IV. Próba schematycznego ujęcia całości tych przemian.

Większość doświadczalnych wyników omawianych w tym sprawozdaniu uzyskały pracownice: K. Finka z Los Angeles, J. M. Coona z Philadelphii i S. Ochoa z New Yorku.

I. Droga degradacji rozgałęzionych α -aminokwasów

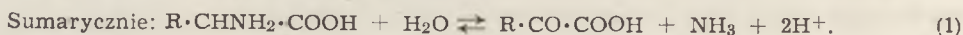
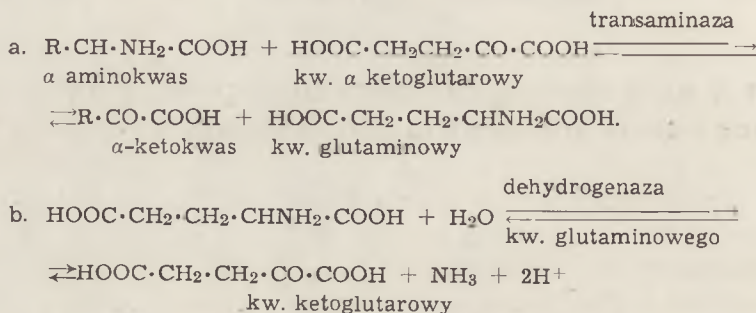
Walina jest aminokwasem glikogennym, leucyna ketogennym (wytwarza $1\frac{1}{2}$ cząsteczki kwasu acetoctowego) (31,34), zaś izoleucyna wykazuje własności keto i glikogenne. Wszystkie te trzy aminokwasy ulegają degradacji w wyniku następujących, kolejno zachodzących etapów przemian: a) transdezaminacji, b) oksydatywnej dekarboksylacji, c) ciągu reakcji analogicznych do oksydacji kwasów tłuszczowych oraz d) przemian ostat-

* Lekarz, Asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Użyte skróty: ATP kwas adenozynotrójfosforowy; ADP kwas adenozynodwufosforowy; AMP kwas adenozynofosforowy; CoA koenzym A; DPN nukleotyd dwufosfopirydynowy; P ortofosforan; PP pirofosforan; TPN nukleotyd trójfosfopirydynowy

nich etapów przebiegających odmiennie dla poszczególnych powstających związków.

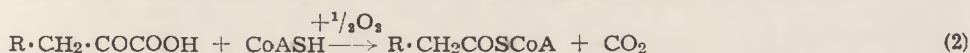
Z tych pojęć wymaga objaśnienia pierwsze, tj. transdezaminacja. Taką nazwę daje Braunstein (19) procesowi transaminacji połączonemu z oksydacyjną dezaminacją kwasu glutaminowego. Schemat tego procesu przedstawia się następująco:



Reakcja a) jest katalizowana przez transaminazę odpowiedniego aminokwasu i kwasu α -ketoglutarowego. Z drobnoustrojów *E. coli* izolowano takie transaminazy swoiste dla poszczególnych rozgałęzionych aminokwasów (113). Choć nie udało się to w stosunku do zwierzęcych tkanek, obecność w nich takich transaminaz można uważać za udowodnioną (24,92a). W odniesieniu do reakcji b) istnieją różnice poglądów (12,29, 112); za powyżej podanym schematem opowiada się Braunstein (19), natomiast Cedra ngolo (29) jest zdania, że amoniak nie występuje jako produkt pośredni, wobec czego kwestionuje potrzebę pojęcia transdezaminacji, uważając że całość tych reakcji jest w swojej istocie transaminacją. Za poglądem Braunsteina przemawiają następujące fakty doświadczalne: występowanie w wielu tkankach dehydrogenazy kwasu glutaminowego (18a, 96), oraz transaminazy kwasu ketoglutarowego i odpowiednich aminokwasów (3,24,92a), a także znaczne zahamowanie powstawania aminokwasów przez zablokowanie cyklu Krebsa w miejscu umożliwiającym wytwarzanie kwasu α -ketoglutarowego (15, 16, 17). Brak jest natomiast przekonujących dowodów doświadczalnych przemawiających za bezpośrednim udziałem wytwarzanego w reakcji (b) amoniaku w syntezie mocznika; w rozważaniu tych spraw nie można zapomnieć o tym, że poziom amoniaku tkanek jest bardzo niski lub brak go zupełnie (97). Pomimo dość licznych prac nad biosyntezą karbamylofosforanu (61, 62, 63, 65) nie wiadomo, w jakiej postaci wbudowuje się weń reszta azotowa (76); wprawdzie udział kwasu N-acetyloglutaminowego jako kofermentu w biosyntezie cytruliny u zwierząt (76) jest udowodniony (65), lecz rola jego w biosyn-

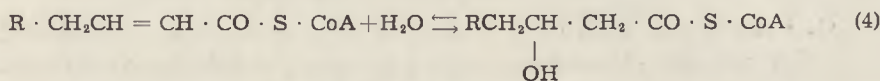
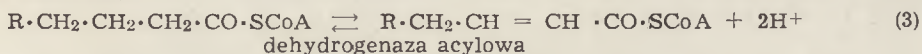
tezie karbamyłanu nie jest znana. Natomiast udział kwasu asparaginowego w wytwarzaniu anginy zdej się mieć trwałe podstawy doświadczalne (30). Poza tym szeroki zasięg procesów transaminacji (3, 24, 92b, 93) przemawiałby raczej za poglądem, że pierwszy etap, tj. transaminacja, nie musi ściśle wiązać się z drugim, tj. oksydacyjną dezaminacją kwasu glutaminowego (29, 114). Ten pierwszy etap przemian aminokwasów o łańcuchu rozgałęzionym jest więc zasadniczo taki jak u wszystkich aminokwasów. Reakcje te są odwracalne, a zatem z odpowiadających ketokwasów ustrój może wytworzyć właściwe im aminokwasy.

Drugim etapem na drodze degradacji aminokwasów rozgałęzionych (a także i niektórych innych aminokwasów) jest oksydacyjna dekarboksylacja wytworzonych z nich α -ketokwasów przebiegająca według równania:



Jak dotychczas nie stwierdzono, by ten typ reakcji przebiegający z dość dużym spadkiem energii wolnej był odwracalny (8). Jest to zasadniczy etap w przemianie aminokwasów rozgałęzionych, wyznacza on bowiem przez swą nieodwracalność z jednej strony kierunek przemian, z drugiej zaś uniemożliwia biosyntezę aminokwasu z jego produktów rozpadu (31). Mechanizm tej reakcji wydaje się skomplikowany już chociażby z tego względu że do przebiegu jej potrzeba całego zestawu koenzymów: dwufosfatiaminy, kwasu liponowego, CoA, DPN, (81).

Dalszy trzeci etap przemian opisują badania Coona i współpracowników; wykazują one, że niektóre etapy przemian aminokwasów o łańcuchu rozgałęzionym są katalizowane przez system enzymatyczny wątroby utleniający kwasy tłuszczowe o nierozgałęzionym łańcuchu węglowym (31, 110, 111).



hydraza enolowa

Jak dotychczas nie jesteśmy w stanie powiedzieć, czy są tu konieczne swoiste enzymy. Jednak z ostatnich badań Greena i współpracowników okazuje się, że na przykład dehydrogenaza acylowa jest enzymem złożonym, z którego udało się wyizolować trzy oddzielne enzymy utleniające kwasy tłuszczowe w zależności od długości łańcucha węglowego, a mianowicie enzym (G), żółty flawoprotein miedziowy, który utlenia aktywne kwasy tłuszczowe o łańcuchu od C₄ do C₈ (88, 59, 60); enzym Y, zielony flawoprotein, który atakuje kwasy tłuszczowe o dłuższym łańcuchu (35), a także enzym Y', którego utleniające działanie zdaje się dotyczyć jedynie aktywnej postaci kwasu palmitynowego (36). Coon i współpracownicy

w swoich doświadczeniach posługiwali się żółtym flawoproteinem miedziowym. Wśród zespołu enzymów biorących udział w przemianie kwasów tłuszczowych hydrazu enolowa (krotonaza) była pierwszym enzymem otrzymanym w postaci krystalicznej (121, 122), dzięki temu zbadano jej swoistość wobec kilku substratów, stała równowagi w stosunku do krotonylo i izokrotonylo-S-CoA, optimum działania pH oraz wpływ niektórych inhibitorów. W trakcie badań okazało się, że krotonaza działa szczególnie wydawnie na nierozgałęzione kwasy tłuszczowe od C₄ do C₉, jest natomiast mniej aktywna w stosunku do kwasów rozgałęzionych, zwłaszcza zawierających podstawniki w pozycji α . Tablica 1 według J. Sterna i współpracowników (121) przedstawia względne aktywności tego enzymu w stosunku do niektórych substratów.

Tabela 1
Aktywność krotonazy w stosunku do różnych substratów

Izomer	Substrat	Względna aktywność
Trans	Krotonylo-CoA	100
Cis	Izokrotonylo-CoA	30
„	α -metylokrotonylo-CoA	ledwie zaznaczona
„	β -metylokrotonylo-CoA	14

Jak widać z tabeli 1, aktywność krotonazy jest w stosunku do izokrotonylo-CoA trzykrotnie mniejsza niż wobec krotonylo-CoA. Inaczej przedstawia się działanie krotonazy w stosunku do akrylo-CoA i metakrylo-CoA; podczas gdy ten ostatni ulega jej działaniu, to wobec pierwszego jest ona nieaktywna.

Dalsze etapy przemian aminokwasów rozgałęzionych, swoiste dla poszczególnych związków, omówię w następnych rozdziałach.

II. Przemiana waliny i tyminy z wytworzeniem semialdehydu kwasu metylomalonowego i kwasu β -aminoizomasłowego

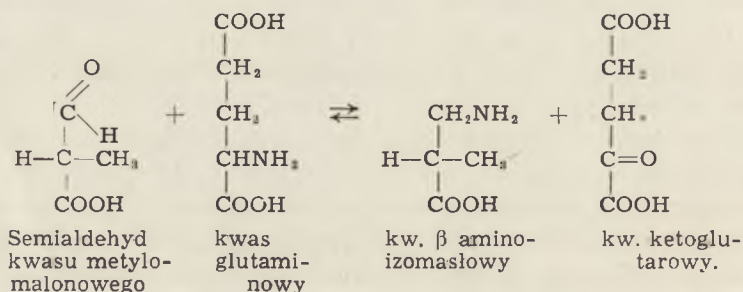
Przemiana waliny

Przemianę waliny przedstawia schemat 1.

Jak już wspomniano, w wyniku dezaminacji powstaje z waliny kwas α -ketoizowalerianowy, który po dekarboksylacji oksydatywnej wytwarza aktywną postać kwasu izomasłowego, tj. izobutyrylo-CoA. Z badań A t c h l e y a (1) wiadomo, że kwas izomasłowy powoduje nagromadzenie się glikozy, a w doświadczeniach izotopowych stwierdzono, że jego trzy atomy węgla mogą być użyte do wytworzenia glikozy. Przypuszczano więc (1, 78), że przemiana kwasu izomasłowego przebiega następująco:

działa oprócz β -hydroksyizobutyrylo-CoA, jest β -hydroksypropionylo-CoA; lecz w stosunku do niego jest trzykrotnie mniej aktywny. Deacylazę otrzymano z serca świni, oczyszczono kilkakrotnie, stwierdzono jej obecność w innych tkankach, nie zawierają jej drożdże, lecz znaleziono ją w stosunkowo dużej ilości u *Neurospora crassa*.

Kwas β -hydroksyizomasłowy przechodzi pod wpływem swoistej dehydrogenazy w semialdehyd kwasu metylomalonowego. Dehydrogenazę wyodrębniono z nerki świni, jej koenzymem jest DPN; odczynniki blokujące grupy SH inaktywują ją; natomiast hydroksylamina i dimedon są bez wpływu na jej aktywność. Stan równowagi tej reakcji jest przesunięty w stronę redukcji semialdehydu kwasu metylomalonowego, tj. do kwasu β -hydroksyizomasłowego (109). Dalsze losy semialdehydu kwasu metylomalonowego nie są dokładnie znane, wydaje się jednak, że jego przemiany prowadzą przez aktywną postać kwasu metylomalonowego (izobursztynowego). Kwas metylomalonowy stwierdzono po raz pierwszy w moczu szczurów zatrutych antracenenem (14) oraz wykazano jego obecność obok kwasu dwuetylbursztynowego w moczu szczurów pozostających na diecie powodującej martwicę wątroby (9, 10). Dotychczas brak doświadczalnych danych o przekształcaniu się semialdehydu w kwas metylomalonowy. Dzięki badaniom O c h o a i współpracowników (11, 45—48) wiadomo bowiem, że propionylo-CoA ulega karboksylacji do metylomalonylo-CoA, a ten w obecności izomerazy przechodzi w bursztynylo-CoA, a następnie w kwas bursztynowy. Szkielet węglowy semialdehydu kwasu metylomalonowego może być wykorzystany do wytworzenia kwasu β -aminoizomasłowego, który jest punktem stycznym na drodze przemian waliny i tyminy. Obecnie znamy szereg transaminacji obejmujących aminokwasy z grupą aminową na węglu ω (13, 108). Najlepiej dotychczas poznaną transaminazą tego typu jest transaminaza kwasu γ aminomasłowego i kwasu ketoglutarrowego; duże jej ilości znaleziono w tkance mózgowej (13). W wyniku tych reakcji powstaje z aminokwasu odpowiadający mu aldehyd. Niedawno izolowano z nerki świni transaminazę kwasu β -aminoizomasłowego i kwasu α -ketoglutarrowego (83). Katalizowana reakcja zachodzi w następujący sposób:



Odwracalność reakcji wykazano w dwóch szeregach doświadczeń; w jednym z nich inkubowano semialdehyd kwasu metylomalonowego, kwas glutaminowy i transaminazę, w drugim kwas β aminoizomasłowy z kwasem ketoglutazarowym. Tabela 2 (według 83) przedstawia wyniki badań swoistości częściowo oczyszczonej transaminazy.

Tabela 2
Swoistość transaminazy kwasu β -aminoizomasłowego i ketoglutazarowego

Substraty	Rf wytworzonego aminokwasu	
	oczekiwano	znaleziono
Kwas β -aminoizomasłowy + kw. ketoglutazarowy	0,25 (kw. glutam.)	0,26
Kwas β -aminoizomasłowy + kw. pyrogronowy	0,36 (alanina)	nic
Kwas β -aminoizomasłowy + kw. szczawiooctowy	0,48 (kw. aspar.)	nic
Kwas β -aminoizomasłowy + kw. ketoizokapronowy	0,44 (leucyna)	nic
Kwas β -aminoizomasłowy + α -keto- β -metylowalerianowy	0,44 (izoleucyna)	nic
β -alanina + kw. ketoglutazarowy	0,25 (kw. glutam.)	0,25
Kwas β -aminomasłowy + kw. ketoglutazarowy	0,25 (kw. glutam.)	nic
Kwas γ -aminomasłowy + kw. ketoglutazarowy	0,45 (kw. glutam.)	0,27
Kwas α , γ -dwuaminomasłowy + kw. ketoglutazarowy	0,25 (kw. glutam.)	0,27

Omawiana transaminaza działa więc jedynie na ω -aminokwasy; kwasu α -ketoglutazarowego żaden inny z badanych ketokwasów nie jest w stanie zastąpić. Nie udało się stwierdzić udziału fosfopirydoksalu przy tego rodzaju transaminacji (83). Hamujący wpływ p-chlorortęciobenzanu zdaje się dotyczyć nie samej transaminazy, lecz dehydrogenazy kwasu β -hydroksyizomasłowego ściśle związanej z procesem transaminacji.

Niezależnie od siebie K. F i n k i współpracownicy (41) oraz C r u m p l e r i współpracownicy stwierdzili w 1951, że aminokwas występujący na chromatogramach jako plamka T (37), spotykany w moczu niektórych zdrowych ludzi oraz w moczu chorych z nowotworami (41), jest kwasem β -aminoizomasłowym. Podczas gdy pracownia K. F i n k a poszukiwała macierzystej substancji tego aminokwasu, to badacze angielscy zainteresowali się jego wydalaniem w moczu ludzi zdrowych (21, 40, 67, 69). Stwierdzono bowiem, że wśród populacji angielskiej około 90% osób wydalają z moczem duże ilości kwasu β -aminoizomasłowego. Dla porównania warto zwrócić uwagę, że w dobowej ilości moczu przeciętne wydalanie

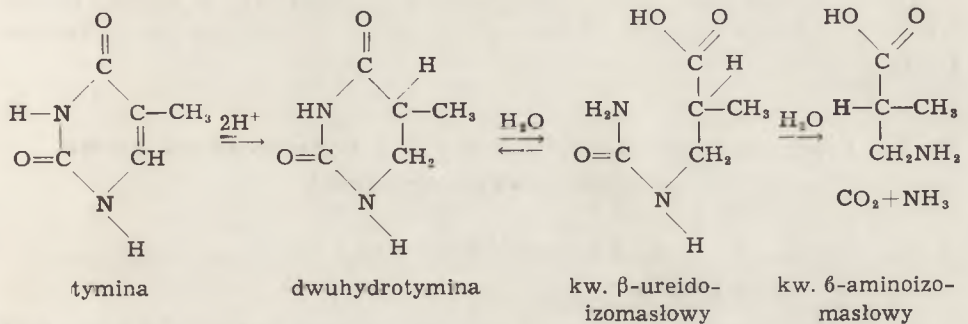
histrydiny, metylohistydney, glicyny i tauryny wyraża się ilością po około 200 mg; glutaminy, alaniny, seryny, treoniny, asparaginy po około 50 mg, a każdego z pozostałych aminokwasów mniej aniżeli po 50 mg (40, 68, 120). U β -wydzielaczy (tak nazwano osoby wydalające większe ilości kwasu β -aminoizomasłowego) przeciętna ilość wydalonego z moczem kwasu β -aminoizomasłowego wynosi 200—300 mg, natomiast u osób nie będących wydzielaczami nie przekracza 10 mg na dobę (40). Stwierdzono ponadto, że wydalanie tego aminokwasu nie zależy od warunków zewnętrznych, a także płci i wieku, a więc należało przypuszczać, że może on podlegać kontroli genetycznej (54, 55, 56, 67, 69). Badania przeprowadzone na dużym materiale wskazywały na to, że wydalanie kwasu β -aminoizomasłowego dziedziczy się, przy najprostszym ujęciu, jako gen recesywny, to znaczy, że β -wydzielacz byłby homozygotą dla tej pary alleli (allele—para genów odpowiedzialna za wytworzenie jakiejś cechy), natomiast osoba nie wydająca lub wydająca nieznaczne ilości tego aminokwasu byłaby homo- lub hetero-zygotą dla dominującej pary alleli (69, 54). Ostatnie badania wskazują, że wśród ludzi rasy żółtej spotyka się znacznie częściej β -wydzielaczy aniżeli u ludzi rasy białej (64). Wydalanie kwasu β -aminoizomasłowego stało się przedmiotem szczególnego zainteresowania genetyków; niewiele mają oni bowiem sposobności posługiwania się cechami dającymi się ująć tak ściśle, jak pewne właściwości biochemiczne; większość tego rodzaju badań z zakresu genetyki człowieka przeprowadza się na ludziach obarczonych schorzeniami dziedzicznymi. Wydzielacze kwasu β -aminoizomasłowego jako przedmiot badań genetycznych mają tę szczególną wartość, że spotyka się ich dość często, a oznaczenie kwasu β -aminoizomasłowego nie nastrocza większych trudności. Inną nie mniej ważną przyczyną, która zmusza do zwrócenia uwagi na kwas β -aminoizomasłowy, jest wzmożone wydalanie aminokwasu u ludzi z nowotworami (4, 41) a w badaniach nowotworów jakikolwiek czynnik odbiegający do normy jest godny zainteresowania.

Przemiana tyminy

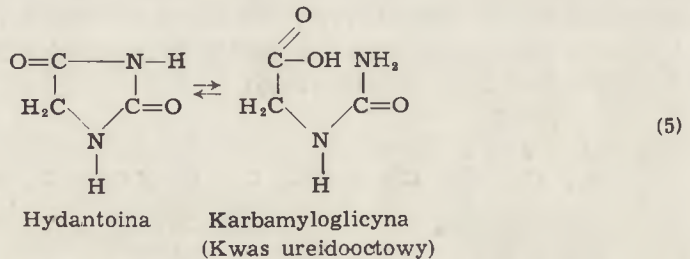
F i n k i współpracownicy (42—44) poszukując substancji macierzystej kwasu β -aminoizomasłowego stwierdzili, że szczury wydają większe ilości tego kwasu na diecie bogatej w kwas dezoksyrybonukleinowy. Wydalanie to wzrosło, gdy podawano tyminę, a zwłaszcza jej pochodną uwodorowaną w pozycji 5.6. W oparciu o te fakty i o badania przy użyciu związków znaczonych izotopami postawił F i n k hipotezę, że w ustroju zwierzęcym rozpad tyminy przebiega według schematu 2. Hipoteza ta została potwierdzona przez innych autorów (25, 50, 51, 104) w niezależnych od siebie pracowniach. Cały układ katalizujący ten ciąg reakcji, prze-

miany tyminy w kwas β -aminoizomasłowy, jest zlokalizowany w niestrukturalnej części komórki; dodanie frakcji mikrosomowej hamuje aktywność enzymatyczną. Podobnie też enzymy biorące udział w biosyntezie zasad pirymidynowych oraz nukleotydów, w skład których one wchodzi, mają być zlokalizowane w cytoplazmie komórki (26, 27). Uwodorowanie tyminy do dwuhydrotyminy zachodzi przy udziale TPN, który nie może być zastąpiony przez DPN. Zahamowanie rozpadu tyminy, jakie ma miejsce po dodaniu frakcji mikrosomowej komórek, jest prawdopodobnie związane z inhibicją tego właśnie etapu (25).

Schemat 2.



Niedawno izolowano enzym nazwany hydrazą hydropirymidynową, rozszczepiający pierścień pirymidynowy pomiędzy atomami 3 a 4 (127). Przy badaniu swoistości tego enzymu okazało się, że wykazuje on znaczną aktywność także wobec hydantoiny, którą przeprowadza w karbamyloglicynę.



Enzym katalizujący powstawanie karbamyloglicyny z hydantoiny zwany hydantoinazą został izolowany i dokładnie zbadany przed dziesięciu laty (39). Jest bardzo prawdopodobne, że enzym ten oraz hydraza hydropirymidynowa są identyczne. Przemawia za tym, że hydraza hydropirymidynowa jest aktywna w stosunku do tyminy, uracylu i hydantoiny, a nie działa na inne związki o podobnej strukturze. Stan równowagi oraz szybkość reakcji katalizowanej przez ten enzym zależy w dużym stopniu od pH; przy pH 5 równowaga jest przesunięta w kierunku zamknięcia łań-

cucha ureido-pochodnej, natomiast w oddziaływaniu zasadowym (optimum pH 8,6) ma miejsce otwarcie pierścienia z wytworzeniem kwasu β -ureidoizomasłowego. W badaniach ze skrawkami wątroby szczura oraz *in vivo* stwierdzono, że przy użyciu tyminy i dwuhydrotyminy znaczonej izotopami atom węgla 2 zjawia się w moczniku, a także w wydychanym CO_2 (44,72), a atom węgla grupy metylowej dołączony do pozycji 5, w kwasie β -aminoizomasłowym, a także w alaninie i glikozie (44). Fakty te są w zgodzie z tym, że dalszy rozpad kwasu β -ureidoizomasłowego następuje między atomem dawnej pozycji 2 a atomem pozycji 1. W ten sposób byłoby zrozumiałe powstawanie kwasu β -aminoizomasłowego z tyminy.

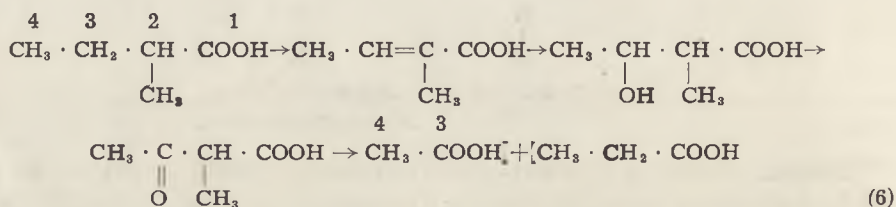
Drogi wytwarzania kwasu β -aminoizomasłowego byłyby w swej istocie poznane, natomiast nic nie wiemy o znaczeniu biologicznym tego aminokwasu.

III. Przemiana izoleucyny i uracylu z wytworzeniem kwasu propionowego i β -alaniny

Przemiana izoleucyny

Przemianę izoleucyny przedstawia schemat 3.

W tych badaniach podstawowe znaczenie ma stwierdzenie słabego, lecz wyraźnie zaznaczonego efektu glikogenego izoleucyny (18, 20, 128); efekt ten daje nie tylko odpowiadający izoleucynie α -ketokwas, ale także związek powstający przez jego dekarboksylację, tj. kwas α -metylomasłowy (18 b). Dalszy rozpad kwasu α -metylomasłowego ulegałby (mimo podstawnika w pozycji α przemianom analogicznym do β -oksydacji nierozgałęzionych kwasów tłuszczowych (28)). Zgodnie z takim ujęciem z 1 cząsteczki kwasu α -metylomasłowego powstaje 1 cząsteczka kwasu octowego oraz 1 cząsteczka kwasu propionowego.

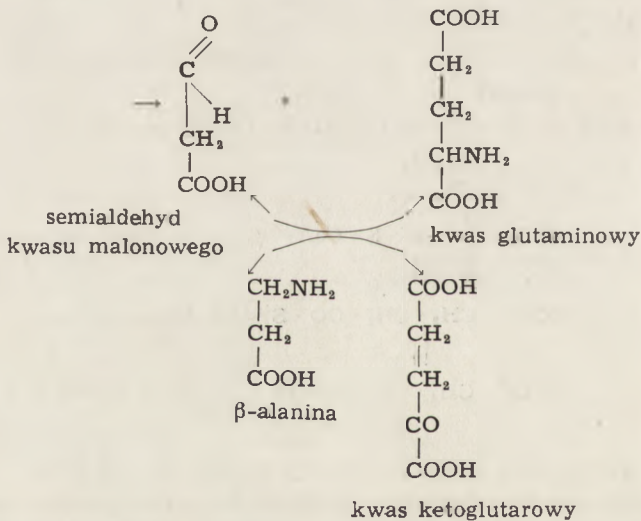
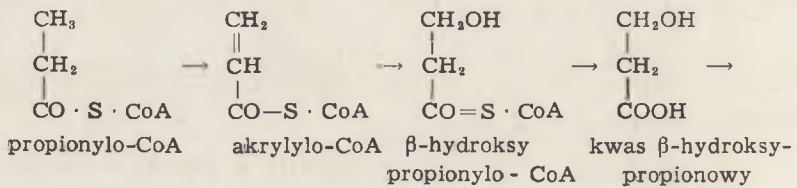


Przy użyciu znakowanego kwasu α -metylomasłowego wykazano, że rzeczywiście z atomów węgla 3 i 4 powstaje cząsteczka kwasu octowego, a węgiel grupy metylowej wchodzi w skład wytworzonego kwasu propionowego (32, 33). Ostatnio dzięki badaniom Coona i współpracowników wiemy, że te przemiany tak, jak przemiany kwasów tłuszczowych, zachodzą nie z wolnymi kwasami, lecz z odpowiednimi acylopochoďnymi

kwasy cytrynowy; b) kwas cytrynowy powstaje również, gdy zamiast tyglicylo-CoA wprowadzić do tego układu kwas α -metyloacetoctowy oraz układ potrzebny do jego aktywacji, to jest bursztynylo-CoA i odpowiednią transferazę. W podobnie przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że zarówno z tyglicylo-CoA jak i kwasu α -metyloacetoctowego powstaje propionylo-CoA w ilości równoważnej ilości aktywnego kwasu octowego. Coon i współpracownicy wiążą aktywny kwas propionowy z β -alaniną wytwarzaną w organizmie zwierząt i opisują przebieg reakcji tak jak to podaje schemat 4.

Schemat 4

Przemiany kwasu propionowego prowadzące do wytwarzania β -alaniny



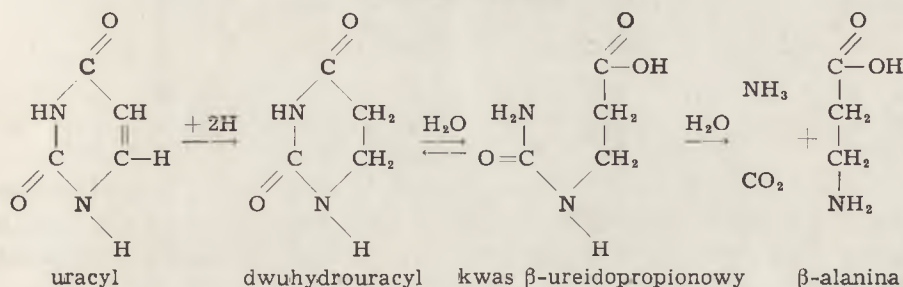
Jak widać ze schematu, w wyniku utleniania kwasu hydroksypropionowego powstaje semialdehyd kwasu malonowego, który w obecności kwasu glutaminowego i swoistej transaminazy przechodzi w β -alaninę. Poszczególne etapy tych przemian są katalizowane przez zespoły enzymów podobne do tych, które opisano przy przemianie waliny. W pewnych etapach zaznacza się jednak charakterystyczna swoistość; i tak ostatnio udało się uzyskać z nerki świni dehydrogenazę kwasu β -hydroksypropionowego stokrotnie oczyszczoną; tak oczyszczony enzym był aktywny wyłącznie

wobec kwasu β -hydroksypropionowego, nie działał natomiast na β -hydroksypropionyl-CoA ani też nie wykazał żadnego powinowactwa w stosunku do kwasu β -hydroksyizomasłowego (38).

Przemiana uracylu

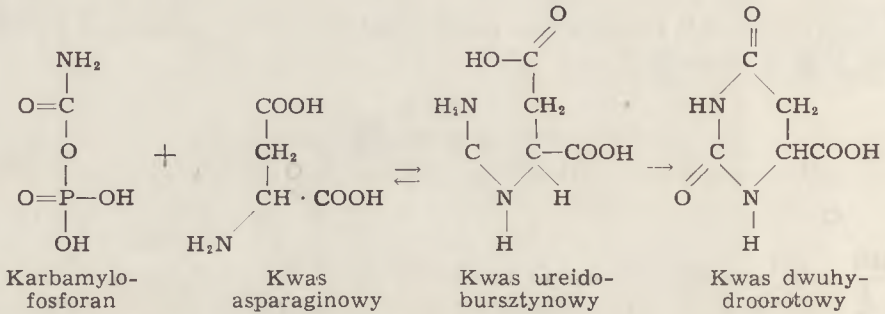
Drugą substancją macierzystą β -alaniny jest uracyl. Schemat 5 przedstawia jego przemiany.

Schemat 5
Przemiana uracylu



Dane, dotyczące systemu enzymatycznego biorącego udział w przemianie tyminy, odnoszą się także do uracylu (25, 50, 51, 52, 104). Analogicznie do tyminy rozpad uracylu rozpoczyna się uwodorowaniem jego pierścienia w pozycji 5 i 6. Na uwagę zasługuje fakt, że wyodrębniona dehydrogenaza, która przeprowadza tę reakcję u *Clostridium uracilicum*, posługuje się DPN, a nie TPN (22, 23), jak ma to miejsce w tkankach zwierzęcych. Enzym otrzymany z wyciągów tych bakterii nie jest aktywny w stosunku do tyminy (22). Natomiast enzym pochodzący z tkanek zwierzęcych jest aktywny wobec tyminy jak i uracylu (63a). Uwodorowane pochodne pirymidyn znaleziono w stanie wolnym w organizmie zwierząt (53); przypuszczano, że biorą one udział w biosyntezie kwasów nukleinowych, jednakże doświadczalnie nie udało się tego wykazać (131). Drugi etap reakcji zachodzi przy udziale hydrazy hydropirymidynowej analogicznie do przemian tyminy. Chociaż stwierdzono, że atom węgla 2 zasad pirymidynowych wbudowuje się w mocznik (44) i udało się ostatnio (133) wyizolować enzym odpowiedzialny za rozkład ureidopochodnych kwasu izomasłowego, nie wiele wiemy o istocie tej reakcji. O mechanizmie tego rodzaju przemian można by wnioskować przez analogię z tego, że cytrulina działaniem fosforylasy cytrulinowej rozkłada się na ornitynę, dwutlenek węgla i amoniak, ta reakcja odbywa się przy udziale ortofosforanu i ma charakter fosforolizy (80, 82, 95). Przypuszczano też, że tego rodzaju rozszczepienie będzie miało miejsce w przypadku kwasu ureidopropionowego i ureidoizomasłowego; okazało się jednak, że zarówno fosforany jak i arse-

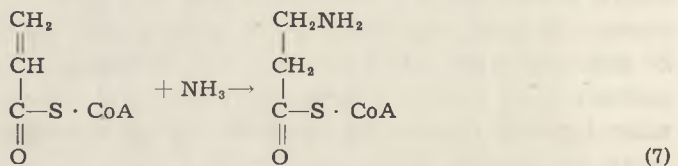
niany nie mają wpływu na prędkość tych reakcji; dowodziłoby to, że rozpad ureidopochodnej kwasu propionowego nie jest fosforolizą (25). Rola fosforolizy w powstawaniu pierścienia pirymidynowego jest dziś jednak ogólnie przyjęta (86, 87, 105) w postaci przemian przedstawionych w następujący sposób:



Wyniki doświadczeń wskazywałyby zatem, że mechanizmy rozpadu kwasu ureidobursztynowego z jednej strony, a β -ureidopropionowego z drugiej, są istotnie różne; podczas gdy pierwszy jest fosforolizą, drugi nie wykazuje tych cech.

Omówione dwa źródła β -alaniny, tj. izoleucyna i uracyl, nie wyczerpują wszystkich możliwości powstawania tego związku w żywych organizmach (103, 119). Od dawna na przykład wiadomo, że substancją macierzystą β -alaniny u niektórych bakterii jest kwas asparaginowy (132). Przypuszczano, że tego typu dekarboksylaza znajduje się także u zwierząt, jednak jak dotychczas nie udało się wykazać dekarboksylazy kwasu asparaginowego (115), chociaż w tkance mózgowej występuje bardzo aktywna dekarboksylaza kwasu glutaminowego.

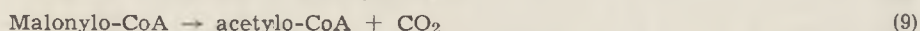
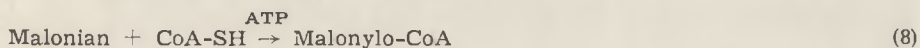
Niedawno opisano enzymatyczną syntezę β -alanilo-CoA z akrylylo-CoA i NH_3 jaka zachodzi u *Clostridium propionicum*. W ustroju zwierzęcym wy-



stępuje β -alanina w postaci wolnej (98, 125) lub związanej jako składnik karnozyny, anzeriny i koenzymu A. Losy β -alaniny u zwierząt nie są dokładnie poznane, wiadomo że jest ona substancją ketogenną (102). Dezaminacja β -alaniny nie przebiega tak samo jak α -alaniny. I tak w homogenatach nerki szczura zużycie tlenu i powstawanie amoniaku po podaniu β -alaniny następuje dopiero po 2—3 godzinach od chwili inkubacji, a po dodaniu α -alaniny już po kilkunastu minutach. W rozkładzie β -alaniny powstawanie dwutlenku węgla następuje przed zwiększeniem zużycia tlenu, nale-

zało więc myśleć o możliwości dekarboksylacji z wytworzeniem etyloaminy, lecz badania w tym kierunku nie stwierdziły obecności amin (118). Nie bez znaczenia dla tych przemian jest stwierdzenie, że użycie moderatora fosforanowego zamiast węglanowego wyraźnie przyspiesza dezaminację; przemiana przebiega jeszcze prędzej, jeżeli substratem jest zamiast β -alaniny jej N-fosforanowa pochodna (117).

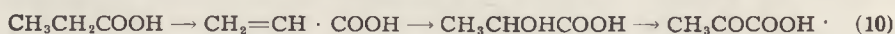
W wyniku transaminacji β -alaniny z kwasem keto-glutarowym (108) lub inozynowym (79) powstaje semialdehyd kwasu malonowego. Losy poszczególnych atomów węgla β -alaniny badano, posługując się aminokwasem znacznym już to na węglu 1, już to na 2 lub 3 (58, 102); w dwie godziny po parenteralnym podaniu β -alaniny szczurom stwierdza się 90% węgla grupy karboksylowej (C_1) jako CO_2 powietrza wydechowego, jeżeli równocześnie z β -alaniną podaje się kwas p-aminobenzoowy, to atomy 2 i 3 zjawiają się w grupie acetylowej wydalonego kwasu acetyloaminobenzoowego. Ani ten ostatni związek, ani kwasy tłuszczowe szczura nie zawierały węgla grupy karboksylowej (C_1). Na podstawie tych faktów wydawało się możliwe, że powstały z dezaminacji β -alaniny semialdehyd kwasu malonowego ulega aktywacji przez CoA na grupie aldehydowej, następnie ma miejsce odszczepienie węgla 1 grupy karboksylowej, a pozostały acetylo-CoA bierze udział w dalszych przemianach. Za takim ujęciem przemawiałyby także doświadczenia (70, 94, 129) stwierdzające, że kwas malonowy przy udziale ATP przechodzi w aktywną postać, która ulega dekarboksylacji dając acetylo-CoA.



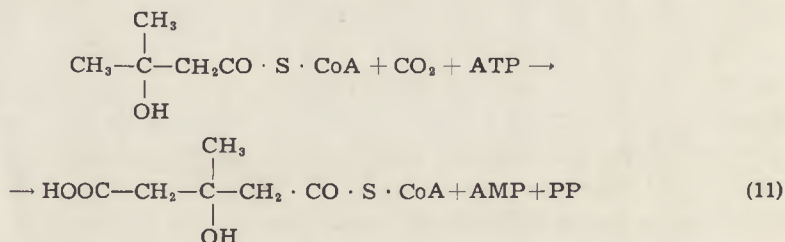
IV. Próba schematycznego ujęcia całości omawianych przemian

Dla ujęcia omawianych przemian w pewną całość wydaje się szczególnie ważne uwzględnienie losów kwasu propionowego. Mechanizm utleniania kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu oraz o nieparzystej liczbie atomów węgla sprawiał badaczom szereg trudności. Zgodnie z teorią β -oksydacji kwasy tłuszczowe o parzystej liczbie atomów węgla dają w wyniku spalań kwas octowy, natomiast utlenienie kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie węgla doprowadza do powstawania kwasu propionowego. Ostatnio coraz częściej, szczególnie dzięki chromatografii rozdzielczej gazów (74, 75) stwierdza się, że tłuszcze naturalne obok znacznej ilości kwasów tłuszczowych o parzystej liczbie węgla zawierają pewien odsetek kwasów tłuszczowych o nieparzystej liczbie atomów (66). U przeżuwaczy powstaje kwas propionowy na drodze fermentacji bakteryjnej; po wessaniu w jelitach może być on użyty do syntezy kwasów tłuszczowych; powstające w ten sposób kwasy mają nieparzystą liczbę atomów węgla.

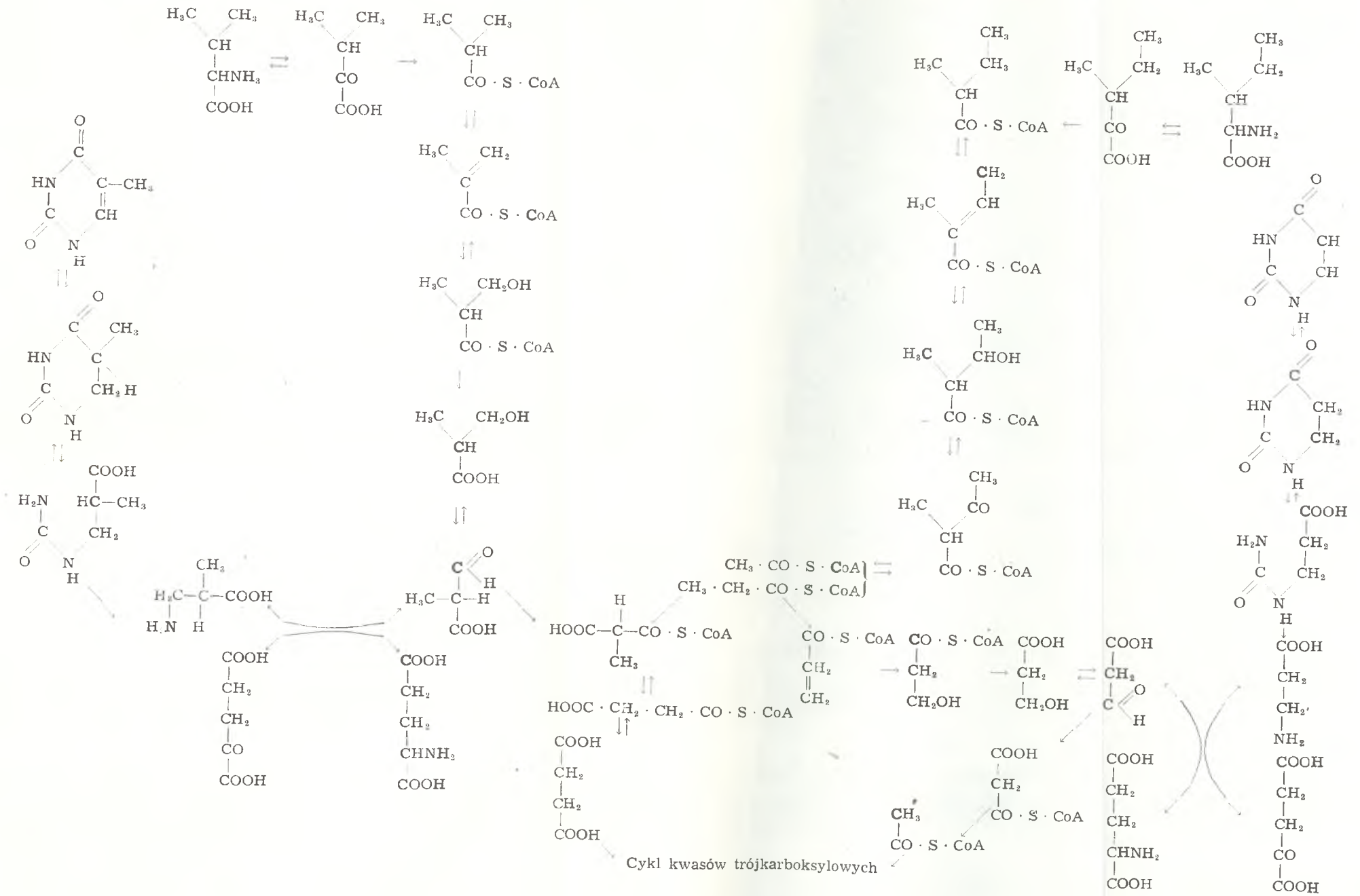
O powstawaniu kwasu propionowego z aminokwasów była już mowa poprzednio. Przedstawiono tam także jedną z dróg przemian prowadzącą do wytworzenia β -alaniny w ustroju zwierzęcym. Wiadomo obecnie, że karnozyna i anzeryna (w skład których wchodzi β -alanina) nie powstają, jak dawniej przypuszczano, na drodze dekarboksylacji aspartyl-histydyny względnie aspartyl-metylohistydyny (90), lecz na skutek połączenia się β -alaniny z histydyną względnie metylohistydyną. Wobec tego zapotrzebowanie na β -alaninę u zwierząt nieprzeżuwających, nie mających więc dodatkowego źródła kwasu propionowego z fermentacji bakteryjnej, będzie pokrywane kosztem endogennego kwasu propionowego. Ponieważ mięśnie, w których występują omawiane peptydy, stanowią poważną część masy całego ciała zwierzęcia, istnieje duże zapotrzebowanie na endogenne kwas propionowy. U podstaw całokształtu rozważań nad przemianą kwasu propionowego był fakt, że jest on substancją glikogenną (85). Zakładano przy tym, że ulega on α -oksydacji, tj. przechodząc stadium kwasu akrylowego i mlekowego wytwarza pirogronian (73).



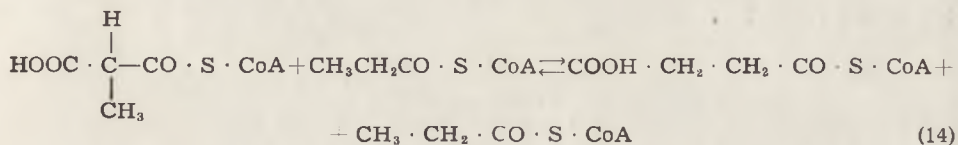
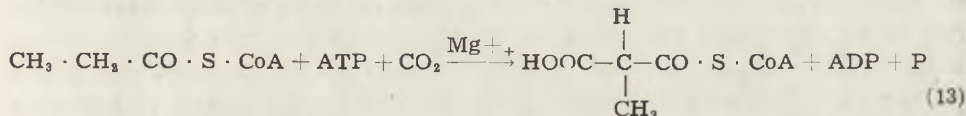
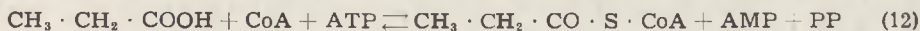
Hipoteza ta nie znalazła potwierdzenia w pracach, w których używano piętnowanego kwasu propionowego. W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że rozmieszczenie piętna w kwasie pyrogronowym, mlekowym oraz octowym, różni się znacznie od tego, jaki należało oczekiwać zgodnie z hipotezą α -oksydacji kwasu propionowego (85, 116). Z drugiej strony jednak stwierdzono następujące fakty: po podaniu promieniotwórczego kwasu propionowego wykazano znaczną radioaktywność kwasu bursztynowego (49, 77, 84), spalanie kwasu propionowego jest wyraźnie hamowane przez kwas malonowy (77, 99); pewne bakterie mogą wytwarzać kwas propionowy przez dekarboksylację kwasu bursztynowego (130). Wymienione fakty nasuwały przypuszczenie możliwości karboksylacji kwasu propionowego z wytworzeniem kwasu bursztynowego. Najbardziej prawdopodobne wydawało się przyłączenie CO_2 na węglu 3 kwasu propionowego, podobną bowiem przemianę wykazano w odniesieniu do kwasu β -hydroksyizowalerianowego (5, 6, 7), z którego po przyłączeniu CO_2 powstaje kwas β -hydroksy- β -metyloglutarowy.



Schemat 6



Jednak okazało się, że przyłączenie CO_2 ma miejsce na węglu 2 kwasu propionowego i że w ten sposób powstaje kwas metylomalonowy czyli izobursztynowy (45, 47, 77), który w obecności izomerazy przechodzi w kwas bursztynowy. Ochoa i współpracownicy przedstawiają etapy tych reakcji w następujący sposób (11, 45—48, 126).



Pod wpływem acetotiokinazy, czynnej również wobec kwasu propionowego, zachodzi (reakcja 12) aktywacja kwasu propionowego (71). Postać nieaktywna tego kwasu nie reaguje z dwutlenkiem węgla. Udział acetotiokinazy w tej reakcji tłumaczy, zdaniem niektórych badaczy, dlaczego spalanie kwasu octowego jest zahamowane w obecności kwasu propionowego. Przyczyną inhibicji byłaby konkurencja o ten sam enzym pomiędzy kwasem octowym i propionowym (71, 100, 101); inni (91) przypuszczają jednak, że kwas propionowy wpływa na przemianę kwasu octowego skierowując ją w innym kierunku aniżeli spalanie na CO_2 . Reakcja (13) ma miejsce jedynie w obecności ATP, dwutlenek węgla przyłącza się do grupy metylenowej kwasu propionowego. W ten sposób powstaje metylomalonylo-CoA a ATP przechodzi w ADP i ortofosforan.

Dotychczas ani w reakcjach chemii organicznej, ani w przemianach biochemicznych nie jest znany typ przeniesienia grupy karboksylowej prowadzącego do powstania bursztynylo-CoA z metylo-malonylo-CoA. Wymienieni autorzy przypuszczają możliwość transkarboksylacji pomiędzy metylomalonylo-CoA a propionylo-CoA, podaną w reakcji (14). Utworzony bursztynylo-CoA zostaje zamieniony na kwas bursztynowy (57, 123, 124), który wchodzi w cykl kwasów trójkarboksylowych.

Całokształt przemian omawianych w tym sprawozdaniu ujmuje schemat 6. Lewa strona schematu przedstawia powstawanie semialdehydu kwasu metylomalonowego z waliny oraz kwasu β -aminoizomasłowego z tyminy. Obydwa powstałe związki łączy ze sobą reakcja transaminacji. Dwie reakcje, a mianowicie oksydacyjna dekarboksylacja kwasu α -ketoizowalerialianowego oraz rozpad kwasu ureidoizomasłowego są nieodwracalne; nie jest więc możliwe przejście tyminy w walinę lub odwrotnie. Druga (prawa) część schematu opisuje powstawanie kwasu propionowego z izoleucy-

ny oraz wytwarzanie β -alaniny z uracylu. Ciąg reakcji analogiczny do przemian waliny łączy ze sobą kwas propionowy i β -alaninę. Wytworzenie kwasu bursztynowego z kwasu propionowego i (jak przypuszcza się) z semialdehydu kwasu metylomalonowego oraz powstawanie aktywnego kwasu octowego z semialdehydu kwasu malonowego — włączają opisane reakcje w cykl kwasów trójkarboksylowych. Należy zwrócić jednakże uwagę na to, że nie wszystkie dane tego schematu są w pełni udowodnione; w szczególności związanie semialdehydu kwasu metylomalonowego z jego aktywną postacią jest nieudowodnionym przypuszczeniem. Mimo jednak tej niepewności omówione badania zdają się łączyć w logicznie związaną całość.

LITERATURA

1. Atchley W. A., J. Biol. Chem. **176**, 123, 1948.
2. Avigan J. Quastel J. H. Scholefield P. G., Biochem. J. **60**, 329, 1955.
3. Awapara J. Seale B., J. Biol. Chem. **194**, 497, 1952.
4. Awapara J. Sato J., Clin. Chim. Acta **1**, 75, 1956.
5. Bachhawat B. K. Robinson W. G. Coon M. J., J. Biol. Chem. **216**, 727, 1955.
6. Bachhawat B. K., Coon J. M., J. Am. Chem. Soc. **79**, 1508, 1957.
7. Bachhawat B. K., Robinson W. G., Coon J. M., J. Biol. Chem. **219**, 539, 1956.
8. Baldwin E. *Dynamic Aspects of Biochemistry* II wyd. University Press Cambridge 1952 str. 447, 448.
9. Barnabei O., Valyasevi A., Arch. Biochem. Bioph. **69**, 259, 1957.
10. Barness L. A., Moeksi H., György P., J. Biol. Chem. **221**, 93, 1956.
11. Beck W. S., Flavin M., Ochoa S. J. Biol. Chem. **229**, 997, 1957.
12. Berezowska N. N., Biochimia **23**, 125, 1958.
13. Bessman S. P., Rossen J., Layne E. C., J. Biol. Chem. **201**, 385, 1953.
14. Boyland E., Levi A. A., Biochem. J. **30**, 2007, 1936.
15. Braunstein A. E., Azarch R. M., Biochimia **22**, 430, 1957.
16. Braunstein A. E., Azarch R. M., Wopr. Mied, Chimii **3**, 380, 1957.
17. Braunstein A. E., Azarch R. M., Arch. Biochem. Bioph. **69**, 634, 1957.
18. Braunstein A. E., *Biochimia Aminokislotnego Obmienu* Moskwa 1949. a) str. 52, b) str. 160.
19. Braunstein A. E., XII *Bachowskie Cztenie glawnije puti assimilacji i dysimilacji azota u zywotnych* Moskwa 1957.
20. Butts J. S., Blunden H., Dunn M. S., J. Biol. Chem. **120**, 289, 1937.
21. Calchi Novati C., Ceppellini A., Biancho I., Silvestroni E., Harris., Ann. Eugen. Cambr. **18**, 335, 1954.
22. Cambell L. L. J., J. Biol. Chem. **227**, 693, 1957.
23. Cambell L. L. J., J. Bacter. **73**, 220, 1957; **73**, 225, 1957.
24. Cammarata P. S. and Cohen P. P., J. Biol. Chem. **187**, 439, 1950.
25. Canelakis E. S., J. Biol. Chem. **221**, 315, 1956.
26. Canelakis E. S., J. Biol. Chem. **227**, 329, 1957.
27. Canelakis E. S., J. Biol. Chem. **227**, 701, 1957.

28. Carter H. E., *Biol. Symposia* 5, 47, 1941.
29. Cedrangolo F., Piazza R., Ranetta G., *Italian J. Biochem.* 6, 56, 1957.
30. Cohen P. P. *Chemical Pathways of Metabolism* Academic Press New York 1954 str. 40.
31. Coon M. J., Robinson W. G., Bachhawat B. K., w Mc Elroy W. D. Glass B., *Amino acid metabolism* Baltimore 1955 str. 431.
32. Coon M. J., Abrahamsen N. S. B., *J. Biol. Chem.* 195, 805, 1952.
33. Coon M. J., Abrahamsen N. S. B. Green G. S., *J. Biol. Chem.* 199, 75, 1952.
34. Coon M. J., *J. Biol. Chem.* 187, 71, 1950.
35. Crane F. H., Mii S., Hauge J. G., Green D. E., Beinert H., *J. Biol. Chem.* 218, 701, 1956.
36. Crane F. H., Hauge J. G., Beinert H., *Biochem. Biophys. Acta* 17, 293, 1955.
37. Crumpler M. R., Dent C. E., Harris H., Westall R. G., *Nature* 167, 302, 1951.
38. Den H., *Federation Proc.* 17, 210, 1958.
39. Eadie G. S., Bernheim F., Bernheim M. L. C., *J. Biol. Chem.* 181, 449, 1949.
40. Evered D. F., *Biochem. J.* 62, 416, 1956.
41. Fink K., Henderson R. B., Fink R. M., *Proc. Soc. Biol. and Med.* 76 692, 1951.
42. Fink K., Henderson R. B., Fink R. M., *J. Biol. Chem.* 197, 441, 1952.
43. Fink R. M., Fink K., Henderson R. B., *J. Biol. Chem.* 201, 349, 1953.
44. Fink K., Cline R. E., Henderson A. B., Fink R. M., *J. Biol. Chem.* 221, 425, 1956.
45. Flavin M., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* 229, 965, 1957.
46. Flavin M., Castro-Mendoza M., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* 229, 981, 1957.
47. Flavin M., Ostiz P. J., Ochoa S., *Nature* 176, 823, 1955.
48. Flavin M., Castro-Mendoza N., Ochoa S., *Biochim. Bioph. Acta* 20, 591, 1956.
49. Friedberg F. Adler J., Lardy M. A., *J. Biol. Chem.* 219, 943, 1956.
50. Fritzson P., *J. Biol. Chem.* 226, 223, 1957.
51. Fritzson P., A. Pihl, *J. Biol. Chem.* 226, 229, 1957.
52. Fritzson P., *Acta Chem. Scand.* 10, 1674, 1956.
53. Funk C., Merrit A. J., Ehrlich A., *Arch. Biochem. Biophys.* 35, 468, 1952.
54. Gartler S. M., Firschein J. L., Gidpasaw T., *Acta Genet. et Stat. Med.* 6, 435, 1956—1957.
55. Gartler S. M., *Am. J. Hum. Genet.* 8, 120, 1956.
56. Gartler S. M., Dobzkansky Th., Berry H. K., *Am. J. Hum. Genet.* 7, 108, 1955.
57. Gibson D. M., Ayengar P., Sanadi D. R., *Biochim. Bioph. Acta* 21, 86, 1956.
58. Greczko W. W., *Biochimia* 22, 736, 1957.
59. Green D. E., Goldman D. S., Mii S., Beinert H., *J. Biol. Chem.* 202, 137, 1953.
60. Green D. E., Mii S., Mahler H. K., Bock K. M., *J. Biol. Chem* 206, 1, 1954.

61. Grisolia S., Cohen P. P., J. Biol. Chem. **204**, 753, 1953.
62. Grisolia S., Marshall R. O. W., Mc Elroy W. D., Glass B., *Amino acid metabolism* Baltimore 258, 1957.
63. Grisolia S., Cohen P. P., J. Biol. Chem. **198**, 561, 1952.
- 63a. Grisolia S. Cordoso S. S., Biochim. Biophys. Acta **25**, 430, 1957.
64. De Grouchy J., Sutton H. E., Am. J. Hum. Genet. **9**, 76, 1957.
65. Hall H. M., Metzenberg R. H., Cohen P. P., J. Biol. Chem. **230**, 1013, 1958.
66. Hansen R. P., Shorland F. B., Cooke N. J., Biochem. J. **65**, 18, 1958.
67. Harris H., Ann. Eugen. Camb. **18**, 43, 1953.
68. Harris H., *Rapports III Congrès de Biochimie Bruxelles* **34**, 1955.
69. Harris H., *Ann. Introduction to Human Biochem. Genetics Eugen. Labor Memoirs* **37** Cambridge Univ. Press London 1953.
70. Hayaishi, J. Biol. Chem. **215**, 125, 1955.
71. Hele P., J. Biol. Chem. **206**, 671, 1954.
72. Holmes W. H., Prusoff W. N., Welch A. D., J. Biol. Chem. **209**, 503, 1954.
73. Huenneckens F. M., Mahler H. R., Nordman J., Arch. Biochem. **30**, 66, 1951.
74. James A. T., Peeters G., Laurysens M., Biochem. J. **64**, 726, 1956.
75. James A. T., Wheatley R., Biochem. J. **63**, 269, 1956.
76. Jones M. E., Spector L., Lipmann F., *Sowriemiennyje Problemy Biochimii*, Moskwa 1957, str. 371.
77. Katz J., Chaikoff I. L., J. Am. Chem. Soc. **77**, 2659, 1955.
78. Kinnory D. S., Takeda J., Greenberg D. M., J. Biol. Chem. **212**, 385, 1955.
79. Kometiani P. A., Klein J. E., Biochimia **21**, 359, 1956.
80. Korzenowsky M., w Mc Elroy W. D., Glass B., *Amino Acid metabolism* Baltimore 309, 1951.
81. Krebs H. A., *Chemical Pathways of Metabolism* V. I. Academic Press New York 1954 str. 130.
82. Krebs H. A., Eggleston L. V., Knivett V. A., Biochem J. **59**, 185, 1955.
83. Kupiecki F. P., Coon J. M., J. Biol. Chem. **229**, 743, 1957.
84. Lardy H. A., Adler J., J. Biol. Chem. **219**, 933, 1956.
85. Lorber V., Livson N., Sakami W., Wood H. G., J. Biol. Chem. **183**, 531, 1950.
86. Lowenstein J. M., Cohen P. P., J. Biol. Chem. **220**, 57, 1956.
87. Lowenstein J. M., Cohen P. P., J. Biol. Chem. **213**, 689, 1955.
88. Mahler H. R., Hueneekens F. N., Biochim. Biophys. Acta **11**, 575, 1953.
89. Mahler H. R., J. Biol. Chem. **206**, 13, 1954.
90. Martingnoni P., Winnick P., J. Biol. Chem. **208**, 251, 1954.
91. Masoro E. J., Felts J. M., Pangars S. S., Rapport D., Arch. Biochem. Bioph. **68**, 270, 1957.
92. Meister A., *Biochemistry of the Amino Acids* Academic Press New York 1957, a) str. 180, b) 175.
93. Meister A., Tice S. V., J. Biol. Chem. **187**, 173, 1954.
94. Nakada H. J., Wolfe J. B., Wick A. N., J. Biol. Chem. **226**, 145, 1957.
95. Oginsky E. L. W., Mc Elroy W. D., Glass B., *Amino Acid metabolism* Baltimore 1955 str. 300.

96. Olson J. A., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **202**, 841, 1953.
97. Parnas J. K., Heller J., *Biochem. Z.* **152**, 1, 1924.
98. Parszın H. N., Goruchina T. A., Gromyko E. A., *Wopr. Med. Chimij* **1**, 217, 1949.
99. Pennington R. J., *Biochem. J.* **56**, 410, 1954.
100. Pennington R. J., *Biochem. J.* **65**, 534, 1957.
101. Pennington R. J., Appleton J. M., *Biochem. J.* **69**, 119, 1958.
102. Pihl N., Fritzsón P., *J. Biol. Chem.* **215**, 345, 1955.
103. Razin S., Bachrach U., Gery J., *Nature* **181**, 700, 1958.
104. Reichard P., Sköld O., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 376, 1958.
105. Reichard P. *Nukleinowyje Kisloty Moskwa 1957 str.* 237.
106. Rendina G., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **225**, 523, 1957.
107. Roberts E., Frankel S., *J. Biol. Chem.* **187**, 55, 1950.
108. Roberts E., Bregoff H. M., *J. Biol. Chem.* **201**, 393, 1953.
109. Robinson W. G., Coon J. M., *J. Biol. Chem.* **225**, 511, 1957.
110. Robinson W. G., Nagle R., Bachhawat B. K., Kupiecki F. P., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **224**, 1, 1957.
111. Robinson W. G., Bachhawat B. K., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **218**, 391, 1956.
112. Rowsell E. N., *Biochem. J.* **64**, 235, 246, 1956.
113. Rudman D., Meister A., *J. Biol. Chem.* **200**, 591, 1953.
114. Salvatore F., Saccone G., Italiano J. of *Biochem.* **6**, 103, 1957.
115. Schenck J. R., *J. Biol. Chem.* **149**, 111, 1943.
116. Schreeve W. W., *J. Biol. Chem.* **195**, 1, 1952.
117. Siewierin S. E., Judełowicz R. J., *Biochimia* **12**, 105, 1947.
118. Sorwaczew K. F., *Biochimia* **18**, 696, 1953.
119. Stadtman E. R., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5765, 1955.
120. Stein J. R., *J. Biol. Chem.* **201**, 45, 1953.
121. Stern J. R., del Campillo A., Raw J., *J. Biol. Chem.* **218**, 971, 1956.
122. Stern J. R., del Campillo A., Raw J., *J. Biol. Chem.* **218**, 985, 1956.
123. Stern J. R., Coon J. M., del Campillo A., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1517, 1953.
124. Stern J. R., Coon M. J., del Campillo A., N. Schneider M. C., *J. Biol. Chem.* **231**, 151, 1956.
125. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 927, 1954.
126. Tietz A., *Federation Proc.* **17**, 332, 1958.
127. Wallach D. A., Grisolia S., *J. Biol. Chem.* **226**, 277, 1957.
128. Wick A. N., *J. Biol. Chem.* **141**, 897, 1941.
129. Wolfe J. B., Ivrler D., Rittenberg S. C., *J. Biol. Chem.* **209**, 867, 875, 1954.
130. Whiteley H. R., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1518, 1953.
131. Visser D. W., Van Prag D., Fukuhava T. K., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 217, 1957.
132. Virtanen A. J., Rintola P., Laine T., *Nature* **142**, 674, 1938.
133. Caravaca J., Grisolia S., *J. Biol. Chem.* **231**, 357, 1958.

kotycznymi — na drodze procesów fizyko-chemicznych. Stąd też wypływa znaczenie metod preparatywno-chemicznych w badaniach nad przemianą tych leków.

Trzy omawiane leki — INH, PAS i T-40 — stanowią grupę najczęściej stosowanych w Polsce przeciwprątkowych chemioterapeutyków syntetycznych i pomimo stale pojawiających się nowych preparatów, dotychczas nie są zastąpione innymi. Zmiany w terapii gruźlicy polegają głównie na rozmaitym kojarzeniu tych trzech leków celem uniknięcia lekooporności, szkodliwych działań ubocznych i złej tolerancji osobniczej.

Przemiana INH

We krwi zwierząt otrzymujących izoniazyd stwierdzono obok podanego preparatu obecność kwasu izonikotynowego, hydrazyny i amoniaku. Wartości stężenia INH we krwi podane przez niektórych autorów są bardzo wysokie (np. 118 mcg/ml po 45 min. od iniekcji dożylnnej). Tłumaczy się to tym, że pobierano krew od zwierząt otrzymujących toksyczne, prowadzące do drgawek dawki preparatu (19). Badania moczu ludzi czy zwierząt, którym podano izoniazyd, wykazało obecność nieznacznej ilości niezmiennego INH oraz kilku produktów jego przemiany, przede wszystkim N-izonikotynoilo-N'-acetylohydrazyny (4, 9, 16). Ta acetylowa pochodna stanowi około 91% wydalonego w ciągu doby INH. Jest ona mniej toksyczna od izoniazylu, ale jednocześnie wykazuje znacznie słabsze właściwości tuberkulostatyczne.

Pierwsze prace omawiające przemiany izoniazylu w organizmie zwierzęcym nie dają dokładnej identyfikacji jego metabolitów. Dopiero opublikowane w 1957 badania Krüger-Thiemera wyjaśniły szereg możliwości biologicznego reagowania izoniazylu w ustroju, łączą wiele przemian w bardziej zwartą całość.

Według dotychczasowych danych liczba wydalanych w moczu produktów przemiany izoniazylu wynosi siedem. W moczu ludzi, królików, świnek morskich i szczurów wykryto następujące związki:

INH

wolny kwas izonikotynowy

izonikotynoiloglicynę

acetylo-INH

hydrazon kwasu pirogronowego

hydrazon kwasu alfa-ketoglutazarowego (28).

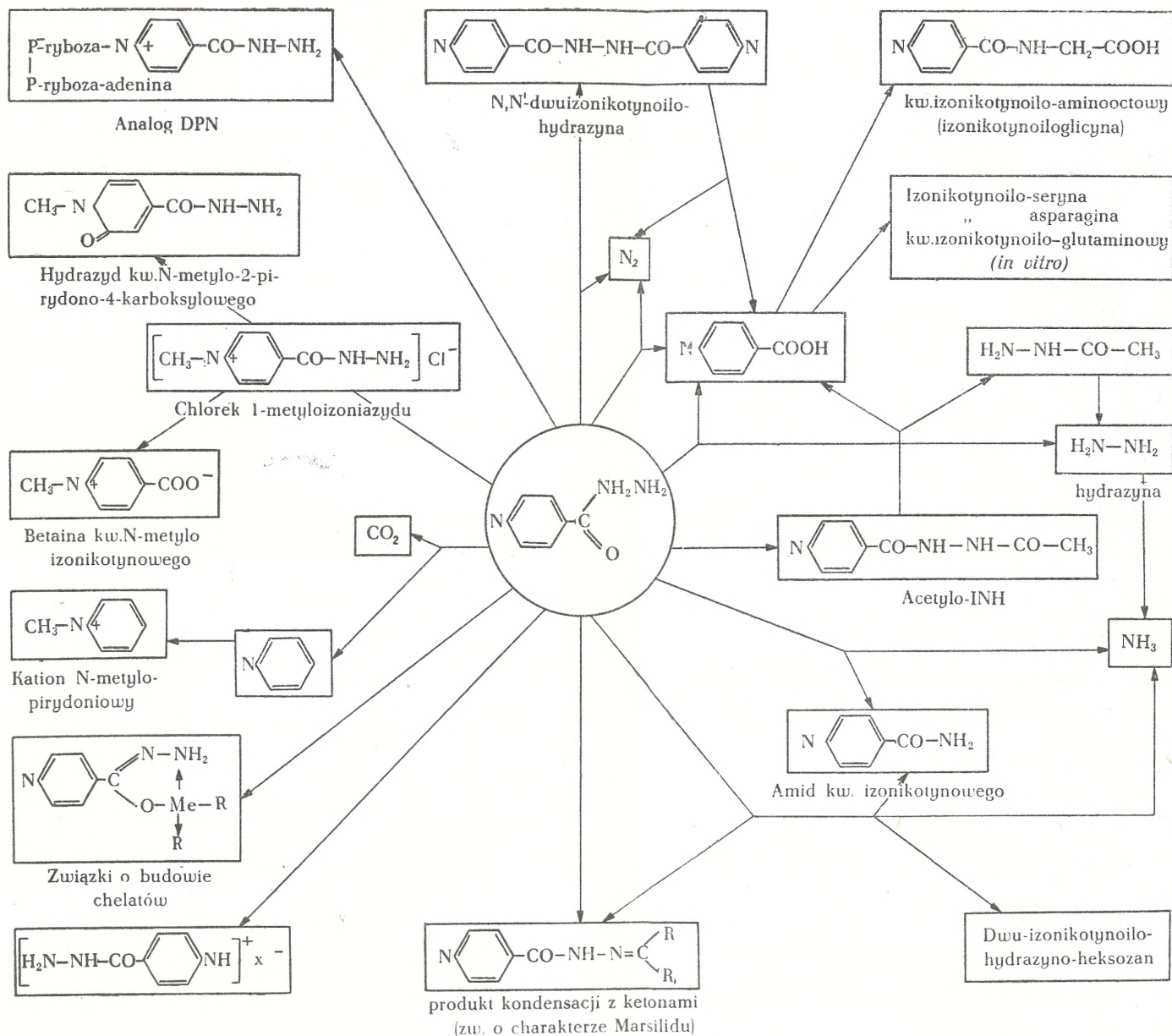
Poza wyżej wymienionymi związkami, które na chromatogramie znajdują się blisko siebie, w niewielkiej odległości od acetylo-INH i hydrazonu kwasu alfa-ketoglutazarowego znajdują się dwa związki:

N-N'-dwiizonikotynoilohydrazyna i

chlerek 1-metyloizoniazylu (13).

Tabela 1

Możliwości reakcji biochemicznych INH wg E. Krüger-Thiemera (14).



Schemat przemian biochemicznych, w wyniku których powstają wymienione związki oraz kilka innych, nie wykrytych dotąd, lecz zdaniem Krüger-Thiemera prawdopodobnych metabolitów hydrazynu kwasu izonikotynowego, podany jest w tabeli 1.

Obecność w moczu niezmienionego izoniazydu nie nasuwa wątpliwości. Pewna jego ilość zależnie od zastosowanej dawki musi pojawiać się w moczu. Występowanie wolnego kwasu izonikotynowego tłumaczą autorzy dwoma równoległe przebiegającymi procesami.

Pierwszy — to hydroliza izoniazydu na kwas izonikotynowy i hydrazynę. Uwalnianie hydrazyny i powstawanie w niej amoniaku łączy się według niektórych autorów z neurotoksycznym działaniem INH (14). Jednocześnie należy zaznaczyć, że hydroliza izoniazydu łączy się ściśle z jego inaktywacją (13). Drugą możliwą drogą powstania wolnego kwasu izonikotynowego jest przekształcenie INH w N,N'-dwiizonikotynoilo-hydrazynę. Według Alberta i Reesa izoniazyd ulega rozkładowi w obecności heminy z wytworzeniem wspomnianej N,N'-dwiizonikotynoilo-hydrazyny, która z kolei ulega dalszym przemianom, dając kwas izonikotynowy. Natomiast według Krüger-Thiemera związek ten powstaje z niezmienionego INH i kwasu izonikotynowego. Proces ten zachodzi także i w nieobecności heminy, jednak bez porównania wolniej.

Wolny kwas izonikotynowy, jak wiele kwasów organicznych, może łączyć się *in vivo* z glicyną dając izonikotynoiloglicynę. Przemiana ta zachodzi głównie w surowicy a poza tym prawdopodobnie w wątrobie i nerce (27). W reakcjach enzymatycznych prowadzonych *in vitro* (14) stwierdzono powstanie połączeń kwasu izonikotynowego z różnymi aminokwasami, jednak *in vivo* połączenie takie zachodzi wyłącznie z glicyną (98).

Acetylo-izoniazyd powstaje w wyniku acetylacji w sposób podobny do tworzenia się w organizmie żywym acetylo-pochodnych sulfonamidów, kwasu p-aminosalicylowego czy amin aromatycznych. W procesie tym bierze udział acetylo-koenzym A (27). Zdolność ustroju do szybkiego acetylowanie jest cechą indywidualną (10) i z tego względu obserwuje się różnice ilościowe w wydalaniu acetylo-izoniazydu.

Acetylo-INH w wyniku hydrolizy może dać kwas izonikotynowy i acetylohydrazynę (10, 27).

Amid kwasu izonikotynowego, który może powstać przez bezpośrednie odcięcie amoniaku od INH, wykryto tylko we krwi (20), natomiast nie występuje on w moczu (14).

Poza wymienionymi już hydrazonami kwasu pyrogronowego, alfa-ketogentarowego znaleziono w moczu połączenie izoniazydu z kwasem dehydroaskorbinowym (14). Hipoteza, że wytworzone hydrazony ketokwasów są aktywną formą INH w ustroju, nie została potwierdzona.

Powstawanie chlorku 1-metylo-izoniazydu przebiega zgodnie z ogólną zasadą wytwarzania amin czwartorzędowych w organizmie żywym. Nie jest to jednak jedyna czwartorzędowa pochodna, jaką daje izoniazyd. W 1954 r. Z a t m a n i współpracownicy wyodrębnili z krwi po podaniu INH żółto zabarwiony związek z maksimum absorpcji w 385 m μ i własnościami zbliżonych do własności DPN (29, 30). Związek ten okazał się analogiem nukleotydu pirydynowego, w którym INH zastępuje amid kwasu nikotynowego, tworząc nowy, nieswoisty dla organizmu żywego układ.

Autorzy zajmujący się oznaczaniem metabolitów INH w moczu metodami kolorymetrycznymi stwierdzają obecność jeszcze jednego związku, którego występowanie nie nasuwa żadnych zastrzeżeń, choć nie jest on wymieniony przez większość badaczy. Jest to kwas izonikotynurowy (18). Być może, że to mało trwałe połączenie ulega rozkładowi w czasie chromatowania w z uwolnieniem kwasu izonikotynowego.

Poznanie produktów przemiany INH wydalonych w moczu nie pozwala na ustalenie mechanizmu jego działania. Przypuszczano, że blokuje on dehydrogenazy, zastępując w DPN i TPN amid kwasu nikotynowego (20, 30). Obecnie jednak bardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza C o l e m a n a, według której mechanizm działania INH polega na przeniesieniu grupy hydrazynowej na pirydoksal i zablokowaniu jego tego koenzymu. Łatwy rozpad hydrazonów izoniazydu wspomaga jego działanie *in vitro* i *in vivo*. Kwestia szkodliwego wpływu INH na gospodarkę węglowodanową nie została wyjaśniona.

Obecny stan wiedzy o przemianach INH w ustroju, choć nie daje jeszcze całkowitego obrazu toczących się procesów w sensie zwartego cyklu, pozwala jednak na wyrobienie sobie poglądu odnośnie wielu fragmentów jego metabolizmu i możliwości reakcji biochemicznych, niemniej jednak dopiero powiązanie wszystkich zebranych faktów pozwoli na udzielenie ostatecznej odpowiedzi.

Przemiana PAS-u

Kwas p-aminosalicylowy jest najstarszym z trzech omawianych leków przeciwgruźliczych. Pomimo wielu niekorzystnych działań ubocznych od 11 lat należy on do szeroko stosowanych chemioterapeutyków. Związek ten jest szybko wchłaniany z przewodu pokarmowego po podaniu doustnym. Najwyższe jego stężenie stwierdzono w nerce, następnie w płucach, w wątrobie i krwi, gdzie znajduje się w postaci związanej z białkami (26). Szybkie wydalenie kwasu p-aminosalicylowego wolnego i związanego z moczem — po 6 godzinach 70% do 90% podanej dawki — wiąże się z jednej strony z dobrym wchłanianiem z drugiej zaś z minimalnym rozkładem preparatu przez tkanki. Przez jakiś czas możliwość dekarboksylacji PAS

w żołądku była kwestią sporną. Niektórzy badacze przypuszczali, że działanie przeciwbakteryjne PAS-u związane jest z tą reakcją i wytwarzaniem m-aminofenolu. Badania *in vitro* wykazują istotnie nietrwałość grupy karboksylowej kwasu p-aminosalicylowego w środowisku kwaśnym, natomiast część autorów zaprzecza całkowicie możliwości analogicznej przemiany *in vivo* (23), inni zaś opierając się na doświadczeniach wykonanych z PAS-em zawierającym ^{14}C są zdania, że po podaniu doustnym 1—1,5% preparatu ulega dekarboksylacji (8). Pierwsze badania moczu ludzi czy zwierząt otrzymujących PAS wykazywały obecność trzech połączeń z wolnymi grupami aminowymi i dwóch z grupami związanymi. Do r. 1948 za główne metabolity uważano kwas acetyloaminosalicylowy, kwas aminosalicylurowy, 4-aminosalicyloiloglicynę (17, 23, 25). Dokładna analiza moczu wykonana metodą chromatograficzną wykazuje obecność sześciu, czasami nawet siedmiu substancji, będących metabolitami kwasu p-aminosalicylowego, metodą ekstrakcji przeciwprądowej, pięciu związków. Na chromatogramie moczu po podaniu PAS-u stwierdzono obecność następujących plam podanych według kolejności występowania, co w pewnym sensie może być scharakteryzowaniem niezidentyfikowanych substancji:

1. kwas p-aminosalicylurowy
2. X
3. PAS
4. X_4 (?)
5. Kwas p-acetyloaminosalicylowy
6. X_2
7. m-aminofenol.

Z siedmiu składników zidentyfikowano cztery oznaczone numerami: 1, 3, 5, 7, natomiast pozostałe trzy X_1 , X_2 , X_4 (?) — są tylko częściowo scharakteryzowane (27).

Pierwszy z omawianych metabolitów — kwas p-aminosalicylurowy — nie przez wszystkich autorów wyizolowany był z moczu toteż niektórzy zaprzeczają możliwości jego powstawania w organizmie (123). Jednakże Lehman i inni autorzy stwierdzili obecność kwasu p-aminosalicylurowego we krwi, wprawdzie w stężeniu niewielkim, niemniej wykazującym możliwość jego biosyntezy (27).

Połączenie oznaczone symbolem X_1 występujące w ilości mniejszej niż 10% wszystkich produktów PAS-u wykrywane jest tylko w świeżym moczu, co przemawia za jego nietrwałością. Związek ten daje żółte zabarwienie z odczynnikiem Ehrlicha po rozpuszczeniu w wodzie czy dioksanie. Z solami żelaza nie reaguje.

Ilość wolnego kwasu p-aminosalicylowego w moczu zależy od dawki leku i indywidualnej zdolności acetylacyjnej danego organizmu.

Pochodna X_3 — nie umieszczona w wykazie substancji rozdzielonych

chromatograficznie, wykryta została w wyniku rozdziału przeciwprądowego. Stanowi ona ok. 5% wszystkich amin wydalonych z moczu po podaniu PAS-u. Z odczynnikiem Ehrlicha daje słabą reakcję dodatnią, po hydrolizie daje na chromatogramie plamę o wartości R_f PAS-u.

Produktu oznaczonego symbolem X_4 (?) i wytwarzającego z odczynnikiem Ehrlicha intensywne żółte zabarwienie nie otrzymano metodą rozdziału przeciwprądowego, a jedynie na chromatogramach i to nie we wszystkich próbkach moczu. Jednak próba kontrolna — badanie moczu osób nie otrzymujących PAS-u — wypada ujemnie co wskazywało, że połączenie to jest jednak metabolitem podanego leku.

Kwas p-acetyloaminosalicylowy stanowi główny metabolit PAS-u — ilość jego wynosi ok. 90% wydalonych w moczu produktów przemiany PAS z zablokowaną grupą aminową — z czego wynika, że acetylacja jest zasadniczym mechanizmem detoksykacyjnym tego preparatu. Według Bartolonia tworzenie się pochodnej acetylowej PAS-u jest ściśle związane z jego właściwościami przeciwbólowymi, przeciwgorączkowymi, przeciwreumatycznymi (3). Pogląd ten jest jednak odosobniony. Wielu autorów przypisuje lecznicze działanie kwasu p-aminosalicylowego zapobieganiu acetylacji innych substancji podawanych jednocześnie.

Właściwość ta związana jest nie tyle z szybkością acetylowania, co z dużą dawką PAS-u. Pojemność acetylacyjna ustroju posiada pewne granice. Duża liczba cząsteczek kwasu p-aminosalicylowego wychwytuje reszty kwasu octowego. Inne aminy, np. INH, również ulegają acetylowaniu, jednak ze względu na małą dawkę INH w porównaniu z dawką PAS-u jego chłonność grup acetylowych jest bez porównania mniejsza. Prawdopodobnie synergizm PAS-u i INH oparty jest na tej zależności (12).

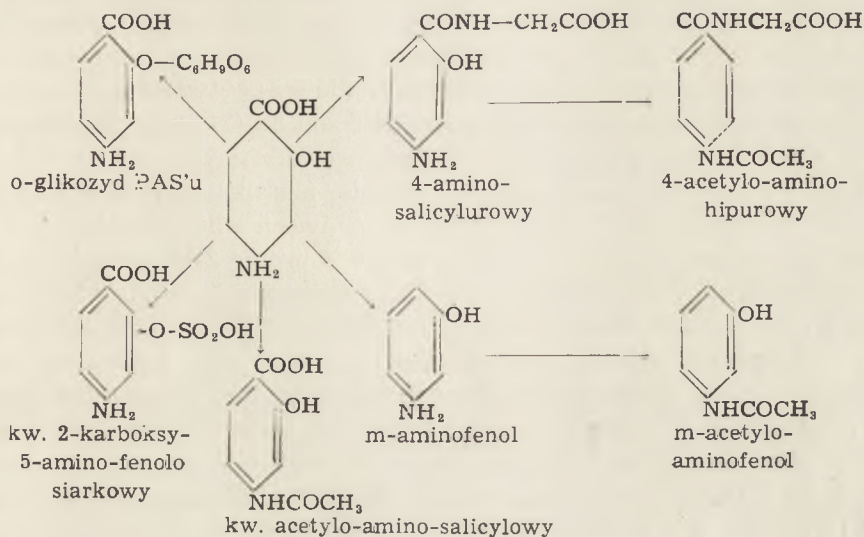
Ostatnia z niezidentyfikowanych pochodnych oznaczona symbolem X_2 jest przypuszczalnie pochodną fenolową. Z odczynnikiem Ehrlicha daje reakcję ujemną, z solami żelaza zabarwienie fioletowe.

Wykrycie w moczu m-aminofenolu będącego głównym produktem rozkładu PAS-u *in vitro* (25) i stanowiącego zawsze zanieczyszczenie tego preparatu nie wykazywałoby jeszcze, że powstał on w organizmie. Jednak ilości znalezione w moczu są wyższe od stwierdzonych w preparacie handlowym.

Na tabeli 2 podany jest schemat możliwych przemian PAS-u według Bagdasariana. Obok metabolitów zidentyfikowanych znajdują się tam związki nie wykryte: o-glikozyd PAS-u i ester kwasu siarkowego (kwas 2-karboksy-5-aminofenolosiarkowy), które mogłyby powstać w warunkach biologicznych. Nie jest wykluczone, że odpowiadają one związkom X. Obecność trzech aktywnych grup w cząsteczce PAS-u ($-\text{COOH}$ — $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) daje możliwość wytwarzania różnego typu produktów przemiany.

Tabela 2

Schemat przemian PAS-u wg Bagdasarjana (2)



Badania z kwasem p-aminosalicylowym znakowanym radioaktywnym węglem wykazały, że lek ten szybko przenika do tkanek ze zmianami serowatymi i osiąga równe stężenie w tkance wątrobowej i płucnej już w ciągu 30 minut (8).

Poważnym minusem leczenia gruźlicy kwasem p-aminosalicylowym jest zarówno duża dawka leku, jak i niekorzystne działanie uboczne. Z tego względu przed kilku laty powstał projekt zastąpienia PAS-u przez kwas 5-bromo-salicylohydroksamowy (T-40). Projekt ten nie został w pełni zrealizowany, niemniej istnieje w Polsce kilka dużych ośrodków klinicznych i sanatoryjnych stosujących ten preparat.

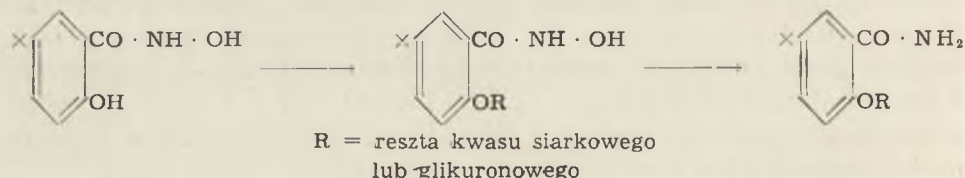
Przmiana T-40

Kwas 5-bromosalicylohydroksamowy oznaczony symbolem T-40 podany zwierzęciu dożylnie bardzo szybko znika z krwiobiegu. Spowodowane to jest łączeniem się tego związku z białkami osocza oraz zdolnością do reakcji z niektórymi aminokwasami. W organizmie zwierzęcym wykryto enzymy katalizujące proces łączenia się kwasów hydroksamowych z kwasem glutaminowym i asparaginowym (21, 25). W doświadczeniach, w których do płynu inkubacyjnego i miazgi wątroby, nerki oraz mięśnia dodano T-40, stwierdzono jego szybki zanik, natomiast po dodaniu tego preparatu do miazgi łącznie z 0,1 n kwasem solnym wykrywano go nawet

po dłuższym czasie. Wskazuje to na enzymatyczny charakter przemiany T-40. Tkanka wątrobowa, jako najbardziej bogata w enzymy, najszybciej metabolizuje preparat. Niewiele słabiej zachodzi ten proces w nerce (24). Wyniki te potwierdzone są wykryciem enzymu katalizującego powstawanie kwasów hydroksamowych z różnych amidów i peptydów w nerce oraz w wątrobie w czasie inkubacji z hydroksyloaminą (21, 25). Badania nad przemianą T-40 w organizmie królika przeprowadzili Mc Isaak i Williams (11). Preparat podawano doustnie, metabolity T-40 oznaczano w wydalonym moczu. Wykazano obecność dwóch glikuronidów A i B. Glikuronid A zidentyfikowano jako kwas 4-bromo-2-karbamylofenylo-beta-D-glikuronowy. Po hydrolizie rozcieńczonym kwasem otrzymano z niego 5-bromosalicyloamid. Glikuronid B okazał się kwasem 4-bromo-2-hydroksykarbamylofenylo-beta-D-glikuronowym. Po hydrolizie rozcieńczonym kwasem otrzymano z niego kwas 5-bromosalicylohydroksamowy, przy użyciu bardziej stężonego kwasu — kwas 5-bromosalicylowy. Oprócz glikuronidów wydzielono również odpowiednie połączenie z kwasem siarkowym. Autorzy przypuszczają, że pierwszą reakcją detoksykacji T-40 jest połączenie z resztą kwasu glikuronowego lub siarkowego, a dopiero później zachodzi redukcja grupy hydroksylaminowej do aminowej. Przemiany te podane są w tabeli 3.

Tabela 3

Przemiana T-40 wg W. M. Mc Isaaca (11)



T-40 u ludzi, królików, szczurów i myszy wydalany jest głównie w postaci amidu. Inaczej zachowuje się kwas salicylohydroksamowy — w tym przypadku reakcja zatrzymuje się po zablokowaniu grupy fenolowej i wytworzone połączenie nie ulega już redukcji, 5-bromosalicyloamid jest związkiem co najmniej dwukrotnie słabiej działającym tuberkulostatycznie niż T-40. Brak jeszcze hipotezy przedstawiającej mechanizm działania T-40. Wykrycie swoistych dla organizmu kwasów hydroksamowych nasuwa przypuszczenie, że lek ten może być czynnikiem hamującym ich normalny metabolizm.

Każdy następny rok niosący ze sobą nowe lub ulepszone metody badania, obszerniejszą wiedzę w dziedzinie biochemii, przynosi coraz większe możliwości poznania przemian zachodzących w ustroju zwierzęcym.

Zapewne najbliższe lata przyniosą dalsze materiały, które pozwolą ująć przemiany omawianych leków przeciwgruźliczych w bardziej ściślejszej formie.

LITERATURA

1. Albert A., Rees W. C., *Biochem. J.* **61**, 128, 1955.
2. Bagdasarian G., Praca wygłoszona na Zjeździe P. T. Fizjol., październik 1957.
3. Bartoloni F., wg Way E. L. i współpr., *J. A. P. A.* **44**, 65, 1955.
4. Bell J. C., Riemensnider D. K., *Am. Rev. Tuberc.* **75**, 992, 1957.
5. Bönicke R., Reif W., *Arch. exp. Path. u. Pharm.* **220**, 321, 1953.
6. Coleman Ch. M., *Am. Rev. Tuberc.* **69**, 1062, 1954.
7. Favez G., Lauener H., *Schw. med. Wschr.* **49**, 1395, 1956.
8. Heller A., Ebert R. H., *Am. Rev. Tuberc.* **75**, 1, 1957.
9. Hughes H. B., *J. Pharm.* **109**, 444, 1953.
10. Hughes H. B., Biehl J. P., Jones A. P., Schmidt L. M., *Am. Rev. Tuberc.* **70**, 266, 1954.
11. Mc Isaac W. M., Williams R. T., *Biochem. J.* **66**, 369, 1957.
12. Johnson W. J., *Nature* **174**, 744, 1954.
13. Krüger-Thiemer E., *Naturwissenschaft* **42**, 47, 1955.
14. Krüger-Thiemer E., *Beitr. Klin. Tuberk.* **II 117**, 179, 1957.
15. Lehman J., wg Way K. L., *J. A. P. A. Sci. edit.* **44**, 65, 1955.
16. Makino K., Kanoshita C., Itoh T., *Nature* **173**, 26, 1954.
17. Paraf J., Desbordes J., Henry J., Paraf M., *Compt. rend. Soc. Biol.* **142**, 162, 1948.
18. Peukert D., *Arzn. Forsch.* **7**, 304, 1907.
19. Porcellati G., Preziosi P., *Bol. Soc. Ital. Biol. Sper.* **29**, 269, 1953.
20. Preziosi P., Porcellati G., *Bol. Ital. Biol. Sper.* **29**, 271, 1953.
21. Slavik K., *Coll. Czechoslov. Chem. Comm.* **16**, 380, 1951.
22. Unterricht W., Schattmann K., Biedermann W., *Arztl. Wschrft.* **9**, 175, 1954.
23. Venkataraman A., Venkataraman P. R., Lewis H. B., *J. Biol. Chem.* **173**, 641, 1948.
24. Venulet J., Jakimowska K., Urbańska A., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II 4*, 189, 1956.
25. Virtanen A. I., Berg A. M., *Acta Chem. Scand.* **5**, 909, 1951.
26. Way E. L., Schmith P. K., Howie D. L., Weiss R., Swanson R., *J. Pharm. exp. Therap.* **93**, 368, 1948.
27. Way W. L., Chin-Tzu Peng, Nasseem Adlawala, Daniels T. C., *J. A. P. A. Sci. edit.* **44**, 65, 1955.
28. Wenzel M., *Naturwissenschaft* **42**, 370, 1955.
29. Zamboni V., Defranceschi A., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 430, 1954.
30. Zatman L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., Cotti M., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 3293, 1953.
31. Zatmam L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., Cotti M., *J. Biol. Chem.* **209**, 467, 1954.

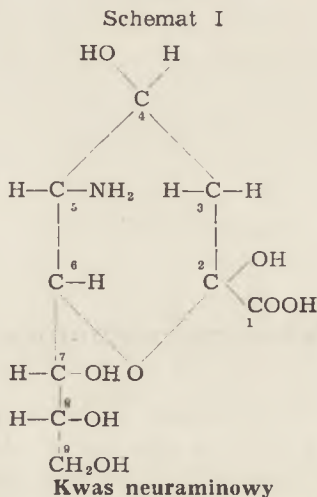
WIKTOR RZECZYCKI*

Kwas neuraminowy

Kwas neuraminowy jest związkiem wchodzącym w skład różnych glikoproteidów i glikolipidów. Jest to substancja, która z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym (odczynnik Ehrlicha) daje czerwone zabarwienie bez uprzedniego działania alkaliami. Ten właśnie odczyn doprowadził Blixa w 1936 roku do wykrycia w mucynie ślinianek podszczękowych wołu (4) związku, któremu nadał początkowo nazwę „węglowodan I” a w 1952 roku (5) „kwas sjałowy”. W międzyczasie Klenk otrzymał z gangliozydów mózgu przez działanie metanolem roztworem chlorowodoru substancję, którą nazwał kwasem metoksyneuraminowym (40, 41). Inni badacze izolowali z rozmaitych materiałów biologicznych związki o podobnych właściwościach, nadając im różne nazwy. Nadawanie związkom o tej samej strukturze różnych nazw skłoniło Blixa, Gottschalka i Klenka (8) do uzgodnienia nomenklatury; zgodzono się na to, by nazwę kwasu neuraminowego otrzymał związek o strukturze podanej w schemacie I; kwasami sjałowymi nazwano acylowe pochodne kwasu neuraminowego (N-acetyloneuraminowy, N,O-dwuacetyloneuraminowy, N-glikoliloneuraminowy); preparat otrzymany przez Klenka z gangliozydów mózgu zatrzymał swą dawną nazwę kwasu metoksyneuraminowego.

Wymienione związki różnią się więc od siebie rodzajem podstawników, a mianowicie: w kwasie metoksyneuraminowym na węglu 2 grupą metoksyłową, a w kwasach sjałowych podstawnikami acylowymi połączonymi z grupą aminową i jedną z grup wodorotlenowych (32, 46). Obecność różnych podstawników w tych związkach powoduje, że niektóre własności chemiczne są różne. I tak kwas metoksyneuraminowy nie reaguje z odczynnikiem Ehrlicha, nie redukuje, natomiast daje dodatni odczyn z ninhydryną. Kwasy sjałowe dają barwne produkty kondensacji z odczynnikiem Ehrlicha, redukują wodorotlenki metali ciężkich, ale nie reagują z ninhydryną. Odpowiednim postępowaniem otrzymuje się z tych związków kwas metoksyneuraminowy (44).

* Lekarz, Asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku.



W tabeli I zestawiono pochodne kwasu neuraminowego z podaniem materiału biologicznego, z którego je uzyskano; dane tej tablicy pozwolą na uniknięcie nieporozumień, wynikających z nadawania rozmaitych nazw przez różnych autorów.

Tabela II podaje jakie kwasy sjałowe izolowano z rozmaitych tkanek.

Izolację pochodnych kwasu neuraminowego poprzedza hydroliza biologicznego materiału. Zazwyczaj w celu otrzymania pochodnej metoksyłowej działa się 2 do 5% metanolem w roztworze chlorowodoru w zatopionej rurze w temperaturze 105 do 110° C (41, 77). Jeżeli chodzi o uzyskanie pochodnych N-acetylowych, stosuje się łagodniejsze warunki (kwas siarkowy 0,1 N lub słabszy) (57,61,66), temperatura hydrolizy waha się wtedy od 70°—100° C. W celu wydzielenia pochodnych kwasu neuraminowego stosuje się żywice jonowymiennie; kwas metoksyneuraminowy adsorbuje się najlepiej na silnych kationitach jak Dowex 50 (77), kwasy sjałowe na silnych anionitach jak Dowex 1, Dowex 2, Amberlit IRA 400 (57,66,79); niektórzy autorzy używali odpowiednich gatunków węgla aktywnego (80). Wymywanie przeprowadza się wodą lub kwasami (66,77,79). W wyniku liofilizacji eluatów, a następnie frakcjonowanej krystalizacji otrzymuje się oczyszczone pochodne kwasu neuraminowego. Wydajność waha się od 20% do 90% ilości kwasu neuraminowego zawartego w badanym materiale, w zależności od sposobu postępowania i materiału wyjściowego (57,66,79).

Kwas neuraminowy jest związkiem nietrwałym i dlatego udało się izolować tylko jego pochodne, tj. kwas metoksyneuraminowy, N-acetyloneuraminowy, N,O-dwuacetylneuraminowy oraz N-glikoliloneuraminowy. Niektóre własności fizyczne i chemiczne kwasu metoksyneuraminowego i kwasu N-acetylneuraminowego podaje tabela III.

Tabela I
Pochodne kwasu neuraminowego z podaniem materiału biologicznego
z którego je uzyskano

Material biologiczny	Nadana nazwa	Odpowiada pochodnej kwasu neuraminowego
Gangliozydy (41)	Kwas metoksyneuraminowy	Kwas metoksyneuraminowy
Gangliozydy (65)	Kwas sjalowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Mucyna ślinianek podszczękowych wołu (24,43)	Kwas metoksyneuraminowy	Kwas metoksyneuraminowy
Mucyny: ślinianek podszczękowych owcy (7), cyst jajnikowych (60), śluzu dróg oddechowych i moczopłciowych (62,76), Owomucyna (62)	Kwas sjalowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Mucyna ślinianek podszczękowych wołu (7)	Kwas sjalowy	Kwas N,O-dwuacetyloneuraminowy
Mucyna ślinianek podszczękowych wieprza (7)	Kwas sjalowy	Kwas N-glikoliloneuraminowy
Stroma erytrocytów końskich. Biochem. J. (Tokyo) 39, 175 (1952) cytowane za (46)	Kwas hemataminowy	Kwas N,O-dwuacetyloneuraminowy
Mleko kobiece (81,82)	Kwas gynaminowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Siara krów (50)	Kwas metoksy-laktaminowy	Kwas metoksyneuraminowy
Siara krów (51,52,54)	O-acetylo-laktamino-laktoza	N,O-dwuacetyloneuramino-laktoza
Gruczoły mleczne szczurów (71)	Neuramino-laktoza	Neuramino-laktoza
Wątroba (57), nerki (58) człowieka	Kwas sjalowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Białka surowicy ludzkiej (61, 79)	Kwas sjalowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Białka surowicy ludzkiej (10,11, 12)	Kwas metoksyneuraminowy	Kwas metoksyneuraminowy
Smółka ludzka (61)	Kwas sjalowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Fetuina (47)	Kwas N-acetyloneuraminowy	Kwas N-acetyloneuraminowy

Tabela II
Kwasy sjałowe Blixa (7) z podaniem materiału biologicznego,
z którego je wyizolowano

Kwasy sjałowe		
Kwas N-acetyloneuraminowy	Kwas N-glikoliloneuraminowy	Kwas N,O-dwuacetyloneuraminowy*
Cysty jajnikowe, smółka, białka surowicy krwi, mucyna ślinianek podszczękowych owcy, gangliozydy, mleko kobiece, owomucyna, wątroba i nerka ludzka.	Mucyna ślinianek podszczękowych wieprza	Mucyna ślinianek podszczękowych wołu, stroma erytrocytów konia.

* Nie ustalono, przy którym atomie węgla kwasu neuraminowego znajduje się grupa O-acetylowa (7).

Do ilościowego oznaczania kwasu neuraminowego w mukoproteidach służą barwne odczyny z odczynnikami Ehrlicha, Biała, rezorcynolowym, z dwufeniloaminą, tryptofanem w kwasie nadchlorowym (38,39,42,64,68, 75,78). Oczywiście swoistość tych reakcji jest różna i wybór metody postępowania zależy od rodzaju badanego materiału. Dla oznaczania kwasu neuraminowego w obecności heksoz najlepiej nadaje się metoda orcynolowa i rezorcynolowa (67); w obecności pentoz lepiej posłużyć się odczynem z dwufeniloaminą (67). Dla identyfikacji i ustalenia jednorodności pochodnych kwasu neuraminowego stosuje się metodę chromatografii bibułowej. Najczęściej używa się układów: n-butanol—kwas octowy—woda 4 : 1 : 5 (66), lub 4 : 1 : 1 (77), butanol II rzędowy—kwas octowy—woda 4 : 1 : 5 (66), n-butanol-n-propanol-0,1 N HCl 1 : 2 : 1 (68a). Jako wywoływacz może służyć rozcieńczony odczynnik Biała (9) względnie odczynniki służące do wykrywania ketocukrów a mianowicie: orcynol — kwas trójchlorooctowy; naftorezorcynol — kwas trójchlorooctowy; α naftol — kwas trójchlorooctowy (66).

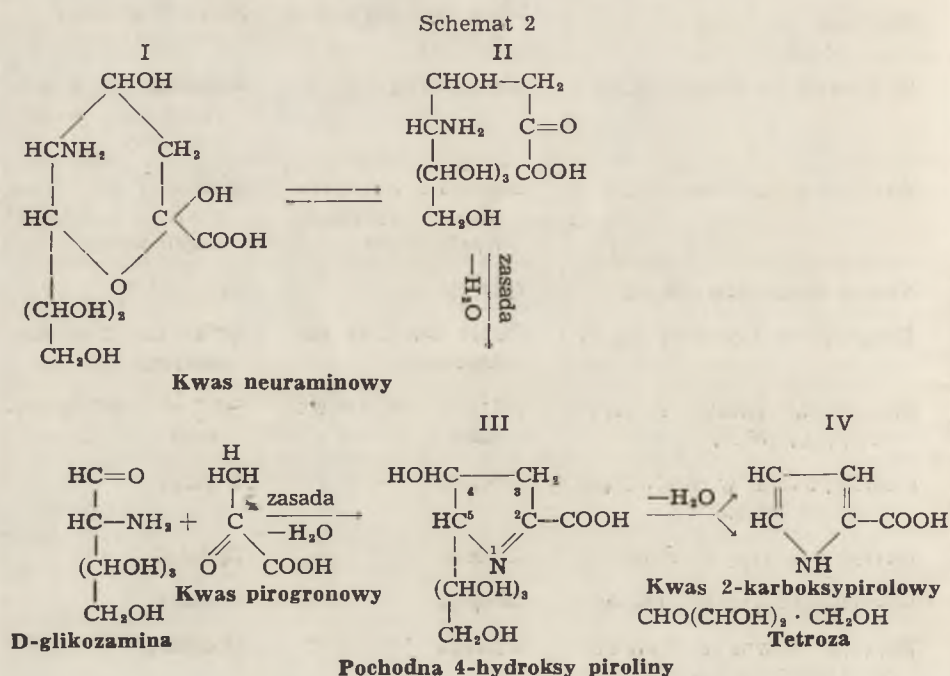
Ustalenie budowy kwasu neuraminowego nie było rzeczą łatwą. Analiza elementarna i oznaczenie masy cząsteczkowej kwasu N-acetyloneuraminowego dało wzór sumaryczny $C_{11}H_{19}O_9N$ (22). Krzywa miareczkowania ($pK_a = 2,6$) wskazuje na obecność jednej grupy karboksylowej w cząsteczce (66). Ujemna reakcja z ninhydriną świadczy o zablokowaniu grupy aminowej (26). Dla ustalenia położenia grup wodorotlenowych posłużono się utlenianiem przy pomocy nadjodanu (46). Najwięcej jednak danych dostarczyło badanie produktów rozkładu. Gottschalk ogrzewając do $100^\circ C$ mucynę z alkaliarni (pH około 11) stwierdza powstawanie kwasu α -karboksypirrolowego i zjawisko to łączy z rozpadem kwasu neuraminowego (30,31,32). Kuhn i Brossmer wykazują, że przy ogrze-

Tabela III
Własności fizyczne i chemiczne kwasu metoksyneuraminowego
i N-acetyloneuraminowego

Własności	Kwas metoksyneuraminowy	Kwas N-acetyloneuraminowy
Wrażliwość na zasady (31,46)	Niewrażliwy	Rozkłada się z wytworzeniem α karboksypirolu
Wrażliwość na kwasy (41,46)	Rozkład z wytworzeniem substancji huminowych	Rozkład z wytworzeniem substancji huminowych
Kształt kryształów (66,45)	Igły	Igły
Temperatura topnienia (22,46)	Około 200° C (z rozkładem)	Około 185° C (z rozkładem)
Skreślalność światła spolaryzowanego (22,46)	$[\alpha]_D^{20} = -55^\circ$ (w wodzie)	$[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ (w wodzie)
Oddziaływanie w roztworach wodnych (46,66)	Obojętne	Kwaśne
Odczyn redukcyjny (26,46)	Ujemny	Dodatni
Odczyn z ninhydriną (26,46)	Dodatni	Ujemny
Reakcja barwna z odczynnikiem Ehrlicha (46,75)	Ujemna	Dodatnia
Reakcja barwna z dwufenilaminą (78)	Ujemna	Dodatnia
Reakcja barwna z odczynnikiem Biala (2,75)	Dodatnia	Dodatnia
Reakcja barwna z odczynnikiem rezorcynolowym (66)	Dodatnia	Dodatnia
Reakcja barwna z tryptofanem w kwasie nadchlorowym (78)	Dodatnia	Dodatnia

waniu kwasu N-acetyloneuraminowego z pirydyną i octanem niklu powstaje N-acetyloglikozamina (53). Inni badacze otrzymali w wyniku rozkładu kwasu N-acetyloneuraminowego kwas pirogronowy i N-acetyloglikozaminę (83). Na podstawie tych faktów G o t t s c h a l k a także K u h n i B r o s s m e r podali hipotezę, że kwas neuraminowy jest produktem kondensacji aldolowej glikozaminy i kwasu pirogronowego. I rzeczywiście G o t t s c h a l k w 1957 roku działając w środowisku alkalicznym kwasem pirogronowym na glikozaminę otrzymuje kwas α -karboksypirolowy (34).

Powstawanie tego kwasu z mieszaniny glikozaminy i kwasu pirogronowego jak również z kwasu neuraminowego objaśnia Gottschalk w następujący sposób (schemat 2) (34).



Hipotetyczny związek III schematu 2 byłby produktem pośrednim zarówno przy rozpadzie kwasu neuraminowego, jak i w kondensacji D-glikozaminy z kwasem pirogronowym, która zachodzi działaniem czynników chemicznych.

Syntezę kwasu N-acetyloneuraminowego opisali w 1958 roku Cornforth i Gottschalk (22); w środowisku alkalicznym w temperaturze pokojowej ma miejsce kondensacja N-acetyloglikozaminy i kwasu szczawiooctowego na kwas N-acetyloneuraminowy, przy czym z kwasu szczawiooctowego odszczepia się dwutlenek węgla; krystaliczny produkt uzyskuje się po adsorpcji na jonowymiennych żywicach, wymyciu i frakcjonowanej krystalizacji. Przebieg tej syntezy wyjaśnia konfigurację przestrzenną atomów węgla 5, 7 i 8. Dla ustalenia konfiguracji atomów węgla 2 i 4 mają istotne znaczenie badania Kuhna i Brossmera (55). Autorzy ci działając na kwas laktaminowy (kwas N-acetyloneuraminowy) merkaptioetanem ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$) w kwasie solnym, otrzymali γ merkaptolakton. Związek ten silniej skręcał światło spolaryzowane w lewo ($[\alpha]_D^{25} = -83^\circ$) niż kwas N-acetyloneuraminowy ($[\alpha]_D^{25} = -32^\circ$); Wskazuje to, że jeżeli przyjmujemy oznaczenie konfiguracji według E. F i s c h e

ra, konfiguracja na węglu 4 byłaby minus. W roztworze dwumetylosulfotlenku kwas laktaminowy wykazuje mutarotację $[\alpha]_D^{25} = -115^\circ$ (7 min.) $\rightarrow [\alpha]_D^{25} = -37^\circ$ (23 min.) $\rightarrow [\alpha]_D^{25} = -24^\circ$ (wartość końcowa). Krystaliczny związek byłby więc początkowo w formie β , układ przestrzenny atomów węgla 2 byłby minus.

Na sposób związania kwasu neuraminowego z innymi składnikami mukoproteidów rzucają nieco światła badania Kuhna i Brossmera oraz Gottschalka. Autorzy ci stwierdzili, że zawsze przy hydrolizie połączeń kwasu neuraminowego zjawia się także galaktozamina lub inny cukier. Oznaczając wzrost własności redukcyjnych po hydrolizie kwasami i zasadami doszli do wniosku, że połączenie cukrowca z kwasem neuraminowym jest typu ozydowego (32,55). Kuhn i Brossmer izolowali z siary krów połączenie kwasu O,N-dwuacetylneuraminowego z laktozą, z którego w środowisku zasadowym odszczepia się reszta O-acetylowa. Powstały związek, połączenie kwasu N-acetylneuraminowego, z laktozą poddany metylowaniu a następnie hydrolizie daje 2,3,6-trójmetyloglikozę i 2,4,6-trójmetylogalaktozę. Wskazuje to, że kwas N-acetylneuraminowy łączy się z atomem węgla 3 galaktozy.

Znaczenie biologiczne kwasu neuraminowego jest tylko fragmentarycznie zbadane. Znanym jest fakt, że podczas inkubacji krwinek czerwonych z hodowlą wirusa grypy B następuje hemaglutynacja — tworzy się sieć złożona z krwinek czerwonych, pomiędzy którymi są wirusy. Jeżeli tak wytworzony układ aglutynacyjny utrzymuje się nadal w temperaturze 37°C , nastąpi rozpad tej sieci. Zostają uwolnione krwinki czerwone oraz wirusy. Takie wirusy mają zdolność ponownego zlepiania innych krwinek czerwonych, natomiast uwolnione erytrocyty tracą własności aglutynacyjne. W oparciu o te doświadczenia przyjęto, że w hodowli wirusa grypy B znajduje się czynnik nazywany „virus enzyme”, który enzymatycznie odszczepia z powierzchni erytrocyta substancję receptorową, to znaczy tę, która przytrzymuje wirus przy krwince (26). Podobne własności odszczepiania substancji receptorowej wykazuje przesącz hodowli przecinkowca cholery. Enzym zawarty w przesączu, a powodujący to odszczepienie nazywano „receptor destroying enzyme (RDE)”. Zauważono również, że pewne substancje jak owomucyna (27), mucyna moczu (29,59,69,70), mukoproteidy surowicy krwi (14,15,63) i inne (25,26,48) zapobiegają rozpuszczaniu układu, który powstał z aglutynacji krwinek pod wpływem wirusa. Jeżeli jednak wymienione mucyny inkubuje się z hodowlą wirusa lub z przesączem przecinkowca cholery, to tracą one te własności. Zjawisko to można wytłumaczyć przyjmując, że wirus jak i przesącz hodowli przecinkowca cholery odszczepia z mucyn i z powierzchni krwinek podobną substancję. Bliższe badania wykazały, że w skład tej substancji „receptorowej” wchodzi kwas neuraminowy. Zbadano działanie zarówno „virus enzyme”

(15,30,35,45,49,52), „RDE” (14,25,26,35,48) jak i podobnego enzymu zawartego w *Clostridium welchii* (15,63) na szereg mukoproteidów zawierających kwas neuraminowy i stwierdzono, że odszczepiają one pochodne kwasu neuraminowego w stanie wolnym. Prawdopodobnie substancją receptorową jest połączenie kwasu neuraminowego z innymi cukrowcami i białkiem. Ostatnie doniesienia (36,37) wykazały, że pod działaniem „virus enzyme” na krwinki pojawia się w przesączu związek zbudowany z kwasu N-acetyloneuraminowego i N-acetylogalaktozaminy, który następnie ulega enzymatycznemu rozkładowi na pojedyncze człony. Substancja receptora jest podobna chemicznie do mucyn hamujących rozpuszczenie sieci zaglutynowanych krwinek. Działanie mucyn zawierających kwas neuraminowy byłoby więc hamowaniem kompetycyjnym.

Tabela IV*
„Kwas sjałowy” w surowicach normalnych i patologicznych

Surowica	Liczba przypadków	Kwas sjałowy oznaczony reakcją dwufeniloaminową, mg % oraz średnie odchylenie
Normalna	20	60 ± 3,1
Czynna gruźlica	15	178 ± 12,6
Podostre bakteryjne zapalenie wsierdzia	17	102 ± 9,8
Zaawansowany rak	10	142 ± 13,1
Schorzenia parenchymatyczne wątroby	8	96 ± 3,2

* według Winzlera (78).

Okazało się, że ilość kwasu neuraminowego tkanek i płynów ustrojowych może mieć znaczenie diagnostyczne w śledzeniu przebiegu niektórych chorób. Wydaje się, że najważniejsze kliniczne znaczenie mogą mieć zmiany kwasu neuraminowego w białkach surowicy krwi. Z białek tych wyizolowano glikoproteid, zwany orosomucyną (74), wędruje on razem z frakcją elektroforetyczną α_2 globulin a charakteryzuje się wysoką zawartością kwasu neuraminowego (około 11%). W normalnej surowicy ilość tego kwasu, podawana przez różnych autorów, waha się w granicach od 40 do 75 mg % (3,9,23,38,39); około 45% całości znajduje się we frakcji α_2 , a po 25% mniej więcej we frakcji α_1 i β globulinowej (3,17,72). W czystej frakcji γ globulinowej nie ma praktycznie kwasu neuraminowego (3). Jak widać z tablicy IV, w chorobach nowotworowych i różnych stanach zapalnych, jak gościec czy zapalenie wsierdzia, ilość kwasu neuraminowego znacznie wzrasta (20,78).

Przebieg ostrej choroby gośćcowej u dzieci można śledzić badając zawartość kwasu neuraminowego surowicy (21). Wzrost kwasu neuraminowego jest równoległy do odczynu opadania krwinek Biernackiego i ma występować o kilka dni wcześniej. Niektórzy autorzy dopatrują się momentów diagnostycznych w oznaczaniu stosunku kwasu neuraminowego w poszczególnych frakcjach elektroforetycznych (16). Zmiany w ilości kwasu neuraminowego w surowicy odbijają się na poziomie kwasu neuraminowego w płynie mózgowo-rdzeniowym (13,73). Związane jest to z jednej strony z wzrastającą ilością białka, które przedostaje się z osocza do płynu mózgowo-rdzeniowego, z drugiej strony z wytwarzaniem kwasu neuraminowego przez samą tkankę mózgową (73).

Przedstawione dane o biologicznym znaczeniu kwasu neuraminowego dotyczą jednak spraw, które nie zdają się być najistotniejszym terenem działania tego związku. Jego występowanie w licznych tkankach o bardzo rozmaitej czynności, szczególnie struktura chemiczna tego związku, jego wielka wrażliwość na działanie różnych czynników pozwalają snuć przypuszczenia o dużym, dotychczas nie poznanym znaczeniu biologicznym.

LITERATURA

1. Ayala W., Moore L., Hess E., *J. Clin. Invest.* **30**, 781, 1951.
2. Barry G., Goebel F., *Nature* **179**, 206, 1957.
3. Baudoin A., Lewis J., Hillon P., *C. rend. Soc. Biol.* **150**, 1316, 1956.
4. Blix G., *Z. Physiol. Chem.* **240**, 43, 1936.
5. Blix G., Svennerholm L., Werner J., *Acta Chem. Scand.* **6**, 358, 1952.
6. Blix G., *Angew. Chem.* **67**, 162, 1955.
7. Blix G., Lindberg E., Odin L., Werner J., *Nature* **175**, 340, 1955.
8. Blix G., Gottschalk A., Klenk E., *Nature* **179**, 1088, 1957.
9. Böhm P., Dauber S., Baumeister L., *Klin. Wschr.* **32**, 289, 1954.
10. Böhm P., Baumeister L., *Klin. Wschr.* **33**, 712, 1955.
11. Böhm P., *Angew. Chem.* **67**, 162, 1955.
12. Böhm P., Baumeister L., *Z. Physiol. Chem.* **300**, 153, 1955.
13. Böhm P., Baumeister L., *Z. Physiol. Chem.* **305**, 42, 1956.
14. Böhm P., Ross J., Baumeister L., *Z. Physiol. Chem.* **307**, 284, 1957.
15. Böhm P., Ross J., Baumeister L., *Z. Physiol. Chem.* **308**, 181, 1957.
16. Bruno W., Volk M., Stanley M., Seifer A., *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 32, 1957.
17. Chatagnon C., Chatagnon P., *C. rend. Soc. Biol.* **148**, 1226, 1954.
18. Chatagnon C., Chatagnon P., *C. rend. Soc. Biol.* **148**, 1765, 1954.
19. Chatagnon C., Chatagnon P., *Presse Med.* **63**, 1194, 1955.
20. Corburn A., Moore L., Haninger J., *A. M. A. Arch. Int. Med.* **92**, 185, 1953.
21. Coburn A., Bates R., Hahn W., Murphy P., *J. Chronic Dis.* **3**, 134, 1954.
22. Cornforth J. W., Firth M., Gottschalk A., *Biochem. J.* **68**, 57, 1958.

23. Dżułyńska J., *Acta Bioch. Pol.* **4**, 103, 1957.
24. Faillard H., *Angew. Chem.* **67**, 162, 1955.
25. Faillard H., *Z. Physiol. Chem.* **305**, 145, 1956.
26. Faillard H., *Z. Physiol. Chem.* **307**, 62, 1957.
27. Gottschalk A., *Nature* **164**, 232, 1949.
28. Gottschalk A., *Nature* **167**, 845, 1951.
29. Gottschalk A., *Nature* **170**, 662, 1952.
30. Gottschalk A., *Nature* **172**, 808, 1953.
31. Gottschalk A., *Biochem. J.* **61**, 298, 1955.
32. Gottschalk A., *Nature* **176**, 881, 1955.
33. Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 560, 1956.
34. Gottschalk A., *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 37, 1957.
35. Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 645, 1957.
36. Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 649, 1957.
37. Gottschalk A., *Nature* **181**, 377, 1958.
38. Hess E., Coburn A., Bates R., Murphy P., *J. Clin. Invest.* **36**, 449, 1957.
39. Hess E., Hahn J., Ayala W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**, 528, 1956.
40. Klenk E., *Z. Physiol. Chem.* **267**, 128, 1941.
41. Klenk E., *Z. Physiol. Chem.* **268**, 50, 1941.
42. Klenk E., Langerbein H., *Z. Physiol. Chem.* **270**, 185, 1941.
43. Klenk E., *Z. Physiol. Chem.* **291**, 147, 1952.
44. Klenk E., Faillard H., *Z. Physiol. Chem.* **298**, 230, 1954.
45. Klenk E., Faillard H., Lempfried H., *Z. Physiol. Chem.* **301**, 235, 1955.
46. Klenk E., Faillard H., *Z. Physiol. Chem.* **304**, 35, 1956.
47. Klenk E., Faillard H., *Deut. Z. Verdauungskr.* **17**, 51, 1957.
48. Klenk E., Uhlenbruck G., *Z. Physiol. Chem.* **307**, 266, 1957.
49. Klenk E., Lempfried H., *Z. Physiol. Chem.* **307**, 278, 1957.
50. Kuhn R., Brossmer R., Schulz W., *Chem. Ber.* **87**, 123, 1954.
51. Kuhn R., Brossmer R., *Angew. Chem.* **68**, 211, 1956.
52. Kuhn R., Brossmer R., *Chem. Ber.* **89**, 2019, 1956.
53. Kuhn R., Brossmer R., *Chem. Ber.* **89**, 2471, 1957.
54. Kuhn R., *Angew. Chem.* **69**, 23, 1957.
55. Kuhn R., Brossmer R., *Angew. Chem.* **69**, 534, 1957.
56. Kuhn R., Brossmer R., *Angew. Chem.* **70**, 25, 1958.
57. Martensson E., Raal A., Svennerholm L., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 652, 1957.
58. Martensson E., Raal A., Svennerholm L., *Acta Chem. Scand.* **11**, 1604, 1957.
59. Odin L., *Nature* **170**, 663, 1952.
60. Odin L., *Acta Chem. Scand.* **9**, 714, 1955.
61. Odin L., *Acta Chem. Scand.* **9**, 862, 1955.
62. Odin L., *Acta Chem. Scand.* **9**, 1235, 1955.
63. Popenoe E. A., Drew R. M., *J. Biol. Chem.* **228**, 673, 1957.
64. Saifer A., Gerstenfeld S., *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 17, 1957.
65. Svennerholm L., *Acta Chem. Scand.* **9**, 1033, 1955.
66. Svennerholm L., *Acta Soc. Med. Upsal.* **61**, 75, 1956.
67. Svennerholm L., *Biochem. J.* **64**, 11p, 1956.
68. Svennerholm L., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 604, 1957.
- 68a. Svennerholm E., Svennerholm L., *Nature* **181**, 1154, 1958.

69. Tamm J., Horsfall F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **74**, 108, 1950.
70. Tamm J., Bugher J. C., Horsfall F., J. Biol. Chem. **212**, 125, 1955.
71. Trucco R., Caputto R., J. Biol. Chem. **206**, 901, 1951.
72. Uzman L., Rosen H., Science **120**, 1031, 1954.
73. Uzman L., Rumpley M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **93**, 497, 1956.
74. Weimer H. E., Mehl W. J., Winzler R. J., J. Biol. Chem. **185**, 561, 1950.
75. Werner J., Odin L., Acta Soc. Med. Ups. **57**, 230, 1952.
76. Werner J., Acta Soc. Med. Ups. **58**, 1, 1953.
77. Weygand F., Rinno H., Z. Physiol. Chem. **306**, 173, 1957.
78. Winzler R. J., *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 2, Academic Press, New York 1955, str. 279.
79. Yomakawa T., Suzuki S., J. Biochem. (Tokyo) **42**, 725, 1955.
80. Yoshiham S., Nature **178**, 995, 1956.
81. Zilliken F., Braun G., György P., Arch. Biochem. Biophys. **54**, 564, 1955.
82. Zilliken F., Braun G., György P., Arch. Biochem. Biophys. **63**, 394, 1956.
83. Zilliken F., Glick M., Naturwissensch. **43**, 536, 1956.

Z Międzynarodowej Unii Biochemicznej

Szwajcaria przystępuje do Międzynarodowej Unii Biochemicznej. Szwajcarski Narodowy Komitet Biochemii ma skład następujący: K. Bernhard, prof. chemii fizjologicznej i dyrektor Instytutu Biochemii Uniwersytetu w Bazylei; M. Brenner, prof. biochemii na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Bazylei; P. Favarger, prof. Biochemii i dyrektor Instytutu Biochemii w Genewie; C. Martius, dyrektor Instytutu Biochemii Federalnej Politechniki w Zurichu; A. Wettstein, z dyrekcji f-my „Ciba” w Bazylei. Członkami doradczymi Komitetu są laureaci Nobla prof. Reichstein z Bazylei i Ruzicka z Zurichu.

Izrael również zgłosił się do Międzynarodowej Unii Biochemicznej, przedstawiając Komitet Narodowy o następującym składzie: prof. prof. F. Bergmann, E. Katchalski, E. Margoliash, M. Sela, T. Winnick, S. Hestrin, N. Lichtenstein, B. Shapiro, E. Wertheimer.

Czasopisma Biochemiczne

Liczba czasopism biochemicznych stale wzrasta. Korzystanie z czasopism referujących jest codziennym zajęciem biochemika. Informacje o tym, jakie są podstawowe biochemiczne wydawnictwa ciągle, są bardzo cenne dla młodych biochemików. Dlatego redakcja „Postępów Biochemii” uważa za celowe umieszczenie w notatkach redakcyjnych trzech następujących wykazów:

A. Ważniejsze archiwalne czasopisma mające w tytule wyrazy: biochemia, chemia fizjologiczna lub chemia biologiczna

Rok założenia	Tytuł	Tytuł skrócony	Kraj	Język	Do początku 1958 uka-zało się
1877	Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie	Z. physiol. Chem.	Niemcy	niemiecki	309 tomów
1905	The Journal of Biological Chemistry	J. Biol. Chem.	USA	angielski	229 „
1906	The Biochemical Journal	Biochem. J.	Anglia	angielski	67 „
1906	Biochemische Zeitschrift	Biochem. Z.	Niemcy	niemiecki	329 „
1914	Bulletin de la Société de Chimie Biologique	Bull. Soc. Chim. Biol.	Francja	francuski	39 „
1922	Journal of Biochemistry	J. Biochem.	Japonia	ang. franc. niem.	44 „
1936	Biochimia	Biochimia	ZSRR	rosyjski	22 „
1942	Archives of Biochemistry and Biophysics	Arch. Biochem. Biophys.	USA	angielski	72 „
1947	Biochimica et Biophysica Acta	Biochim. Biophys. Acta	Holandia	ang. także franc. niem.	26 „
1954	Acta Biochimica Polonica	Acta Biochim. Pol.	Polska	polski, także ang.	4 „

B. Ważniejsze czasopisma, referujące prace treści biochemicznej

Rok założ.	Tytuł	Tytuł skrócony	Kraj	Język	Do początku 1958 ukazało się	Uwagi
1871	Jahresbericht über die Fortschritte der Tierchemie.	Maly's Jahresbericht	Austria, Niemcy	niemiecki	49 tomów	Zamknięte 1918
1920	Berichte über die gesamte Physiologie und experimentelle Pharmakologie	Rona's Berichte	Niemcy	niemiecki	194 "	
1932	Annual Review of Biochemistry	Ann. Rev. Biochem.	USA	angielski	26 "	Wydawnictwo o podstawowym znaczeniu dla każdego biochemika
1948	Excerpta Medica Section II, Physiology, Biochemistry and Pharmacology	Excerpta Med. II	Holandia	angielski	10 "	
1954	International Abstracts of Biological Sciences. Tomy 1—3 mają tytuł British Abstracts of Medicinal Sciences	Intern. Abstr. Biol. Scienc.	Anglia	angielski	8 "	Dawniej British Abstracts A. III.
1955	Referativnyj Zhurnal Khimii, Biologii i Medycyny	Referat. Zhur. Biol. Chim.	ZSRR	rosyjski	3 "	Dawniej w ramach Referatywny Zhurnal Khimii

C. Wydawnictwa podające, w jakich bibliotekach znajdują się w Polsce biologiczne czasopisma i wydawnictwa ciągłe

Rok wydania	Autor	Tytuł	Wydawca
1951	A. i A. Szwejcero- wowie	Spis zagranicznych biologicznych czasopism i wydawnictw ciągłych znajdujących się w bibliotekach polskich	Państwowy Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
1952	A. Szwejcero- wa i Groszyń- ska	Spis polskich biologicznych czasopism i wydawnictw ciągłych znajdujących się w bibliotekach polskich	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polskiej Akademii Nauk

Symposium Metod Białkowych

W Pradze trwało w okresie od 2—14.VI.58 międzynarodowe sympozjum poświęcone metodom oznaczania mikrostruktury białek.

Sympozjum zostało zorganizowane przez Instytut Chemiczny Czechosłowackiej Akademii Nauk w wyniku podjętej uchwały przez Międzynarowy Komitet Białkowy w Liblicach (CSR) w 1956 r. Sympozjum miało na celu praktyczne przedstawienie metod używanych przez czeskich biochemików i prowadzone było przez zespół pracowników naukowych Oddziału Biochemii I.

W sympozjum wzięło udział 20 osób, w tym z Polski 7 (3 z Warszawy i po 1 z Gdańska, Krakowa, Lublina i Wrocławia), ZSRR — 4, CSR — 4, Bułgarii — 2, Chin — 2, Węgier — 1.

Program sympozjum był następujący:

1. Otwarcie i referat wprowadzający o stosowanych metodach (F. Šorm — B. Keil)
2. Izolacja i krystalizacja białek (V. Tomášek)
3. Przebieg i kontrola hydrolizy białek (V. Holeyšovský)
4. Elektroforeza — bibułowa i wysokowoltowa (Z. Prusik, J. Kára)
5. Chromatografia bibułowa (J. Vaněček)
6. Chromatografia kolumnowa na węglu i jonitach (O. Mikeš)
7. Przeciwwąadowe rozdzielanie faz (O. Mikeš)
8. Metody oznaczania grup końcowych (B. Meloun, V. Kostka)
9. Ilościowe oznaczanie aminokwasów (Z. Zmrhal)
10. Zamknięcie sympozjum i dyskusja.

Całość zorganizowana została poza wykładem wprowadzającym w formie ćwiczeń. Zajęcia trwały od 8—12 i od 13—16 z 1-godzinną przerwą obiadową. Uczestników podzielono na 3-osobowe grupy, z których każda przerabiała codziennie inną metodę. Ćwiczenia prowadzono w 3 językach: czeskim, rosyjskim i niemieckim. Do ćwiczeń przygotowane były doskonale opracowane skrypty, obejmujące część teoretyczną i praktyczną danej metody oraz podstawową literaturę. Sposób prowadzenia ćwiczeń był jednolity, na wstępie część teoretyczną szczegółowo i krytycznie omawiał prelegent, a część praktyczną wykonywali pod jego kierunkiem sami uczestnicy, taki

system zajęć stwarzał niezmiernie korzystne warunki do prowadzenia bezpośredniej dyskusji.

Organizacja sympozjum stała na bardzo wysokim poziomie zarówno pod względem wyczerpującego opracowania poszczególnych metod, samego przygotowania ćwiczeń, jak również udostępnienia nowoczesnej aparatury. Szczególne zainteresowanie budził aparat do elektroforezy wysokowoltowej, kolektory frakcji i aparaty do przeciwnądowego rozdzielania faz.

Wolne od zajęć praktycznych soboty poświęcono na zwiedzanie Zakładów Akademii Nauk oraz zabytków architektonicznych Pragi. W niedzielę zorganizowano wycieczki — jedną do Karlovych Varów i okolicy, a drugą na Karlstejn.

Podczas całego sympozjum panowała bardzo serdeczna atmosfera i wielka życzliwość okazywana wszystkim przez gospodarzy.

(*Maria Piechowska*)

Konkurs na pracę eksperymentalną

Komitet Mikrobiologiczny przy Wydziale II Polskiej Akademii Nauk ogłasza konkurs na eksperymentalne prace naukowe na temat:

„Zagadnienie z dziedziny metabolizmu drobnoustrojów” z terminem nadsyłania prac do dnia 1 września 1960 roku.

Regulamin konkursu jest następujący:

1. Prawo zgłaszania prac konkursowych mają wszyscy pracownicy naukowci ośrodków krajowych, obywatele polscy.
2. Prace mogą być indywidualne i zespołowe.
3. Do konkursu można zgłaszać prace nieopublikowane lub opublikowane nie wcześniej niż w 1959 roku.
4. Autor lub autorzy mogą zgłaszać dowolną ilość prac.
5. Prace winny być opatrzone imieniem, nazwiskiem i adresem autora (autorów) i nadesłane na adres Komitetu Mikrobiologicznego PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki — Wydział II, w nieprzekraczalnym terminie do dnia 1 września 1960 roku (decyduje data stempla pocztowego) w trzech egzemplarzach maszynopisu.
6. W pierwszej połowie września 1960 roku Komitet Mikrobiologiczny PAN ustali skład 3-osobowego Sądu Konkursowego, do którego mogą wejść tylko osoby, które nie nadesłały prac na konkurs.
7. Sąd Konkursowy przedstawia pisemną ocenę prac i umotywowanie decyzji do ostatecznej aprobaty Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN. Decyzje Sądu Konkursowego wraz z aprobatą Komitetu Mikrobiologicznego PAN zostaną opublikowane w czasopiśmie fachowych. Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi w terminie do dnia 1 grudnia 1960 roku.
8. Nagrody w konkursie są w zasadzie trójstopniowe, ustala się:

I	nagrodę	w	wysokości	zł.	7.000.—
II	„	„	„	„	5.000.—
III	„	„	„	„	3.000.—

9. W zależności od wyników oceny prac nadesłanych na konkurs Sądowi Konkursowemu i Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN przysługuje prawo:

- a) przyznania trzech równorzędnych nagród
 - b) zmniejszenia ilości nagród lub tp. zmian
 - c) nie przyznania żadnej nagrody.
10. Na życzenie autorów prace nagrodzone zostaną opublikowane staraniem Komitetu Mikrobiologicznego PAN.

Sekretarz Naukowy
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
(Prof. dr R. Pakuła)

Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
Prof. dr K. Bassalik

SPIS TREŚCI

J. Krawczyński — Białka systemu nerwowego	415
S. Angielski — Naturalne β -aminokwasy w związku z przemianą aminokwasów o łańcuchu rozgałęzionym	449
K. Jakimowska — Przemiana INH, PAS i T-40 w ustroju zwierzęcym	471
W. Rzezycki — Kwas neuraminowy	481
Z Międzynarodowej Unii Biochemicznej	493
Czasopisma biochemiczne	493
Symposium metod białkowych (M. Piechowska)	496
Konkurs Komitetu Mikrobiologicznego	497

INFORMACJE I WSKAZOWKI DLA AUTORÓW

1. Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w „Postępkach Biochemii” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach.

2. Prace należy przesyłać do redakcji w 3 egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie z podwójną interlinią, z marginesem około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej, oraz numeracją stron. W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem. Po tytułach nie należy stawiać kropek.

3. Przesłane do redakcji maszynopisy powinny być w postaci gotowej do druku, ilość poprawek nie może przekraczać pięciu na jednej stronie.

Prace nie odpowiadające wymaganiom zostaną przepisane na koszt autora, a odpowiednia kwota zostanie potrącona z honorarium autorskiego.

4. Wszelkie rysunki, wykresy i fotografie należy złożyć razem z maszynopisem na oddzielnych kartkach, w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Rysunki, wykresy i fotografie powinny być ponumerowane, a w tekście maszynopisu należy wskazać na marginesie miejsca i rozmiary poszczególnych klisz. U dołu rysunku, a przy fotografiach na odwrocie należy czytelnie podać odpowiedni napis oraz tytuł pracy i nazwisko autora. Ostateczne wykonanie rysunków jest obowiązkiem redakcji. Nadmierna ilość rysunków może być wykonana wyłącznie na koszt autora.

5. Wzory lub części wzorów i oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, powinny być napisane ręcznie atramentem, bardzo wyraźnie.

6. Tablice powinny mieć nagłówek opisujący ich treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu pracy.

7. Cytowaną literaturę należy wypisać na oddzielnej karcie, wymieniając pozycję w alfabetycznej kolejności autorów. W wykazie podać kolejno liczbę porządkową, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopisma, tom (rocznik), stronę i rok wydania. Np. 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793, 1953. Jeżeli cytowany artykuł ma kilku autorów, należy w wykazie literatury podać nazwiska i początkowe litery wszystkich autorów. Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać także tytuł książki, nazwisko nakładcy, miejsc oraz rok wydania dzieła. Np. Przyłęcki S. J., Podręcznik Chemii Fizjologicznej, Lemański, Łódź, 1947. Wykaz używanych czasopism podają Roczniki Chemii 26, 497, 1952. Powoływanie się w tekście na odnosną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie. Np. (10)

8. Autora obowiązuje korekta autorska, którą należy zwracać redakcji w ciągu 3 dni. Korektę należy wykonać kolorowym ołówkiem (nie czerwonym). Koszty spowodowane zmianą tekstu w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor. Autorzy wydrukowanych artykułów otrzymują honorarium i 25 bezpłatnych odbitek pracy. Żądanie większej ilości odbitek należy zgłosić piśmiennie przy zwrocie korekty autorskiej. Koszt tych odbitek ponosi autor.

9. Redakcja nie przeprowadza jakichkolwiek zmian w pracy bez zgody autora. Dla dokonania zmian uważanych przez redakcję za celowe dwa egzemplarze pracy odsyła się autorowi, trzeci pozostaje w aktach redakcji.

Cena w prenumeracie: półroczna zł 40.—; rocznie zł 80.—

Zamówienia i wpłaty przyjmują: 1) Centrala Kolportażu Prasy i Książki „Ruch”, Warszawa, ul. Srebrna 12, konto PKO nr 1-6-100.020; 2) urzędy pocztowe.

Prenumerata za zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100.024.

Bieżące numery do nabycia w Księgarniach Naukowych Domu Książki i we Wzorcowni PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Informacji w sprawie egzemplarzy z poprzednich lat udziela Centrala Kolportażu „Ruch”, Sprzedaż Prasy Zdezaktualizowanej, Warszawa, ul. Srebrna 12, oraz Wzorcownia PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.