

~~12 1370~~  
P. 939  
D 90/78  
K  
POLSKA AKADEMIA NAUK

KOMITET BIOCHEMICZNY

# POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK



TOM III

1957

ZESZYT 1

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE  
WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>



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 III

1957

ZESZYT 1

---

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Józef Heller  
Zastępca redaktora nacz. — Jerzy Meduski

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1957

Nakład 835 (745 + 90) egz.	Oddano do składania 28.XI.56.
Ark. wyd. 6,3. Ark. druk. 5,25	Podpisano do druku 6.III.57.
Papier druk. sat. kł. V, 70 g, 70 × 100	Druk ukończono w marcu 1957.
Cena zł 20.—	Zam. 1730c/56. B-11.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JERZY PAWEŁKIEWICZ

## Witaminy grupy B<sub>12</sub> i ich biosynteza

### 1. Wstęp

Odkrycie witaminu B<sub>12</sub> wiąże się ściśle z badaniami nad czynnikami przeciwanemicznymi zawartymi w wątrobie zwierzęcej. Badania te zainicjowali 30 lat temu dwaj amerykańscy uczeni Minot i Murphy (129) stwierdzając, że surowa wątroba zwierzęca, podawana ludziom doustnie w dużych dawkach, cofa objawy choroby *Addison-Biermera* czyli anemii złośliwej. Od tego momentu rozpoczęto pracę nad otrzymywaniem ekstraktów zawierających czynną substancję. Miały one zastąpić w terapii surową wątrobę. W roku 1928 Cohn i współpracownicy (40) wykazują, że substancje czynne można wyekstrahować z wątroby wodą szczególnie w słabo kwaśnym odczynie a następnie uwolnić od białek i szeregu innych substancji dodając do wodnego wyciągu alkoholu do stężenia 70<sup>0</sup>/. Po odfiltrowaniu zanieczyszczeń dalsze podwyższenie stężenia alkoholu w przesączu do 95<sup>0</sup>/o wytrąca osad zawierający zaadsorbowany czynny składnik. Postępowanie powyższe daje t. zw. „frakcje G Cohna”, którą z powodzeniem stosowano w terapii anemii złośliwej. Ci sami badacze wykazali, że aktywny czynnik można wyekstrahować z wodnego roztworu butanolem oraz że wytrąca go kwas fosforowoframowy, natomiast nie wytrąca octan ołowiaowy. Oczyszczoną „frakcję G” Cohna używano już do iniekcji.

Nowe metody frakcjonowania czynnika przeciwanemicznego opracowali Dakin i współpracownicy (48), (49) opierając je na wytrąceniu zanieczyszczeń alkoholowymi roztworami octanu wapniowego.

Jeszcze bardziej aktywne preparaty otrzymali w roku 1936 Subbarow, Jacobson i Prochownik (182).

W tym samym roku ważnego odkrycia dokonali badacze norwescy Laland i Klem wykazując, że aktywny czynnik można ekstrahować z wodnego roztworu upłynnionym fenolem (122). Również stwierdzili oni, że związek ten adsorbuje się na węglu aktywnym, skąd wy-

eluować go można fenolem. Ich zasługą jest również wykazanie, że z odpowiednio oczyszczonych bezwodnych koncentratów związek czynny łągają alkohole metylowy i etylowy i że z tych roztworów wytrąca je eter. Znaczny postęp jakiego dokonali wymienieni badacze skandynawscy pozwolił im po raz pierwszy w historii badań nad czynnikami przeciwanemicznymi uzyskać preparaty, które były czynne klinicznie w dawkach miligramowych.

Następne 10 lat nie przyniosły nowych odkryć. W roku 1945 S u b a r o w i współpracownicy (181) w referatowej pracy na temat czynnika przeciwanemicznego wyrażają nawet pogląd, że nie będzie możliwe wyodrębnienie takiej substancji, gdyż zapewne chodzi tu o cały zespół związków wspólnie działających. Wbrew tej pesymistycznej opinii rok później E m e r y i P a r k e r (66) wykorzystując uprzednio opublikowane metody donoszą o otrzymaniu preparatu, który w pojedynczej jednomiligramowej dawce był w pełni klinicznie czynny. W owym czasie wydawało się, że preparat ten jest prawie czystym związkiem przeciwanemicznym. Dziś wiemy, że zawierał on tylko ok. 1% witaminu B<sub>12</sub>. Postęp prac nad wyodrębnieniem czynnika przeciw anemii złośliwej odbywał się bardzo powoli. Przyczyną tego była konieczność przeprowadzania kontroli klinicznej każdej z otrzymywanych frakcji. Obiektem doświadczalnym był człowiek a dobór odpowiednich chorych, nieuniknione indywidualne reakcje poszczególnych pacjentów utrudniały i przedłużały czas badań. Doniosłym więc, choć dla samego odkrycia witaminu B<sub>12</sub> nie najważniejszym, było odkrycie S h o r b a (163) stwierdzające, że klinicznie czynne preparaty wątrobowe zawierają jednocześnie substancje wzrostowe dla bakterii kwasu mlekowego — *Lactobacillus lactis Dorner* — oraz że między aktywnością kliniczną a mikrobiologiczną zachodzi prosta zależność.

Wykorzystując częściowo testy mikrobiologiczne podane przez S h o r b a (164) (165), badacze amerykańscy R i c k e s, B r i n k, K o n i u s z y, W o o d i F o l k e r s izolują w roku 1948 po raz pierwszy właściwy czynnik przeciwanemiczny (146) i nazywają go witaminem B<sub>12</sub>.

Kilka tygodni później niezależnie od odkrycia badacze amerykańskich, związek ten izolują w Anglii L e s t e r S m i t h i P a r k e r (177). Trzeba tu zaznaczyć, że badacze angielscy całą pracę izolacji witaminu B<sub>12</sub> kontrolowali prawie wyłącznie klinicznie. Trudności na jakie napotymano przy wyodrębnianiu witaminu B<sub>12</sub> ilustrują najlepiej uzyskiwane w tym czasie wydajności witaminu wynoszące średnio 15 mg krystalicznego preparatu z 1000 kg świeżej wątroby (69).

W historii odkrycia witaminu B<sub>12</sub> nie można pominąć prac żywienia prowadzonych w szeregu ośrodkach badawczych, które doprowadziły do powstania pojęcia t. zw. „czynnika białka zwierzęcego” (*Animal Protein Factor*).

Doświadczenia żywieniowe przeprowadzone jeszcze w latach trzydziestych, wykazały, że szczury hodowane na uproszczonej diecie zawierającej tylko kompleks witaminów B pochodzenia roślinnego, cierpią na zaburzenia rozwojowe spowodowane brakiem nieznanych wówczas czynników dodatkowych (w badaniach tych nieznaną związek nazywano czynnikiem X). Zaburzenia te występowały szczególnie ostro w okresie ciąży i laktacji zwierząt, przy czym można je było usunąć podając zwierzętom świeżą wątrobę lub ekstrakty wątrobowe (45), (46), (34).

W międzyczasie podobne doświadczenia wykonywano na kurczętach i wykazano, że gdy ptakom podawać tylko białko pochodzenia roślinnego rosną one wolniej od kurcząt kontrolnych. Wzrost przyspieszał dodatek mączki rybnej z sardynek, mączki wątrobowej, lub substancji zawartych w wyciekach z ryb (*fish solubles*) (34) (35) (93). Podobny wpływ wywierał dodatek do paszy kału krów lub zawartości żwacza zwierząt przeżuwających (94) (186).

Z wszystkich tych badań wynikało, że w szeregu dodawanych substancjach znajduje się czynny związek o charakterze witaminowym, nie występujący w materiale roślinnym, a jedynie w zwierzęcym. Stąd też powstało jego określenie jako „czynnika białka zwierzęcego”).

Rubin i Bird otrzymali z kału krów koncentraty zawierające ten związek (155), (156), (9), i stwierdzili, że nie jest on identyczny ani z kwasem fioletowym, ani z witaminem B<sub>6</sub>. Bogatym źródłem czynnika białka zwierzęcego (lub czynnika X dla szczurów) okazały się zagęszczone ekstrakty wątrobowe czynne również przeciw anemii złośliwej (133) (32). Gdy dalej wykazano, że pewne tlenowe bakterie wyizolowane z kału kur zawierają czynnik przeciwanemiczny (180) stało się wyraźnym, że „czynnik białka zwierzęcego” jest identyczny z aktywnym związkiem zwalczającym anemię złośliwą. Hipotezę tę potwierdziły bezpośrednie badania przeprowadzone na kurczętach i szczurach (134), (63). Witamin B<sub>12</sub> zastępował w nich „czynnik białka zwierzęcego”.

---

\* W historycznym ujęciu — czynnikiem białka zwierzęcego — nazywano tylko tę substancję, która była niezbędna dla normalnego rozwoju drobiu. W analogicznych badaniach żywieniowych przeprowadzanych na innych zwierzętach nadawano temu czynnikowi inne nazwy jak np.: „Factor X”, „Hatchability factor”, „Cow manure factor”, „Zoopherin”.

## 2. Otrzymywanie witaminu B<sub>12</sub>

Dotychczasowe badania wykazały, że witamin B<sub>12</sub> jest syntetyzowany wyłącznie przez drobnoustroje. Ani rośliny zielone (78), z wyjątkiem kilku alg (26), ani ustroje zwierzęce tej zdolności nie posiadają. Występowanie witaminu B<sub>12</sub> w tkankach i organach zwierzęcych tłumaczymy nagromadzeniem się go z pożywienia, albo z flory jelitowej syntetyzującej ten związek. Najbogatszym w witamin B<sub>12</sub> organem zwierzęcym są nerki i wątroba.

Mimo, że witamin B<sub>12</sub> wyodrębniono po raz pierwszy w stanie czystym z wątroby zwierzęcej, tuż zaraz po jego odkryciu badacze amerykańscy wykazali również, że bogatym źródłem nadającym się dla celów przemysłowych, są niektóre drobnoustroje (148). Znaleźli oni substancje czynne w kulturach *Mycobacterium smegmatis*, *Lactobacillus arabinosus*, *Bacillus subtilis* i szeregu promieniowców, jak *Streptomyces roseochromogenus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces antibioticus*. Z hodowli *Streptomyces griseus* autorzy ci otrzymali witamin B<sub>12</sub> w stanie krystalicznym (148).

Obecnie produkcja krystalicznego witaminu B<sub>12</sub> opiera się wyłącznie na surowcu mikrobiologicznym. Wykorzystuje się w tym celu produkty uboczne fabrykacji streptomycyny, chlorotetracykliny i innych antybiotyków, a nadto przerabia się kultury *Bacillus megtherium* i bakterii propionowych. Ostatnio zwrócono baczniejszą uwagę na inny taki surowiec a mianowicie na przefermentowane w oczyszczalniach ścieki miejskie (83), (8), (111).

Trudności związane z otrzymywaniem witaminu B<sub>12</sub> polegają, na tym, że substancja ta występuje w małych stężeniach. Np. maksymalne, dziś osiągalne, stężenia witaminu w kulturach *Streptomyces olivaceus* wynoszą ok. 3 mg na litr pożywki (141), a w kulturach *Propionibacterium shermanii* do 10 mg w 1 l hodowli (192). Stąd otrzymywanie znaczniejszych ilości witaminu było, zwłaszcza w początkowych okresach badań, związane z dużymi trudnościami technicznymi. Dane literaturowe z tego okresu czasu były bardzo skąpe, a same metody były przez długi czas tajemnicami fabrycznymi.

Z biegiem czasu odkrywcy witaminu B<sub>12</sub> ujawnili pewne szczegóły (69) (172), a następnie w 3 lata po odkryciu witaminu B<sub>12</sub> pojawiły się publikacje i innych ośrodków badawczych zajmujących się tym problemem. (107), (159). Dziś literatura tego przedmiotu, zwłaszcza patentowa, jest bardzo szeroka.

W Polsce metodę otrzymywania koncentratów witaminu B<sub>12</sub> z hodowli promieniowców opracowali Borensztajn i Kuryłowicz



(13), a metodę otrzymywania krystalicznego preparatu Janicki i współpracownicy (114).

W metodach izolacji krystalicznego witaminu B<sub>12</sub> z materiału biologicznego możemy wyróżnić 4 fazy procesu oczyszczania. Polegają one na:

1) na uwolnieniu witaminu B<sub>12</sub> z połączeń białkowych na drodze termicznej, a niekiedy dodatkowo na drodze enzymatycznej

2) adsorpcji witaminu na określonym stałym adsorbencie (węglu aktywowanym, bentonicie) i jego elucji rozpuszczalnikami organicznymi lub wodnymi roztworami związków nieorganicznych

3) zagęszczeniu i oczyszczeniu otrzymanego eluatu na drodze selektywnych ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (fenolem i jego pochodnymi, alk. butylowym, benzylovym) i

4) chromatograficznym oczyszczeniu uzyskanego koncentratu i krystalizacji witaminu z wodnego acetonu.

W zależności od użytego surowca oraz od jakości i ilości występujących w nim zanieczyszczeń spotyka się szereg modyfikacji w poszczególnych fazach procesu krystalizacji. Używając bogatego surowca witaminu B<sub>12</sub> np. odwirowanych komórek bakterii kwasu propionowego, można metodę wydobycia jeszcze bardziej uprościć.

### 3. Metody oznaczania witaminu B<sub>12</sub>

Istniejące metody oznaczania witaminu B<sub>12</sub> dzielą się na metody:

- a) fizyko-chemiczne
- b) biologiczne i
- c) mikrobiologiczne

Znane są również testy kliniczne.

#### a) Metody fizyko-chemiczne

W czystych i wolnych od zanieczyszczeń roztworach można oznaczyć stężenie witaminu B<sub>12</sub> na drodze prostego pomiaru kolorymetrycznego lub spektrofotometrycznego. Zasadą nielicznych metod analitycznych opartych na tym założeniu jest ilościowe wydobycie witaminu z badanego materiału i staranne oczyszczenie koncentratu.

Kolorymetryczną metodę oznaczania witaminu B<sub>12</sub> w ekstraktach wątrobowych podali Lens i współpracownicy (124), w preparatach wielowitaminowych Marsh i Kuzel (127), a w przefermentowanych ściekach miejskich Janicki i współpracownicy (111). Ponieważ staranne oczyszczenie koncentratów może być połączone ze zna-

czynnymi stratami witaminu, Bacher, Boley i Shonk (3) połączyli zasadę pomiaru spektrofotometrycznego z techniką izotopowego rozcieńczania. W metodzie tych autorów dodaje się do próby małą ilość witaminu B<sub>12</sub> znaczonego promieniotwórczym kobaltem, po czym po starannym oczyszczeniu koncentratu oznacza się w nim aktywność oraz stężenie witaminu. Z rozcieńczenia witaminu Co<sup>60</sup>—B<sub>12</sub> wylicza się wielkość strat i koryguje wynik pomiaru spektrofotometrycznego. Standartowe odchylenie metody dla trudnych analiz wynosi 4,3%. Wydaje się, że metoda ta winna znaleźć szersze zastosowanie również dla oznaczania innych witaminów grupy B<sub>12</sub>.

Inną ciekawą metodę spektrofotometryczną podali Rudkin i Taylor (157). Metoda oparta jest na istnieniu różnicy widm absorpcyjnych witaminu B<sub>12</sub> i jego kompleksu dwucyjanowego tworzącego się w alkalicznym środowisku wobec nadmiaru jonów CN. Badacze ci obliczali zawartość witaminu B<sub>12</sub> w roztworze z pomiarów różnicy ekstynkcji obu form dla fali o długości 582 mμ. Wartość tej metody polega na tym, że zanieczyszczenia zawarte w roztworze nie wpływają na różnicę ekstynkcji roztworów w badanym zakresie widma i stąd nie zachodzi potrzeba intensywnego oczyszczania koncentratu. Modyfikację metody Rudkina i Taylora opracowali u nas Janicki i współpracownicy (112).

Pozostałe znane chemiczne metody oznaczania witaminu, oparte albo na ilościowym pomiarze uwolnionego hydrolitycznie 5,6-dwumetylobenzimidazolu, lub uwolnionego fotolitycznie cyjanowodoru z cząsteczki witaminu B<sub>12</sub> są jeszcze mniej specyficzne, od podanych wyżej, i mają dziś raczej znaczenie historyczne (16), (15), (188). To samo można powiedzieć o metodzie Heinricha (97) opartej na kolorymetrycznym pomiarze estru t.zw. „czerwonego kwasu”, barwnego fragmentu cząsteczki witaminu B<sub>12</sub> powstającego z niego w czasie hydrolitycznego rozpadu.

Wszystkie metody fizyko-chemiczne są przydatne tylko do oznaczania znacznie większych (co najmniej 10—100 μg) ilości witaminu i dlatego ich użyteczność jest silnie ograniczona.

#### b) Metody biologiczne

Szereg zwierząt hodowanych na diecie wyłącznie roślinnej wolnej od witaminu B<sub>12</sub> cierpi na zaburzenia wzrostu. Szczególnie łatwo można wywołać i zaobserwować to zjawisko u kurcząt, a dalej u białych szczurów i myszy. Metody biologiczne oznaczania witaminu B<sub>12</sub> opierają się na badaniu działania wzrostowego badanych prób na odwitaminizowanych zwierzętach doświadczalnych. Dużą trudność stwarza

tu dostateczne odwitaminizowanie zwierząt. Przyczyna tego leży w tym, że młode organizmy używane do badań często posiadają znaczne ilości zmagazynowanego witaminu pochodzącego od rodziców. Nadto zwierzęta mogą absorbować pewne ilości witaminu syntetyzowanego przez florę przewodu pokarmowego. Z tych powodów w doświadczeniach z kurczętami używa się np. tylko tych ptaków, które wylęły się z jaj kur hodowanych na diecie ubogiej w witamin B<sub>12</sub> oraz chroni się je od zetknięcia z kałem (39). Również dla przyspieszenia odwitaminizowania zwierząt stosuje się specjalne diety jak np. z zawartością jodowanej kazeiny lub tyroksyny (14), (132), z dodatkiem laktozy (47), czy z dużą zawartością białka (191) lub tłuszczu (179).

W metodach biologicznych do badań używa się znaczniejszej liczby zwierząt i wylicza wartości średnie przyrostu wag, a jednocześnie z indywidualnych odchyleń określa się dokładność metody z pomocą wyliczeń statystycznych.

Jakkolwiek ze wszystkich znanych metod metody biologiczne mogą wydawać się najbardziej obiektywne, choćby ze względu na to, że nie reagują w nich inne związki należące do grupy witaminu B<sub>12</sub>\*, również i one nie są bezwzględnie specyficzne. Istnieje szereg danych wskazujących na obecność niezbadanych dotąd czynników wpływających na wzrost zwierząt doświadczalnych (37), (39).

### c) Metody mikrobiologiczne

Metody mikrobiologiczne są najczęściej stosowane do ilościowych oznaczeń witaminu B<sub>12</sub>. Są to metody proste a zarazem bardzo czułe. Przy ich pomocy można wykryć i oznaczyć witamin B<sub>12</sub> jeszcze w stężeniu 10<sup>-15</sup> g/ml. Oznaczenie witaminu metodami mikrobiologicznymi polega na pomiarze wzrostu odpowiedniego drobnoustroju testowego. Wzrost ten jest w pewnym zakresie proporcjonalny do stężenia witaminu. Wzrost mikroorganizmów testowych możemy mierzyć w różny sposób. W metodach probówkowych mierzymy go nefelometrycznie, alkalimetrycznie lub potencjometrycznie (np. dla bakterii kwasu mlekowego) oraz kolorymetrycznie (dla *Euglena gracilis* oznaczając ilość wyekstrahowanego chlorofilu). W metodach płytowych (używanych głównie dla *E. coli*) mierzy się, na zestalonej agarze pożywce, powierzchnię lub średnicę okrągłych plam wzrostu powstałych wokół metalowego cylinderka (technika cylinderkowa) lub wokół małych krążków bibuły wysyconych badanym roztworem i nałożonych na zestaloną

\* Słabą czynność posiada tylko t.zw. witamin B<sub>12</sub> III (5-hydroksybenzimidazolocyjanokobalamina) (37).

pożywkę (pad technique). Często zamiast pomiaru powierzchni plam wzrostowych waży się proporcjonalną do niej wagę wyciętych krążków papieru, na który skopioowano lub sfotografowano plamy (71).

Liczba mikroorganizmów używanych do oznaczania witaminu B<sub>12</sub> jest dość znaczna (78). Najczęściej stosuje się szczep *Escherichia coli* 113—3, *Lactobacillus leichmanii*, *Euglena gracilis* i *Ochromonas malhamensis*.

#### *Escherichia coli* 113—3

W roku 1950 Davis i Mingioli (50) izolowali szereg mutantów *E. coli*, które potrzebowały dla swego wzrostu witaminu B<sub>12</sub>. Jeden ze szczepów oznaczony numerem 113—3 wykazywał szybki i powtarzalny wzrost. Szczep ten wprowadzono do praktyki analitycznej. Stosuje się go zarówno w metodzie probówkowej jak i płytowej. Do najbardziej znanych metod z *E. coli* należą metoda probówkowa Burkholdera (30) i płytowa Harrisona i współpracowników (95). Opisano szereg modyfikacji tych metod (189). W Polsce podobne metody opracowali Bogucka, Iwanowska i Kąkol (10). Metody z mutantem *E. coli* nie są specyficzne. Podobne działanie wzrostowe jak witamin B<sub>12</sub> wywiera metionina (11). W metodzie płytowej wzrost wywołany metioniną manifestuje się charakterystycznym dyfuzyjnym wyglądem plamy wzrostowej. Najbardziej charakterystycznym dla *E. coli* jest to, że drobnoustrój ten reaguje prawie ze wszystkimi związkami grupy witaminu B<sub>12</sub> (p. tabl. 1). Wrażliwość *E. coli* na poszczególne kobalaminy jest różna w metodach probówkowych i płytowych. Porównując w obu metodach wzrost wywołany obecnością różnych związków grupy witaminu B<sub>12</sub> i stosując czysty witamin B<sub>12</sub> jako standard obserwujemy prawie zawsze wyższe wyniki w metodzie płytowej. Stwierdzenie tymi metodami różnej aktywności w badanych próbach (w porównaniu do aktywności witaminu B<sub>12</sub>) świadczy zawsze o obecności innych kobalaminy. Metodę płytową z *E. coli* można uważać za test zbiorczy dla witaminów grupy B<sub>12</sub>.

#### *Lactobacillus leichmanii*

Do oznaczania zawartości witaminu B<sub>12</sub> po raz pierwszy zastosowano bakterie kwasu mlekowego — *Lactobacillus lactis Dorner* — (164), (165). Dziś metody te prawie zupełnie zarzucono jako metody mało specyficzne i trudne. Szereg czynników jak np. obecność środków redukcyjnych w pożywce, stężenie CO<sub>2</sub>, tymidyny i innych dezyribozydów wpływa znacznie na wzrost tego drobnoustroju. Na

miejsce szczepu D o r n e r a, S k e g g s i współpracownicy (168) wprowadzili *Lactobacillus leichmanii*. Metoda z *L. leichmanii* była modyfikowana przez szereg autorów (168) (183) (65). W Polsce zajmowali się nią B o r e n s z t a j n i K u r y ł o w i c z (13). Autoklawowanie prób zawierających witamin B<sub>12b</sub> z pożywką stosowaną dla *L. leichmanii* często prowadzi do utraty znacznej części aktywności. Dla stabilizacji witaminu B<sub>12b</sub> S o a r s i H e n d l i n (178) zalecili dodawać przed autoklawowaniem ślady cyjanków, które przekształcają ten związek w trwałą witamin B<sub>12</sub>. Również dodatek kwasu tioglikolowego chroni witaminę przed inaktywacją (162). Metody z *Lactobacillus leichmanii* posiadają szereg zalet jak wysoką czułość (4 μg/ml) i krótki czas inkubacji. Jednak podobnie jak inne bakterie kwasu mlekowego stosowane do oznaczeń witaminu B<sub>12</sub>, *L. leichmanii* nie jest drobnoustrojem specyficznym. Tymidyna i inne dezoksyribozydy zastępują witamin B<sub>12</sub>. W próbach bogatych w te substancje (jądra komórkowe) o niskiej zawartości witaminu otrzymuje się wyniki zbyt wysokie. Zwykle jednak proste rozcieńczanie próby eliminuje wpływ dezoksyribozydów i dlatego metody te są szeroko stosowane w pracowniach do oznaczania witaminu B<sub>12</sub>.

### *Euglena gracilis*

H u t n e r i współpracownicy (106) po raz pierwszy zastosowali *Euglena gracilis* do oznaczania witaminu B<sub>12</sub>. Metoda tych autorów odznaczała się wielką prostotą pożywki i czułością. Stężenie witaminu B<sub>12</sub> potrzebne do osiągnięcia połowy maksymalnego wzrostu organizmu wynosiło 10 μg/ml (10<sup>-11</sup> g/ml). *Euglena gracilis* nie reaguje na obecność metioniny ani dezoksyribozydów. Natomiast czynne dla *Euglena gracilis* są adeninocyjanokobalamina (pseudowitamin B<sub>12</sub>) oraz 2-metyloadeninocyjanokobalamina (czynnik A), związki nieaktywne w terapii anemii złośliwej i w próbach biologicznych (151) (73). R o b b i n s, H a r v e y i S t e b b i n s opublikowali szereg analitycznych danych wykonanych metodą z *Euglena gracilis* na różnym materiale (149) (150). R o s s zastosował *E. gracilis* do oznaczeń witaminu B<sub>12</sub> w płynach ustrojowych (153). H e i n r i c h i L a h m a n n (98) znacznie uczulili metodę opierając pomiar na wyekstrahowanym z komórek *E. gracilis* chlorofilu mierząc jego stężenie fotometrycznie przy użyciu filtru 436 mμ. W ten sposób, autorzy ci, wykazali jeszcze obecność witaminu B<sub>12</sub> w stężeniu 10<sup>-15</sup> g/ml (co odpowiada 2,2 · 10<sup>6</sup> cząsteczkom /ml). H e i n r i c h i współpracownicy (99) wprowadzili również do praktyki analitycznej nowy szczep „*Euglena gracilis isol. T*”

wyodrębniony przez Pringsheima i syntetyzujący więcej chlorofilu niż szczep Hutnera. Ostatnio, również Ross, Hutner i Bach (154) zastosowali nowy szczep *Euglena gracilis* „szczep z” i zmodyfikowaną bogatszą pożywkę.

W Polsce metodę z *Euglena gracilis* adaptowali Janicki i współpracownicy (113).

#### *Ochromonas malhamensis*

W roku 1953 Ford (73) wprowadził do mikrobiologicznych metod oznaczania witaminu B<sub>12</sub> fotosyntetyzujący mikroorganizm wyizolowany przez Pringsheima *Ochromonas malhamensis*. W odróżnieniu od wszystkich poznanych dotąd drobnoustrojów *Ochromonas malhamensis* reaguje specyficznie na witamin B<sub>12</sub>. Kobalaminy nieaktywne w testach klinicznych lub próbach biologicznych są również nieczynne dla tego mikroorganizmu.

### 4. Chemia witaminu B<sub>12</sub>

#### a) Własności fizyczne i chemiczne witaminu B<sub>12</sub>

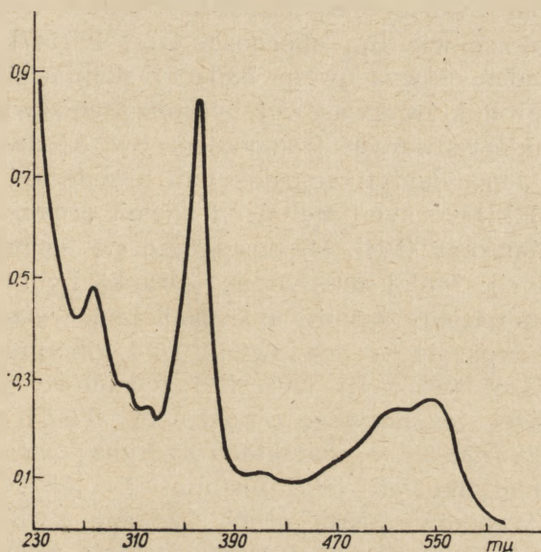
Witamin B<sub>12</sub> krystalizuje z wodnych roztworów acetonu w postaci czerwono — fioletowych igieł w układzie ortorombowym (Rys. 1). Kryształy zawierają do 17% wody krystalizacyjnej (102). Współczynniki refrakcji wynoszą odpowiednio X = 1,616, Y = 1,652 i Z = 1,6645 (146). Kryształy ogrzane do temp. ok. 212° ciemnieją i nie topią się nawet w temp. 320° (148), (22). Witamin jest związkami optycznie czynnym. Współczynnik skręcalności optycznej dla fali o długości 6438 Å wynosi  $[\alpha]_{6438}^{20} = -110^{\circ} \pm 11^{\circ}$  (69), a dla fali 6563 Å  $[\alpha]_{6563}^{20} = -59 \pm 9^{\circ}$  (22). W widmie absorpcyjnym obserwujemy (Rys. 2) charakterystyczne maksima dla fal o długości



Rys. 1. Mikroskopowy obraz kryształów witaminu B<sub>12</sub>

278, 361 i 550 mμ. Wartości współczynników ekstynkcji dla podanych maksimów wynoszą  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 115, 204$  i 63 (22). Wzór sumaryczny wit. B<sub>12</sub>: C<sub>63</sub>H<sub>90</sub>O<sub>14</sub>N<sub>14</sub>PCo (101), (12). Z diamagnetyczności cząsteczki wywnioskowano, że atom kobaltu jest trójwartościowy (55).

Witamin B<sub>12</sub> jest związkim trwałym. Długotrwałe ogrzewanie w wodnym roztworze w granicach pH 4—7 nie zmienia jego aktywności, a conajwyżej tylko nieznacznie (96), (91). W roztworach bar-



Rys. 2. Widmo absorpcyjne witaminu B<sub>12</sub>

dziej kwaśnych, a szczególnie w alkalicznych witamin ulega stopniowemu rozkładowi (147). Rozkład przyspieszają substancje utleniające lub redukujące. Nieczyste koncentraty wit. B<sub>12</sub> są mniej trwałe od preparatu krystalicznego (172).

Witamin B<sub>12</sub> jest rozpuszczalny w wodzie (do 1,20%) w niższych alkoholach (metanolu, etanolu i butanolu), alk. benzyłowym, fenolu, krezolach i chlorofenolach. Nie rozpuszcza się natomiast w typowych rozpuszczalnikach organicznych jak w eterze, eterze naftowym, chloroformie, czterochlorku węgla, benzenie, jak również w bezwodnym acetonie. Rozpuszczalniki witaminu B<sub>12</sub> które same nie rozpuszczają się w wodzie, ekstrahują witamin z roztworów wodnych. Współczynnik podziału między fazę alk. benzyłowego a fazę wody jest niezależny od wartości pH w granicach 4—9,5 i wynosi 0,8 (175). Bernhauer i Friedrich stwierdzają, że pomiar współczynnika podziału między fazę wodną a fazę fenolu (lub jego pochodnych) w trójchloroetylenie może być dobrym kryterium rozpoznawczym dla szeregu związków z grupy witaminu B<sub>12</sub> (8), (86).

#### b) Struktura chemiczna witaminu B<sub>12</sub>

Głównymi ośrodkami badań budowy chemicznej witaminu B<sub>12</sub> był w Stanach Zjednoczonych zespół Folkersa (laboratoria badawcze

Mercka), a w Angli zespoły Lestera Smitha (laboratoria badawcze f-my Glaxo), Petrova (British Drug Houses), prof. Todda (Uniwersytet w Cambridge), i Hodgkin (Uniwersytet w Cxfordzie). Głównie tym ośrodkom zawdzięczamy poznanie struktury wit. B<sub>12</sub>. Po stwierdzeniu w cząsteczce wit. B<sub>12</sub> obecności Co i P (147) (171) w pierwszym okresie badań główna uwaga badaczy skupiła się na izolowaniu i identyfikacji produktów kwasowej hydrolizy tego związku. Pierwszym w pełni scharakteryzowanym fragmentem był 5,6-dwumetylobenzimidazol (wzór I). Jego identyfikacji dokonali niezależnie Brink i Folkers (17), (18) klasycznymi metodami chemii organicznej oraz Holliday i współautorzy (104), (4) posługując się techniką badań spektrofotometrycznych. Mniej drastyczne warunki hydrolizy (6 N HCl, 120°, 8 godz.) pozwoliły grupie amerykańskiej wyizolować glikozyd dwumetylobenzimidazolu a mianowicie 1- $\alpha$ -D-ribofuranozydo-5-6-dwumetylobenzimidazol (wzór II) (20), (19) i budowę potwierdzić syntezą (105). Związek ten nazwano  $\alpha$ -ribazolem. Buchanan i współautorzy (29), (28) znaleźli w produktach hydrolizy wit. B<sub>12</sub> trzeci związek, który zidentyfikowali jako fosforan 2'- lub 3'- $\alpha$ -ribazolu. Do analogicznych wyników doszła grupa badaczy z British Drug Houses (60), (4), (42). Tym ostatnim udało się również wykazać na podstawie subtelnych badań widmowych, że atom N(3) pierścienia benzimidazolowego jest bezpośrednio koordynacyjnie powiązany z centralnym atomem kobaltu (5), (6). Kaczka i Folkers (117) na podstawie badań porównawczych chromatograficznych przypisali wyodrębnionemu z wit. B<sub>12</sub> nukleotydu wzór fosforanu 3'- $\alpha$ -ribazolu (wzór III). Warto tu zwrócić uwagę, że w tym nukleotydzie występuje wiązanie  $\alpha$ -glikozydowe w odróżnieniu od  $\beta$ -wiązania w nukleotydach kwasów nukleinowych.

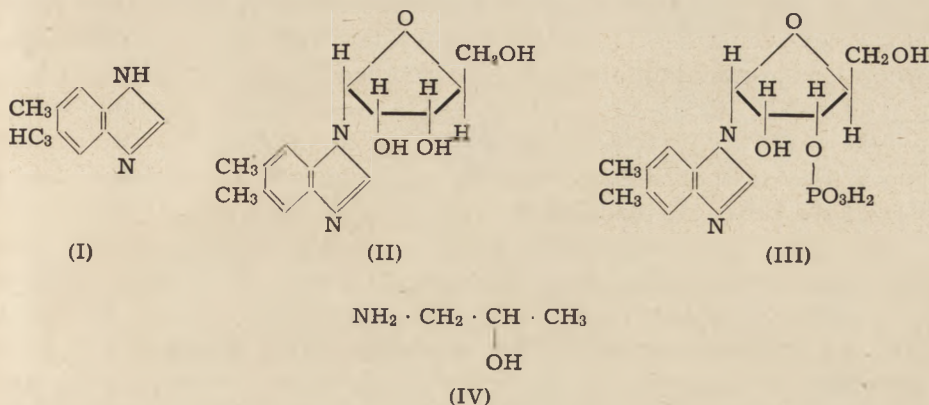
Innym hydrolitycznym produktem rozkładu wit. B<sub>12</sub> była prócz amoniaku, bezbarwna substancja, nieabsorbująca selektywnie w ultrafiolecie, lecz dająca purpurowe zabarwienie z ninhydryną. Początkowo Ellis i współprac. (60), (61), (62) w oparciu o badania chromatograficzne przypisywali jej budowę 2-amino-propanolu-1. Grupa Folkersa (190) udowodniła, że związkiem tym jest d<sub>g</sub>-1-amino-propanol-2 (wzór IV)\*, co potwierdzili również nieco później poprzedni badacze (43). Związek ten, jak i jego O-fosforan otrzymano syntetycznie (190), (41), (36). Pierwsze ilościowe oznaczenia aminopropanolu uwolnionego na drodze acydolizy, a oparte na oznaczaniu etanolaminy dały 2 mole

---

\* Wskaźnik d<sub>g</sub> podaje, że konfigurację ustalono w odniesieniu do aldehydu D-glicerynowego.



aminopropanolu na cząsteczkę wit. B<sub>12</sub> (33). Później Cooley i inni (44) stwierdzili, że w cząsteczce witaminu znajduje się tylko jedna cząsteczka aminopropanolu.



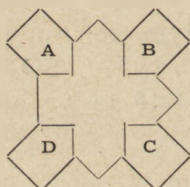
Prawie w tym samym czasie, kiedy rozstrzygano budowę nukleotydowej części wit. B<sub>12</sub>, szereg badaczy doniosło w obecności grupy cyjanowej koordynacyjnie związanej z atomem kobaltu (21), (119), (184). Grupa Folkersa wykazała przy tym, że grupę CN można zastąpić innymi grupami, np. Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CNO<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup> otrzymując w ten sposób nowe pochodne (116). Wszystkie te pochodne pod działaniem cyjanokobaltów odtwarzały witamin B<sub>12</sub>.

Najtrudniejszym problemem w chemii wit. B<sub>12</sub> było rozstrzygnięcie budowy czerwonego fragmentu uwalnianego podczas kwaśnej hydrolyzy. Fragment ten zawierał silnie związany atom kobaltu i posiadał charakter kwasu. Kwas ten ulegał łatwo estryfikacji (60) szczególnie wyższymi alkoholami jak np. oktanołem (97). Już w roku 1949 wyrażano przypuszczenie, że ta część cząsteczki wit. B<sub>12</sub> może mieć charakter związku porfiryrynowego, ponieważ w produktach suchej destylacji przeprowadzanej w obecności stopionego NaOH, znaleziono związki dające reakcje pirolowe (22). W tym kierunku szły badania grupy Petrova (128), chociaż hipotezę tą mocno podważał brak w widmie absorpcyjnym charakterystycznego pasma Soreta występującego u wszystkich porfiryryn.

W roku 1953 Schmit, Ebnöther i Karrer (160) stwierdzili, że czerwony produkt acydolizy nie jest substancją jednorodną, lecz stanowi złożoną mieszaninę szeregu związków o zbliżonych własnościach. Dopiero jednak Armitage i inni (2) wprowadzając do badań produktów hydrolyzy (zarówno kwasowej jak i alkalicznej) technikę

elektroforezy bibułowej zdołali bliżej określić kierunek zmian jakie w tych procesach zachodzą. Autorzy ci stwierdzili, że w zależności od warunków hydrolizy następowało albo odłączenie grupy nukleotydowej, albo powstanie wolnych grup karboksylowych (w liczbie od 1 do 7), albo wreszcie oba te procesy zachodziły równocześnie. Z badań tych wynikało dalej, że wit. B<sub>12</sub> posiada charakter związku poliamidowego, zawierającego conajmniej 3 pierwszorzędowe grupy CONH<sub>2</sub> oraz grupę —CO—NH—CH<sub>2</sub>—CH(CH<sub>3</sub>)—O—P z fragmentem propanolaminy. Produkt pozbawiony tylko nukleotydu był identyczny z t. zw. czynnikiem B (Factor B) substancją wyodrębnioną przez Forda i Portera (81) z kału krów (p. rozdział 5).

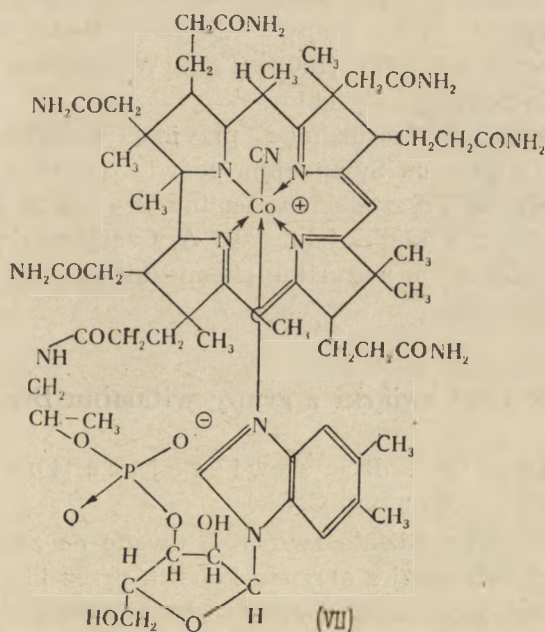
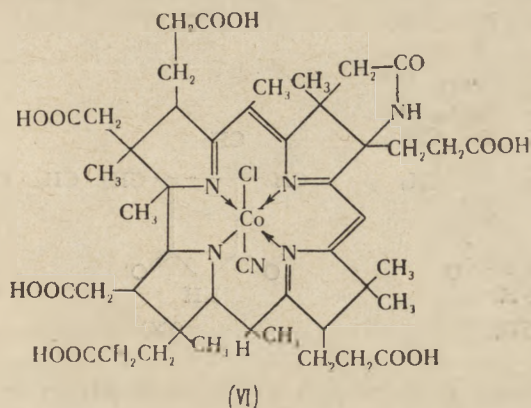
Dla dalszych badań bardzo istotnym było otrzymanie w serii doświadczeń wykonanych przez Cannona, Johnsona i Todda krystalicznego kwasu sześciokarboksylowego (31). Badania rentgenograficzne przeprowadzone na tym materiale przez grupę Hodgkin pozwoliły jej ustalić, że w cząsteczce witaminu B<sub>12</sub> występują 4 pierścienie pięcioczłonowe, z których 3 (A, B, C) są połączone mostkami metinowymi podobnie jak w porfirynach, natomiast czwarty (D) wiąże się z pierwszym pierścieniem (A) wiązaniem bezpośrednim (wzór V).



(V)

Gęstości elektronowe a stąd i położenia poszczególnych atomów wyliczano z rentgenogramów metodami matematycznymi. O trudnościach i skomplikowaniu obliczeń matematycznych niech świadczy to, że pracą tą wykonywano jeszcze prawie rok na elektronowej maszynie do liczenia (Trueblood i Prosen) zanim nie ustalono ostatecznego wzoru kwasu sześciokarboksylowego a za nim witaminu B<sub>12</sub>. Hodgkin, Pickworth, Robertson, Trueblood, Prosen i White) (101). Jednak ustalenie wzorów obydwu związków nie było tylko zasługą badań krystalograficznych. W tym stadium badań między grupą Hodgkin a pracowniami prof. Todda i Lestera Smitha istniała bardzo ścisła współpraca. Dane krystalograficzne pozostały szereg otwartych problemów chemicznych w strukturze kwasu sześciokarboksylowego i witaminu B<sub>12</sub>. Należało tu zbadać rozmieszczenie wiązań podwójnych i niektórych grup atomowych, charakter

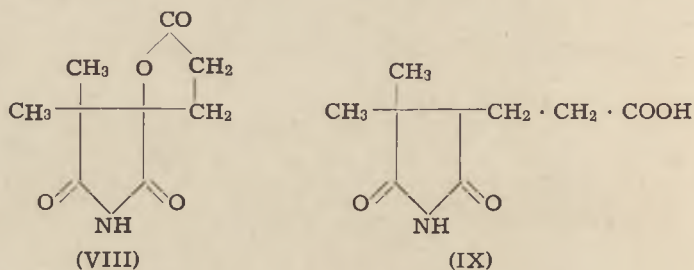
dotatkowego pierścienia przyłączonego do pierścienia B w kw. sześciokarboksylowym i inne. Dane te uzupełniły wspomniane grupy badawcze (Bonnnett, Cannon, Johnson, Sutherland, Todd i Smith) (12). Publikacje Hodgkin i współprac.) (101) oraz



Todda i Smitha i współprac. (12) ukazały się dlatego wspólnie w czasopiśmie londyńskim „Nature. Budowę kw. sześciokarboksylowego oraz witaminu B<sub>12</sub> podają wzory VI i VII.

W obu wzorach znajdujemy dotąd nieznaną, częściowo uwodnioną prawie płaski układ czteropirolowy zawierający 5 sprzężonych wią-

zań podwójnych. Rozmieszczenie reszt kwasu octowego i propionowego jest takie same jak w uroporfirynie III. W pierścieniu C brak jest grupy kwasu octowego natomiast występują tu 2 grupy metylowe. Kuehl, Shunk i Folkers (121) udowodnili obecność tego ugrupowania znajdując w produktach utlenienia witaminu B<sub>12</sub> związki o budowie podanych we wzorach VIII i IX.



Obecność szeregu grup metylowych występujących w cząsteczce wit. B<sub>12</sub> można zrozumieć jako następstwo reakcji metylowania w miejscach aktywowanych przez grupy =C=N—. Podobnie tłumaczymy proces chlorowania wit. B<sub>12</sub> (160), (135). W miejsce aktywowanych wodorów zostaje podstawiony chlor.

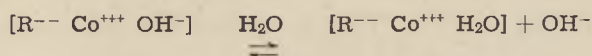
Dalsze badania potwierdzające przyjętą strukturę przedstawili Smith i Hodgkin na Sympozjum poświęconemu wit. B<sub>12</sub> w Hamburgu (174), (100). W kryształach witaminu B<sub>12</sub> znane są dziś pozycje wszystkich atomów z dokładnością  $\pm 0,3$  Å. Cząsteczka jest zbudowana bardzo zwięźle, przy czym wszystkie chemicznie czynne grupy znajdują się na jej powierzchni.

## 5. Inne związki z grupy witaminu B<sub>12</sub>

a) Pochodne wit. B<sub>12</sub> zawierające inne podstawniki w miejsce grupy CN.

Już w poprzednim rozdziale zwrócono uwagę na zdolność wymiany grupy cyjanowej związanej z atomem kobaltu przez inne grupy. Wśród tych związków na szczególną uwagę zasługuje pochodna hydroksylowa. Związek ten znajduje się w przyrodzie i po raz pierwszy izolował go w roku 1949 Pierce i współprac. (144). Nadano mu nazwę witaminu B<sub>12b</sub>. Nazwę witaminu B<sub>12a</sub> zarezerwowano dla substancji otrzymanej na drodze redukcji wit. B<sub>12</sub> wodorem w obecności rozdrobnionej platyny (118). Dopiero rok później udowodniono, że obie substancje są identyczne (2), (24), (115). Podobnie wyizolowany przez Anslova

i innych (1) t. zw. wit. B<sub>12d</sub> okazał się hydroksylową pochodną wit. B<sub>12</sub> (176). Dziś najłatwiej otrzymać go można w procesie fotolizy wit. B<sub>12</sub> (15), (16), (184). W porównaniu do wit. B<sub>12</sub> wit. B<sub>12b</sub> posiada tą samą czynność biologiczną, lecz ma zmienione widmo absorbcyjne z maksymami przy 273 ( $E_{1cm}^{1\%} = 138$ ), 351 (159) i 525 (54) m $\mu$  (24). Widmo świeżo sporządzonego roztworu zmienia się nieznacznie w czasie (115). Pewien wpływ wywiera również pH roztworu. Fakty te, jak również stwierdzony słabo zasadowy charakter wit. B<sub>12b</sub> (176), pozwalają przypuszczać, że związek ten istnieje w dwóch odmianach, a mianowicie w formie hydroksylowej, w której grupa hydroksylowa jest związana z atomem Co oraz w formie aquo — związku w którym na miejscu grupy OH stoi cząsteczka wody. Obydwie formy istnieją w roztworze w równowadze (116):



Zasadowy charakter posiada tylko aquo — forma.

W obecności śladów cyjanków wit. B<sub>12b</sub> przekształca się w trwalszy wit. B<sub>12</sub>. Kaczka i inni (119) zaproponowali dla wit. B<sub>12b</sub> w oparciu o nomenklaturę związków kompleksowych Wernera, nazwę hydroksykobalaminy. Dla wit. B<sub>12</sub> przyjęto nazwę cyjanokobalaminy. Ostatnia nazwa jest do dziś powszechnie stosowana. Sprawy nomenklatury omówimy bliżej w rozdz. 6.

Z innych pochodnych tego typu wymienić można znaleziony w hodowlach *Streptomyces griseus* witamin B<sub>12c</sub> (1), (176). W związku tym występuje grupa azotynowa ONO<sup>-</sup> i stąd nazwano go azotynokobalamina.

Szereg sztucznie otrzymywanych pochodnych (116), (175) nie posiada szczególniejszego znaczenia. Selenocyjano — kobalamina była używana do badań rentgenograficznych, gdyż wprowadzenie drugiego ciężkiego atomu Se ułatwiało poznanie przestrzennego rozmieszczenia atomów (23).

Wodne roztwory chloro —, bromo —, i siarczano — kobalaminy są silnie zdysocjowane. Według Smitha (173), (175) mamy tu raczej do czynienia z solami aquokobalaminy np. chlorkiem czy siarczanem. Cechą najbardziej charakterystyczną dla tych wszystkich pochodnych jest łatwość przechodzenia w wit. B<sub>12</sub> pod działaniem cyjanków.

#### b) Produkty addycji

Roztwór wit. B<sub>12</sub>, a również roztwory innych kobalaminy zadane nadmiarem cyjanków tworzą w alkalicznym (a niekiedy i obojętnym)

środoowisku niebiesko-fioletowo zabarwione pochodne. Maksima absorpcji większości tych pochodnych leżą przy 368, 540 i 580 m $\mu$ . Według Smitha i współpracowników (170) wit. B<sub>12</sub> tworzy w tych warunkach związek zawierający 2 grupy CN. Nadmiar jednej grupy cyjanowej powoduje elektroujemność tego związku. Znane są nawet nierozpuszczalne w wodzie sole Ag<sup>+</sup> i Zn<sup>++</sup> tego anjonu. W środowisku słabo kwaśnym dwucjanowa forma wit. B<sub>12</sub> rozpada się z powrotem na wit. B<sub>12</sub> i cyjanek. Podobne pochodne tworzą się również z siarkocyjanekami.

### c) Inne związki kobalaminowe

Niedługo po poznaniu omówionych wyżej kobalamin, szereg badaczy izolowało ze złożonego materiału mikrobiologicznego (kał zwierząt, treść pokarmowa jelił) kilka związków o własnościach bardzo zbliżonych do własności wit. B<sub>12</sub>, lecz nie ulegających przekształceniu w wit. B<sub>12</sub> pod działaniem cyjanków.

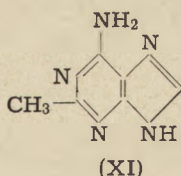
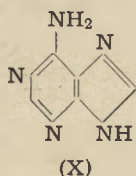
W roku 1951 Wijmenga (187) izoluje z kału świń związek o widmie absorpcyjnym witaminu B<sub>12</sub>, lecz różniący się od tego witaminu aktywnością mikrobiologiczną. Również metodą chromatografii bibułowej można go było oddzielić od wit. B<sub>12</sub>. Od słowa *mest* (=kał) związek ten nazywa witaminem B<sub>12m</sub>. Jednocześnie z kału szczurów Wijmenga izoluje inny, mikrobiologicznie tylko częściowo czynny związek, który nazywa Czynnikiem WR. Witamin B<sub>12m</sub> podobnie jak cyjanokobalamina, okazał się kompleksem cyjanowym i można go było przekształcić w procesie fotolizy w pochodną hydroksylową.

W tym samym roku Kon i współpracownicy zajmując się biologicznym i mikrobiologicznym oznaczeniem wit. B<sub>12</sub> w treści pokarmowej i kale zwierząt przeżuujących otrzymywali dla obu metod nie pokrywające się z sobą wyniki (38), (39). Dane te pozwoliły autorom wyciągnąć wniosek, że w badanym materiale mogą się znajdować różne substancje niejednakowo czynne dla drobnoustrojów i zwierząt. Bezpośrednie wyodrębnienie tych substancji, metodami zastosowanymi uprzednio do izolacji wit. B<sub>12</sub> z wątroby, potwierdziło tę hipotezę. Z treści przeżuwaczy oraz z kału cieląt wyodrębniono obok wit. B<sub>12</sub> dwie inne substancje, które nazwano czynnikami (faktorami) A i B (79). Czynniki A i B pod działaniem cyjanków nie przechodziły w wit. B<sub>12</sub>. Wkrótce potem członkowie grupy badawczej Kona, a mianowicie Ford i Porter (81) donoszą o wykryciu nowego czynnika C.

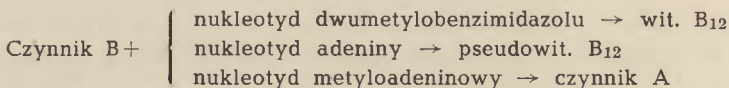
W Stanach Zjednoczonych Pfiffner i współpracownicy wyizolowali z niezidentyfikowanego bliżej beztlenowego mikroorganizmu pochodzącego z żwacza cieląt, krystaliczną substancję nazwaną pseudowitaminem B<sub>12</sub> (143), a Lewis, Tappan i Elvehjem (125), (126) z kału szczurów wyodrębniają krystaliczny wit. B<sub>12f</sub> (f = faeces).

Bardzo poważnym postępowaniem metodycznym w tych badaniach było wprowadzenie metody elektroforezy bibułowej i użycie roztworów słabych elektrolitów jako cieczy przewodzących (103). Metodą tą grupa Kona wykazała w badaniach porównawczych, że wit. B<sub>12m</sub> jest mieszaniną złożoną głównie z czynnika A oraz z małych ilości pseudowitaminu B<sub>12</sub> wit. B<sub>12</sub> i czynnika B. Podobnie czynnik WR i witamin B<sub>12f</sub> okazały się substancjami niejednorodnymi (74). Krystalizacja jako kryterium czystości związków kobalaminowych okazała się w tej grupie związków warunkiem zupełnie niewystarczającym. Jednocześnie wymienione badania porównawcze pozwoliły w owym czasie zredukować liczbę nowych pochodnych kobalamin do czterech. Były to czynniki A, B, C, oraz pseudowitamin B<sub>12</sub> (120).

Międzyczasie Dion, Calkins i Pfiffner wykazali, że w cząsteczce pseudowitaminu B<sub>12</sub> nie ma 5,6-dwumetylobenzimidazolu, lecz jego miejsce zajmuje adenina (wzór X) (56), (57). Podobnie okazało się, że nukleotyd czynnika A zawiera niewykrytą dotąd w przyrodzie 2-metylo-adeninę (58), (wzór XI). Te zawile zależności wyjaśniła dalej wspomniana wyżej praca Armitagea i innych (2) oraz publikacja Ganta, Smitha i Parkera (92). Armitage zidentyfikował czynnik B jako związek powstający z witaminu B<sub>12</sub> po usunięciu z jego cząsteczki nukleotydu. Gant, Smith i Parker wykazali, że czynnik B powstaje również w trakcie hydrolizy czynnika A i pseudowitaminu B<sub>12</sub>. W ten sposób wyjaśniono wzajemne zależności istniejące między wit. B<sub>12</sub> a niektórymi substancjami pokrewnymi. Podstawowym związkiem jest tu czynnik B.

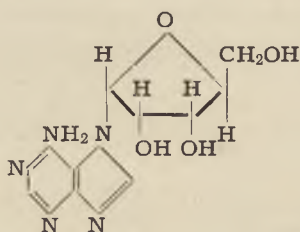


Po dołączeniu do niego nukleotydu z dwumetylobenzimidazolem, adeniną lub metyloadeniną jako zasadą otrzymujemy odpowiednie: witamin B<sub>12</sub>, pseudowitamin B<sub>12</sub> lub czynnik A:

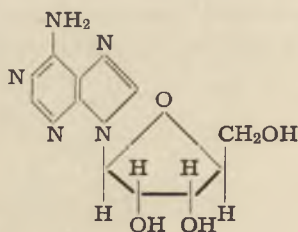


Warto dodać, że czynnik B jak i inne beznukleotydowe kobalaminy nie otrzymano dotąd w stanie krystalicznym.

Niezależnie od badań grupy Kona, czynnik B wyizolowano i w innych ośrodkach, gdzie nadawano mu odrębne nazwy. Sjöström, Neujahr i Lundin znaleźli go w ściekach miejskich i nazwali czynnikiem IV (167). Z tego samego materiału wyodrębnili go również Bernhauer i Friedrich (8) i nadali mu nazwę czynnika. I. Janicki i Pawełekiewicz wyizolowali z hodowli bakterii kwasu propionowego — *Propionibacterium shermanii* — związek kobalaminy, którzy nazwali wit. B<sub>12p</sub> (od *Propionibacterium*) (108), (109). W późniejszych badaniach witamin B<sub>12p</sub> okazał się identyczny z czynnikiem B (110). Podobnie w różnym materiale znajdowano pseudowitamin B<sub>12</sub> oraz czynnik A. Związki te występują w przefermentowanych ściekach miejskich (8), (167), (131), w morskich algach (67), (26), a ostatnio Pawełekiewicz i Zodrow izolowali je w postaci krystalicznej z kultur *Corynebacterium diptheriae* (139). Z problemów chemicznych dotyczących purynowych pochodnych kobalaminy, do dziś nie jest rozstrzygnięte czy w tych nukleotydach występuje wiązanie α czy β-glikozydowe. Również nie jest znane czy reszta cukrowa łączy się z atomem 7 czy 9 pochodnej purynowej. Te różne wiązania stwarzają możliwości istnienia, przynajmniej teoretycznie, 4 izomerów tych kobalaminy, o niesymetrycznych zasadach nukleotydowych (120), (77). Według opinii Hodgkin (cyt. wg. 120) względy przestrzenne przemawiają wyłącznie na korzyść wiązania przy atomie C(7) puryn (wzów XI) (\*)



(XI)



(XII)

\* Prof. Bernhauer w prywatnej rozmowie z autorem niniejszego referatu wyraził nadzieję, że zapewne w najbliższym czasie uda mu się rozstrzygnąć ten problem w analogiczny sposób jak to uczynił Gulland dla nukleotydów kwasów nukleinowych.



Mielibyśmy tu zupełnie inne stosunki niż w nukleotydach kwasów nukleinowych, które są 9- $\beta$ -glikozydami (wzów XII).

O czynniku C wiemy dziś niewiele. Późniejsze dane wykazały (78), (131), że substancję tę, którą uważano początkowo za jednorodną, można rozłożyć na 2 składniki, które nazwano czynnikami C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub>. Można je odzielić od siebie metodą chromatografii i elektroforezy bibułowej. Mikrobiologicznie czynniki te są podobnie aktywne jak czynnik B, lecz wykazują nadto niewielką aktywność również dla *L. leichmanii* i *Euglena gracilis* (p. tablica1). Jest rzeczą interesującą, że mutant *E. coli*, przekształca w czasie hodowli czynnik B w czynnik C (80).

Dellweg i inni (52) stwierdzili ostatnio, że ta przemiana nie jest jednokierunkowa jak sądzono uprzednio i że obok czynników C powstających zresztą w małych ilościach, z syntetyzowane zostają równocześnie witamin B<sub>12</sub>, pseudowitamin B<sub>12</sub>, czynnik A oraz t. zw. czynniki V<sub>1</sub> i V<sub>2</sub>.

Wydaje się, że opisany przez Sjöströma i innych t. zw. czynnik I oraz wit. B<sub>12s</sub> Ericsona i Lewisa (67) są substancjami identycznymi z czynnikiem C. Pawełkiewicz i Zodrow (138) wyizolowali z komórek *Prop. shermanii* (z hodowli ubogich w Fe) kobalaminę, która według Pawełkiewicza (136) może być również mieszaną czynników C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub>. Widma absorpcyjne tych kobalamin, które nazwano kobalaminami Y<sub>1</sub> i Y<sub>2</sub>, są identyczne z widmem witaminu B<sub>12p</sub> (czynnika B), a zatem wskazują na brak nukleotydu. Bakterie propionowe w hodowlach z dostateczną ilością żelaza, lecz bez kobaltu przekształcają te substancje w witamin B<sub>12p</sub>, czynnik A i witamin B<sub>12</sub> (136). Mielibyśmy tu do czynienia jakby z odwróceniem procesu przebiegającego w komórkach *E. coli*.

Jak wykazały późniejsze badania lista nowych, występujących w przyrodzie kobalamin, nie ograniczyła się do 4 powyżej opisanych związków, (czynnika A, B, C (= C<sub>1</sub> + C<sub>2</sub>) i pseudowit. B<sub>12</sub>). Następne prace znacznie powiększyły tę liczbę, a ostatnie doniesienia wykazują, że proces ich poznania jest w pełnym biegu. Należy przypuszczać, że szereg tych substancji stanowi niewątpliwie produkty pośrednie biosyntezy kobalamin potrzebnej komórce, inne natomiast są produktami rozpadu. Poniżej omówiono szereg znalezionych w przyrodzie kobalamin. (P. również tabl. 1.)

#### Czynnik D (Faktor D)

Związek ten opisali Brown i inni (25). Jest on mikrobiologicznie nieczynny i posiada charakter zasadowy (elektroforeza w kw. octowym).

### Czynnik E (Faktor E)

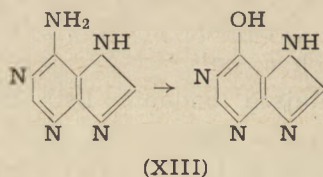
Związek ten wykryli Brown i inni (25) w ekstraktach z kału cieląt i świń. Posiada on charakter kwaśny i własnościami mikrobiologicznymi przypomina czynnik B. Jonoforeza bibułowa w 1 N kw. octowym nie oddziela go od wit. B<sub>12</sub>, natomiast w buforze fosforanowym o pH 6,5 czynnik ten wędruje ku anodzie i rozdziela się na 2 blisko leżące czerwone frakcje.

### Czynnik F (Faktor F)

Wyodrębniony w postaci krystalicznej również przez Browna i inn. (25). Znajdzie je się w kale świń, lecz tylko w śladach w kale cieląt. Wydaje się, że jest to główny czynnik kału kurcząt. Elektroforetycznie jest on obojętny (w kw. octowym). Wartość R<sub>f</sub> (względem wit. B<sub>12</sub>) wynosi 0,77 (II-rz. butanol nasyc. wodą w atmosferze HCN, metodą spływową).

### Czynnik G (Faktor G) (hipoksantyno-cyjanokobalamina)

Ten krystaliczny związek otrzymali Pfiffner i inni (142), Dion i inni (58) oraz Brown i Smith (27) na drodze dezaminacji pseudowitaminu B<sub>12</sub> kwasem azotawym. W warunkach tych adenina związana w nukleotydzie pseudowitaminu B<sub>12</sub> przechodzi w hipoksantynę: (wzór 'XIII)



Później izolowano go również z kału świń (25). Czynnikiem G jest substancją elektroobojętą (przy pH 3) i mikrobiologicznie czynną dla *E. coli*, lecz nieznacznie czynną dla *L. leichmanii*.

### Czynnik H (Faktor H) (2-metylohipoksantyno-cyjanokobalamina)

Związek ten otrzymano podatknie jak czynnik G dezaminując czynnik A (58), (25), (27), (166). Posiada własności zbliżone do związku poprzedniego.

Witamin B<sub>12</sub> III (czynnik I, faktor I) (5-hydroksybenzimidazolo-cyjanokobalamina)

Po raz pierwszy związek ten izolowali w postaci krystalicznej Friedrich i Bernhauer (83) z przefermentowanych ścieków miejskich, a ostatnio Brown i inni (25) z kału cieląt i świń. Własnościami mikrobiologicznymi i biologicznymi przypomina wit. B<sub>12</sub> (7). Poza wit. B<sub>12</sub> wit. B<sub>12</sub> III jest jedną substancją występującą w przyrodzie czynną przeciw anemii złośliwej. Widmo absorpcyjne roztworu wodnego różni się od widma wit. B<sub>12</sub> tylko słabo zaznaczonym pasmem przy 278 mμ i obecnością szerokiego pasma absorpcyjnego przy 295 mμ niewystępującego w widmie cyjanokobalaminy. Od witaminu B<sub>12</sub> daje się łatwo oddzielić metodą chromatografii bibułowej (90).

Po otrzymaniu większych ilości wit. B<sub>12</sub> III (prof. Bernhauer otrzymał ze ścieków kilka gramów preparatu), Friedrich i Bernhauer (84), (87) oraz współpracująca z Bernhauerem grupa Folkersa (152) szybko stwierdzili, że związek ten różni się od wit. B<sub>12</sub> tylko obecnością 5-hydroksybenzimidazolu w miejscu 5,6-dwumetylobenzimidazolu występującego w nukleotydzie witaminu B<sub>12</sub>. Ponieważ cząsteczka 5-hydroksybenzimidazolu jest niesymetryczna (podobnie jak cząsteczka puryn, a przeciwnie jak 5,6-dwumetylobenzimidazolu) należało jeszcze rozstrzygnąć, czy obecny w wit. B<sub>12</sub> III nukleotyd jest pochodną 5— czy 6— hydroksybenzimidazolu. Na ostatnio odbytym w Hamburgu Sympozjum poświęconemu wit. B<sub>12</sub> zarówno Bernhauer (88) jak i Folkers (166) przedstawili badania swych pracowni, w których wykazali słuszność pierwszej hipotezy i obecność 1-α-D-ribofurynozyd-5-hydroksybenzimidazolu w cząsteczce witaminu B<sub>12</sub> III.

Dalsze czynniki J, K, L i M opisuje Rabek i współprac. (145). Związki te wyodrębniono ze ścieków miejskich. Są one wszystkie nieaktywne wobec *E. coli* i badania elektroforetyczne wykazują przy pH 6,5 kwaśny charakter. Ostatnią grupę związków kobalaminy stanowią t.zw. czynniki V Bernhauera i Friedricha (8), (83). Do grupy tej zaliczają ci autorzy szereg produktów zbliżonych budową do czynnika B, a różniących się od niego obecnością wolnych grup karboksylowych (w miejsce amidowych) oraz niekiedy dodatkowo brakiem cząsteczki propanolaminy.

Wspomniane wyżej czynniki V<sub>1</sub> i V<sub>2</sub> wyizolowane przez Delwega i innych (52) z produktów przemian etiokobalaminy w komórkach *E. coli*, okazały się mono- i dwu-karboksylowymi pochodnymi etiokobalaminy.

Do tej samej klasy kwaśnych związków można zaliczyć wykryty ostatnio t.zw. kwas etiokobalaminafosforowy, będący estrem fosforo-

wym czynnika B (89). Ma on odgrywać zdaniem Dellwega, Backera i Bernhauera ważną rolę w biosyntezie wit. B<sub>12</sub> (p. rozdz. 6)

Grupa wspomnianych wyżej kwaśnych kobalamin wymaga jeszcze szerszego opracowania.

#### d) Sprawy nomenklatury związków kobalaminowych

Poznanie tak licznych związków grupy witaminu B<sub>12</sub> oraz ustalenie, przynajmniej dla części z nich, wzajemnych strukturalnych zależności skłoniło z jednej strony Bernhauera i Friedricha (8), a z drugiej autora niniejszego referatu (135) do przedstawienia własnych koncepcji odnośnie nomenklatury związków kobalaminowych. Propozycje te wyszły w roku 1954, a więc jeszcze przed poznaniem budowy witaminu B<sub>12</sub>. Nomenklatura Pawełkiewicza (i prawie identyczna z nią Bernhauera i Friedricha) była rozszerzeniem nomenklatury Kaczki i inn. (119). Jej założenie najlepiej zilustrują przykłady. Witamin B<sub>12</sub> (cyjanokobalamina) przyjmuje nazwę 5,6-dwumetylobenzimidazolo-cyjano-kobalaminy, pseudowitamin B<sub>12</sub>: adenino-cyjano-kobalaminy, a witamin B<sub>12b</sub> 5,6-dwumetylobenzimidazolo-hydroksykobalaminy (ostatni związek występuje nadto w roztworze wodnym w formie wodorotlenku 5,6-dwumetylo-benzimidazolo-aquo-kobalaminy). Nazwę „kobalaminy” zarezerwowano wyłącznie dla fragmentu cząsteczki zawierającego Co i makropierścień. Według zaproponowanej nomenklatury czynnik B (wit. B<sub>12p</sub>) winien nosić nazwę cyjano-kobalaminy, gdyż zawiera on tylko fragment makropierścienia z atomem Co oraz grupą CN (wzgl. Cyjano-aquo-kobalaminy, gdyż jest również możliwe, że szósta wartościowości koordynacyjna Co jest wysycona cząsteczką H<sub>2</sub>O). Ponieważ w całej literaturze światowej cyjanokobalamina nazywa się wit. B<sub>12</sub>, Pawełkiewicz celem uniknięcia nieporozumień przyjął dla czynnika B nazwę deznukleotydo-cyjano-kobalaminy. Bernhauer zaproponował dla tego związku termin etiokobalaminy akcentując w ten sposób, że idzie tu o substancję podstawową dla związków kobalaminowych (grec. etia = podstawowy).

Jest rzeczą oczywistą, że dziś, gdy znamy już budowę wit. B<sub>12</sub>, tego rodzaju uproszczona nomenklatura musi ulec zmianie. Nomenklatura racjonalna musi opierać się na nazwach układów elementarnych jak to ogólnie jest przyjęte w chemii związków organicznych oraz musi stwarzać możliwości jej zastosowania dla wszystkich pochodnych. Na ostatnio odbytym sympozjum hamburskim przedstawiono w formie komunikatu owe propozycje (Bernhauer, Folkers, Smith). Nazwy związków kobalaminowych wg. tych propozycji zupełnie od-

biegają od dotychczas przyjętych. Ponieważ podane nazwy układów podstawowych jak i związków bardziej złożonych wymagają jeszcze dyskusji, a następnie zatwierdzenia przez Międzynarodową Unie Chemiczną, szersze zajęcie się tym problemem w tym referacie wydaje się przedwczesne i dlatego celowo je pominięto.

## 6. Biosynteza witaminu B<sub>12</sub> i substancji pokrewnych

Odkąd stwierdzono, że jednym z fragmentów budowy cząsteczki witaminu B<sub>12</sub> jest 5,6-dwumetylobenzimidazol, prowadzono szereg prac, w których badano, czy ten związek bądź jego pochodne lub substancje blisko chemicznie spokrewnione nie mają aktywności biologicznej witaminu B<sub>12</sub> (64), (44), (123).

W roku 1950 badacze japońscy Sahasaki, Mikata i Sakai (158) zwrócili uwagę na znamienne zachowanie się homogenizatów wątroby inkubowanych z dodatkiem 5,6-dwumetylobenzimidazolu. W takich warunkach stwierdzono znaczny wzrost aktywności witaminowej mierzonej metodami mikrobiologicznymi. Również w tej samej pracy badacze ci wykazali, że dodatek 20 mg dwumetylobenzimidazolu na 1 litr syntetycznej pożywki Dulaneya zwiększa do 150% produkcję wit. B<sub>12</sub> u szczepu *Streptomyces X-28*. Z badań tych Sahasaki, Mikata i Sakai wysunęli wniosek, że 5,6-dwumetylobenzimidazol jest wykorzystany do wzmożonej syntezy wit. B<sub>12</sub>. Dopiero jednak 4 lata później udokumentowano w bezpośrednich badaniach hipotezę postawioną przez badaczy japońskich.

W roku 1954 Janicki i Pawełekiewicz stwierdzają, że szczep bakterii kwasu propionowego *Propionibacterium shermanii* syntetyzuje obok nieznacznych ilości wit. B<sub>12</sub> wtedy jeszcze nie określoną substancję kobalaminową nazwaną wit. B<sub>12p</sub> (108), (109). Pawełekiewicz zajmując się dalej wytwarzaniem przez ten drobnoustrój wit. B<sub>12</sub> nieoczekiwanie znalazł, że w obecności 5,6-dwumetylobenzimidazolu, dodanego do pożywki, produkcja wit. B<sub>12p</sub> spada praktycznie do zera natomiast na jej miejscu pojawia się witamin B<sub>12</sub> (135). To, że w przedstawionym procesie biosyntezy następuje istotnie wbudowanie zawartego w pożywce związku benzimidazolowego potwierdziło następne doświadczenie, w którym jako prekursor zastosowano 5-metylobenzimidazol. W wyodrębnionych, krystalicznych preparatach zidentyfikowano na drodze analitycznej obecność 5,6-dwumetylobenzimidazolu w pierwszym i 5-metylobenzimidazolu w drugim doświadczeniu. W ten sposób po raz pierwszy w historii tych badań otrzyma-

no w stanie krystalicznym „sztuczną“, niespotykaną w przyrodzie 5-metylobenzimidazolo-cyjanokobalaminę.

W tym samym roku dwa ośrodki badawcze, a mianowicie prof. Kona (Uniwersytet w Reading, Anglia) i prof. Bernhauera (Stockatadt n. Menem, Niemcy) donoszą o biosyntetycznych zdolnościach *Eschericha coli*.

Już w roku 1953 Kon i współpracownicy (38) stwierdzają, że mikroorganizmy zawarte w kale posiadają zdolności nie tylko syntezy różnych związków kobalaminowych, lecz mogą również te związki wzajemnie przekształcać jedne w drugie. Z podobnym zjawiskiem spotkali się ci autorzy u mutantu *Eschericha coli* 113—3 (Davis) używanego do mikrobiologicznego oznaczenia witaminów grupy B<sub>12</sub>. Szczep tego organizmu hodowany na pożywce zawierającej czynnik B, przekształca go w czynnik C (80), (82). Wiedząc, że szereg kobalamin różni się między sobą obecnością różnych zasad nukleotydowych, grupa Kona celowo użyła do badań ewentualnej biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin szczepu *E. coli* 113—3, hodując go na pożywce z czynnikiem B oraz różnymi pochodnymi puryn i benzimidazolu. W ten sposób Ford i Holdsworth (74), posługując się techniką bioautografii wykazują, że wymieniony drobnoustrój syntetyzuje wit. B<sub>12</sub> z czynnika B i 5,6-dwumetylobenzimidazolu lub 4,5-dwumetylo-o-fenylendwuaminy. Podobnie działa również riboflawina. W analogicznych doświadczeniach wykazano tworzenie się pseudowitaminu B<sub>12</sub> (adenino-CK) w obecności adeniny. Bardzo ciekawym było tu stwierdzenie, że ani adenozyne czy kwas adenyłowy ani kwas adenozynotrójfosforowy nie były prekursorami pseudowit. B<sub>12</sub>. W dalszych doświadczeniach (76), (77), wykazano techniką bioautografii i autoradiografii tworzenia się dalszych 12 nowych nukleotydocyjanokobalamin, między innymi, występującej w przyrodzie, 2-metyloadenino-CK (czynnika A).

Analogiczne badania przeprowadzili Bernhauer i Friedrich (8). Jak wykazały doświadczenia tych autorów zdolność biosyntezy nukleotydocyjanokobalaminy posiada nie tylko mutant *E. coli*, ale również nawet w większym stopniu, dziki szczep *E. coli*. Biosynteza zachodzi w komórkach rosnących jak i wyrosniętych. Dalsze publikacje Pawełkiewicza i Nowakowskiej (137) oraz Dellwega, Becher i Bernhauera (51) donoszą o otrzymaniu w stanie krystalicznym dalszych benzimidazolowych pochodnych witaminu B<sub>12</sub>.

Niezależnie od cytowanych prac, Fantès i O'Callaghan stwierdzili na przykładzie *Streptomyces griseus*, że biosynteza różnych pochodnych wit. B<sub>12</sub> zachodzi również i dla tych mikroorganizmów,

które normalnie syntetyzują wyłącznie wit. B<sub>12</sub> (70), (71). W obecności względnie w dużych ilości o-fenylendwuaminy w pożywce (40 — 480 µg/ml) otrzymano w ten sposób benzimidazolocyjanokobalaminę.

Ostatnie doniesienia wskazują, że inne mikroorganizmy posiadają zdolności biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. Fantesi i O'Callaghan stwierdzili tę zdolność u *Streptomyces olivaceus*, *Str. fradiae*, *Str. aureofaciens*, *Bacillus megatherium*, *Xanthomonas juglandis*, *Clostridium tetani* i *Clostridium welchii* (72), a Pawełkiewicz i Zodrow u *Corynebacterium diphtheriae* (140). W tablicy 2 zestawiono listę syntetyzujących mikroorganizmów jak również otrzymane nukleotydocyjanokobalaminy.

### Mechanizm tworzenia się nukleotydocyjanokobalamin

O mechanizmie tworzenia się nukleotydocyjanokobalamin (NCK) nie wiemy dziś jeszcze wiele. U mikroorganizmów syntetyzujących normalnie beznukleotydowe kobalaminy jak np. u *Propionibacterium shermanii* reakcja tworzenia się NCK jest reakcją następczą w stosunku do reakcji powstawania pochodnych beznukleotydowych (137). Brak zdolności wytwarzania przez te drobnoustroje wit. B<sub>12</sub> uwarunkowana jest tylko brakiem zdolności lub ograniczeniem syntezy 5,6-dwumetylobenzimidazolu. Wynika stąd, że synteza fragmentu pseudoporfirynowego cząsteczki wit. B<sub>12</sub> i układu nukleotydowego przebiega niezależnie od siebie. Dalej możliwości wbudowania różnych pochodnych benzimidazolu i puryn do cząsteczki kobalaminowej wskazuje na mało specyficzny układ enzymatyczny katalizujący tę reakcję. Te układy enzymatyczne posiadają również mikroorganizmy, które nie mają zdolności ani syntezy pierścienia pseudoporfirynowego, ani też pierścienia benzimidazolowego (np. *E. coli*). Dotychczasowe wstępne próby przeprowadzenia biosyntezy NCK na drodze enzymatycznej nie dały rezultatu (135). Natomiast na podstawie zebranego materiału ustalono pewne empiryczne prawidłowości określające, które z pochodnych benzimidazolu mogą być wykorzystane do syntezy NCK. Prawidłowości te można streścić w następujących punktach (51).

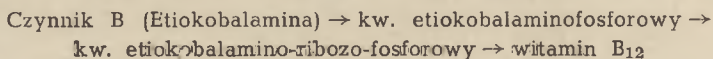
1) Najlepiej wykorzystywanymi prekursorami biosyntezy NCK są pochodne benzimidazolu podstawione tylko w pozycji 5 lub 5 i 6.

2) Pochodne substytuowane w pozycji 4 i (lub) 7 nie są prekursorami. Jednak jednoczesne podstawienie w pozycji 4 i 6 prowadzi do otrzymania czynnego prekursora.

3) Substytucja w pozycji 2 daje związki, które nie mogą być wykorzystywane jako prekursory biosyntezy NCK. Wyjątkiem pod tym względem są te pochodne, w których grupą podstawioną jest grupa kar-

boksyłowa (COOH), lub karboksamidowa (CONH<sub>2</sub>). Początkowo przypuszczano, że również 2-hydroksymetylo — pochodne benzimidazolu zachowują się w analogiczny sposób (51). Ostatnie prace laboratorium Bernhauera zaprzeczają jednak temu. (53). Grupy COOH i CONH<sub>2</sub> przed włączeniem ulegają wymianie na wodór. Otrzymane w rezultacie NCK zawierają zasadę benzimidazolową z wolną pozycją 2.

Według ostatnich doniesień (185) wydaje się, że C<sub>2</sub>-atom benzimidazolu cząsteczki kobalaminowej odgrywa specyficzną biologiczną funkcję. Weygand i Wycker stwierdzili przy pomocy 5,6-dwumetylobenzimidazolu — (2—C<sup>14</sup>), że atom węgla z pozycji 2 jest przenoszony do cząsteczki adeniny i guaniny (w pozycję 8). Wymienione obserwacje Weyganda i Wackera mogą nam tłumaczyć dlaczego 2-substytuowane pochodne benzimidazolu nie mogą być prekursorami odpowiednich NCK. W wyjaśnieniu drogi biosyntezy NCK bardzo ważne były spostrzeżenia Dellwega i inn. (51). Badacze ci stwierdzili, że o ile w obecności 5,6-dwumetylobenzimidazolu stopień przemiany czynnika B w wit. B<sub>12</sub> w komórkach *E. coli* jest rzędu 50%, to wykorzystanie  $\alpha$ -ribazolu (nukleotydu) i fosforanu  $\alpha$ -ribazolu (nukleotydu) jest o wiele mniejsze. Na tej podstawie wymienieni autorzy sugerują (przy czym pomijają w dyskusji zdolność lub niezdolność przenikania tych związków przez ścianę komórkową bakterii), że wit. B<sub>12</sub> tworzy się z czynnika B nie przez proste przyłączenie gotowego nukleotydu, lecz na drodze następujących przemian:



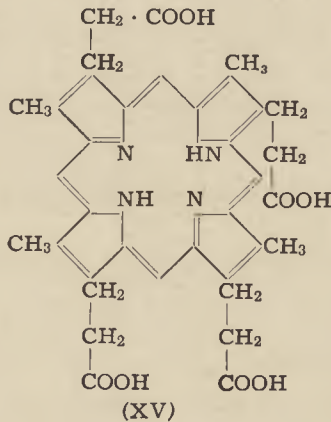
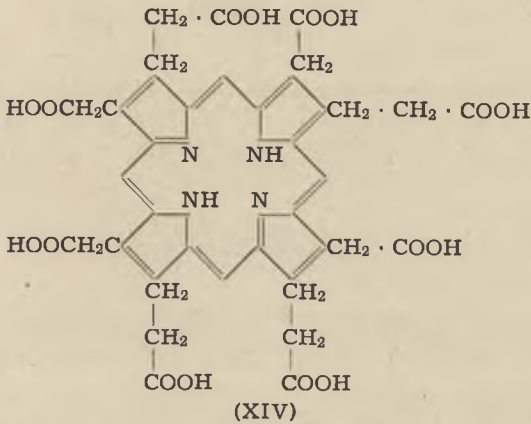
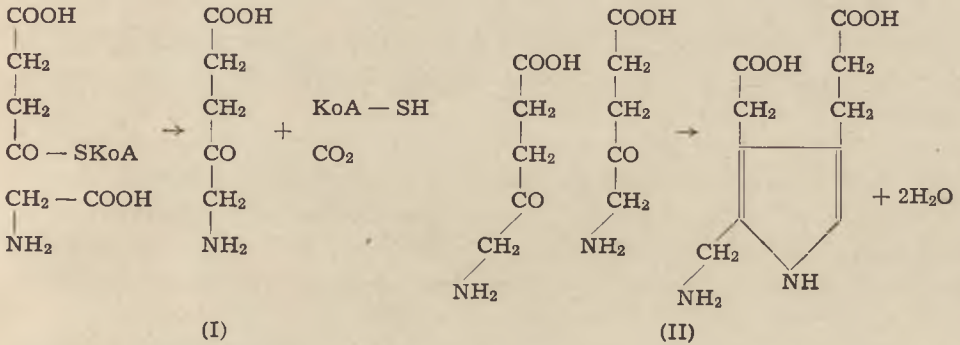
Trzeba dodać, że grupa Bernhauera doniosła ostatnio o wyizolowaniu kwasu etiokobalaminofosforowego (p. rozdz. 5) (89).

W jaki sposób powstaje w komórce drobnoustrojów 5,6-dwumetylobenzimidazol nie mamy do dziś żadnych danych. Wydaje się, że związek ten może powstawać z tych samych elementów z których tworzy się aromatyczny pierścień riboflawiny. Natomiast wyraźniej przedstawia się nam mechanizm biosyntezy czteropirołowego pierścienia kobalaminowego.

Pawełkiewicz i Zodrow (138) przeprowadzając doświadczenie nad produkcją witaminów grupy B<sub>12</sub> przez *Propionibacterium shermanii* na półsyntetycznych pożywkach zauważyli, że bakterie te, przy niedostatecznej ilości jonowego żelaza, wytwarzają wolną koproporfirynę III. Dodanie do pożywki soli żelazowych hamowało syntezę koproporfiryny. Podobnie, choć znacznie w mniejszym stopniu działały sole kobaltawe. Mechanizm biosyntezy porfiryn jak i sposób hamowania tego procesu jonami żelaza jest już dziś dobrze znany (161),



(130), (68), (59). Wiadomym jest, że prekursorem związków porfiryńowych jest kw.  $\delta$ -aminolewulinowy, powstający z glicyny i bursztynylu — koenzymu A (reakcja I). Kondensacja 2 cząsteczek kw  $\delta$ -aminolewulinowego daje porfobilinogen (reakcja II). Jest to związek pirolowy, z którego tworzy się uroporfiryna III. (wzór XIV).

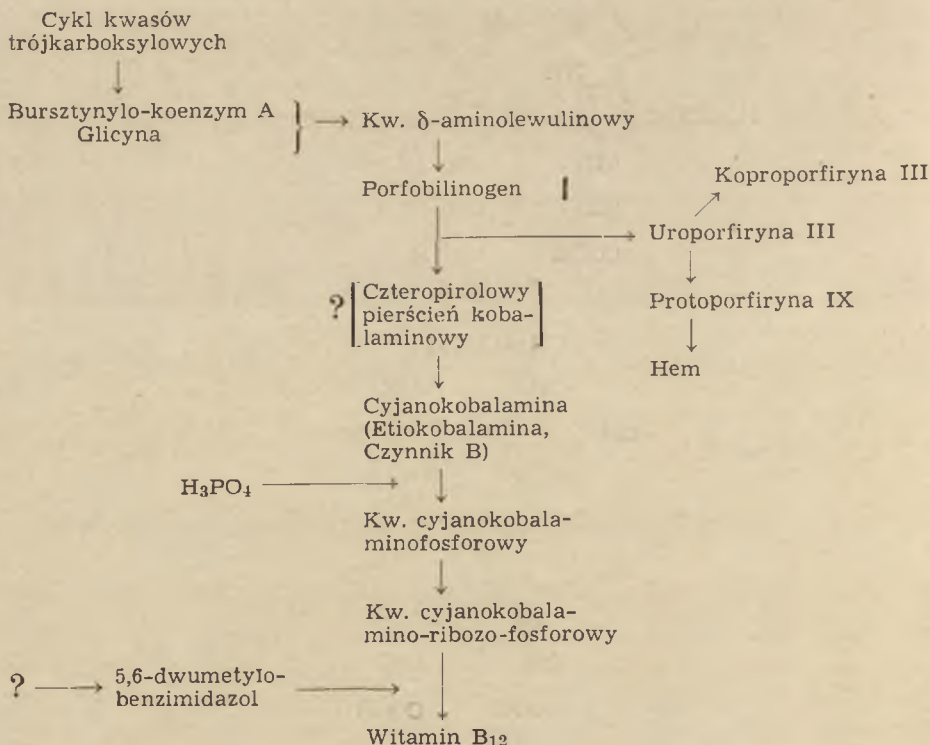


Przy dostatecznej ilości żelaza uroporfiryna III przekształca się w żelazo — protoporfirynę. Ostatni związek jest grupą prostetyczną bardzo wielu enzymów oddechowych, katalazy i peroksydazy. Przy niedoborze żelaza reakcja powstawania protoporfiryny jest zahamowana, a na jej miejscu pojawia się niepotrzebna dla organizmu koproporfiryna III (wzór XV).

Pawełkiewicz i Zdrow tłumacząc hamujące działanie  $\text{Co}^{++}$  na syntezę wolnej koproporfiryny III założyli, że kobalaminy powstają z kw.  $\delta$ -aminolewulinowego. W obecności soli kobaltu synteza kobalamin konkurencyjnie obniża stężenie kw.  $\delta$ -aminolewulinowego, a tym samym proces tworzenia się koproporfiryn. Trzeba dodać, że autorzy ci wykryli po raz pierwszy w hodowlach drobnoustrojów kw. aminolewulinowy. Hipoteza mechanizmu biosyntezy kobalamin pozwoliła nadto autorom wydedukować zdolność tworzenia się tych związków u *Corynebacterium diphtheriae* (139).

Ostateczny dowód powstania kobalamin z kw.  $\delta$ -aminolewulinowego uzyskał ostatnio Lester Smith (174). W swym referacie wygło-

PRZYPUSZCZALNY SCHEMAT BIOSYNTETY WITAMINU B<sub>12</sub>



szonym na Sympozjum hamburskim przytoczył dane uzyskane wspólnie z prof. Neubergerem wykazujące, że zarówno znaczone węglem C<sup>14</sup> glicyna jak i kw δ-aminolewulinowy są wykorzystywane do biosyntezy witaminu B<sub>12</sub>. Powyżej podajemy przypuszczalny schemat biosyntezy witaminu B<sub>12</sub>.

## LITERATURA

1. Anslow W. K., Ball S., Emery W. B., Fantès K. H., Smith L. E., Walker A. D., *Chem. and Industry*, 1950, 574.
2. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Smith L. E., Stafford W. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1953, 3849.
3. Bacher F. A., Boley A. E., Shonk C. E., *Anal. Chem.*, **26**, 1146, 1954.
4. Beaven G. W., Holliday E. R., Johnson E. A., Ellis B., Mamalis P., Petrov V., Sturgeon B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1**, 957, 1949.
5. Beaven G. W., Holliday E. R., Johnson E. A., Ellis B., Petrov V., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2**, 733, 1950.
6. Beaven G. W., Holliday E. R., Johnson E. A., Ellis B., Petrov V., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2**, 944, 1950.
7. Bernhauer K., Blumberger K., Petrides P., *Arzeim.—Forsch.*, **5**, 442, 1955.
8. Bernhauer K., Friedrich W., *Angew. Chem.*, **66**, 776, 1954.
9. Bird H. R., Rubin M., Groschke A. C., *J. Biol. Chem.*, **174**, 611, 1948.
10. Bogucka J., Iwanowska J., Kąkol H., *Przemysł Chem.*, **9**, 14, 1953.
11. Bolzoni C. S., *Boll. Inst. Sieroterap., milanese*, **31**, 97, 1952.
12. Bonnett R., Cannon J. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A. R., Smith L. E., *Nature*, **176**, 328, 1955.
13. Borensztajn D., Kuryłowicz W., *Med. Dośw. i Mikrobiologia*, **4**, 483, 1952.
14. Bosshardt D. K., Paul W. J., O'Doherty K., Huff J. W., Barnes R. H., *J. Nutrit.*, **37**, 21, 1949.
15. Boxer G. E., Rickards J. C., *Archiv. Biochem.*, **29**, 75, 1950.
16. Boxer G. E., Rickards J. C., *Archiv. Biochem.*, **30**, 372, 382, 392, 1952.
17. Brink N. G., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2951, 1949.
18. Brink N. G., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4442, 1951.
19. Brink N. G., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2856, 1952.
20. Brink N. G., Holly F. W., Shunk C. H., Peel E. W., Cahill J. J., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1866, 1950.
21. Brink N. G., Kuehl F. A., Folkers K., *Science*, **112**, 354, 1950.
22. Brink N. G., Wolf D. E., Kaczka E. A., Rickes E. L., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1854, 1949.
23. Brink C., Hodgkin D. C., Lindsey J., Pickworth J., White J. G., *Nature*, **174**, 1169, 1954.
24. Brockman J. A., Pierce J. V., Stokstad E. L. R., Broquist H. P., Jukes T. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1042, 1950.
25. Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., Smith L. E., *Biochem. J.*, **59**, 82, 1955.
26. Brown F., Cuthberston W. F. J., Fogg G. E., *Nature*, **177**, 188, 1956.
27. Brown F. B., Smith L. E., *Biochem. J.*, **56**, XXXIV, 1954.

28. Buchanan J. G., Johnson A. W., Mills J. A., Todd A. R., *Chem. and Indust.*, 1950, 426.
29. Buchanan J. G., Johnson A. W., Mills J. A., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1950, 2845.
30. Burkholder P. R., *Science*, **114**, 459, 1951.
31. Cannon J. R., Johnson A. W., Todd A. R., *Nature*, **174**, 1168, 1954.
32. Cary C. A., Hartman A. M., Dryden L. P., Likely G. D., *Federation Proc.*, **5**, 128, 1946.
33. Chargaff E., Levine C., Green C., Kream J., *Experientia*, **6**, 229, 1950.
34. Christiansen J. B., Halpin J. G., Hart E. B., *Poultry Sci.*, **18**, 481, 1939.
35. Christiansen J. B., Deobald, H. J., Halpin J. G., Hart E. B., *Poultry Sci.*, **19**, 18, 1940.
36. Clark R. L., Jones W. H., Raich W. J., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3995, 1954.
37. Coates M. E., Ford J. E., *Biochem. Soc. Symposia No 13*, 36, 1955.
38. Coates M. E., Ford J. E., Harrison G. F., Kon S. K., Porter J. W. G., *Brit. J. Nutr.*, **7**, 319, 1953.
39. Coates M. E., Harrison G. F., Kon S. K., *Analyst*, **76**, 146, 1951.
40. Cohn R., Minot G. R., Alles G. A., Slater W. T., *J. Biol. Chem.* **77**, 325, 1928.
41. Cooley G., Davies M. T., Eillis B., Petrov V., Sturgeon B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **5**, 257, 1953.
42. Cooley G., Ellis B., Mamalis P., Petrov V., Sturgeon B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2**, 579, 1950.
43. Cooley G., Ellis B., Petrov V., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2**, 535, 1950.
44. Cooperman J. M., Tabenkin B., Drucker R., *J. Nutr.*, **46**, 467, 1952.
45. Coward K. H., Key K. M., Dyer F. J., Morgan B. G. E., *Biochem. J.*, **24**, 1952, 1930.
46. Coward K. H., Dyer F. J., Morton R. A., Gaddum J. H., *Biochem. J.*, **25**, 1102, 1931.
47. Cuthbertson W. F. J., Thornton D. M., *Brit. J. Nutrition*, **6**, 170, 1952.
48. Dakin H. D., West R., *J. Biol. Chem.*, **109**, 489, 1935.
49. Dakin H. D., Ungley C. C., West R., *J. Biol. Chem.*, **115**, 771, 1936.
50. Davis B. D., Mingioli E. S., *J. Bacteriol.*, **60**, 17, 1950.
51. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.*, **327**, 422, 1956.
52. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.*, **328**, 81, 1956.
53. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.*, **328**, 88, 1956.
54. Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.*, **328**, 96, 1956.
55. Diehl H., van der Haar R. W., Sealock R. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5312, 1950.
56. Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1108, 1952.
57. Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *Federation Proc.*, **11**, 269, 1952.
58. Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *Am. Chem. Soc.*, **76**, 948, 1954.
59. Dresel E. I. B., Falk J. E., *Nature*, **172**, 1185, 1953.
60. Ellis B., Petrov V., Snook G. F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1**, 60, 1949.
61. Ellis B., Petrov V., Snook G. F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1**, 735, 1949.
62. Ellis B., Petrov V., Snook G. F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1**, 950, 1949.

63. Emerson G. A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **70**, 392, 1949.
64. Emerson G. A., Brink N. G., Holley F. W., Koniuszy F., Heyl D., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **72**, 3084, 1950.
65. Emery W. B., Lees K., Tootill J. P. R., Analyst, **76**, 141, 1951.
66. Emery W. B., Parker L. F. J., Biochem. J., **40**, lv, 1946.
67. Ericson L. E., Lewis L., Ark. Kemi, **6**, 427, 1953.
68. Falk J. E., Dresel E. I. B., Rimington C., Nature, **172**, 292, 1953.
69. Fantes K. H., Page J. E., Parker L. F. J., Smith L. E., Proc. Roy. Soc. Ser. B, **136**, 592, 1949.
70. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., **56**, XXI, 1954.
71. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., Biochem. J., **59**, 79, 1955.
72. Fantes K. H., O'Callaghan C. H., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956; Biochem. J., **63**, 10P, 1956.
73. Ford J. E., Brit. J. Nutrition, **7**, 299, 1953.
74. Ford J. E., Holdsworth E. S., Biochem. J., **56**, 1954.
75. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Porter J. W. G., Nature, **171**, 149, 1953.
76. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Biochem. J., **58**, XXIV, 1954.
77. Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Biochem. J., **59**, 86, 1955.
78. Ford J. E., Hutner S. H., Vitamins and Hormones, **13**, 101, 1955.
79. Ford J. E., Kon S. K., Porter J. W. G., Biochem. J., **50**, IX, 1951.
80. Ford J. E., Kon S. K., Porter J. W. G., Biochem. J., **52**, VIII, 1952.
81. Ford J. E., Porter J. W. G., Biochem. J., **51**, V, 1952.
82. Ford J. E., Porter J. W. G., Brit. J. Nutr., **7**, 326, 1953.
83. Friedrich W., Bernhauer K., Angew. Chem., **65**, 627, 1953.
84. Friedrich W., Bernhauer K., Angew. Chem., **67**, 619, 1955.
85. Friedrich W., Bernhauer K., Angew. Chem., **68**, 439, 1956.
86. Friedrich W., Bernhauer K., Ztschr. Naturforsch., **9b**, 755, 1954.
87. Friedrich W., Bernhauer K., Ztschr. Naturforsch., **11b**, 68, 1956.
88. Friedrich W., Bernhauer K., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.
89. Friedrich W., Dellweg H., Gross G., Becher E., Spaude S., Bernhauer K., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.
90. Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., Mikrochimica Acta, 1956, 134.
91. Frost D. V., Lapidus M., Plaut K. A., Scherfling E., Fricke H. H., Science, **116**, 119, 1952.
92. Gant D. E., Smith L. E., Parker L. F. J., Biochem. J., **56**, XXXIV, 1954.
93. Hammond J. C., Bird H. R., Poultry Sci. **21**, 230, 1942.
94. Hammond J. C., Poultry Sci., **23**, 471, 1944.
95. Harrison G. F., Lees K. A., Wood F., Analyst, **76**, 696, 1951.
96. Hartley F., Stross P., Stuckey R. E., J. Pharm. Pharmacology, **2**, 648, 1950.
97. Heinrich H. C., Z. anal. Chem., **135**, 251, 1952.
98. Heinrich H. C., Lahann H., Ztschr. Naturforsch., **7b**, 417, 1952.
99. Heinrich H. C., Rädcl G., Sommer L., Ztschr. Vitamin—, Hormon— und Fermentforsch., **7**, 124, 1955.
100. Hodgkin C. D., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.

101. Hodgkin C. D., Pickworth J., Robertson J. H., Trueblood K. N., Prosen R. J., White J. G., *Nature*, **176**, 325, 1955.
102. Hodgkin D., Porter M. W., Spiller R. C., *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, **136**, 609, 1949.
103. Holdsworth E. S., *Nature*, **171**, 148, 1953.
104. Holliday E. R., Petrov V., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1**, 734, 1949.
105. Holly F. W., Shunk C. H., Peel E. W., Cahill J. J., Lavigne J. B., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4521, 1952.
106. Hutner S. H., Provasoli L., Stokstad E. L. R., Hoffmann C. E., Belt M., Franklin A. L., Jukes T. H., *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, **70**, 118, 1949.
107. Jackson W. G., Whitfield G. B., de Vries W. H., Nelson H. A., Evans J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 337, 1951.
108. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochem. Pol.*, **1**, 307, 1954.
109. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II*, **3**, 5, 1955.
110. Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochem. Pol.*, **2**, 329, 1955.
111. Janicki J., Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochem. Pol.*, **3**, 161, 1956.
112. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Zodrow K., *Przemysł Chem.*, **9**, 509, 1953.
113. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Zodrow K., *Przemysł Chem.*, **9**, 614, 1953.
114. Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Szebiotko K., Zodrow K., *Przemysł Chem.*, **9**, 385, 1953.
115. Kaczka E. A., Denewalter R. G., Holland A., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 335, 1951.
116. Kaczka E. A., Donald E. W., Kuehl F. A., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3569, 1951.
117. Kaczka E. A., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 6317, 1953.
118. Kaczka E. A., Wolf D. E., Kuehl F. A., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2952, 1949.
119. Kaczka E. A., Wolf D. E., Kuehl F. A., Folkers K., *Science*, **112**, 354, 1950.
120. Kon S. K., *Biochem. Symp*, No 13, 17, 1955.
121. Kuehl F. A., jr., Shunk C. H., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 251, 1955.
122. Laland P., Klem A., *Acta med. scand.*, **88**, 620, 1936.
123. Lambooy J. P., Haley E. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1087, 1952.
124. Lens J., Wijmenga H. G., Wolff R., Karlin R., Winkler K. C., De Haan P. G., *Biochem. Biophys. Acta*, **8**, 56, 1952.
125. Lewis U. J., Tappan D. V., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.*, **194**, 539, 1952.
126. Lewis U. J., Tappan D. V., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.*, **199**, 517, 1952.
127. Marsh M., Kuzel N. R., *Anal. Chem.*, **23**, 1773, 1951.
128. Mc Connel R. J., Overell B. G., Petrov V., Sturgeon B., *J. Pharm. Pharmacol*, **5**, 179, 1953.
129. Minot G. R., Murphy W. P., *J. Am. Med. Assoc.*, **87**, 470, 1926.
130. Neuberger A., Scott J. J., *Nature*, **172**, 1093, 1953.
131. Neujahr H. Y., *Acta Chem. Scand.*, **9**, 622, 1955.
132. Nichol C. A., Dietrich L. S., Cravens W. W., Elvehjem C. A., *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, **70**, 40, 1949.

133. Nichol C. A., Robblee A. R., Cravens W. W., Elvehjem C. A., J. Biol. Chem., **170**, 419, 1947.
134. Ott W. H., Rickes E. L., Wood T. R., J. Biol. Chem., **174**, 1047, 1948.
135. Pawelkiewicz J., Acta Biochim. Pol., **1**, 313, 1954.
136. Pawelkiewicz J., Acta Biochim. Pol., w druku. 1957.
137. Pawelkiewicz J., Nowakowska K., Acta Biochim. Pol., **2**, 259, 1955.
138. Pawelkiewicz J., Zodrow K., Acta Biochim. Pol., **3**, 225, 1956.
139. Pawelkiewicz J., Zodrow K., Acta Microbiol. Pol., w druku
140. Pawelkiewicz J., Zodrow K., Acta Microbiol. Pol., w druku
141. Pfeifer V. F., Vojnovich C., Heger E. N., Ind. Eng. Chem., **46**, 843, 1954.
142. Pffiffner J. J., Calkins D. G., Dion H. W., Federation Proc., **13**, 274, 1954.
143. Pffiffner J. J., Calkins D. G., Peterson R. C., Bird O. D., Mc Glohlon V., Stipek R. W., Abstr. pap. Am. Chem. Soc., 120 th Meeting, 22c, 1951.
144. Pierce J. V., Page A. C., Stokstad E. L. R., Jukes T. H., J. Am. Chem. Soc., **71**, 2952, 1949.
145. Rábek V. T., Sichova O., Stedra H., Biochem. Biophys. Acta, **19**, 191, 1956.
146. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, **107**, 396, 1948.
147. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, **108**, 134, 1948.
148. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., Science, **108**, 634, 1948.
149. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Bull. Torrey bot. Cl., **77**, 423, 1950.
150. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Bull. Torrey bot. Cl., **78**, 363, 1951.
151. Robbins W. J., Hervey A., Stebbins M. E., Nature, **170**, 845, 1952.
152. Robinson F. M., Miller I. M., Mc Pherson J. F., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **77**, 5192, 1955.
153. Ross G. I. M. Nature, **166**, 270, 1950.
154. Ross G. I. M., Hutner S. H., Bach M. K., I-sze Europejskie Sympozjum na temat witaminu B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.
155. Rubin M., Bird H. R., J. Biol. Chem., **163**, 387, 1946.
156. Rubin M., Bird H. R., J. Biol. Chem., **163**, 393, 1946.
157. Rudkin G. O., Taylor R. J., Anal. Chem., **24**, 1155, 1952.
158. Sahashi Y., Mikata M., Sakao H., Bull. Chem. Soc. Japan, **23**, 247, 1950. Chem. Abstr., **46**, 8210, 1952.
159. Schindler O., Reichstein T., Helv. Chim. Acta, **35**, 307, 1952.
160. Schmid K., Ebnöther A., Karrer P., Helv. Chim. Acta, **36**, 65, 1953.
161. Shemin D., Russell C. S., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4873, 1953.
162. Shive W., Ravel J. M., Eakin R. E., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2614, 1948.
163. Shorb M. S., J. Biol. Chem., **169**, 455, 1947.
164. Shorb M. S., Science, **107**, 397, 1948.
165. Shorb M. S., Briggs G. M., J. Biol. Chem., **176**, 1463, 1948.
166. Shunk C. H., Robinson F. M., Folkers K., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.
167. Sjöström A. G. M., Neujahr H. Y., Lundin H., Acta Chem. Scand., **7**, 1036, 1953.

168. Skeggs H. R., Nepple H. M., Valentik K. A., Huff J. W., Wright L. D., *J. Biol. Chem.*, **184**, 211, 1950.
169. Skeggs H. R., Huff J. W., Wright L. D., Bosshardt D. K., *J. Biol. Chem.*, **176**, 1459, 1948.
170. Smith L. E., Fantes K. H., Ball S., Ireland D. M., Waller J. G., Emery W. B., Anslow W. K., Walker A. D., *Biochem. J.*, **48**, 1, 1951.
171. Smith L. E., *Nature*, **162**, 144, 1948.
172. Smith L. E., *Nutrition Abstr. Rev.*, **20**, 795, 1951.
173. Smith L. E., *Biochem. J.*, **50**, XXXVI, 1952.
174. Smith L. E., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.
175. Smith L. E., Ball S., Ireland D. M., *Biochem. J.*, **52**, 395, 1952.
176. Smith L. E., Fantes K. H., Ball S., Waller J. G., Emery W. B., Anslow W. K., Walker A. D., *Biochem. J.*, **52**, 389, 1952.
177. Smith L. E., Parker L. F. J., *Biochem. J.*, **43**, VIII, 1948.
178. Soars M. H., Hendlin D., *J. Bacteriol.*, **62**, 15, 1951.
179. Spivey M. R., Briggs G. M., Ortiz L. O., *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.*, **85**, 451, 1954.
180. Stokstad E. L. R., Page A. C. jr., Pierce J., Franklin A. L., Jukes T. H., Heinle R. W., Epstein M., Welch A. D., *J. Lab. Clin. Med.*, **33**, 860, 1948.
181. Subbarow Y., Hastings A. B., Elkin N., *Vitamins and Hormones*, **3**, 237, 1945.
182. Subbarow Y., Jacobson B. M., Prochownik V., *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 2234, 1936.
183. Thompson H. T., Dietrich L. S., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.*, **184**, 175, 1950.
184. Veer W. L. C., Edelhausen J. H., Wijmenga H. G., Lens J., *Biochem. Biophys. Acta*, **6**, 225, 1950.
185. Weygand F., Wacker A., I-sze Europejskie Sympozjum na temat wit. B<sub>12</sub> i czynnika wewnętrznego, Hamburg, 1956.
186. Whiteson D., Hammond J. C., Titus H. W., Bird H. R., *Poultry Sci.*, **24**, 408, 1945.
187. Wijmenga H. G., Rozprawa doktorska, Uniwersytet w Utrechcie, 1951.
188. Wijmenga H. G., Hurenkamp B., *Chem. Weekbl.*, **47**, 217, 1951.
189. Williams W. L., Stiffey A. V., Jukes T. H., *Agricultural and Food Chemistry*, **4**, 364, 1956.
190. Wolf D. E., Jones W. H., Valiant J., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2820, 1950.
191. Yacowitz H., Miller R. F., Norris L. C., Heuser G. F., *Poultry Sci.*, **31**, 89, 1952.
192. Zodrow K., Pawełekiewicz J., Pat. Pol. 84431.



Tablica 1

## Charakterystyka naturalnych związków kobalaminowych

Kobalamina	Nazwa racjonalna	Postać	Maksyma absorpcji w m $\mu$	Elektroforeza bibułowa		Chromatografia bibułowa R <sub>f</sub>		Własności mikrobiologiczne					Aktywność kliniczna i biologiczna	
				pH 3	pH 6,5	(a)	(b)	<i>E. coli</i> (plyt.)	<i>E. coli</i> (prob.)	<i>L. leichm.</i>	<i>E. gracilis</i>	<i>Ochrob. maltophilia</i>		
1	2	3	4	5		6		7					8	
Wit. B <sub>12</sub>	5,6-dwumetylobenzimidazolo-CK	K	278, 361	O	O	0,25	0,30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Czynnik B	cyjanokobalamina (etiokobalamina)	B	276, 315, 355 500, 525-30	Z	O	0,50	0,45	+++	+	O	O	O	O	O
Czynnik A	2-metyloadenino-CK	K	280, 320, 361 520, 548	Z		0,13	0,12	+++	++	++	++	O	O	O
Pseudowit. B <sub>12</sub>	adenino-CK	K	278, 308, 320 361, 518, 548-550	Z		0,11	0,085	+++	+	++	+++	O	O	O
Czynnik C <sub>1</sub>		B (?)	jak czynnik B (?)	K	K	0,02	0,04	+++	+	+	+	O		
Czynnik C <sub>2</sub>		B (?)	jak czynnik B (?)	O (K?)	K	0,04	0,06	+++	+	+	+	O	O	O
Czynnik D								O	O	O	O	O	O	O
Czynnik E				O		0,35	0,40	+++	O	O		O		
Czynnik F		K		O		0,21	0,17	+++	++			+	(?)	
Czynnik G	hipoksantyno-CK	K	359, 516, 540	O				+++		++		O		
Czynnik H	2-metylohipoksantyno-CK	K	358,5, 517 540	O				+++	+	++		O		
Czynnik I Wit. B <sub>12</sub> III	5-hydroksybenzimidazolo-CK	K	295, 316, 518 550	O		0,13	0,14	+++	++	++	++	++	++	++
Czynnik J			353	Z	K			O						
Czynnik K			361	O	K			O						
Czynnik L				Z	K			O						
Czynnik M			361	O	K			O						

Oznaczenia:

3. K — krystaliczna B — bezpostaciowa
5. pH 3 0,5—2,0 N CH<sub>3</sub>COOH + 0,01% KCN  
pH 6,5 0,05 M bufor fosforanowy + 0,01% KCN  
Z — zasadowa, O — obojętna, K — kwaśna
6. (a) II-rz. butanol wysyc. wodą: 1% CH<sub>3</sub>COOH + 0,01% KCN  
(b) II-rz. butanol wysyc. wodą: 1% NH<sub>3</sub> + 0,01% KCN
7. +++ — aktywny jak wit. B<sub>12</sub>  
++ — aktywny ca. 50% w stosunku do wit. B<sub>12</sub>  
+ — aktywny ca. 15% w stosunku do wit. B<sub>12</sub>  
O — mniej aktywny niż 1% w stosunku do wit. B<sub>12</sub>

Tablica 2  
Biosynteza nukleotydcyjanokobalaminy

Prekursor	Mikroorganizm	Produkt biosyntezy	Uwagi	Literatura
5,6-dwumetylo-BIA*	P. shermanii E. coli 113-3 E. coli C. diphteriae	witamin B <sub>12</sub>		(135) (74), (76), (77), (8) (8), (51) (140)
Kwas 5,6-dwumetylo-BIA-karboksylowy-2	E. coli	witamin B <sub>12</sub>		(51)
Amid kw. 5,6-dwumetylo-BIA-karboksylowego-2	E. coli	witamin B <sub>12</sub>		(51)
5,6-dwuetylo-BIA	E. coli	5,6-dwuetylo-BIA-CK*		(8), (51)
5,6-dwuchloro-BIA	E. coli 113-3 E. coli Str. griseus	5,6-dwuchloro-BIA-CK	Czynna w anemii złośliwej i doświadczeniach biologicznych	(76), (77), (51) (51) (72)
5,6-dwunitro-BIA	P. shermanii C. diphteriae	5,6-dwunitro-BIA-CK		(137) (140)
5,6-imidazo-BIA	P. shermanii C. diphteriae	5,6-imidazo-BIA-CK		(137) (140)
5(6)-metylo-6(5)-nitro-BIA	P. shermanii	5(6)-metylo-6(5)-nitro-BIA-CK		(137)
2,3-naftimidazol	Str. griseus i inne promieniowce E. coli	2,3-naftimidazolo-CK	Czynna w anemii złośliwej i doświadczeniach biologicznych	(72) (54)
BIA	P. shermanii E. coli 113-3 E. coli Str. griseus	BIA-CK	Czynna w anemii złośliwej i doświadczeniach biologicznych	(137) (8), (76), (77) (8), (51) (71)
Kwas BIA-karboksylowy-2	E. coli	BIA-CK		(51), (53)
Amid kw. BIA-karboksylowego-2	E. coli	BIA-CK		(51)
5-metylo-BIA	P. shermanii E. coli 113-3 E. coli	5(6)-metylo-BIA-CK	Czynna w anemii złośliwej	(137) (8), (76), (77) (8), (51)
Amid kw. 5-metylo-BIA karboksylowego-2	E. coli	5(6)-metylo-BIA-CK		(51)
5-amino-BIA	E. coli 113-3 Str. griseus i inne promieniowce	5-amino-BIA-CK i małe ilości 5-hydroksy-BIA-CK	Nieczynna dla Ochromonas malhamensis	(8), (76), (77) (72)
5-nitro-BIA	P. shermanii E. coli 113-3 E. coli	5(6)-nitro-BIA-CK		(137) (76), (77) (51)
5-hydroksy-BIA	E. coli 113-3	5-hydroksy-BIA-CK (wit. B <sub>12</sub> II)		(152)
5-etoksy-BIA	P. shermanii	5(6)-etoksy-BIA-CK		(137)
Adenina	E. coli 113-3	adenino-CK		(74), (76), (77)
2-metyloadenina	E. coli 113-3	2-metyloadenino-CK		(76), (77)
2,6-dwuaminopuryna	E. coli 113-3	prawdopodobnie 2,6-dwuaminopuryno-CK		(76), (77)
2,6-dwuchloroadenina	E. coli 113-3	prawdopodobnie 2,8-dwuchloroadenino-CK		(76), (77)

\*) BIA — benzimidazol  
CK — cyjanokobalamina

HEINZ FRAENKEL-CONRAT

## Odbudowanie rozłożonego wirusa\*

### Streszczenie

Wirus mozaiki tytoniowej składa się z białka i kwasu nukleino-  
wego, które to części mogą być od siebie oddzielone za pomocą łagod-  
nych środków chemicznych. Gdy obydwie składniki zostaną zmieszane,  
powstają z powrotem zakaźne cząstki wirusa.

Kilka miesięcy temu wynikło wielkie poruszenie z powodu arty-  
kułów w prasie codziennej o „wytworzeniu życia w probówce” do-  
konanym w Laboratorium Wirusologicznym Uniwersytetu Kalifornijs-  
kiego. W rzeczywistości jednak, to o czym pracownia donosiła, było  
od samego początku jednocześnie i bardziej sprecyzowane i mniej ro-  
mantyczne. Zdajmy sobie jasno sprawę z zasięgu tych badań. Stwier-  
dzono, że jeżeli wirus mozaiki zostanie rozbity na części — białko  
i kwas nukleinowy — to w odpowiednich warunkach mogą się one  
z powrotem połączyć, tworząc cząstki, które wyglądają zupełnie tak  
jak wirus oryginalny, i posiadają także inne jego własności, mianowicie  
zdolność zakażenia komórek roślinnych (tytoniu), a także zdolność  
rozmnażania się w tych komórkach. Celem tych prac nie było „stwa-  
rzanie życia”, ale próba wyjaśnienia na drodze chemicznej budowy  
tworów biologicznie czynnych. Wyniki badań wirusologicznych mogą  
być pomocne w walce z chorobami wywoływanymi przez wirusy.  
Wszelkie wiadomości, jakie możemy zdobyć o chemicznej budowie  
tych tworów, znajdujących się w bezpiecznym kraju leżącym na pogra-  
niczu między tak zwanymi światami martwym i żywym, mogą pro-  
wadzić do lepszego zrozumienia ewolucyjnej drogi od zwykłych mo-  
lekuł do żywych organizmów.

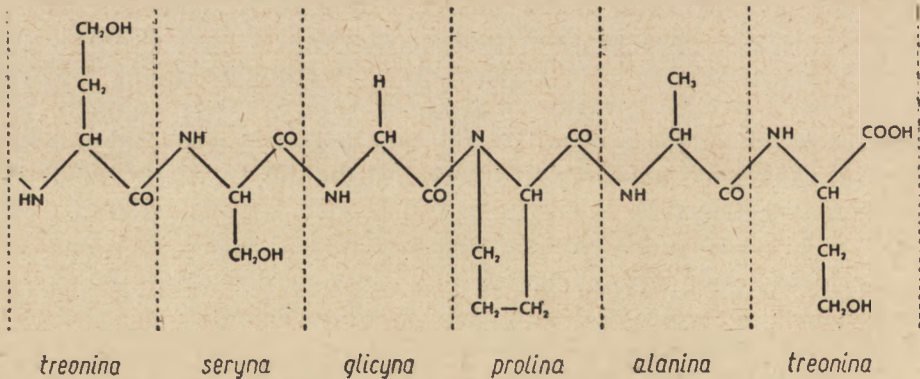
Już z chwilą, kiedy w roku 1935 Wendell M. Stanley, obec-

\* Tłumaczenie z „Scientific American”, 1956, 194, 42.

Przekład i publikacja z pozwoleniem autora artykułu a także redakcji „Scientific  
American”. Z angielskiego przełożył Tadeusz Korzybski.

nie dyrektor naszego laboratorium, pierwszy izolował wirusa mozaiki tytoniowej w postaci krystalicznej w Instytucie Rockefellera dla Badań Lekarskich, wirus ten znalazł się w centrum zainteresowania wirusologii ogólnej. Jego biologiczna aktywność była przedmiotem licznych badań. Badano go szczegółowo za pomocą mikroskopu elektronowego, a także poddawano analizie chemicznej. Badania te, wraz z badaniami przeprowadzonymi przez pracowników naszej pracowni dały następujący obraz. Wirus mozaiki tytoniowej (oznaczany zwykle przez badaczy w skrócie jako TMV) jest cząstką o kształcie pałeczki, o długości 300 milimikronów. Składa się on z dwóch części, z grubościennego cylindra złożonego z białka i pałeczkowatego rdzenia kwasu nukleinowego, znajdującego się wewnątrz cylindra białkowego. (ryc. 4 i 8) Białko stanowi 94% masy wirusa, kwas nukleinowy pozostałe 6%. Kwas nukleinowy jest typu rybozowego (RNA). Badania rentgenograficzne i chemiczne wskazują, że znajdująca się wewnątrz pałeczka kwasu nukleinowego prawdopodobnie nie jest lita, ale stanowi twór rurkowy złożony ze skręconych wzajemnie pasem.

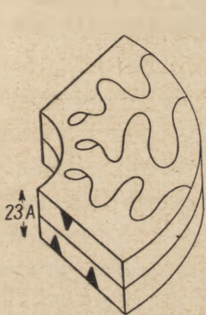
Za pomocą względnie łagodnych środków chemicznych można rozbić białko na podjednostki, z których każda jest pojedynczym łańcuchem peptydowym składającym się z około 150 reszt aminokwasowych. Podjednostka ta jest obecnie przedmiotem badań. Ustalono jej częściową budowę przedstawioną na ryc. 1. W tej formie białko jest zdenatu-



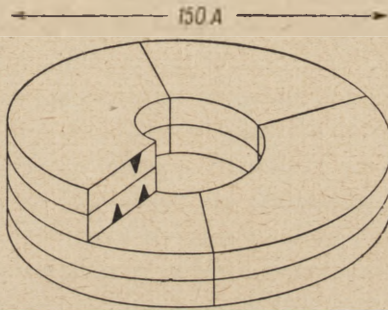
Rys. 1. Cząsteczka białka wirusa choroby mozaikowej tytoniu składa się z 5 czy 6 jednostek jednołańcuchowych. Jeden z końców każdego z łańcuchów tworzy pętlę (od aminowej strony łańcucha peptydowego, przyp. tłumacza); drugi koniec został zbadany chemicznie, ma on budowę przedstawioną na rycinie.

rowane, straciło swoją trwałą, uporządkowaną budowę, stało się nierozpuszczalne i niezdolne do ponownego połączenia się na pierwotny kompleks białkowo-nukleinowy.

Przy zastosowaniu bardziej delikatnych metod chemicznych można białko wirusa uwolnić od kwasu nukleinowego i uzyskać w stanie niezmienionym. Składa się ono wtedy, jak się zdaje, z 5 czy 6 jednostek jednołańcuchowych, które są związane ze sobą tworząc trwałą strukturę. Niezmienione białko wirusa mozaiki tytoniowej jest rozpuszczalne w wodzie i odznacza się wybitnie zaznaczoną tendencją do tworzenia wielkich agregatów cząsteczek. Ten rodzaj budowy jest zupełnie wyjątkowy. Dzięki specjalnym miejscom „autopowinowactwa” cząsteczki białka łączą się ze sobą bok do boku. Muszą one tworzyć struktury o kształcie wycinków koła (tortu), które następnie łączą się i tworzą stos o budowie spiralnej (ryc. 2, 3 i 4). Być może tworzą one supercząsteczkę o charakterystycznym kształcie pałeczki.



Rys. 2

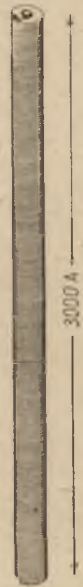


Rys. 3

Rys. 2. Zaopatrzone w pętle łańcuchy białka wirusa mozaiki można ułożyć w dwie warstwy; powstaje w ten sposób cząsteczka o wysokości 23 Å. Na jednym z boków schematycznej budowy umieszczono dwa czarne trójkąty, które mają oznaczać miejsca mające powinowactwo dla dopełniających miejsc drugiej cząsteczki.

Rys. 3. Najcieńszy krążek białka wirusowego mozaiki tytoniowej składa się z cząsteczek połączonych w postaci ślimacznicy za pomocą odpowiadających części na ich płaskich bokach. Średnica krążka wynosi 150 Å, średnica otworu około 50 Å

Rys. 4. Cała cząsteczka wirusa mozaiki tytoniowej jest ślimacnicą złożoną z białka z biegnącym pośrodku, wzdłuż cząstki pasmem kwasu nukleinowego. Ślimacznica składa się ze 130 dwuwarstwowych skrętów białka. Długość wynosi 3.000 Å.



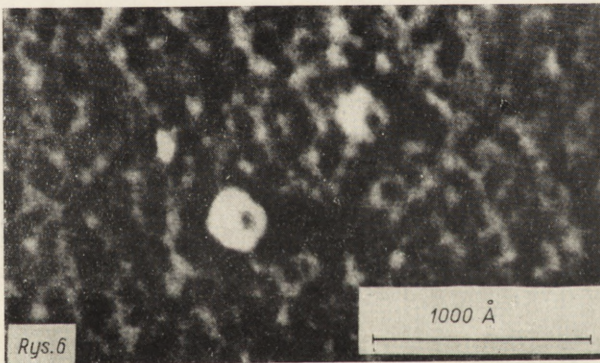
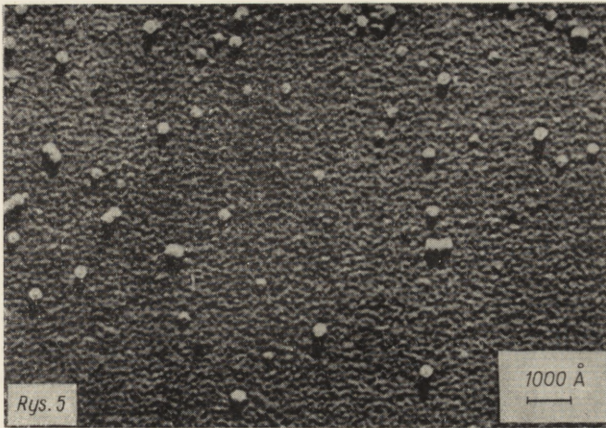
Rys. 4

Robley C. Williams wykonał w naszym laboratorium w mikroskopie elektronowym zdjęcia tego procesu w różnych stadiach. W słabo kwaśnym oddziaływaniu (pH około 6) białko występuje w postaci małych o jednakowej średnicy krążków z otworem pośrodku (ryc. 5 i 6). Gdy roztwór zostanie nieco zakwaszony (do około pH 5), zaczynają się pojawiać pałeczki, prawdopodobnie przez spiralne narastanie krążków. Pałeczki powiększają się do różnej długości; niektóre z nich wyglądem swym nie dają się odróżnić od pałeczki wirusa.

Sama pałeczka białkowa nie zachowuje się jak wirus — jest ona całkowicie niezakaźna. Jeżeli jednak w oddziaływaniu lekko kwaśnym (pH między 6 i 7) białko zostanie zmieszane ze świeżo przygotowanym kwasem nukleinowym, łączą się one na cząstki o wszystkich cechach właściwego wirusa. Są to pałeczki o takiej samej średnicy i długości, jak oryginalny wirus (ryc. 7). Roger Hart w naszym laboratorium wykazał jasno, że zrekonstruowane pałeczki mają taką samą budowę jak wirus: cylinder białkowy obejmuje ciekłą wewnętrzną pałeczkę kwasu nukleinowego (ryc. 8). Ponadto te zrekonstruowane pałeczki wywołują chorobę mozaikową tytoniu, jeżeli potraktuje się nimi liście rośliny.

Gdy doświadczenia te przeprowadzono po raz pierwszy, zarówno autor jak i jego koledzy mieli poważne wątpliwości, czy chorobowe zmiany w roślinie były wywołane przez wirusy, które zostały rzeczywiście na nowo wytworzone w mieszaninie reagującej. Było co prawda wiele powodów do sądzenia, że istotnie sprawa tak się przedstawiała. Po pierwsze, materiał stawał się zakaźny tylko wtedy, gdy w mieszaninie pokazywały się zrekonstruowane cząstki podobne do wirusa. Po drugie, aktywność pojawiała się tylko wtedy, gdy składniki działały na siebie w określonych koncentracjach (około 1% białka i 0,1% kwasu nukleinowego), w korzystnym pH i w przeciągu określonego okresu czasu. Po trzecie, jeżeli preparat kwasu nukleinowego nie był świeży, albo jeżeli przed wprowadzeniem do reagującej mieszaniny był on poddany destrukcyjnemu działaniu rybonukleazy, otrzymany materiał nie stawał się zakaźny. Mimo to istniała jeszcze możliwość, że roztwory były zanieczyszczone pozostałym czynnym wirusem, który w pierwszym stadium mógł uniknąć rozpadu na dwie składowe. Nie było wykluczone, że takie utajone wirusy, choć w rozłożonej próbce nie wykazywały aktywności, w jakiś sposób mogły się przecież stać bardziej agresywne podczas inkubacji mieszaniny reagującej.

Wirusy mogą się oczywiście rozmnażać tylko w żywej komórce. Jedynym sposobem uzyskania odpowiedzi na pytanie, do jakiego stopnia pozostałe, nierozłożone wirusy mogły być odpowiedzialne za zakaźność mieszaniny, byłoby dokładne oznaczenie ilości przeżywających wirusów. Wyniki takich badań wskazują, że oddzielone białko zawiera nierozłożony wirus w ilości nie większej, niż jeden na milion, a oddzielony kwas nukleinowy nie więcej niż 30 części na milion. Czy taki stopień zanieczyszczenia można zbagatelizować, jako nie mający praktycznego znaczenia, zależy jednoznacznie od odpowiedzi na następne, dalsze pytanie czy ilość ta może tłumaczyć powstałą aktywność zakaźną mieszaniny? Odpowiedź brzmi: stopień zakaźności był



Rys. 5. i 6. Zdjęcia w mikroskopie elektronowym (wykonane przez Róbley'a C. Williamsa w Uniwersytecie Kalifornijskim) pokazują krążki białka mozaiki znalezione w roztworze wirusów, które zostały rozbite na drodze chemicznej. Pośrodku krążków widoczny otwór.



Rys. 7. Zdjęcia zrekonstruowanych cząstek wirusa (wykonane przez Robley'a C. Williamsa). Białko i kwas nukleinowy zostały rozdzielone, następnie pozwolono im połączyć się z powrotem. Dłuższe pałeczki są charakterystyczne dla cząstek pierwotnych.



Rys. 8. Cząsteczki wirusa rozbitego. Mikrofotografia Rogera Hart'a z Uniwersytetu Kalifornijskiego. Cząsteczki zostały rozbite działaniem detergentu. Cienkie nitki wydobywające się z niektórych pałeczek są kwasem nukleinowym.



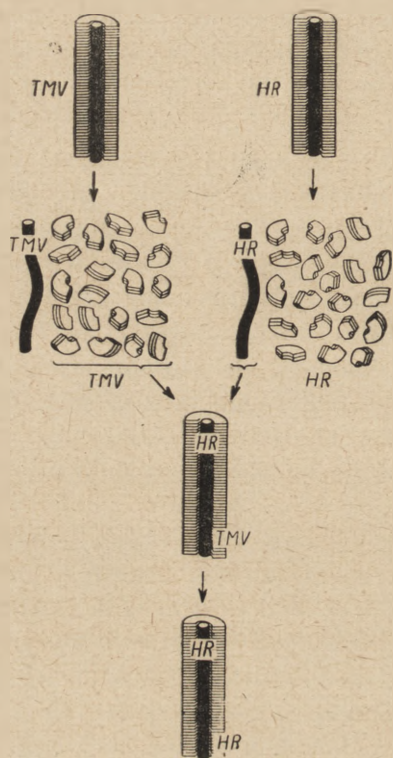
niekiedy nawet 100.000 razy większy od tego, jaki mógłby wynikać z ewentualnej obecności nierozłożonego wirusa. Wydaje się więc, iż przypuszczenie, że istotnie powstał nowy, chorobotwórczy wirus przez ponowne połączenie się rozdzielonych składników — jest rzeczą mienioną.

Wniosek ten został ostatnio potwierdzony na drodze biologicznej, przy czym uzyskany dowód wydaje się być absolutnym. Dowód ten jest wynikiem doświadczeń nad łączeniem składników pochodzących z odmiennych szczepów wirusa mozaiki.

Jedną z najbardziej istotnych cech żywej materii jest zdolność do mutowania. Gdy wirusy rozmnażają się w komórce gospodarza, one także wykazują tę własność: powstają mutanty wirusa, które albo mogą atakować innych gospodarzy, albo wytwarzają objawy chorobowe odmienne niż pierwotnie. Poznano wiele mutantów wirusa mozaiki tytoniowej. Niektóre z nich są bardzo podobne do zwykłego szczepu. Inne różnią się tak bardzo, że muszą być wynikiem całego szeregu mutacji. Okazało się, że wszystkie znane odmiany mutacyjne wirusa mozaiki tytoniowej mają ten sam kształt i wielkość, stwierdzono tylko różnice w ich składzie chemicznym. Te, dające się stwierdzić odchylenia odnoszą się do składowej białkowej wirusa. Niektóre mutanty zawierają nieco większe, lub nieco mniejsze ilości jednego, czy dwóch aminokwasów w porównaniu ze zwykłym szczepem wirusa mozaiki. Inne różnią się od niego znacznie. Jeden na przykład ze szczepów, oznaczony literami HR, ma inne stosunki ilościowe odnośnie prawie wszystkich aminokwasów, a ponadto zawiera dwa rodzaje aminokwasów, których nie stwierdzono w zwykłym wirusie mozaiki (por. C. A. Knight i Dean Fraser: Mutacja wirusów. „Scientific American“, lipiec 1955). Mutanty te z pewnością różnią się także swym kwasem nukleinowym, różnic tych jednak nie udało się narazie stwierdzić na drodze analizy chemicznej.

Różne szczepy wirusa udało się rozdzielić na ich składniki — białko i kwas nukleinowy, a następnie związać je z powrotem, ale na krzyż, tworząc „hybrydy” wirusowe. W każdym wypadku „hybryd” taki wytworzył w testowej roślinie zawsze tylko takie objawy chorobowe, które są charakterystyczne dla tego z pierwotnych wirusów, który dostarczył swego kwasu nukleinowego. Okazało się, że bez względu na różnice w ich części białkowej, hybrydowe preparaty wirusa wywoływały zawsze tę samą chorobę, ale pod warunkiem, że zawierały ten sam kwas nukleinowy. W ten sposób niedwuznacznie udowodniono to, co badacze od dawna przypuszczali, mianowicie, że kwas nukleinowy jest głównym nośnikiem informacji genetycznej przenoszonej

z rodziców na potomstwo. Wiele pięknych prac wykonanych w licznych pracowniach wykazywało, że kwas dezoksyrybonukleinowy odgrywa taką właśnie rolę w wirusach bakteryjnych; doświadczenia z wirusem mozaiki tytoniowej po raz pierwszy pokazały bezpośrednio, że również i kwas rybonukleinowy może być głównym nośnikiem informacji genetycznej.



Rys. 9. Dwa szczepy wirusa (skrócone przekroje górnego szeregu) zostały rozbite (drugi szereg); pozwolono białku jednego szczepu na połączenie się z kwasem nukleinowym drugiego (trzeci szereg). Potomstwo tego hybrydu (czwarty szereg) zawierało białko, które pierwotnie występowało z jego kwasem nukleinowym.

Dalsze badania z tej serii doświadczeń dostarczyły przekonującego dowodu, że ponowne połączenie białka z kwasem nukleinowym prowadziło istotnie do powstania aktywnych cząstek wirusa. Ten dowód uzyskano na drodze immunologicznej. Gdy zwierzęciu wstrzykuje się obce białko, zwykle powstają w nim przeciwciała skierowane przeciw tej substancji. W ten sposób wstrzyknięcie wirusa choroby mozaikowej tytoniu królikowi stanowi u niego podjęcie do tworzenia przeciwciał, mogących w sposób wybiórczy zobojętniać białko wirusowe. Jeżeli wstrzykniemy na przykład zwykły szczep wirusa — TMV, wytworzone przeciwciała są specyficznie skierowane w stosunku do tego białka. Jeżeli wstrzykniemy szczep HR, to powstałe przeciwciała są odmienne, reagują z białkiem HR, w stosunku zaś do zwykłego wirusa TMV są o wiele mniej aktywne.

Wyobraźmy sobie następnie (ryc. 9), że bierzemy pewną ilość wirusa HR, rozbijamy go na części składowe — białkową i nukleinową — a następnie

mieszamy kwas nukleinowy HR z białkiem TMV (zwykłej mozaiki). W mieszaninie tej powstaną cząstki hybrydowe z rdzeniem złożonym z kwasu nukleinowego HR i otoczką złożoną z białka TMV. Następnie dodajemy przeciwciała skierowane przeciw wirusowi HR, po czym wprowadzamy materiał do rośliny tytoniu. Jeżeli preparatem tym uda nam się zakazić roślinę, będzie to oznaczać, że zakażenie jest

wynikiem nowowytworzonych cząstek, ponieważ te cząstki pierwotnego wirusa HR, które mogły przeżyć, nie ulegając działaniu chemicznemu i które mogły ciągle pozostawać jeszcze w preparacie w stanie utajonym, byłyby zobojętnione przez przeciwciała HR. Następnie możemy wykonać dalszą kontrolę przez dodatek przeciwciała skierowanego przeciwko zwykłemu wirusowi TMV. Jeżeli zapobiegnie ono powstaniu infekcyjnych własności roztworu, będziemy mieć ostateczny dowód, że zakaźność tę należy odnieść do nowowytworzonych hybrydów wirusowych o rdzeniu HR i otoczce TMV.

Doświadczenia takie w istocie wykonano. Dały one niedwuznaczną odpowiedź. Immunologiczne próby wykazały, że zakaźne cząstki rzeczywiście mają otoczki TMV. Z drugiej jednak strony powodują one powstanie w roślinie objawów chorobowych charakterystycznych dla HR, co wskazuje na to, że cząstki te mają rdzeń z kwasu nukleinowego HR.

Następne podniecająco ciekawe pytanie brzmi: jaki rodzaj cząstek hybrydy te wytworzą, gdy będą się rozmnażać w komórce rośliny? Innymi słowy, jak będzie wyglądało potomstwo hybrydowych wirusów? Mamy już w tym względzie poważną wskazówkę; komórki rośliny opanowane przez rozprzestrzeniający się wirus wykazują objawy charakterystyczne dla HR. Analiza chemiczna tych potomków wskazuje, że ich otoczka białkowa jest istotnie rodzaju HR. Białko to zawiera histydynę i metioninę, dwa aminokwasy, które znajdują się w wirusach HR, brak ich natomiast w zwykłym wirusie TMV. Dowodzi to, że zwykły kwas nukleinowy odgrywa dominującą rolę w determinowaniu własności potomstwa, dostarczając planu (schematu), według którego otrzymują one otoczki HR, ściśle dopasowane do ich nukleinowego jądra HR.

Coprawda istnieją, zdaje się, pewne drobne ilościowe różnice między białkiem potomstwa i białkiem pierwotnego wirusa HR. Nasuwa to przypuszczenie, że białko TMV również bierze pewien udział w genetycznym planowaniu, prowadząc do pewnych modyfikacji w białkowej otoczce potomstwa. Jeżeli tak, to mielibyśmy tu do czynienia ze sztucznie wytworzoną mutacją. Możliwość ta wskazuje na ewentualną metodę wytwarzania nowych szczepów wirusów. Otwiera to zachęcające widoki na stwarzanie „dokrawanych na zamówienie” hybrydowych wirusów, które mogłyby służyć jako szczepionki na choroby wirusowe. Są to jednak jedynie spekulacje, ponieważ przedtem należałoby jeszcze wykonać wiele badań dla wyjaśnienia zmian zachodzących w hybrydowych wirusach.

To jednak, co z pewnością możemy wnioskować, możnaby sformułować tak: prace nad wirusami mozaiki odkryły nowe chemiczne podejście do badań nad chorobami wirusowymi, nad strukturą biologicznie czynnej materii i nad mechanizmem dziedziczenia.

WITOLD DRABIKOWSKI

## Nowoodkryte nukleotydy polifosforanowe i ich rola w organizmie

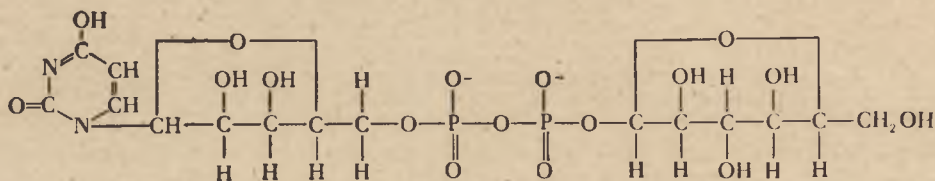
Do lat ostatnich z wolnych nukleotydów występujących w organizmach żywych wiedziano tylko o nukleotydach adenilowych. Rola adenozynepolifosforanów jako uniwersalnych przenośników energii jest powszechnie znana. W związkach tego typu adenozyne jest zestyfikowana kwasem fosforowym przy piątym węglu rybozy. Tymczasem mononukleotydy zarówno adenilowe, jak i pochodne innych zasad otrzymane przez hydrolizę kwasów nukleinowych posiadają głównie rybczę zestyfikowaną przy węglu 2 (lub 3). Innych wolnych mononukleotydów, poza adenilowymi nie znano i wszystko zdawało się wskazywać na to, że adenina, jako jedyna z zasad purynowych i pirymidynowych, będącymi składnikami kwasów nukleinowych zajmuje wyjątkowe stanowisko w przyrodzie.

W roku 1949 Park (105) wykrył w bakteriach *Staphylococcus aureus* związki, będące pochodnymi kwasu urydylo-5-dwufosforowego, a w roku 1950 Leloir i współpracownicy wykryli w drożdżach urydyno-5-dwufosfoglukozę. Początkowo wydawało się, że związki te występują w niewielu przedstawicielach świata żywego, a rola ich ogranicza się do wąskich i specjalnych zadań. Tymczasem badania lat późniejszych, szczególnie prowadzone od roku 1953-go przez pracownie Leloira, Kalckara, Pottera a ostatnio Ochoa i innych przyniosły ogromną ilość danych dotyczących omawianych tu związków, wykazały ich powszechne występowanie oraz wniosły wiele faktów do zrozumienia ich biogenezy i roli w organizmach.

Trzeba zaznaczyć, że tak imponujące wyniki nie zostałyby na pewno osiągnięte, gdyby nie użycie nowoczesnych metod rozdzielania i wyodrębnienia substancji. Wymieniacze jonowe, chromatografia i elektroforeza bibułowa znalazły tu bardzo szerokie zastosowanie. Również użycie w tym przypadku odkrytych w ostatnich latach specyficznych enzymów, takich jak np. 5-nukleotydaza z jadu węzów, w znacznym stopniu przyczyniło się do ustalenia budowy tych związków.

## Budowa i występowanie

Leloir i współpracownicy badając mechanizm zamiany galaktozy w glukozę u drożdży *Saccharomyces fragilis* adaptowanych na galaktozę stwierdzili, że koenzym odpowiedzialny za tę przemianę zawiera w swym składzie glukozę i labilny fosforan. W toku dalszych prac (21, 23, 79) wyizolowano powyższy koenzym oraz oznaczono jego budowę. Okazał się on być połączeniem nukleotydu urydylowego z fosfoglukozą czyli urydyno-5-dwufosfoglukozą (UDPG) (Rys nr 1).



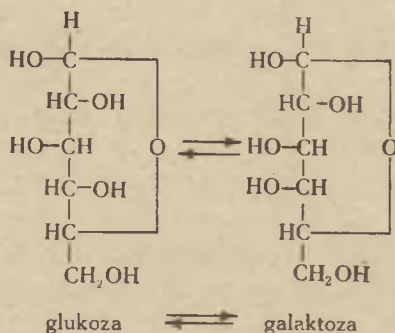
urydynodwufosfoglukoza (UDPG)

Rys. 1. Urydynodwufosfoglukoza

Stwierdzono, że substancja ta występuje również w drożdżach nie adaptowanych na galaktozę oraz w wielu tkankach zwierzęcych, chociaż w o wiele niższym stężeniu. W drożdżach, szczególnie po inkubacji z toluenem ilość tego związku wzrastała i wynosiła maksymalnie do  $2,5 \mu\text{M}$  na 1 g świeżej masy. W tkankach zwierzęcych znaleziono go w ilościach  $0,1\text{--}0,3 \mu\text{M}$  na 1 g. Zidentyfikowano jako składniki tego związku: uracyl — przez absorpcję w ultrafiolecie, oraz cukry kolorymetrycznie i chromatograficznie. UDPG po łagodnej hydrolizie (5 min.  $0,01 \text{ N}$  kwasem w  $100^\circ$ ) uwalniał glukozę, dając kwas urydyno-5-dwufosforowy (UDP). Dalsza hydroliza (15 min.  $1 \text{ N}$  kwasem w  $100^\circ$ ) uwalniała 1 mol fosforanu. Pozostałość zidentyfikowano jako kw. urydyno-5-fosforowy (UDP). Obecność wiązania pyrofosforanowego stwierdzono drogą miareczkowania elektrometrycznego. Położenie grupy fosforanowej przy węglu 5 rybozy udowodniono na podstawie metody Klímka i Parnasa (68, 69) za pomocą powstawania kompleksów z miedzią, badania kompleksów boranowych oraz działania nadjodanu. Ciekawe było działanie alkali. UDPG pod ich wpływem rozpada się na dwie substancje — UMP i fosfoglukozę, różną jednak od znanych estrów glukozy. Po dłuższym działaniu alkali daje ona mieszaninę 1- i 2-fosfoglukozy. W toku dalszych badań (104) substancja ta okazała się glukozą podwójnie zestryfikowaną jedną resztą fosforanową przy węglu pierwszym i drugim.

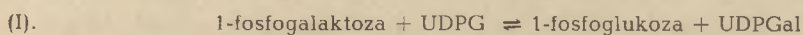
Enzymy z drożdży są zdolne zamieniać galaktozę w glukozę i odwrotnie. Okazało się, że UDPG jest koenzymem galaktowaldenazy, to jest enzymem wywołującym przekształcenia Waldena przy węglu czwartym glukozy (78, 79) (Rys. nr 2).

Znane ze stereochemii przekształcenia Waldena polega na zmianie konfiguracji przestrzennej cząsteczki w czasie cyklu reakcji chemicznych. W tym przypadku mechanizm inwersji przy C<sub>4</sub> heksozy jest do dziś dnia niewyjaśniony, w każdym razie nie stwierdzono w trakcie reakcji przejściowego rozpadu na triozy. Omawiana inwersja jest zupełnie nowym typem reakcji enzymatycznej i nie stosuje się do żadnego ze znanych mechanizmów chemicznych.

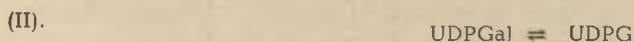


Rys. 2. Glukoza  $\rightleftharpoons$  galaktoza

Leloir założył (78, 79), że powyższa reakcja inwersji składa się z dwu etapów:



(UDPGal — oznacza urydnono-5-dwufosfogalaktozę)



Reakcja II katalizowana przez galaktowaldenazę została przez Leloir udowodniona. UDPG inkubowana z preparatem enzymatycznym z drożdży daje w rezultacie mieszaninę 75% UDPG i 25% UDPGal będących ze sobą w stanie równowagi (80). (Taki stosunek UDPG do UDPGal pozostających w równowadze potwierdzili później Hansen i Craine (44) badając ekstrakty z *Lactobacillus helveticus*). Enzymu odpowiedzialnego za reakcję I Leloir jednak nie wyodrębnił. Istnienie jego potwierdziły dopiero późniejsze badania Kalckara (58, 95).

Jak już wspomniano, w roku 1949 Park (105, 106) stwierdził, że jeżeli do rozwijającej się kultury *Staphylococcus aureus* dodać penicyliny w stężeniu nieco większym od stężenia hamującego podział, to w ciągu następnych 3/4—1 godziny następuje silny wzrost zawartości labilnego fosforu. Zawartość labilnego fosforu wzrastała z 0,1  $\mu\text{M}$  do 5—8  $\mu\text{M}$  na 1 g masy bakteryjnej. Dalsze prace Parka (107, 108) zmierzają do wyjaśnienia pochodzenia tego labilnego fosforu. Frakcjonowanie soli barowych alkoholem i dalszy rozdział na wymienniczkach jono-

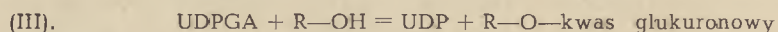
wych oraz na drodze chromatograficznej wykazał istnienie trzech połączeń. Wszystkie one zawierały kwas urydyno-5-dwufosforowy i komponentę cukrową, którą była N-acetylo-2-aminoheksoza. Nie była to ani glukozamina, ani galaktozamina, gdyż posiadała jeszcze grupę karboksylową. Najprostszy ze zbadanych związków był połączeniem kwasu urydynodwufosforowego z tym aminocukrem, o budowie analogicznej do budowy UDPG. Dwa dalsze związki zawierały albo alaninę, albo peptyd składający się z trzech cząsteczek alaniny, jednej cząsteczki lizyny i jednej kwasu glutaminowego. Aminokwasy łączą się prawdopodobnie z aminocukrem poprzez jego grupę karboksylową. Park stwierdził, że w normalnej kulturze *S. aureus* związki te występują również, aczkolwiek w o wiele mniejszym stężeniu.

Jak wspomniano, odkrycie UDPG i nukleotydów Parka nie wskazywało na to, że najbliższy okres pozwoli na znalezienie innych podobnych związków.

Już jednak w roku 1952 Paladini i Leloir (104) donieśli o obecności w oczyszczonych preparatach UDPG innego związku, zidentyfikowanego następnie (20) jako urydyno-5-dwufosfo-N-acetyloglukozaminę (UDPAG). Był więc to związek podobny do nukleotydów Parka, różniący się jednak brakiem grupy karboksylowej w reszcie cukrowej. Ostatnio Videla (145) wyizolował również urydynodwufosfo-N-acetylogalaktozaminę (UDPAGal).

Istnienie tego związku potwierdził Pontis (110) izolując z wątroby mieszaninę UDPAG i UDPAGal. W mieszaninie tej około 30% stanowiło UDPAGal.

W roku 1953 Dutton i Storey (29) donieśli o otrzymaniu z wątroby połączenia UDP z kwasem uronowym. Inkubacja tej substancji w obecności homogenatów wątroby z o-aminofenolem lub (—) mentolem prowadziła do powstania stechiometrycznej ilości glukuronidów. Dalsze badania tych autorów (30, 133) doprowadziły do wyizolowania z 2,5 kg wątroby 8 mg tego związku i zbadania jego budowy. Był to kwas urydyno-5-dwufosfoglukuronowy (UDPGA). Hydroliza jego przez 15 min. 1 N kwasem w 100° dawała UMP, fosforan nieorganiczny i kwas uronowy, zidentyfikowany jako kwas glukuronowy. Hydroliza 7-io minutowa w I, 1 N kwasie dawała UDP i kwas 1-fosfoglukuronowy. Synteza glukuronidów z kwasu urydynodwufosfoglukuronowego i akceptora (fenolu) zachodziła w obecności zawiesiny z wątroby, wg. reakcji:



W reakcjach z fenolami i alkoholami powstaje między nimi a kwasem glukuronowym wiązanie glukozylowe. Ostatnio Dutton (31)



doniósł, że UDPGA reaguje również z niektórymi kwasami karboksylowymi (np. z kw. antranilowym, dając glukuronidy posiadające wiązania acetalowe. Z kwasem urydynodwufosfoglukuronowym reaguje bardzo duża ilość związków: fenoltaleina, tyroksyna, niektóre kortykosteroidy i inne. W najnowszej swej pracy (32) Dutton podaje, że UDPGA działa jako donor glukuronylowy dla bardzo szerokiego zasięgu aglikonów, takich jak niektóre alifatyczne alkohole i kwasy tłuszczowe. Wydaje się, że jedynym warunkiem strukturalnym jest obecność grupy OH. Tak więc w reakcji III-ej symbol akceptora: R-OH nie oznaczałby wyłącznie fenoli, a ogólnie związek posiadający grupę hydroksylową.

Wszystkie powyżej omawiane związki UDPG, UDPGal, UDPAG, UDPAGal, UDPGA, były połączeniami urydynodwufosforanu z glukozylem. Dowód na istnienie kwasu urydynotrójfosforowego — analoga ATP dał już w r. 1951 Kornberg (71). Wykazał on, że UDP inkubowany w obecności fosfokinazy pirogronianowej pobiera od fosfopirogronianu jeden mol fosforanu.

Cohn i Carter (26) publikując w r. 1950 metodę rozdzielenia mononukleotydów na wymienniczkach jonowych sygnalizowali istnienie jakichś innych, niż dotychczas znane nukleotydów. Stosując ich metodę wykryto w roku 1953 niezależnie od siebie w dwu pracowniach obecność w ustrojach kwasu urydino-5-trójfosforowego (UTP). Lipton i wsp. (91) wydzielili go z drożdży. Bergkvist i Deutsch (12) rozdzielali frakcję nukleotydową wyciągu kwasu trójchlorooctowego z mięśni. 2—4% tej frakcji lub handlowych preparatów ATP stanowiły UTP oraz trzeci analog ATP — kwas guanozyno-5-trójfosforowy (GTP). Autorzy po zmodyfikowaniu met. Cohna i Cartera oraz zastosowaniu chromatografii bibułowej izolowali oba polifosforany i oznaczyli ich skład i budowę. Badano powstawanie kompleksów z miedzią i boranami, działanie nadjodanu i 5-nukleotydazy z jadu węzów. Przeprowadzono dezaminację GTP do ksantynotrójfosforanu (XTP), który również zidentyfikowano. Obok GTP stwierdzono występowanie niewielkich ilości kwasu cytydino-5-trójfosforowego (CTP).

Smith i Mills (129) badając frakcję nukleotydową wątroby świnki morskiej potwierdzili występowanie tam UDPG, UDPAG, UDPGA oraz UMP, UDP, i UTP. W gruczołach mlecznych ssaków pierwsi Rutter i Hansen (117) wykazali obecność UDPG. Smith i Mills (130) frakcjonując wyciągi z gruczołów mlecznych znaleźli prócz nukleotydów adenilowych UDPG, UDPGal, UMP, UDP, UTP, GMP, GDP i CMP. Wyniki te potwierdził Manson (92) stwierdzając, że szczególnie wysokie jest w gruczołach mlecznych stężenie glukozylowych

pochodnych UDP. Tak np. w gruczole mlecznym kozy UDPAG znajdowało się w ilości 25  $\mu\text{M}$  na 100 g, a UDPG w ilości 40  $\mu\text{M}$  na 100 g tkanki.

Cabib i Leloir (19) zbadali dokładnie wykryte uprzednio (79) połączenie guanozynodwufosforanu z mannozą. Badania pozwoliły stwierdzić, że budowa tego nukleotydu jest analogiczna do budowy UDPG. Jest to więc guanozyno-5-dwufosfomannoza (GDPM).

Obecność takiego związku sygnalizował również Buchanan (18), który w produktach otrzymanych w wyniku bardzo krótko trwającej fotosyntezy w obecności  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  znalazł w radioaktywnych produktach reakcji związek zawierający w swym składzie guaninę i mannozę. Obok tego Buchanan stwierdził obecność połączeń UDP, z piętnowanymi heksozami takich jak UDPG i UDPGal. Strominger (135) badając kwasorozpuszczalną frakcję jajowodów kury znalazł tam również GDP i GDPM. Oprócz tego wykrył tam kilka połączeń UDP z N-acetyloaminocukrem. Jedno z nich zidentyfikował jako UDPAG. Połączenia UDP z acetyloaminocukrami wykrył Strominger także u *Lactobacillus helveticus*, gdzie ilość ich ulegała zwiększeniu pod wpływem penicyliny. Te wszystkie związki były więc analogami nukleotydów Parka.

W dalszej pracy nad nukleotydami zawartymi w jajowodach nośnych kur Strominger (140) potwierdził istnienie wykrytej przez Videla (145) urydynodwufosfoacetylalaktosaminy (UDPAGal), oraz stwierdził, że i w jajowodach znajduje się ona w równowadze z UDPAG. Prócz tego udało się mu zidentyfikować dwa dalsze połączenia z N-acetyloaminocukrem. Jednym z nich był fosforan urydynodwufosfoacetylglukozaminy, drugim siarczan urydynodwufosfoacetylalaktosaminy. Wydaje się, że dodatkowy mol fosforanu i siarczanu znajduje się w pozycji 6 aminocukru.

Kwas inozynowy (IMP) znany jest od czasów Liebiga. Jednak jego pochodne polifosforanowe przez długi okres czasu nie były znane. W roku 1942 Kleinzeller (67) otrzymał kwas inozyno-5-trójfosforowy (ITP) na drodze dezaminacji ATP. Dopiero jednak w roku 1953 możliwość istnienia ITP w organizmach żywych wykazali na drodze enzymatycznej Berg i Joklik (10). Inozynopolifosforany znaleziono ostatnio w mięśniach królika (77) oraz w szeregu innych narządów.

Pracownia Pottera (51), stosując zmodyfikowaną przez siebie metodę Cohna i Cartera rozdziału nukleotydów na Dowex'ie badała występowanie powyżej omówionych związków w wielu rodzajach tkanek. Wykazano obecność wszystkich znanych gluko-

zyłowych pochodnych GDP oraz wszystkich polifosforanowych analogów ATP. Tak np. w wątrobie stwierdzono występowanie m. in. cytydino-mono-, dwu- i trójfosforanów. Badano również zawartość nukleotydów w mózgu i mięśniach. W tych ostatnich charakterystyczny jest brak glukozyłowych pochodnych UDP. Schmitz (124, 125) badał występowanie nukleotydów w różnego rodzaju tkankach nowotworowych jak *Flexner-Jobling carcinoma*, *Walker carcinoma*, *Ascitestumor* oraz w drożdżach (126). W poszczególnych rodzajach tkanek rakałowych można było wykryć charakterystyczne różnice w zawartości poszczególnych nukleotydów, w zależności od rodzaju nowotworu. Włączanie się nieorganicznego piętnowanego fosforanu w izolowane mitochondrie wątroby badał Beyer (15). Stwierdził on szybkie pojawianie się  $^{32}\text{P}$  w izolowanych mononukleotydach polifosforanowych. Izolowaniem GTP i GDP z drożdży zajmowali się Ayengar i wsp. (3).

Doniesiono również o występowaniu omawianych nukleozydopolifosforanów oraz glukozyłowych pochodnych UDP i GDP w różnych bakteriach jak *Lactobacillus arabinosus* (4), *Lactobacillus helveticus* (117), streptokokki grupy A (28) oraz w pleśniach: *Penicillium chrysogenum* (5, 6).

Trzeba wspomnieć, że budowa powyżej omówionych związków uzyskała potwierdzenie przez porównanie z syntetycznie otrzymanymi nukleotydami. W pracowni Todda, badacza szczególnie zasłużonego na polu syntezy nukleotydów, otrzymano już wcześniej UMP (96), UDP (2, 63), a ostatnio UTP (43, 65), UGPG (64) i GMP (25).

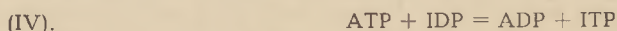
Na zakończenie przeglądu nowoodkrytych nukleotydów należy omówić nowe polifosforany adenozyne. Już w r. 1953 Goldwasser (36) badając włączenie się znaczonej adeniny w nukleotydy stwierdziła występowanie jakiegoś nowego nukleotydu adenilowego. Sacks i wsp. (120) rozdzielając nukleotydy wątroby i mięśni znaleźli jakies pochodne polifosforanowe adenozyne o większej niż w ATP ilości labilnego fosforu. Również i Schmitz (126) rozdzielając nukleotydy z drożdży zaobserwował obecność innych niezidentyfikowanych pochodnych adenozyne. Dopiero Marrian (93, 94) rozdzielając na Dowex'ie handlowe preparaty ATP stwierdził występowanie w nich nowego nukleadenozyny. Dopiero Marrian (93, 94) rozdzielając na Dowex'ie handlowe preparaty ATP stwierdził występowanie w nich nowego nukleotydu, którego zawartość wynosiła do 1/3 zawartości ATP. Analiza wykazała, że jest to adenozyno-5-czterofosforan związek o trzech molach labilnego fosforanu w cząsteczce. W roku 1955 Sacks (119) a także i Lieberman (89) potwierdzili istnienie powyższego związku. (Co prawda Sacks znalazł go w ilościach mniejszych, bo wyno-

szących do 8% wszystkich nukleotydów adenilowych). Prócz tego stwierdził on występowanie w preparatach ATP w ilościach do 1% kwasu adenozyno-5-pięciofosforowego, w którym są 4 labilne reszty fosforanowe.

We wszystkich omawianych dotychczas związkach komponentą cukrową była ryboza. O występowaniu analogicznych nukleotydów poli-fosforanowych zawierających dezoksyrybozę zamiast rybozy do niedawna nie było nic wiadome. Dopiero w końcu 1955 r. Potter i Schlesinger (112) donieśli o wykryciu w kwasorozpuszczalnych wyciągach z grasicy cielęcej mono, dwu i trójfosforanowych pochodnych tymidyny i dezoksycytocyny. W wyciągach tych nie można było natomiast wykryć dezoksyrybonukleotydów purynowych.

### Biosynteza i przemiany enzymatyczne

Krebs i Hems w r. 1953 (74) stwierdzili przy użyciu znacznego  $^{32}\text{P}$ , że ITP nie może powstać z IDP analogicznie do powstawania ATP: Zachodzi natomiast reakcja:



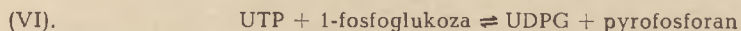
Reakcja ta nie jest katalizowana przez miokinazę, ani przez takie enzymy jak adenozynotrójfosfataza i alkaliczna fosfataza, ale przez specyficzną fosfokinazę, analogiczną do kreatynofosfokinazy.

Powyzszą reakcję transfosforylacji (IV) badali w tym samym czasie Berg i Joklik (10, 11). Stwierdzili oni występowanie enzymu katalizującego reakcję (IV) w drożdżach i mięśniach oraz udowodnili, że nie chodzi w tym przypadku o transaminację a o transfosforylację.

Dla enzymu tego zaproponowali autorzy nazwę nukleozydodwufosfokinaza. Reakcja IV ma charakter bardziej ogólny; obejmuje ona nie tylko inozynofosforany, ale również i inne nukleotydy dwufosforanowe jako akceptory i trójfosforanowe jako donory. Nukleozydomonofosforany nie wchodzą w reakcję. Tak np. wykazano istnienie następującej reakcji:

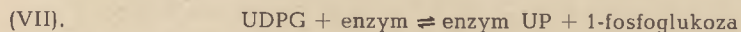


Już w r. 1951 Trucco (143) stwierdził, że UDP inkubowane z ATP i 1-fosfoglukozą w obecności soku z komórek drożdży daje UDPG i założył, że prawdopodobnie w trakcie reakcji powstaje przejściowo UTP. Berg i Joklik (11) uważają, że tworzenie się UTP jest umożliwiające właśnie dzięki odkrytemu przez nich enzymowi. Najpierw zachodzi w tym przypadku reakcja V, a następnie tworzy się UDPG przy udziale powstałego UTP wg. schematu VI:



Reakcja VI — pyrofosforalizy została stwierdzona w pracowni Kalckara (99). Dializowany sok z drożdzy zawiera enzym, który w obecności UDPG i piętnowanego pyrofosforanu daje 1-fosfoglukozę. Ten enzym (urydynodwufosfoglukozy-pyrofosforylaza) nie działa na inne połączenia UDP. UTP jak i UDPG jest w tym przypadku donorem urydylu i stąd enzym ten może być nazwany również urydylotransferazą (ściśle pyrofosforano-urydylotransferazą). Jest on szeroko rozpowszechniony w przyrodzie. Wykryto go między innymi w gruczołach mlecznych (131) w wątrobie (129), w mięśniach i tkance nerwowej (102) i w liściach szpinaku (102).

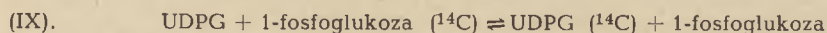
Kinetykę reakcji VI badała dokładnie, przy użyciu bardzo oczyszczonej urydylotransferazy, Munch-Petersen (102). Autorka sprawdziła zależność reakcji od zmian pH, udział aktywatorów i inhibitorów itd. Badając mechanizm reakcji VI założyła ona (100,102), że reakcja ta może być rozpatrywana dwuetapowo (reakcje VII i VIII):



Autorka przy użyciu znaczonego fosforanu wbudowanego w pyrofosforan lub w fosfoglukozę uzyskała znaczne włączenie  $^{32}\text{P}$  w nukleotydy. Wyniki zdają się wskazywać na to, że rzeczywiście w trakcie reakcji tworzy się przejściowe połączenie enzymu z urydylem, choć próby izolowania tego połączenia zawiodły.

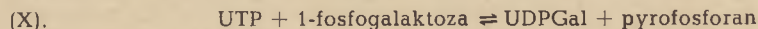
W dalszych pracach Kalckar i współpracownicy (58) udowodnili i zbadali reakcje tworzenia się UDPGal w obecności dializowanego soku z drożdzy. Jedną z nich jest reakcja I, której istnienie przyjmował jeszcze Leloir do wytłumaczenia mechanizmu inwersji galaktozy w glukozę i która uzyskała teraz potwierdzenie doświadczalne. Katalizowana jest ona przez enzym fosfoglukozyurydylotransferazę.

Istnienie reakcji I-ej potwierdził również Trucco (144). Otrzymał on przy inkubacji UDPG z piętnowaną  $^{14}\text{C}$  fosfoglukożą w obecności ekstraktów z *Saccaromyces fragilis* włączenie się znakowanego węgla do UDPG (reakcja IX):



Drugą reakcją związaną z powstawaniem UDPGal jest reakcja II-galaktowaldenazy. Ten enzym występuje również bardzo szeroko w przyrodzie. Znalaziono go w gruczołach mlecznych (22), u bakterii (117, 95). Maxwell i współ. (95) badali galaktowaldenazę i fosfoglukozyurydylotransferazę z wątroby. Ten ostatni enzym katalizujący reakcję I-ą, jest bardziej stabilny od galaktowaldenazy w stosunku do podwyższonej

temperatury i może być na tej zasadzie od niej oddzielony. Autorzy znaleźli oba enzymy w wielu tkankach ssaków. Jeszcze jedną reakcją, na drodze której może powstać UDPGal jest reakcja X, analogiczna do reakcji VI-ej.



Reasumując urydynodwufosfogalaktoza może więc powstawać trzema drogami (58):

a) przez enzymatyczną inwersję UDPG, katalizowaną przez galaktowaldenazę (reakcja II).

b) przez przenoszenie urydylu z 1-fosfoglukozy na 1-fosfogalaktozę (reakcja I).

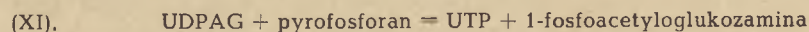
c) przez przeniesienie urydylu z pyrofosforanu na 1-fosfogalaktozę (reakcja X).

Jest bardzo interesujące, że niektóre preparaty enzymatyczne (np. z mózgu młodych zwierząt) zawierają enzymy katalizujące reakcję X i II, a nie zawierają transferazy odpowiedzialnej za reakcję I-ą (95).

Pełna zamiana galaktozy na glukozę następuje więc albo w wyniku zajścia reakcji I-ej i II-ej albo cyklu kolejno po sobie przebiegających reakcji: X-ej, II-ej, i VI-ej. (Reakcja VI w tym przypadku musi zachodzić oczywiście z prawa na lewo).

Bilansem obu cykli reakcji będzie zamiana 1-fosfogalaktozy w 1-fosfoglukozę (lub odwrotnie). Przemiany te badali Hansen i w wsp. (46) przy użyciu ekstraktów z *Streptococcus fragilis* i *Lactobacillus bulgaricus*. Stwierdzili oni, że niefrakcjonowane wyciągi z obu rodzajów bakterii zamieniają 1-fosfogalaktozę w 1-fosfoglukozę w obecności katalicznych ilości urydynodwufosfoheksyzy lub UTP (czyli obu możliwymi drogami). Frakcjonowane ekstrakty powodują zamianę tylko w obecności urydynodwufosfoheksyzy, nie zawierają więc pyrofosforolitycznych układów enzymatycznych.

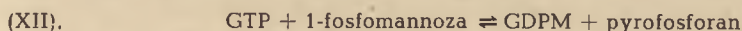
Smith i Mills (128, 129) stwierdzili, że obecny w wątrobie związek wykryty przez Paladini i Leloir (104) i zidentyfikowany później jako urydynodwufosfoacetylglukozamina (20), nie podaje się pyrofosforolizie analogicznie do UDPG przy pomocy preparatu urydylotransferazy drożdży. Natomiast w obecności jąder komórkowych wyizolowanych z wątroby zachodzi reakcja XI analogiczna do reakcji VI:



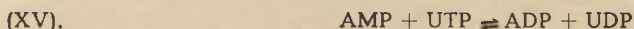
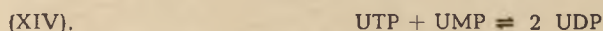
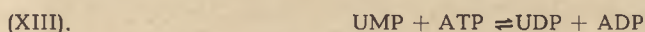
Jądra komórkowe mają również zdolność pyrofosforylowania UDPG, i to dwa razy szybciej niż UDPAG (97). Natomiast próby uży-

skania analogicznej reakcji z kwasem urydynodwufosfoglukuronowym zawiody.

Munch-Peterson (101) udowodniła, że również i guanozyno-dwufosfomannoza powstaje w reakcji analogicznej do reakcji VI i X. W obecności preparatu enzymatycznego z drożdży *S. fragilis* zachodziła reakcja XII:



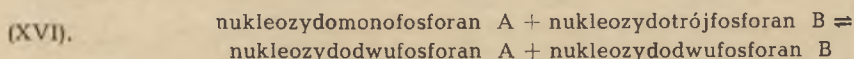
Lieberman i Kornberg (85) badali niewyjaśnione drogi powstanie urydynotrójfosforanu z urydynomonofosforanu. Znaleźli oni, że drożdże zawierają enzym podobny do miokinazy, katalizujący następujące reakcje:



Drożdże nie zawierały natomiast nukleozydodwufosfokinazy katalizującej reakcję IV i V, co zostało wykazane przez brak reakcji ATP z IDP (85).

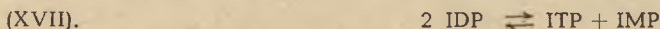
Munch-Petersen (103) badała dokładnie przebieg reakcji XIII i wykazała, że nie zachodzi tu przeniesienie pyrofosforanu na UMP połączone z późniejszą jego defosforylacją do UDP. Istotą reakcji jest prosta transfosforylacja ostatniej reszty fosforanowej ATP na UMP.

W reakcjach XIII — XV mogą brać udział także guanozynofosforany. Ogólnie więc te systemy enzymatyczne katalizują następującą reakcję:



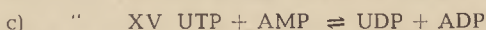
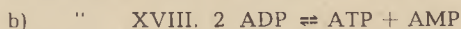
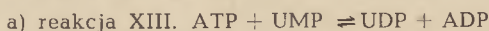
Enzym ten (lub enzymy) różnią się od miokinazy większą labilnością w stosunku do podwyższonej temperatury.

W układzie powyższym jedynie IMP nie brało udziału, choć Joklik (34) znalazł w ekstraktach z drożdży enzym katalizujący właśnie dyzmutację inozynodwufosforanów:



Podobne badania prowadzili również Strominger i wsp. (136). Stwierdzili oni, że w preparatach z wątroby cielęcej znajduje się enzym, nazwany przez nich nukleozydomonofosfokinazą, katalizujący szereg reakcji, których wynikiem jest reakcja XIV. Ten preparat enzymatyczny nie zawiera nukleozydodwufosfokinazy. W obecności jego zachodzi również reakcja XIII. Inkubacja handlowego UTP z UMP da-

je w wyniku reakcji XIV nieznaczną ilość UDP, ponieważ reakcja zachodzi jedynie dzięki obecności w preparatach śladów ATP, w przeciwieństwie do badań Liebermana i wsp. (87), u których reakcja XIV zachodziła bez udziału ATP. Strominger i wsp. sądzą, że na reakcję XIV składają się następujące etapy:



Podobne reakcje zachodzą między ATP i AMP, ATP i CMP, AMP i CTP. ATP nie reaguje jednak z IMP. Nie zaobserwowano żadnej reakcji między parą nukleotydów, w której przynajmniej jeden ze składników nie był nukleotydem adenilowym. CTP nie reaguje z CMP lub z UMP, chyba że w obecności śladów ATP.

Powyższy zespół reakcji związany jest z czynnością enzymu obecnego w preparatach z wątroby, katalizującego nieodwracalną reakcję (XIX).



W reakcji XIX UDP jest hydrolizowany około 100 razy szybciej niż UTP, ATP lub ADP i CDP.

Defosforylacja GDP i IDP (141) następuje równie szybko jak UDP. Enzym katalizujący reakcję XIX nie reaguje z żadnym z nukleozydomono — lub trójfosforanów. Te ostatnie mogą być defosforylowane kiedy reakcję XIX połączy się z systemem powyżej omawianych reakcji katalizujących przeniesienie fosforu z nukleozydotrój — na nukleozydomonofosforany z tym zastrzeżeniem, że jeden z powstałych nukleotydów dwufosforanowych będzie UDP, GDP lub IDP.

Niezależnie od Stromingera enzym odpowiedzialny za reakcję XIX-ą został wyizolowany przez Planta (109), który badając go doszedł do podobnych rezultatów.

W sumie więc wynikiem zespołu przemian tworzących reakcję XIV i reakcję XIX jest reakcja XX:

(XX).



Jak już wspomniano wyżej ani Lieberman (85) ani Strominger (135) nie stwierdzili, badając przemiany nukleozydotrój— i monofosforanów reakcji między IMP a jakimkolwiek trójfosforanem. Potwierdzili to Krebs i Hems (75), wykazując jednak obecność w tkankach zwierzęcych enzymu odpowiedzialnego za reakcję XXI:

(XXI).



Autorzy udowodnili odwrotność tej reakcji oraz wykazali, że nie



chodzi w tym przypadku o transaminację. Sądzą oni, że nie jest wykluczone, że reakcja XXI jest wynikiem dwu reakcji, a mianowicie reakcji transfosforylacji między nukleotydami adenilowymi katalizowanej przez miokinazę i reakcji IV.

Pracownia Pottera zajmowała się ostatnio (48) lokalizacją w komórce enzymów odpowiedzialnych za fosforylację UMP. Stwierdzono, że izolowane mitochondria są zdolne fosforylować UDP do UTP, nie działają natomiast na UMP. Z kolei wyciąg po odwirowaniu mitochondrii fosforyluje UMP do UDP i częściowo tylko do UTP. Główne działanie jąder w tych reakcjach polega natomiast na defosforylowaniu UMP. W czasie tych wszystkich reakcji stwierdzono odwracalną transfosforylację między nukleotydami adenilowymi a urydylowymi.

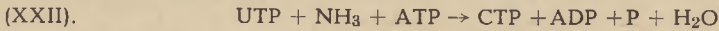
Biogeneza, kwasu urydynodwufosfoglukuronowego przebiega nieco odmiennie. Jak już wspomniano, Smith i Mills (199) stwierdzili, że nie można przeprowadzić pyrofosforolizy UDPGA analogicznie do reakcji VI. Tak więc UDPGA nie może się tworzyć z UTP i kwasu 1-fosfoglukuronowego. Ostatnio Strominger i wsp. (137) donieśli, że wolny od elementów morfotycznych wyciąg z wątroby może utleniać UDPG do UDPGA w obecności  $DNP^+$  i enzymów otrzymanych z proszku acetonowego z wątroby. Enzym ten nie utlenia urydynodwufosfoacetyloglukozaminy.

Kalckar (59) doniósł o obecności w *Haemophilus influenzae* specyficznego enzymu rozszczepiającego UDPG do UMP i 1-fosfoglukozy. Enzym ten nie podobnie do odpowiadających mu preparatów z drożdży działa niezależnie od dodatku pyrofosforanu lub estrów fosforowych heksoz (brak reakcji I i VI). Urydynodwufosfoacetylo-glukozamina nie była rozkładana przez ten enzym.

Dotychczas omawiane przemiany poszczególnych mononukleotydów dotyczyły jedynie wzajemnej przemiany reszt fosforanowych lub glukozylów. We wszystkich przypadkach pierścień purynowy lub pirymidynowy nie brał udziału w reakcji. Przemiany, w których biorą udział zasady azotowe są ściśle związane z zagadnieniem aminacji lub dezaminacji. Do lat ostatnich z enzymów biorących udział w tego typu przemianach, zachodzących na szczeblu nukleotydów znana była właściwie tylko szeroko rozpowszechniona dezaminaza kwasu adenilowego, powodująca powstanie IMP z AMP. Niedawno Deutsch i Nilsson (27) wykazali, że żel aktomiozynowy po defosforylacji ATP do ADP powoduje dezaminację tego ostatniego na szczeblu dwu, a nie monofosforanu, jak to się dotychczas sądziło, a więc powstanie tym samym IDP.

Enzymów katalizujących aminację nukleotydów do czasów ostat-

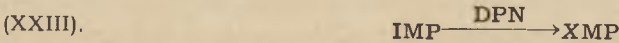
nich właściwie nie znano. Lieberman w r. 1955 opisał obecny w ekstraktach *E. coli* enzym, który przeprowadzał reakcję XXII:



W reakcji tej jony amonowe nie mogły być zastąpione przez grupy aminowe amidów kwasowych aminokwasów. Reakcja zachodziła natomiast w obecności hydroksylaminy.

Również w 1955 r. ukazało się niezależnie od siebie kilka komunikatów dotyczących powstawania guanozynofosforanów z kw. inozynowego (1, 76, 34). Gehring i Magasagnik (34) stwierdzili, że oczyszczone ekstrakty z *Aerobacter aerogenes* powodują w obecności DPN przemianę kwasu inozyno-5-fosforowego w ksantozyno-5-fosforowy (XMP).

Dokładniej zagadnienie to zbadali: Lagerkvist na preparatach z wątroby (76) i Abrams i Bentley na wyciągach ze szpiku kostnego (1). Autorzy ci wykazali istnienie enzymu dehydrogenazy kw. inozynowego odpowiedzialnego za reakcję XXIII:



Powstały w wyniku tej reakcji ksantozynomonofosforan ulega aminacji do GMP wg reakcji XXIV:



Donorem grupy aminowej jest tu kwas glutaminowy lub glutamina. Reakcja zachodzi w obecności ATP. W ten sposób w wyniku reakcji XXIII i XXIV powstaje GMP z IMP. Prócz tego w wyciągach ze szpiku kostnego (1) znaleziono inny enzym, powodujący bezpośrednią aminację IMP:



Reakcja wymaga obecności związku makroergicznego jako źródła energii oraz donora grup aminowych, którym może być jedynie kwas asparaginowy. Należy podkreślić wysoką specyficzność reakcji XXIV i XXV w stosunku do odpowiednich aminokwasów dwukarboksylowych.

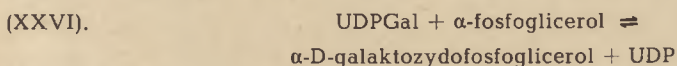
### Rola w ustroju

Rola powyżej omawianych związków nie jest jeszcze dokładnie poznana. Już dziś zarysowują się jednak wyraźnie dwie dziedziny, w których opisywane mononukleotydy biorą aktywny udział. Jedną z tych

dziedzin jest udział glukozylowych pochodnych nukleozydodwufosforanów w metabolizmie cukrów.

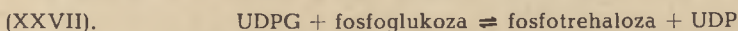
Znaczenie UDPG jako koenzymu galaktowaldenazy zostało już omówione. Wydaje się dziś udowodnione, że synteza galaktozy w ustroju a także włączenie się jej w cykl glikolityczny przebiega właśnie na tej drodze. Wykrycie przez Buchana (17, 18) połączeń heksoz z urydyno- i guanozynodwufosforanami w zielonych liściach i glonach w wyniku już b. krótkotrwałej fotosyntezy potwierdza pogląd co do udziału ich w syntezie cukrów.

Niedawno Bean i Hassid (7) opublikowali badania nad asymilacją  $C^{14}O_2$  przez czerwone glony *Iridophycus flaccidum*. Okazało się, że już po 8-miu sek. fotosyntezy pojawia się UDPG i zaraz po niej UDPGal. Autorzy uważają, że UDPGal bierze udział w reakcji powstawania  $\alpha$ -D-galaktozydoglicerolu, zapasowego cukru tych glonów wg schematu:

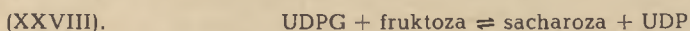


Istnieje już szereg danych potwierdzających udział glukozylowych pochodnych nukleotydów przy tworzeniu dwucukrów.

Leloir (81) stwierdził, że UDPG inkubowana w obecności ekstraktu z drożdży z fosfoglukozą daje fosfotrehalozę.

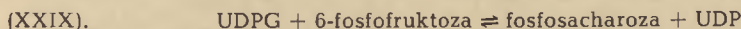


W zarodkach zbóż, fasoli i innych roślin oraz pędach ziemniaków Leloir (82, 24) znalazł enzym katalizujący reakcję:



Enzym ten nazwany został UDPG-fruktozotransglukozylazą. Wydaje się, że występowanie jego posiada charakter ogólny.

Leloir (84) otrzymał także inny enzym, katalizujący reakcję:



W następnym etapie, po reakcji XXIX działa fosfataza odszczepiająca fosfor od fosfosacharozy. Już Buchan (17) wcześniej stwierdził, że synteza sacharozy przebiega według reakcji XXIX, a nie według XXVIII, chociaż fosfosacharoza otrzymana przez niego zawierała resztę fosforanową prawdopodobnie w pozycji 1 fruktozy, podczas gdy otrzymana przez Leloira posiadała fosfor przy węglu 6-tym fruktozy.

Tabone i Tabone (142) wykazali, że przy powstawaniu estru

glukozylowego kw. antranilowego w obecności *Bacterium megatherium* glukozyłu dostarcza również UDPG.

We wszystkich powyższych przykładach UDPG jest donorem glukozyłu, dając początek  $\alpha$  glukozydom. Dyskutowana jest również rola UDPG przy tworzeniu  $\beta$  glukozydów. Istnieją dowody na udział UDPG w syntezie laktozy. W gruczołach mlecznych ssaków wykryto stosunkowo dużą zawartość UDPG (do około  $15 \mu\text{M}$  na 100 g tkanki) oraz enzymy: galaktowaldenazę (22) i urydylotransferazę (131). Rutter i Hansen (117) wykazali, że UDPG podnosi znacznie produkcję kwasu mlekowego przez zawieszinę komórek *Lactobacillus bulgaricus* zaadaptowanych do wzrostu na glukozie lub galaktozie jako źródle węglowodanów.

Udział kwasu urydynodwufosfoglukuronowego w syntezie glukuronidów był już powyżej omówiony. Wszystkie naturalne glukuronidy mają konfigurację  $\beta$ . Storey i Dutton (133) omawiając rolę UDPGA w tworzeniu glukuronidów stwierdzają jednak, że na obecnym etapie wiedzy trudno jest podać, czy konfiguracja urydynodwufosfoglukuronidów jest  $\beta$ , ponieważ być może następuje inwersja w trakcie tworzenia wiązania glukozylowego.

Dyskutowana jest również rola powyższych związków w syntezie polisacharydów. Cabib i Leloir (19) wysuwają możliwość udziału guanozynodwufosfomannozy w syntezie mannanu, obecnego w błonach komórkowych drożdży. Tak samo brano pod uwagę udział UDPAG jako donora acetyloglukozaminy w syntezie chityny (20). Niestety pierwsze prace nie potwierdziły tego założenia. Leloir i Cardini (83) badając pleśń *Neurospora crassa*, syntetyzującą duże ilości chityny z acetyloglukozaminy nie stwierdzili koenzymatycznej funkcji UDPAG. Ostatnio Storey i Dutton (133) omawiają możliwą rolę połączeń urydynodwufosforanowych w tworzeniu takich mukopolisacharydów jak kwas hyaluronowy, kwas chondroitynosiarkowy czy heparyna, w skład których wchodzi jak wiadomo acetyloglukozamina, acetylogalaktozamina i kwas glukuronowy. Trudnością takiego założenia jest fakt, że nie znaleziono UDPGA i odpowiedniego systemu enzymatycznego w innych tkankach poza wątrobą. Istnieje jednak możliwość, że organ ten ma specyficzną funkcję w tworzeniu jednostek dwusacharydowych N-acetyloheksosamino-glukuronidów (133).

Potwierdzeniem tej hipotezy jest niedawne wykrycie przez Stromingera (140) w jajowodach kury obok UDPAG, UDPAGal i GDPM nowych pochodnych UDP: fosforanu UDPAG i siarczanu UDAPGal. Jedną z ważniejszych funkcji jajowodów jest synteza glukoproteidów zawierających między innymi acetyloglukozaminę i mannozę. Istnienie więc w nich stosunkowo dużych ilości pochodnych UDP potwierdziłoby hipotezę udziału ich w syntezie cukrowców.

Również Balbio i wsp. (6) omawiając występowanie glukozylo- wych pochodnych UDP w pleśniach zawierających różne polisacharydy sugeruje rolę ich jako donorów glukozyłu w syntezie cukrowców.

Drugim zagadnieniem, coraz szerzej rozpracowywanym jest udział nukleotydów polifosforanowych w syntezie kw. nukleinowych.

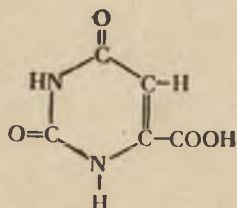
Już wcześniej udowodniono, że te piętnowane puryny i pirymidyny, które są wbudowywane w kw. nukleinowe szybko włączają się w odpowiadające tym zasadom 5-polifosfonukleozydy (35). Gold w a s e r (36, 37, 38) stwierdziła szybkie włączanie się adeniny w adenozy- nopolifosforany, a następnie w kw. nukleinowe w obecności homoge- natów z wątroby. Autorka udowodniła, że adenozy-nofosforany wcho- dzą w cząsteczkę kwasu nukleinowego w całości, tak że uprzednie roz- bicie w nukleotydzie wiązania fosfor-ryboza nie ma miejsca. Również w embrionach jeżowca adenina jest szybko wbudowywana w 5-nukle- otydy i w KDN oraz wolniej w KRN (56). Bennet i Krueckel (9) także stwierdzili szybkie wbudowywanie się znaczonej adeniny w 5-nukleotydy adenilowe, natomiast wolniejsze wbudowywanie się w od- powiednie pochodne guanozyny. Autorzy stoją na stanowisku, że nu- kleotydy te są prekursorami kwasów nukleinowych.

Strominger (134, 139) znalazł, że działanie penicyliny na *Sta- phylococcus aureus* przejawia się między innymi, tym, że znaczoney uracyl akumuluje się w połączeniach urydyno-i cytydynofosforowych wyciąganych zimnym kwasem trójchlorooctowym. W nieobecności pe- nicyliny uracyl jest bardzo szybko włączany w kwasy nukleinowe.

Szereg innych prac również wskazuje na niewątpliwy udział nu- kleozydo-5-fosforanów w metabolizmie kwasów nukleinowych. Kay i Davidson (61) frakcjonując związki fosforowe jąder komórko- wych wykazali obecność tam obok kw. nukleinowych wolnych mono- nukleotydów. Schmitz i wsp. (127) badając polifosforanowe nukle- otydy, zawarte w różnych tkankach stwierdzili w przypadku intensywnie rosnących nowotworów oraz drożdży, że wolne nukleotydy są bez wątpienia bezpośrednimi prekursorami kwasów nukleinowych.

Kalckar (56) omawiając już w 1953 r. rolę mononukleotydów w syntezie kwasów nukleinowych sugerował, że mogą być one użyte do tworzenia dwustrowych wiązań fosforowych w kwasach nukleino- wych. Można to sobie uświadomić jako współdziałanie krańcowych jednostek polinukleotydu z wolnym polifosforanem, dające w rezulta- cie włączenie tego nukleotydu w cząsteczkę kwasu nukleinowego. Syn- teza nukleozydopolifosforanów w obecności i kosztem ATP przy udzia- le powyżej omówionych enzymów może dostarczać „cegiełek budulco- wych” dla syntezy kwasów nukleinowych.

Wcześniejsze badania (przegląd piśmiennictwa (33) pozwoliły stwierdzić, że kwas orotowy (4-karboksy-uracyl) (rys. nr 3) jest prekursorem pirymidyn kwasów nukleinowych. (Jedynie w przypadku *Staphylococcus aureus* zachowuje się on inaczej, niż w tkankach ssaków, włącza się bowiem o wiele wolniej od uracylu tak w mononukleotydy jak i w kwasy nukleinowe (134).

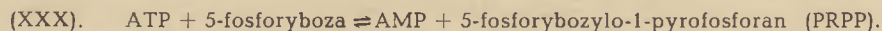


kwas orotowy

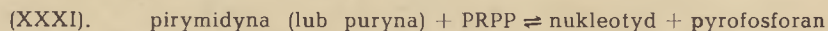
Poszczególne etapy przemian kwasu orotowego były jednak do niedawna nieznane. Dopiero prace Hurlberta i wsp. dostarczyły dowodów na to, że kwas orotowy włącza się w wątrobie szybko w pochodne 5-fosforydyny (49) i że związki te są intermediatami pirymidyn kwasu rybonukleinowego. W dalszych pracach (50, 51) stwierdzono, że wprowadzony do organizmu kwas orotowy można początkowo wykryć we frakcji kwasorozpuszczalnej wątroby, później zaś dopiero we frakcji kwasonierozpuszczalnej. Autorzy znaleźli w 20 min. po iniekcji kwasu orotowego w wątrobie takie radioaktywne związki, jak UMP, UDP i jego glukozylowe pochodne oraz CMP. Po dłuższym czasie następuje włączenie się ich w kwas rybonukleinowy tak cytoplazmatyczny jak i jądrowy. W następnej pracy Hurlbert (52) szukał enzymu odpowiedzialnego za zamianę kwasu orotowego w kwas urydylofosforowy. Otrzymał go z oddializowanego wyciągu lub z ekstraktów z proszku acetonowego z wątroby. W obecności tego enzymu, ATP, Mg<sup>++</sup> i 5-fosforybozy piętnowany kwas orotowy dawał różne radioaktywne substancje, z których jedną zidentyfikowano jako UMP, inne zaś były pochodnymi urydynofosforanów.

Stwierdzono, że 5-fosforyboza reaguje z ATP dając rybozotrójfosforan (reakcja XXX), który reaguje z kwasem orotowym dając jako pierwszy intermediat UMP. (53)

Niezależnie od Hurlberta zagadnienie włączenia kwasu orotowego w nukleotydy pirymidynowe rozwiązała pracownia Kornberga (72, 73, 86). Wyizolowany przez nich z proszku acetonowego z wątroby enzym katalizuje reakcję: (72)

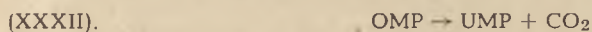


Inne układy enzymatyczne, obecne również w wątrobie umożliwiają reakcję XXXI.



Kwas orotowy w obecności izolowanego z drożdży enzymu reaguje

z PRPP dając kwas orotydyno-5-fosforowy (OMP). (86) Reakcja XXXI jest podobnie jak reakcja VI i X reakcją pyrofosforolizy. Powstały OMP ulega następnie dekarboksylacji wg reakcji:

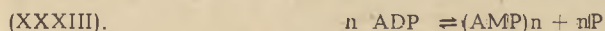


Autorzy wyizolowali z drożdży inny enzym, który warunkuje syntezę nukleotydów adenilowych z adeniny i PRPP, a także enzym syntetyzujący kwas inozynowy. Według schematu reakcji XXXI mogą powstawać również nukleotydy guanilowe (73).

Inne prace (116, 70) potwierdziły wyniki badań Kornberga. Przebadano system enzymatyczny, w którym IMP był syntetyzowany z hipoksantyny w obecności 5-fosforybozy, ATP i dwu preparatów enzymatycznych z wątroby. Pierwszy z enzymów katalizuje reakcję XXX, drugi reakcję XXXI syntetyzując kwas inozynowy z hipoksantyny i 5-fosforybozylpyrofosforanu. Stwierdzono przy tym, że ta ostatnia reakcja jest odwracalna.

W ten sposób zostały wykryte pośrednie etapy biosyntezy nukleotydów pirymidynowych i purynowych oraz wytłumaczone włączanie się zasad azotowych w dalszej konsekwencji w kwasy rybonukleinowe.

Pewne światło na udział i rolę nukleozydopolifosforanów w syntezie kw. nukleinowych rzucają ciekawe badania pracowni Ochoa (39, 40, 41, 42, 47). Autorzy otrzymali z wyciągów *Azotobacter vinelandii* enzym nazwany fosforylaza polinukleotydową i katalizujący reakcję polimeryzacji mononukleotydów-5-fosforowych. Inkubując ADP lub IDP w obecności preparatów tego enzymu stwierdzono znikanie wolnych nukleotydów oraz uwalnianie się stechiometrycznych ilości fosforanu. Równocześnie ze znikaniem nukleotydów powstaje wysoko cząsteczkowa substancja, rozpuszczalna w wodzie, niedializująca i wtrącająca się kwasem trójchlorooctowym i alkoholem. Substancja ta posiada normalne widmo nukleotydowe w ultrafiolecie. Stwierdzono, że zachodząca w wyniku inkubacji reakcja ma przebieg następujący:



Powstałe polimery  $(\text{AMP})_n$  lub  $(\text{IMP})_n$  posiadają ciężar cząsteczkowy dochodzący do 800.000. W toku dalszych badań okazało się, że również i inne nukleozydodwufosforany polimeryzują pod wpływem tego samego enzymu. Badanie powstałych polimerów wykazały, że poszczególne nukleotydy łączą się ze sobą wiązaniem fosfodwuestrowym położonym między 5-ym węglem rybozy jednego nukleotydu, a 3-im (lub drugim) węglem rybozy sąsiedniego nukleotydu, a więc w taki sam sposób jak w rodzimych kwasach nukleinowych. Krańcowy nukleotyd łańcucha posiada grupę fosforanową w pozycji 5 rybozy.

Również i obrazy dyfrakcji promieni X takich polimerów były podobne do obrazów dyfrakcji kw. nukleinowych.

Autorzy inkubując mieszaninę nukleozyddwufosforanów otrzymali także polinukleotydy zawierające wszystkie 4 zasady azotowe. Takie „mieszane” polinukleotydy były zupełnie podobne do naturalnego kwasu rybonukleinowego, co przejawiało się między innymi w łatwiejszym atakowaniu ich przez rybonukleazę w porównaniu z „prostymi” polinukleotydami (tj. zbudowanymi z jednej tylko zasady azotowej).

Reakcja polimeryzacji nukleotydów (reakcja XXXII) jest odwracalna. W kierunku odwrotnym zachodzi tylko w obecności fosforanu nieorganicznego. Niewyjaśniony jest fakt, że „proste” polimery ulegają szybciej fosforylacji niż „mieszane”. Omawiany enzym zdolny jest również fosforylować naturalne kwasy rybonukleinowe różnego pochodzenia, choć reakcja w tym przypadku przebiega raczej wolniej. Kwas dezoksyrybonukleinowy oraz fragmenty kwasu rybonukleinowego pozostałe po trawieniu rybonukleazą nie ulegają fosforylacji pod wpływem fosforylasy polinukleotydowej.

Odwracalność reakcji polimeryzacji jest bardzo interesująca z energetycznego punktu widzenia. Z przebiegu reakcji wynika, że wolna energia hydrolizy wiązania dwuestrowego polinukleotydu nie może być dużo niższa niż energia wiązania pyrofosforanowego w nukleozyddwufosforanach.

Ostatnie badania O c h o a pozwoliły wykazać, że fosforylaza polinukleotydowa jest bardzo rozpowszechniona w przyrodzie. Enzym ten znaleziono u szeregu bakterii, u drożdży a także u wyższych roślin. Nie otrzymano jednak jeszcze jednoznacznego dowodu obecności jego w tkankach zwierzęcych.

Powyższy enzym znalazł również B e e r s (8) w wyciągach z komórek *Mycobacterium lysodeikticus*. Badania jego są zgodne z wynikami pracowni O c h o a.

Niewyjaśnionym dotychczas jest udział intermediatów w syntezie kwasu dezoksyrybonukleinowego. Jedynie Salbe (118) stwierdził, że w obecności enzymu z mitochondrii dezoksyadenozyno-5-fosforan może być fosforylowany do dwu i trójfosforanu.

Znalezienie w grasicy (112) wolnych nukleotydów polifosforanowych pochodnych dezoksynukleozydów pozwoli być może na stwierdzenie ich analogicznej roli przy syntezie kwasów dezoksyrybonukleinowych.

Prócz omawianej roli nukleozydów polifosforanowych w syntezie cukrowców i kwasów nukleinowych zaczynają się ukazywać wzmianki o możliwej jeszcze innej roli tych związków.

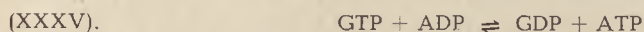
S a n a d i i wsp. (121, 122) wykryli, że w systemie enzymatycz-



nym katalizującym fosforylację ADP połączoną z rozpadem sukcylokoenzymu A występuje jako dodatkowy koenzym GDP. Pierwszym etapem reakcji jest powstanie GTP.



Dopiero w następnym etapie następuje tworzenie się ATP w reakcji XXXV analogicznej do reakcji IV i V:



W reakcji XXXIV tylko IDP może zastąpić GDP. Autorzy wyizolowali z nadnercza świni preparat enzymatyczny odpowiedzialny za reakcję XXXIV. Nie katalizuje on reakcji fosforylacji, gdy użyć bardzo czystego preparatu ADP. Również synteza sukcylo-koenzymu A w obecności ATP wolnego od śladów nukleotydów guanozynowych nie zachodzi.

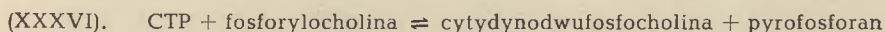
Ling (90) doniósł, że ITP lub UTP mogą również szybko jak ATP fosforylować 6-fosfofruktozę do 1,6-dwufosfofruktozy. Wyniki zdają się wskazywać na to, że odbywa się tu bezpośrednia fosforylacja nie poprzedzona wymianą fosforu z ADP w obecności nukleozyddwufosfokinazy.

Powyżej już podano, że fosfokinaza pirogromianowa działa również na IDP (67) i na UDP (71). Ostatnio Strominger podał (138), że enzym ten katalizuje tak samo fosforylację GDP i CDP. Autor sądzi, że jest to prosta reakcja fosforylacji i pośrednictwo nukleotydów adenilowych jest wykluczone.

Potter i wsp. (48) badali tworzenie się polifosforanów urydynowych z UMP w czasie oksydatywnej fosforylacji. Autorzy podają, że fosforylacja urydynofosforanów odbywa się poprzez przeniesienie fosforanu z ATP. Nukleotydy adenilowe wydają się być niezbędnym ogniwem między donorami oksydatywnej fosforylacji a UMP.

Jak wynika z badań Liebermanna (89) adenozyńceterofosforan jest związkiem mniej aktywnym niż ATP. Tak np. stopień tworzenia 6-fosfoglukozy przy użyciu fosfokinazy wynosi w przypadku adenozyńceterofosforanu mniej niż 1% wydajności osiągniętej w przypadku użycia ATP. Brak jest również przeniesienia fosforanu z adenozyńceterofosforanu na ADP w obecności miokinazy.

Bardzo ciekawe jest doniesienie Kennedy i wsp. (62), że jedna z dróg biosyntezy lecytyny wymaga udziału cytydynotrójfosforanu. CTP jest w tym przypadku związkiem bardzo specyficznym, tak że oczyszczone preparaty ATP są zupełnie bez efektu. Autorzy postulują następujący schemat reakcji:



(XXXVII).      cytydynodwufosfocholina + akceptor  $\rightleftharpoons$  lecytyna + CMP

Lipidowym akceptorem jest prawdopodobnie  $\alpha, \beta$ -dwugliceryd. Reakcja XXXVI jest, jak widać jeszcze jednym z przykładów reakcji pyrofosforolizy.

Obecność innych niż adenilowe nukleotydów pyrofosforanowych w mięśniach wysunęło zagadnienie ich ewentualnej roli w procesach skurczu mięśnia. Już w r. 1942 Kleinzeiler (67) badał otrzymane przez siebie ITP i stwierdził, że odszczepienie fosforu przez miozyn od ITP zachodzi trzy razy szybciej niż od ATP. Defosforylacja wyciągami z mięśni zatrzymuje się na stadium inozynodwufosforanu, bowiem miokinaza na ten związek nie działa. Powstawanie fosfokreatyny z ITP zachodzi 5—8 razy wolniej niż z ATP. Fakt szybszego rozszczepienia ITP przez miozyn potwierdzili później Spicer i Bowen (132). To samo stwierdził również Gergely (35) badając działanie meromiozynu na ITP. UTP defosforyluje się też szybciej niż ATP pod wpływem ciężkiego meromiozynu a krystaliczny miozyn rozkłada UTP 4—6 razy szybciej niż ATP. (57)

ITP wywołuje podobnie do ATP spadek lepkości roztworu aktomiozynu co spowodowane jest dysocjacją aktomiozynu (98) (132). Analogiczne zjawisko zachodzące pod wpływem UTP badał Ranney (114). Stwierdził on pewną różnicę w działaniu na aktomiozyn między UTP i ATP. Różnicę tę przypisuje on słabszemu dysocjującemu działaniu UTP na aktomiozyn, lub temu, że miozyn charakteryzuje się większą aktywnością UTP-atyczną niż ATP-atyczną.

Wpływ UTP i GTP na żel aktomiozynowy badali Bergkvist i Deutsch (13). Oba te związki w ilościach równoważnych ilościom ATP wywołują identyczny efekt kurczenia się żelu aktomiozynu.

Na marginesie można wspomnieć, że preparaty aktynu nie zawierają według badań pracowni Strauba (113) innych nukleotydów niż adenilowe. Przy badaniu działania miozynu i aktomiozynu na ITP i UTP stwierdzono bardzo duży wpływ jonów dwuwartościowych metali. Tak więc szybkość odszczepienia fosforu od ATP w nieobecności  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  jest większa niż od ITP (132). Przy braku dostatecznych stężeń jonów  $\text{Mg}^{++}$  nie zachodzi spadek lepkości aktomiozynu pod wpływem ITP (98, 132) ani UTP (114).

Kinetykę reakcji miozynu z nukleotydami polifosforanowymi badał wyczerpująco Blum (16). Wykazał on następującą kolejność stałych Michaelisa-Mentena:  $K_m(\text{ATP}) > K_m(\text{UTP}) > K_m(\text{ITP})$ . Jony  $\text{Mg}^{++}$  podwyższają  $K_m$  podczas gdy  $\text{Ca}^{++}$  ma tylko mały wpływ. Autor zakłada, że pierścień zasady azotowej nukleotydu łączy się w pozycji

6 poprzez jon metalu z enzymem i tym tłumaczy taką kolejność stałych  $K_m$ .

W nieobecności jonów  $Mg^{++}$  i  $Ca^{++}$  maksymalne szybkości defosforylacji przedstawiają się następująco:  $v(ATP) > v(UTP) > v(ITP)$ . Po dodaniu  $Ca^{++}$  szybkości wzrastają, ale kolejność zmienia się na  $v(ITP) > v(UTP) > v(ATP)$ . Jony  $Mg^{++}$  obniżają silnie  $v(ATP)$ , a już w bardzo małym stopniu wpływają na obniżenie  $v(UTP)$ .

Kielley i wsp. (66) stwierdzili, że CTP, GTP i adenylozoczwierofosforan też są hydrolizowane przez miozyn. Autorzy badali również wpływ kationów jednowartościowych, a także kwasu etylenodwuaminyoczwierooctowego (wersenu) na aktywność hydrolityczną miozynu wobec różnych nukleotydów.

W obecności jonów  $Ca^{++}$  (zgodnie z powyżej omawianymi badaniami) miozyn jest najmniej aktywny w stosunku do ATP. Obraz zmienia się w obecności wersenu i jonów  $K^+$ , kiedy właśnie ATP jest najszybciej hydrolizowany. Podobnie do ATP zachowuje się GTP, natomiast adenylozoczwierofosforan nie przypomina swym zachowaniem ATP a upodabnia się raczej do GTP.

Z danych doświadczalnych autorzy wysuwają wniosek, że w obecności  $Ca^{++}$  najszybciej są hydrolizowane te nukleotydy, które posiadają gr.  $-OH$  przy węglu 6-ym zasady azotowej; obecność gr- $NH_2$  przy tym węglu hamuje aktywność. Odwrotnie przedstawia się sprawa w obecności wersenu.

Prócz prac nad reakcją nukleotydów polifosforanowych z miozyinem lub aktomiozyinem badano również ich zdolność wywoływania skurczu modeli mięśniowych, takich jak nici aktomiozynowe lub włókna mięśniowe ekstrahowane glicerolem. Spicer i Bowen (132) oraz Portzehl (111) wykazali, że ITP posiada zdolność kurczenia modeli mięśniowych w takim stopniu jak czyni to ATP dopiero w obecności większych niż w przypadku ATP stężeń jonów  $Mg^{++}$ . Wówczas gdy są one obecne w dostatecznej ilości (0,02M) maksymalny skurcz modeli mięśniowych zależy tak samo od stężenia ITP jak od stężenia ATP.

Również Hoffman — Berling (48a) osiągnął pod wpływem ITP w obecności jonów  $Mg^{++}$  maksymalny skurcz jednakowy ze skurczem otrzymanym pod wpływem ATP. Podobny efekt dla UTP pod względem zdolności kurczenia włókien glicerolowych uzyskali Ranney (114) i Kalckar (57). Ranney (115) wykazał, że ITP, UTP, CTP są pod względem aktywności równoważne ATP. Nukleotydy te przy skurczu modeli mięśniowych reagują bezpośrednio — udział pośredni ATP przy współdziałaniu nukleozydodwufosfokinazy jest wykluczony. Ranney badał również skurcz włókien glicerolowych pod wpływem GTP

i adenozynterofosforanu uzyskując jednak w tym przypadku dużo mniejszy stopień skurczenia niż pod wpływem ATP.

Zagadnienie ewentualnego udziału innych nukleotydów niż adenilowe w procesie skurczu mięśni omawia szeroko Weber (146) w referacie na III Kongresie Biochemicznym w Brukseli.

Autor stoi na stanowisku uprzywilejowania ATP przy skurczu fizjologicznym oraz podaje szereg dowodów przemawiających za takim poglądem. Jednym z nich jest konieczność obecności dużych stężeń jonów  $Mg^{++}$  przy wywoływaniu skurczu modeli mięśniowych przez inne niż ATP nukleozydotrójfosforany. Podczas gdy normalnie istniejące stężenie  $Mg^{++}$  równe  $0,5-1,0 \times 10^{-5}$  M wystarczy zupełnie dla reakcji z ATP, to w przypadku pozostałych związków  $Mg^{++}$  musi być obecny w stężeniu aż do  $10^{-2}$  M.

Prócz tego autor podaje, że modele włókien pozbawione całkowicie nukleozyddwufosfokinazy nie rozkładają w ogóle ITP jeżeli jest prócz tego obecny ATP, póki stężenie tego ostatniego znacznie nie spadnie. Stwierdzono to dodając do takich włókien mieszaninę piętnowanego ATP z niepiętnowanym ITP i IDP. Brak było przenoszenia  $^{32}P$  na IDP, a reakcji ulegał wyłącznie ATP.

Również inaczej w stosunku do analogów ATP zachowuje się tzw. czynnik *Marsha-Bendalla*. Jest to obecny w mięśniach czynnik rozkurczowy o niezupełnie jeszcze poznanej budowie. Hamuje on normalnie odszczepianie fosforu od ATP. Nie reaguje jedynie wtedy, gdy stężenie ATP jest niższe od fizjologicznego. Okazuje się, że czynnik *Marsha-Bendalla* nie ma wpływu na napięcie modeli mięśniowych wywołane przez takie nukleotydy jak ITP, GTP i UTP aż do momentu gdy stężenie tych związków jest równe  $10^{-2}$  M. Tymczasem czynnik ten reaguje w przypadku ATP gdy ten jest obecny już w stężeniu  $2,5 \times 10^{-3}$  M.

Wynika z tego, że gdyby inne nukleotydy wywoływały w normalnych warunkach skurcz, to skurcz taki byłby trwały, bowiem czynnik *Marsha-Bendalla* nie działałby na te związki obecne w minimalnym stężeniu w mięśniach.

Zagadnienia omawiane w niniejszym artykule znalazły już w ostatnim czasie zastosowanie również przy badaniu stanów patologicznych w medycynie. Istnieje dziecięca choroba, zwana galaktozemią, charakteryzująca się zaburzeniami metabolizmu galaktozy. U chorych na tę chorobę zostało stwierdzone, że galaktoza, po podaniu z pożywieniem akumuluje się w erytrocytach pod postacią 1-fosfagalaktozy. Badając dalsze jej losy *Kalcarki* wsp. (54, 60) znaleźli, że z enzymów biorących udział w metabolizmie galaktozy tj. fosfagalaktozourydylotransferazy (reakcja I) i galaktowaldenazy (reakcja II) w krwinkach dzieci

chorych brak jest jedynie transferazy. Wskutek tego reakcja I nie może zachodzić i następuje gromadzenie się 1-fosfogalaktozy po podaniu galaktozy. Z drugiej strony obecność galaktowaldenazy zapewnia chorým pozostającym na diecie bezgalaktozowej normalny rozwój. Galaktozę bowiem konieczną chociażby dla budowy cerebrozydów wytwarza sobie organizm *via* reakcja II.

W pewnym związku z powyższym stoją badania Hansena i wsp. (45) nad kurczętami hodowanymi na diecie galaktozowej. Galaktoza podawana w dużych ilościach jest szkodliwa dla kurcząt. Wywołuje ona objawy drżenia, a w bardzo ostrych przypadkach nawet i drgawki epileptyczne. Hansen i wsp. badali zawartość urydynodwufosfoheksos w wątrobie kurcząt karmionych od momentu wyklucia się dietą galaktozową w porównaniu z normalnymi kurczętami.

Stwierdzono, że w wątrobie kurcząt otrzymujących galaktozę następuje gromadzenie się urydynodwufosfoheksos (18,5  $\mu\text{M}$  na 100 g w porównaniu z 8,8  $\mu\text{M}$  w wątrobach normalnych) stanowiących mieszaninę UDPG i UDPGal. W normalnych wątrobach UDPGal występuje również (co jest zupełnie zrozumiałe, gdyż kurczęta muszą ją wytwarzać), ale w dużo mniejszej niż UDPG ilości. Tymczasem w wątrobach kurcząt karmionych galaktozą ilość UDPGal znacznie przewyższa ilość UDPG. Świadczy to o tym, że w przypadku zaburzeń galaktozowych u kurcząt równowaga między UDPG a UDPGal ustalana przez galaktowaldenazę (80), (44) ulega znacznemu zakłóceniu.

Jak widać, na obecnym etapie wiedzy znamy już dobrze budowę i występowanie omówionych w niniejszym artykule związków. Rola ich nie jest jeszcze dokładnie poznana. Jednak dosłownie dzień po dniu zaczynają się ukazywać publikacje dotyczące tej dziedziny i można być pewnym, że w niedługim czasie zrozumiemy znaczenie tych związków. Dziś już wiadomo z pewnością, że nukleotydy adenilowe nie mają monopolu wyłączności w ustrojach. Inne nukleotydy, mimo że stężenie ich jest o wiele niższe od stężenia adenozynefosforanów niewątpliwie odgrywają również ważną rolę w organizmie.

Panu Prof. dr W. Niemierko składam tą drogą podziękowanie za krytyczne przejście tej pracy.

#### LITERATURA

1. R. Abrams, M. Bentley, J. Am. Chem. Soc. **77**, 1479, 1955.
2. N. Anand, V. M. Clark, R. H. Hall, A. R. Todd, J. Chem. Soc. 3665, 1952.
3. P. Ayengar, D. M. Gibson, C. H. Lee Peng, D. R. Sanadi, J. Biol. Chem. **218**, 521, 1956.

4. J. Baddiley, A. P. Mathias, *J. Chem. Soc.* 2723, 1954,
5. A. Balbio, C. Casinovi, 3-ème Inter. Congr. Bioch. Res. Com. 97, 195555.
6. A. Balbio, C. Casinovi, G. Serlupi-Cresenti, *Bioch. Bioph. Actata* 20, 414, 1956.
7. R. F. Bean, W. Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* 212, 411, 1955.
8. R. F. Beers jr., *Nature* 177, 790, 1956.
9. E. L. Bennett, B. J. Krueckel, *Bioch. Bioph. Acta* 17, 515, 1955.
10. P. Berg, W. K. Joklik, *Nature* 172, 1008, 1953.
11. " " " " *J. Biol. Chem.* 210, 657, 1954.
12. R. Bergkvist, A. Deutsch, *Acta Chem. Scand.* 7, 1307, 1953.
13. " " " " " 8, 1105, 1954.
14. " " " " " 8, 1877, 1880, 1889, 1954.
15. R. E. Beyer, J. Glomset, T. Beyer, *Bioch Bioph. Acta* 18, 292, 1955.
16. J. J. Blum *Arch. Biochem.* 55, 486, 1955.
17. J. G. Buchanan, *Arch. Biochem.* 44, 140, 1953.
18. J. G. Buchanan, V. H. Lynch, A. A. Benson, D. F. Bradley, M. Calvin, *J. Biol. Chem.* 203, 935, 1953.
19. E. Cabib, L. F. Leloir, *J. Biol. Chem.* 206, 779, 1954.
20. E. Cabib, L. F. Leloir, C. E. Cardini, *J. Biol. Chem.* 203, 1055, 1953.
21. R. Caputto, L. F. Leloir, C. E. Cardini, A. C. Paladini, *J. Biol. Chem.* 184, 333, 1950.
22. R. Caputto, R. F. Trucco, *Nature* 169, 1061, 1952.
23. C. E. Cardini, A. Paladini, R. Caputto, L. F. Leloir, *Nature* 16565, 191, 1950.
24. C. E. Cardini, L. F. Leloir, J. Chiriboga, *J. Biol. Chem.* 214, 149, 195555.
25. R. Chambers, J. G. Moffott, H. G. Khorane, *J. Am. Chem. Soc.* 7777, 3416, 1955.
26. W. E. Cohn, G. E. Carter, *J. Am. Chem.* 72, 4273, 1950.
27. A. Deutsch, R. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* 8, 1898, 1954.
28. A. Dorfman, J. A. Cifonelli, 3-ème Inter. Congr. Bioch. Res. Comm. 3; 195955.
29. G. J. Dutton, I. D. E. Storey, *Biochem. J.* 55, XXXVII, 1953.
30. " " " " " 57, 275, 1954.
31. G. J. Dutton, *Biochem. J.* 60, XIX, 1955.
32. G. J. Dutton, J. H. Spencer, *Biochem. J.* 63, 80, 1956.
33. B. Filipowicz, *Wiadomości Chem.* 8, 638, 1954.
34. L. B. Gehring, B. Magasagnik, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4685, 1955.
35. J. Gergely, *J. Biol. Chem.* 200, 543, 1953.
36. E. Goldwasser, *Nature*, 171, 126, 1953.
37. " " *Bioch. Bioph. Acta* 13, 341, 1954.
38. " " *J. Am. Chem. Soc.* 77, 6083, 1955.
39. M. Grunberg-Manago, S. Ochoa, *J. Am. Chem. Soc.* 77, 3165, 1955.
40. M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz, *Science*, 122, 907, 1955.
41. M. Grunberg-Manago, S. Ochoa, 3-ème Inter. Congr. Bioch. Res. Comm. 37, 1955.
42. M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz, S. Ochoa, *Bioch. Bioph. Acta* 20, 269, 1956.
43. R. H. Hall, H. G. Khorane, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5056, 1954.
44. R. G. Hansen, E. M. Craine, *J. Biol. Chem.* 208, 293, 1954.

45. R. G. Hansen, R. A. Freedland, H. M. Scott, *J. Biol. Chem.* **219**, 391, 1956.
46. R. G. Hansen, R. A. Freedland, *J. Biol. Chem.* **216**, 303, 1955.
47. A. Heppel, P. J. Ortiz, S. Ochoa, *Science* **123**, 415, 1956.
48. E. Herbert, v. R. Potter, Y. Takagi, *J. Biol. Chem.* **213**, 923, 1955.
- 48a H. Hoffman-Berling, *Bioch. Bioph. Acta* **14**, 182, 1954.
49. R. B. Hurlbert, *Feder. Proc.* **12**, 222, 1953.
50. R. B. Hurlbert, v. R. Potter, *J. Biol. Chem.* **209**, 1, 1954.
51. R. B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brunum, v. R. Potter, *J. Biol. Chem.* **209**, 23, 1954.
52. R. B. Hurlbert, P. Reichard, *Acta Chem. Scand.* **8**, 1099, 1954.
53. R. B. Hurlbert, P. Reichard, *Acta Chem. Scand.* **9**, 251, 1955.
54. K. J. Isselbacher, E. P. Anderson, K. Kurah'aski, H. M. Kalckar, *Science* **123**, 635, 1956.
55. W. K. Joklik, *Bioch. Bioph. Acta* **16**, 610, 1955.
56. H. M. Kalckar, *Bioch. Bioph. Acta* **12**, 250, 1953.
57. " " *Science* **119**, 479, 1954.
58. H. M. Kalckar, B. Braganca, A. Munch-Peterson, *Nature* **172**, 1038, 1953.
59. H. M. Kalckar, *Acta Chem Scand.* **8**, 1103, 1954.
60. H. M. Kalckar, E. P. Anderson, K. J. Isselbacher, *Bioch. Bioph. Acta* **20**, 262, 1956.
61. E. R. M. Kay, J. N. Davidson, *Experientia* **11**, 439, 1955.
62. E. P. Kennedy, S. B. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 250, 1955.
63. W. G. Kenner, A. R. Todd, F. J. Weymouth, *J. Chem. Soc.* 3675, 1952.
64. W. G. Kenner, A. R. Todd, R. F. Webb, *J. Chem. Soc.* 2843, 1954.
65. W. G. Kenner, A. R. Todd, R. F. Webb, F. J. Weymouth, *J. Chem. Soc.* 2288, 1954.
66. W. W. Kielley, H. M. Kalckar, L. B. Bradley, *J. Biol. Chem.* **219**, 95, 1956.
67. A. Kleinzeller, *Biochem. J.* **36**, 729, 1942.
68. R. Klimek, J. K. Parnas, *Biochem. Z.* **252**, 392, 1932.
69. R. Klimek, J. K. Parnas, *Zeit. physiol. Chem.* **258**, 30, 1933.
70. F. D. Korn, Ch. N. Renny, R. C. Wasilejko, J. M. Buchanan, *J. Biol. Chem.* **217**, 875, 1955.
71. A. Kornberg *Phosphorus Metabolism*, Johns Hopkins Press Baltimore **1**, 390, 1951.
72. A. Kornberg, I. Liebermann, E. S. Simms, *J. Biol. Chem.* **215**, 389, 1955.
73. A. Kornberg, I. Liebermann, E. S. Simms, *J. Biol. Chem.* **215**, 417, 1955.
74. H. A. Krebs, R. Hems, *Bioch. Bioph. Acta* **12**, 172, 1953.
75. H. A. Krebs, R. Hems, *Biochem. J.* **61**, 435, 1955.
76. U. Lagerkvist, *Acta Chem. Scand.* **9**, 1028, 1955.
77. J. M. Langhlin, G. Schiffmai, A. Szent-Györgyi, *Bioch. Bioph. Acta* **17**, 160, 1955.
78. L. F. Leloir, *Adv. Enzym.* **14**, 193, 1953.
79. " " *Phosphorus Metabolism*, Johns Hopkins Press Baltimore **1**, 77, 1951.
80. L. F. Leloir, *Arch. Biochem.* **33**, 186, 1951.
81. L. F. Leloir, E. Cabib, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5445, 1953.
82. L. F. Leloir, C. E. Cardini, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 6084, 1953.
83. " " " " *Bioch. Bioph. Acta* **12**, 15, 1953.
84. " " " " *J. Biol. Chem.* **214**, 157, 1955.

85. I. Lieberman, A. Kornberg, E. S. Simms, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3608, 1954.
86. I. Lieberman, A. Kornberg, E. S. Simms, *J. Biol. Chem.* **215**, 403, 1955.
87. I. Lieberman, A. Kornberg, E. S. Simms, *J. Biol. Chem.* **215**, 429, 1955.
88. J. Lieberman, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2661, 1955.
89. " " " " " " **77**, 3373, 1955.
90. K. Ling, H. A. Lardy, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 2842, 1954.
91. S. A. Lipton, S. A. Morell, A. Frieden, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5449, 1953.
92. W. Manson, *Bioch. Bioph. Acta* **19**, 398, 1956.
93. D. H. Marrian, *Bioch. Bioph. Acta*, **12**, 492, 1953.
94. " " " " **13**, 278, 1954.
95. E. S. Maxwell, H. M. Kalckar R. M. Burton, *Bioch. Bioph. Acta* **18**, 444, 1955.
96. A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* 2476, 1949.
97. G. T. Mills, R. Ondarza, E. E. B. Smith, *Bioch. Acta* **14**, 159, 1954.
98. W. F. H. M. Mommaerts, *J. Gen. Physiol.* **31**, 361, 1948.
99. A. Munch-Petersen, H. M. Kalckar, E. Cutolo, E. E. B. Smith, *Nature* **172**, 1036, 1953.
100. A. Munch-Petersen, *Acta Chem. Scand.* **8**, 1102, 1954.
101. " " " *Arch. Biochem.* **55**, 592, 1955.
102. " " " *Acta Chem. Scand.* **9**, 1523, 1955.
103. " " " " " " **9**, 1357, 1955.
104. A. C. Paladini, L. Leloir, *Biochem J.* **51**, 426, 1952.
105. J. T. Park, M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.* **179**, 585, 1949.
106. J. T. Park, *Feder. Proc.* **9**, 213, 1950.
107. E. T. Park, *Phosphorus Metabolism*, Johns Hopkins Press Batimore **1**, 93, 1951.
108. E. T. Park, *J. Biol. Chem.* **194**, 877, 885, 897, 1952.
109. G. W. Plant, *J. Biol. Chem.* **217**, 235, 1955.
110. H. G. Pontis, *J. Biol. Chem.* **216**, 195, 1955.
111. H. Portzehl, *Bioch. Bioph. Acta* **14**, 195, 1954.
112. R. L. Potter, S. Schlesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6714, 1955.
113. E. Pragoj, *osobiste doniesienie*
114. R. E. Ranney, *Am. J. Physiol.* **178**, 517, 1954.
115. " " *Science* **122**, 642, 1955.
116. Ch. N. Renny, W. T. Renny, J. M. Buchanan, *J. Biol. Chem.* **217**, 885, 1955.
117. W. J. Rutter, R. G. Hansen, *J. Biol. Chem.* **202**, 311, 323, 1953.
118. H. Z. Sable, P. W. Wieber, A. E. Conen, M. R. Kane, *Bioch. Bioph. Acta* **13**, 156, 1954.
119. J. Sacks, *Bioch. Bioph. Acta* **16**, 436, 1955.
120. J. Sacks, L. Lutwak, P. D. Hurley, *Am. Chem. Soc.* **76**, 424, 1954.
121. D. R. Sanadi, D. M. Gibson, P. Ayengar, *Bioch. Bioph. Acta* **14**, 434, 1954.
122. D. R. Sanadi, D. M. Gibson, P. Ayengar M. Jacob, *J. Biol. Chem.* **218**, 505, 1956.
123. H. Schmitz, R. B. Hurlbert, v. R. Potter, *J. Biol. Chem.* **209**, 41, 1954.
124. H. Schmitz, *Bioch. Bioph. Acta* **14**, 160, 1954.
125. " " *Naturwissenschaften* **41**, 120, 1954.
126. " " *Biochem. Z.* **325**, 555, 1954.
127. " " *J. J. Sankkonen*, 3-ème Inter. Cong. Bioch. Res. Comm, **72**, 1955.



128. E. E. B. Smith, A. Munch-Petersen, G. T. Mills, *Nature* **172**, 1038, 1953.
129. E. E. B. Smith, G. T. Mills, *Bioch. Bioph. Acta* **13**, 386, 1954.
130. " " " " " " " " **13**, 587, 1954.
131. " " " " " " " " **18**, 152, 1955.
132. S. S. Spicer, W. J. Bowen, *J. Biol. Chem.* **188**, 741, 1951.
133. J. D. Storey, G. T. Dutton, *Biochem. J.* **59**, 279, 1955.
134. J. L. Strominger, *Feder. Proc.* **12**, 277, 1953.
135. " " " " **13**, 307, 1954.
136. J. L. Strominger, L. A. Heppel, E. S. Maxwell, *Arch. Biochem.* **52**, 488, 1954.
137. J. L. Strominger, H. M. Kalckar, J. Axelrod, E. S. Maxwell, *J. Am. Chem.* **76**, 6411, 1954.
138. J. L. Strominger, *Bioch. Bioph. Acta* **16**, 616, 1955.
139. " " *Phosphorus Metabolism* J. Hopkins Press Baltimore **2**, 422, 1952.
140. J. L. Strominger, *Bioch. Bioph. Acta* **17**, 283, 1955.
141. J. L. Strominger, L. A. Heppel, E. S. Maxwell, 3-ème Congr. Inter. *Bioch. Res. Comm.* **58**, 1955.
142. D. Tabone, J. Tabone, *Compt. rend. hebd. acad. sci.* **242**, 302, 1956.
143. R. E. Trucco, *Arch. Biochem.* **34**, 482, 1951.
144. " " *Nature* **174**, 1103, 1954.
145. H. G. P. Videla, *Ciencia e Invest.* **10**, 236, 1954 cyt. wg (133)
146. H. H. Weber, 3-ème Congr. Inter. *Bioch. Rapports*, 1955.



## Wizyta wybitnego uczonego angielskiego w Polsce

Na zaproszenie Wydziału Nauk Biologicznych Polskiej Akademii Nauk w okresie od 23 X do 13 XI b. r. bawił w Polsce wybitny biochemik angielski — prof. dr Stanisław Kazimierz Kon, dyrektor Oddziału Nauki Żywności w National Institute for Research in Dairying w Reading. Prof. Kon jest specjalistą zagadnień związanych z biochemią zwierząt hodowlanych oraz witaminem B<sub>12</sub>.

Celem przyjazdu prof. Kona do Polski było zapoznanie pracowników nauki z osiągnięciami badań prowadzonych przez wybitnego uczonego jak i przez Oddział Nauki Żywności.

Prof. Kon żywo interesuje się rozwojem nauk biochemicznych i weterynaryjnych w polskich ośrodkach naukowych. W związku z tym zwiedził następujące placówki naukowe: w Warszawie — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Zakład Biochemii PAN, Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. Instytut Hematologii, Główną Szkołę Gospodarstwa Wiejskiego; w Krakowie — Zakład Chemii Fizjologicznej A. M.; w Bydgoszczy w Puławach — Instytut Weterynarii; w Lublinie i Poznaniu — Wyższą Szkołę Rolniczą oraz Zakład Mięsoznawstwa; w Gdyni — Morski Instytut Rybacki.

W placówkach tych prof. S. K. Kon zapoznał się z tematyką i metodyką badań jak również z organizacją zakładów. Wielogodzinne rozmowy i dyskusje prowadzone zarówno z kierownikami placówek jak i studentami wyjaśniły wiele wątpliwości wysuwanych przez słuchaczy.

W Warszawie dn. 5. XI. b.r. S. K. Kon na zaproszenie Komitetów Biochemicznego i Nauk Rolniczych PAN wygłosił odczyt na temat „Antybiotyki w żywieniu zwierząt hodowlanych” (streszczenie odczytu poniżej).

Wizyta prof. S. K. Kona przyczyniła się niewątpliwie do zacieśnienia stosunków między polskimi biochemikami i fizjologami zwierząt a jednym z największych instytutów agrobiologicznych w Anglii reprezentowanym przez wybitnego uczonego.

## Antybiotyki w żywieniu zwierząt hodowlanych

(Streszczenie referatu wygłoszonego przez prof. S. K. Kona w PKiN dnia 5. XI. 1956 r.)

W 1947 r. w jednym z Instytutów Badawczych w Stanach Zjednoczonych zauważono, że zwierzęta doświadczalne otrzymujące streptomycynę szybciej przybywają na wadze niż zwierzęta kontrolne. Wtedy jednak nie zwrócono na ten fakt uwagi.

W 1948 r. w kilku krajach otrzymano w stanie czystym witaminę B<sub>12</sub> co spowodowało duże zainteresowanie tym środkiem leczniczym. Ponieważ najlepszym źródłem witaminy B<sub>12</sub> okazały się materiały odpadowe przy produkcji antybiotyków, zwłaszcza aureomycyny ponownie zainteresowano się wpływem antybiotyków na przyrost na wadze zwierząt hodowlanych. Stwierdzono mianowicie, że niewielki dodatek aureomycyny do karmy trzody chlewnej przyspiesza jej wzrost.

W Anglii stosunek do tego odkrycia był raczej konserwatywny. Ministerstwo Rolnictwa zasięgało u fachowców opinii co do istoty działania antybiotyków i ewentualnego ich zastosowania w praktyce hodowlanej. Prof. Kon wyraził wtedy pogląd, że korzystny wpływ na wzrost zwierząt spowodowany jest nie działaniem antybiotyku lecz witaminu B<sub>12</sub> który może znajdować się w niezupełnie oczyszczonych preparatach antybiotyków. Pogląd ten okazał się później błędny — antybiotyki w stanie krystalicznym, całkowicie oczyszczone również działają korzystnie na przyrost wagi zwierząt.

Rada Badań Rolniczych postanowiła przeprowadzić doświadczenia celem stwierdzenia, czy w warunkach angielskich lub szkockich antybiotyki działają korzystnie na przyrost wagi zwierząt oraz czy nie wywierają wpływu szkodliwego. Pierwsze doświadczenia przeprowadzono na świniach, dodając aureomycyny do karmy tych zwierząt. Stwierdzono przyrost na wadze o ok 18% większy od przyrostu na wadze zwierząt karmionych dietą podstawową. Zauważono jednocześnie, że przyrost na wadze był większy u tych zwierząt, które otrzymywały w diecie więcej białka roślinnego (makuchy). Zwierzęta otrzymujące więcej białka zwierzęcego (mączka rybna) wykazywały również przyrost na wadze po dodaniu antybiotyku, mniejszy jednak w porównaniu z poprzednio omówionymi. Poza pewnym przyrostem na wadze zwierząt stwierdzono, że dodanie antybiotyku do karmy zwiększa jej użyteczność.

W następnych doświadczeniach zwierzęta uszeregowano według dziennego przyrostu na wadze. Wykazano, że im mniejszy był przyrost na wadze bez antybiotyków, tym korzystniejszy wpływ wywołało dodanie antybiotyku. Podobną zależność stwierdzono, badając wpływ antybiotyku na użyteczność karmy: gdy użyteczność karmy była stosunkowo dobra — wpływ antybiotyków był stosunkowo niewielki; gdy użyteczność karmy była bardzo niska, wpływ antybiotyków był znacznie większy.

Dawki stosowanych antybiotyków, wykazujące korzystne działanie są bardzo małe: np. penicylina 8 mg/kg karmy (czyli 8 g/-tonę). Dawki takie są optymalne pod względem działania na przyrost na wadze zwierząt a jednocześnie pod względem kosztów.

Poza doświadczeniami na świniach, omówionymi powyżej, przeprowadzano badania, dotyczące wpływu antybiotyków na przyrost na wadze kurcząt. Jedną z ciekawszych jest obserwacja wskazująca, że najbardziej zaznacza się korzystny wpływ antybiotyków w pierwszej fazie wzrostu kurcząt (do 7 tygodni). Użyteczność karmy jest w tym okresie również największa. Ten korzystny wpływ maleje w miarę wzrostu kurcząt. Na podstawie tych doświadczeń stwierdzić można, że im intensywniejszy jest wzrost zwierzęcia, tym większy wpływ antybiotyków.

W doświadczeniach na cielętach, otrzymujących aureomycynę, badano wpływ środowiska na działanie antybiotyku. Aureomycynę podawano cielętom kupnym i cielętom własnego chowu z farmy Instytutu. Korzystniejsze działanie na przyrost na wadze wywierały antybiotyki u zwierząt kupnych, po zmianie środowiska. Wpływ antybiotyków na przyrost na wadze cieląt własnego chowu był stosunkowo nieznaczny.

Pewna grupa doświadczeń dotyczyła działania antybiotyków na zwierzęta pozbawione siary, a tym samym ciał ochronnych w niej zawartych. Cielęta podzielono na następujące grupy: A) otrzymujące siarę, B) nie otrzymujące siary, C) nie otrzymujące siary a otrzymujące antybiotyki. Pierwsza grupa zwierząt rozwijała się dobrze. W drugiej grupie zwierząt dochodziło do spadku na wadze i biegunek. Trzecia grupa zwierząt rozwijała się dobrze, przy czym zwierzęta otrzymujące samą penicylinę rozwijały się gorzej w stosunku do zwierząt otrzymujących penicylinę i aureo-

mycynę. Może to być spowodowane faktem, że aureomycyna działa skuteczniej na *Bacterium Coli*.

Obserwacji dokonywanych na poszczególnych antybiotykach i poszczególnych rodzajach zwierząt nie można uogólniać. Doświadczenia, z których wynika, że penicylina działa korzystnie na wzrost pewnego gatunku zwierząt bynajmniej nie świadczą o tym, że ten sam antybiotyk będzie działał korzystnie na inny gatunek. Należy zawsze mówić o działaniu antybiotyku wymieniając rodzaj antybiotyku i rodzaj zwierząt.

### Próby wytłumaczenia istoty działania antybiotyków na przyrost na wadze zwierząt

Działanie antybiotyku na wzrost zwierzęcia może być a priori zależne od następujących czynników: rodzaj antybiotyku, ilość antybiotyku, wiek zwierzęcia, skład paszy i środowisko.

Stwierdzono, że u cieląt aureomycyna działa korzystniej niż penicylina. Dla trzody chlewnej działanie tych dwóch antybiotyków jest prawdopodobnie jednakowe, chociaż niektórzy autorzy wolą aureomycynę. Dla kurcząt korzystniejsza jest penicylina. Stosowane ilości antybiotyków — tenamycyny i aureomycyny są podobne: 10 — 15 mg/kg karmy. Najlepiej na antybiotyki oddziałują zwierzęta najmłodsze, w fazie intensywnego wzrostu. Antybiotyki dają lepsze wyniki u zwierząt karmionych paszą z przewagą białka roślinnego.

Przy omawianiu istoty działania antybiotyków można rozróżnić kilka możliwych mechanizmów: 1) przeciwbakteryjne działanie na florę jelitową zwierząt, 2) bezpośredni wpływ na jelito — antybiotyki być może zmieniają przepuszczalność jelita, 3) bezpośredni wpływ na organizm zwierzęcia.

Bezpośredni wpływ na organizm zwierzęcia badano w doświadczeniach, w których zwierzęta te hodowano w warunkach jałowych, tak że jelito było pozbawione nawet saprofitów. Metoda ta jest bardzo kosztowna i skomplikowana. Zwierzęta rozwijają się, utrzymywane aseptycznie, w przestrzeni całkowicie odizolowanej od świata zewnętrznego. Jakkolwiek początkowo nie zaobserwowano korzystnego wpływu podawania antybiotyków, to ostatnie prace wydają się wskazywać, że antybiotyki działają dodatnio także na zwierzęta, hodowane w warunkach jałowych. Mimo trudności związanych z przeprowadzaniem tego rodzaju doświadczeń konieczne jest uzyskanie niedwuznacznych wyników. Wyniki te rozstrzygną bowiem, czy antybiotyki działają tylko na florę bakteryjną czy także na makroorganizm.

Inna metoda, mająca na celu badanie bezpośredniego wpływu antybiotyku na organizm zwierzęcia, a wyeliminowanie jego działania na bakterie, polega na podawaniu antybiotyku np. penicyliny unieczynnionej za pomocą wyższej temperatury, lub metali ciężkich. W metodzie tej wyniki nie są całkowicie zgodne: penicylina unieczynniona ma korzystny wpływ na przyrost na wadze u świń, nie ma natomiast wpływu u kurcząt.

Wydaje się, że z wymienionych możliwych mechanizmów działania antybiotyków największe znaczenie musi mieć wpływ na florę jelitową. Można tu wyodrębnić a priori kilka punktów: a) usuwanie drobnoustrojów chorobotwórczych, b) zmiany we florze jelitowej — pobudzanie wzrostu drobnoustrojów które produkują znane lub nieznanne witaminy, c) hamowanie wzrostu drobnoustrojów współzawodniczących ze zwierzęciem o witaminy, d) usuwanie drobnoustrojów obniżających potencjał rozwoju zwierzęcia.

Badanie wpływu penicyliny na zwierzęta karmione dietą niedoborową wykazało, że z wyjątkiem diety pozbawionej kwasu nikotynowego, antybiotyki wywołały przyrost na wadze.

Przeprowadzono także doświadczenia mające na celu zbadanie wpływu penicyliny na odkładanie witaminu A w wątrobie kurzej. Stwierdzono, że gdy podaje się kurczęciu witamin A lub  $\beta$ -karoten, to przy jednoczesnym podawaniu penicyliny zwiększa się odkładanie witaminu A w wątrobie.

W doświadczeniach wykonywanych w 2 różnych pracowniach ustalono, że wpływ antybiotyków na przynosił wagi zwierząt zależy jest w pewnym stopniu od środowiska. W pracowni, którą określono mianem „zakazanej” (nie chodziło tu o zakażenie znanymi czynnikami patogennymi, lecz o pewien wpływ obniżający potencjał rozwojowy zwierzęcia) podawanie penicyliny dawało lepsze wyniki niż w innej pracowni, którą uważano za „niezakazaną”. Pewne doświadczenia wydają się wskazywać, że „zakażenie” to wywołane jest przez *Clostridium Welchii*.

Badano także wpływ antybiotyków na wagę jelita i jego długość — wyniki jednak nie miały większego znaczenia.

W zakończeniu referatu podkreślono, że konieczne są dalsze badania w celu wyświetlenia istoty działania antybiotyków. Zagadnienie to powinno być rozpatrywane oddzielnie dla każdego zwierzęcia i dla każdego antybiotyku, zachodzą tu bowiem istotne różnice. Poza znaczeniem teoretycznym badania te mają dużą wartość praktyczną.

Hanna Michałek

## Wydawnictwa z dziedziny biochemii

(Książki z dziedziny biochemii w planie wydawnictw rolniczych)

Redakcja Postępów Biochemii pragnie informować czytelników o nowych pozycjach literatury z dziedziny biochemii, które ukażą się w 1957 r. w wydawnictwach polskich. W bieżącym omawiamy zamierzenia wydawnicze w zakresie biochemii Państwowego Wydawnictwa Rolniczego i Leśnego na podstawie opracowania, które na naszą prośbę, przygotowała Redakcja Literatury Naukowej i Podręczników dla Szkół Wyższych.

Mimo oczywistości faktu olbrzymiego znaczenia biochemii w rozwoju innych dziedzin biologii i w życiu gospodarczym nie można powiedzieć, że biochemia, znalazła dotychczas w nauce polskiej należne jej miejsce.

Spełnienie nader słusznego postulatu pracy nad odpowiednim rozwojem biochemii wymaga oczywiście przede wszystkim szerszego niż dotychczas uwzględnienia jej w programach nauczania, dostarczenia dostatecznych środków na rozbudowę pracowni biochemicznych, ponadto również znacznego rozszerzenia działalności wydawniczej i dziedziny publikacji biochemicznych.

Należy podkreślić, że ani liczba wydanych dotychczas w Polsce książek biochemicznych dotyczących naukowych podstaw rolnictwa, ani zakres omawianych w tych książkach zagadnień nie odzwierciedlały w dostatecznej mierze tendencji rozwojowych nauk światowej. W ostatnich jednak latach stała się oczywistą ko-

niezbędność uwzględnienia, w szerszym niż dotychczas zakresie, problematyki biochemicznej w planach wydawnictw rolniczych. W związku z realizacją zamierzeń w tej dziedzinie w latach 1956 i 1957 ukażą się, wydane przez Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, następujące podręczniki i monografie naukowe:

1. B. Skarżyński: *Chemia fizjologiczna*. Tom I s. około 450,

Tom ten opracowany przy udziale prof. dra I. Reifera, obejmuje głównie statykę biochemiczną (aminokwasy i białka, kwasy nukleinowe i nukleoproteidy, barwiki pirolowe, hemoproteidy, alkaloidy, cukrowce, glikozydy, tłuszczowce, sterydy, karotenoidy, terpeny) i enzymologię (termodynamiczne podstawy i kinetyka reakcji enzymatycznych, wpływ temperatury, pH i elektrolitów na przebieg reakcji enzymatycznych, chemiczna struktura enzymów, inhibitory i aktywatory, odwracalność reakcji enzymatycznych, ilościowe oznaczanie enzymów, klasyfikacja enzymów).

Książka zawiera obszerniejszy materiał niż zbiór podstawowych wiadomości, może zatem służyć jako podręcznik nie tylko dla studentów wyższych uczelni rolniczych, uniwersytetów i akademii medycznych, lecz również dla biologów, lekarzy i chemików.

*Chemia fizjologiczna* zaznajamia czytelnika ze stanem wiedzy do 1955 r. i uwzględnia potrzeby czytelnictwa wynikającego z problematyki agrobiologicznej. Książka ukaże się na rynku księgarskim w I kwartale 1957 r.

2. E. Baldwin.: *Biochemia dynamiczna* (Dynamic Aspects of Biochemistry). s. około 500.

Przekład został dokonany na podstawie drugiego wydania angielskiego z 1952 r. Przedmiotem książki jest nauka o enzymach (ogólne właściwości enzymów, istota procesu katalitycznego, energetyka biologiczna, hydrolazy i enzymy sprzęgające, transferazy i izomerazy, enzymy utleniające, układy dehydrogenazy) i metabolizm (metody stosowane w badaniach nad przemianą materii, trawienie i wchłanianie, metabolizm białek i aminokwasów, przemiany związków purynowych, przemiany węglowodanów oraz tłuszczowców).

Dzieło Baldwina jest obszerną pracą przeglądową o szczególnych walorach dydaktycznych i naukowych. W uznaniu wielkiej wartości tej pracy przyznano autorowi w r. 1952 nagrodę Cortina-Ulisse, udzielaną za najlepszą publikację europejską napisaną w okresie ostatnich pięciu lat.

Wydanie polskie zaopatrzone będzie w przypisy stanowiące uzupełnienie lub korektę tekstu autora, zgodnie z nowszymi wynikami badań.

Książka przeznaczona jest dla takiego samego zespołu odbiorców, jak wymieniona poprzednio *Chemia fizjologiczna*; ukaże się na rynku księgarskim w II kwartale 1957 r.

3. T. Mann: *Biochemia nasienia* (The Biochemistry of Semen. London 1954). s. około 200.

Praca Manna jest monografią na wysokim poziomie naukowym, stanowiącą syntezę osiągnięć nauki w zakresie biochemii nasienia zwierzęcego (spermy). Oparta jest na bibliografii złożonej z około 900 publikacji (w tym kilkadziesiąt prac własnych autora).

W pierwszym rozdziale omówione są takie zagadnienia jak: spermatogeneza i dojrzewanie plemników, ruch wędrowka w żeńskich drogach rodnych i „uczynnianie” właściwości chemizmu i morfologii plemników, plazma nasienia (ogólna charakterystyka), funkcja wydzielnicza męskich gruczołów dodatkowych, znaczenie fizjologiczne plazmy nasienia itp.

Drugi rozdział poświęcony jest chemicznym i fizycznym właściwościom nasienia. Dalsze rozdziały omawiają następujące zagadnienia:  
wpływ czynników zewnętrznych, hormonów i warunków środowiska;  
enzymy wewnątrzkomórkowe, metaloproteidy, nukleoproteidy oraz inne składniki białkowe plemników;  
składniki białkowe i enzymy plazmy nasienia;  
tłuszczowce i ich rola w metabolizmie nasienia;  
fruktoza i fruktozylaza.

Dalej podany jest szczegółowy przegląd i charakterystyka takich składników nasienia jak: spermina, cholina, ergotioneina i inne zasady nasienia oraz kwas cytrynowy i inozytol.

Dzięki krytycznej ocenie metodyki pracy poszczególnych autorów Mann niejako selekcjonuje wiarygodność poszczególnych doniesień, co ma duże znaczenie dla pracowników nie dysponujących dostatecznym przygotowaniem biochemicznym.

Problematyka rozwinięta przez Manna nabiera ostatnio szczególnego znaczenia praktycznego w związku z coraz szerzej stosowanym w zootechnice sztucznym zapładnianiem.

*Biochemia nasienia* powinna zainteresować przede wszystkim biochemików, zootechników i lekarzy wet., ale znajdują w niej wiele ciekawego materiału również lekarze.

Książka zostanie wydana w III kwartale 1957 r.

4. J. B. S. Haldane: *Biochemia genetyczna* (The Biochemistry of Genetics. London 1954). s. około 200.

Publikacja ta przedstawi czytelnikowi polskiemu nowy, na ogół nie znany u nas dział nauki. Sposób ujęcia tematu jest taki, że treść książki może być łatwo przyswojona zarówno przez biochemika, który ma słabsze przygotowanie z genetyki jak i przez genetyka mniej obeznanego z biochemią.

W pierwszym rozdziale autor wprowadza czytelnika w elementy genetyki. W rozdziale drugim omawiane są produkty działania genów. W dalszym ciągu przedstawione są zagadnienia genów kontrolujących procesy biosyntetyczne u grzybów, problemy: genetyki bakteryjnej, drożdży i wirusów w ujęciu biochemicznym — następnie biochemii genetyki roślin wyższych, oraz genetyki zwierzęcej (w tym i człowieka). Końcowe rozdziały poświęcone są problemowi pozajądrowych wpływów na czynność biochemiczną oraz zagadnieniom mutacji i reprodukcji genów.

Książka zawiera bardzo dużo materiału z dziedziny genetyki (od roku 1953). Postawa autora wobec współczesnych prądów genetycznych jest niezwykle obiektywna, co znalazło swój wyraz również w doborze bibliografii.

Rozwój biochemii genetycznej stanowi szczególnie charakterystyczny przykład „biochemizacji” nauk o życiu. Bliższe omówienie tego zagadnienia znajdzie czytelnik w artykule J. Meduskiego (Kosmos, Nr. 4, 1956).

Zapoznanie się z problematyką biochemii genetycznej otwierającej nowe i poważne perspektywy rozwojowe dla genetyki, a tym samym dla rolnictwa, jest nagłą koniecznością zarówno dla genetyków jak i biochemików zajmujących się problematyką rolniczą, szczególnie ze względu na duże zamierzenie genetyki w Polsce w ubiegłym dziesięcioleciu.

*Biochemia genetyczna* ukaże się na półkach księgarskich w III kwartale 1957 r.

5. *Metoda atomów znaczonych w biologii* Метод меченых атомов в диологии Москва 1955. s. około 450.

Książka ta ukaże się jako drugi tom serii wydawnictw pt.: *Zastosowanie izoto-*



pów w *biologii i rolnictwie* (pierwszy tom tej serii pt.: *Zastosowanie izotopów w badaniach rolniczych*, zawierający zbiór przekładów z języków: rosyjskiego, angielskiego i francuskiego, został wydany w maju b. r.). Celem tej serii jest zapoznanie polskich studentów, biologów i pracowników naukowych rolnictwa z metodyką izotopową i osiągnięciami uzyskanymi przy jej zastosowaniu. W książkach wydanych w ramach „serii izotopowej” znajdą wiele interesującego materiału również lekarze i pracownicy naukowcy przemysłu spożywczego. Podjęcie szerokiej akcji wydawniczej w tej dziedzinie wynikało ze zrozumienia faktu, że burzliwy rozwój biochemii, oraz fizjologii w ostatnim dziesięcioleciu i idący za tym wielki postęp nauk rolniczych i medycznych, należy przypisać w znacznej mierze wprowadzeniu metody izotopowej.

Spopularyzowanie metody izotopowej w Polsce wydaje się tym bardziej pilne i konieczne, że zgodnie z planem, w przyszłym roku mają być u nas uruchomione akceleratorzy oraz reaktor atomowy. Należy się spodziewać, że podobnie jak i w innych krajach, nastąpi wówczas szybkie i szerokie wprowadzenie metody izotopowej w różnych dziedzinach, a między innymi również w badaniach rolniczych.

*Metoda atomów znaczonych w biologii* została opracowana pod redakcją wybitnego badacza radzieckiego prof. A. Kuzina. Książka ta jest obszerniejszym podręcznikiem wprowadzającym czytelnika w podstawy teoretyczne i w metodykę ogólną badań z zastosowaniem izotopów. Wydanie polskie ukaże się w III kwartale 1957 r.

Następne tomy serii wydawnictw poświęconej metodyce izotopowej w biologii i rolnictwie opracowane zostaną przez autorów polskich i zawierać będą przegląd osiągnięć uzyskanych przy zastosowaniu izotopów (z uwzględnieniem możliwie najnowszych badań), oraz szczegółowsze odpowiednio dobrane wiadomości metodyczno-techniczne niezbędne do rozpoczęcia badań w pracowniach izotopowych.

Tom III serii (praca zbiorowa pod redakcją prof. dra J. Chmielewskiej, doc. dra Z. Kasprzyk i mgra W. Brzeskiego) omówi problem zastosowania pierwiastków izotopowych do badań w biochemii i fizjologii roślin.

Tom IV serii (praca zbiorowa pod redakcją doc. dr J. Meduskiego i kand. L. Janoty) poświęcony będzie zastosowaniu metody izotopowej w mikrobiologii, oraz zagadnieniu działania promieniowania na mikroorganizmy.

Oba te tomy ukażą się w IV kwartale 1957 r.

Planowane jest również wydanie dalszych tomów dotyczących zastosowania izotopów w biochemii i fizjologii zwierząt (pod redakcją prof. dra B. Skarżyńskiego, kand. L. Wojtczaka i dr W. Ostrowskiego) oraz w badaniach rolniczych (pod redakcją prof. dra M. Górskiego i mgra St. Moskala).

6. A. Mieczyska i J. Gołębiowska: *Krązenie azotu w przyrodzie*. s. około 200.

Książka omawiać będzie następujące zagadnienia: występowanie azotu w przyrodzie i jego znaczenie dla żywych organizmów, wiązanie wolnego azotu, charakterystyka organizmów zdolnych do wiązania wolnego azotu, mechanizm wiązania wolnego azotu przez organizmy symbiotyczne i wolno żyjące, metabolizm azotowy w organizmach roślinnych i zwierzęcych, przemiany azotowe w drobnoustrojach, rozkład i przemiany związków azotowych poza organizmami żywymi, przemiany azotowe w glebie i nawozach organicznych.

Praca jest monografią — przeznaczoną dla studentów wyższych szkół rolniczych, biologów i pracowników naukowych rolnictwa. Została wydana w II kwartale 1957 r.

W planie wydawnictw rolniczych znajdują się również książki, które trudno zaliczyć do biochemicznych, ale uwzględniające dość obszernie problematykę biochemiczną. Do publikacji takich należą następujące prace, których przekłady ukażą się również w 1957 r.:

Dwight Espe i Vearl K. Smith: *Secretion of Milk*. Iowa 1952, s. 291;

Virgil Greene Lilly, Horace L. Barnett: *Physiology of the Fungi*. New York 1951, s. 464.

Podany przegląd zaplanowanych do wydania książek biochemicznych z dziedziny naukowych podstaw rolnictwa nie zaspakaja oczywiście w dostatecznym stopniu potrzeb czytelnictwa. Rzucającym się w oczy jest brak publikacji ze specjalnych dziedzin biochemii stosowanej dotyczących problemów związanych ściślej z uprawą roślin i hodowlą zwierząt. Chodzi tu o większe prace o charakterze podręczników, a przede wszystkim o monografie. W celu uzupełnienia tych braków PWRiL podjęło już pewne zamierzenia w porozumieniu z przedstawicielami nauki. Zamierzenia te będą realizowane w roku 1958 i dalszych latach. Należy się spodziewać dalszej inicjatywy w tej dziedzinie zarówno ze strony placówek naukowych biologicznych jak i rolniczych.

*Redakcja Literatury Naukowej i Podręczników  
dla Szkół Wyższych Państwowego Wydawnictwa  
Rolniczego i Leśnego*

## SPIS TREŚCI

J. Pawełekiewicz — Witaminy grupy B <sub>12</sub> i ich biosynteza . . . . .	3
H. Fraenkel-Conrat — Odbudowanie rozłożonego wirusa . . . . .	39
W. Drabikowski — Nowo odkryte nukleotydy polifosforanowe i ich rola w organizmie . . . . .	47

### AKTUALNOŚCI BIOCHEMICZNE

Wizyta wybitnego uczonego angielskiego w Polsce . . . . .	77
Antybiotyki w żywieniu zwierząt hodowlanych (Streszczenie referatu prof. S. K. Kona) (H. Michałek) . . . . .	77
Wydawnictwa z dziedziny biochemii . . . . .	80

Cena zł 20.—