

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1966
tom 12
nr 1

KWARTALNIK

Ubrals

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postęпах Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach. Artykuły są honorowane wg ustalonych stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek pracy; żądanie dalszych odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie nadsyłając pracę. Autora obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor.

Redakcja zastrzega sobie możliwość wprowadzenia skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy.

Forma maszynopisu. Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich stopnie i tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

Rozdziały w tekście należy oznaczać numeracją rzymską a podrozdziały — arabską. Tytuły nie wydzielone z tekstu nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków, schematów i wzorów. W żądanym miejscu należy pozostawić wolny wiersz i oznaczyć: Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1 lub liczbą rzymską w nawiasie — numer odpowiedniego wzoru. W tekście należy odwołać się do numeracji wzoru po słownym wymienieniu związku, np.: kwas glutaminowy (I).

Powołując się na literaturę należy podać w tekście, w nawiasie, kolejny numer pozycji w spisie literatury.

Załączniki do tekstu. Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, opatrzonej kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście n.p. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej sens powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu a każda rubryka powinna być zaopatrzona w odpowiedni tytuł.

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem. W fotografiach i wykresach należy oznaczyć „górną i „dół”.

Literatura. Wykaz literatury należy wypisać oddzielnie, na ostatnich stronach maszynopisu, w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1966
tom XII
Zeszyt 1

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzykówna (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbo-
gen (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), J. Trojanowski
(Lublin).

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa 12, ul. Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 508

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1966

Nakład 1380 (1232 + 148)	Oddano do składania 20.X.65 r.
Ark. wyd. 14,5. Ark. druk. 11,75	Podpisano do druku w styczniu 66
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w lutym 1966 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1469/65. M-72

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA.

W roku 1953 z inicjatywy Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk powstaje kwartalnik *Postępy Biochemii* pod redakcją prof. dr Józefa Hellera. Czas był to trudny i dla biochemii polskiej krytyczny. Przerzedzona losami wojny kadra naukowa nie została jeszcze odbudowana, a źle wyposażone i nad miarę obciążone pracą usługową i dydaktyczną zakłady nie są naogół w stanie nadążyć za dynamicznie rozwijającą się biochemią światową. *Postępy Biochemii* już od początku swego istnienia wnoszą cenny wkład w poprawę ówczesnego stanu rzeczy. Publikują artykuły referatowe, omawiające problemy ważne i aktualne, informujące o kierunkach badawczych w biochemii światowej. Począwszy od roku 1955, zaczynają również spełniać doniosłą rolę w szkoleniu początkujących pracowników nauki, uwożliwiając im publikowanie swych prac i ucząc jasnego, logicznego i poprawnego wyrażania drukiem swoich myśli.

Objętość i nakład *Postępów Biochemii* szybko rosną, rozbudowuje się dział ogólnoinformacyjny, podający sprawozdania ze zjazdów, sympozjów, pracowni, zawierający materiały bibliograficzne itp. Pod wytrawnym kierownictwem pierwszego Redaktora Naczelnego, prof. dr J. Hellera, *Postępy Biochemii* osiągają rangę czasopisma wysokiej użyteczności, o dobrze ugruntowanej w naszych zakładach pozycji, czytany i doceniany przez szerokie rzesze pracowników nauki.

Postępy Biochemii stają się w roku 1960 organem polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a redakcję obejmuje Prof. dr Irena Chmielewska. W tym czasie sytuacja w zakładach uległa poprawie: lepsze wyposażenie pracowni, stypendia zagraniczne i dobre zaopatrzenie w piśmiennictwo światowe sprawiły, że polska biochemia zaczęła odzyskiwać należne jej miejsce w biochemii światowej. Maleje konieczność dostarczania czytelnikowi artykułów typu podręcznikowego, a rośnie potrzeba przeciwdziałania nadmiernej specjalizacji czy uleganiu modzie w doborze tematyki badawczej. Na łamach *Postępów Biochemii* ukazują się opracowania problemów ważnych a niedostatecznie docenianych w naszych zakładach. Szczególną jednak troską otacza Redaktor Naczelnny młodych adeptów biochemii: dla nich *Postępy Biochemii* stają się doskonałą szkołą

pisania rozpraw naukowych, szkołą, która tworzy trwałe podwaliny ich przyszłej kariery. Bezblędna treść, jasna ekspozycja i nienaganna forma prac publikowanych na łamach *Postępów Biochemii* sprawiają, iż kwartalnik naszego Towarzystwa zyskuje uznanie już nie tylko w kraju ale i zagranicą.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne oddaje obecnie w ręce czytelnika pierwszy zeszyt *Postępów Biochemii* pod redakcją dr Zofii Lassota. Przed trzecim Redaktorem Naczelnym *Postępów Biochemii* stają nowe i trudne zadania. Rozwój biochemii na świecie postępuje w tempie wykładniczym. Wszechstronne zespoły badawcze i coraz doskonalsza, wysoce zautomatyzowana aparatura sprawiają, że otwierające się perspektywy poznawcze są szybko eksplorowane. Narastają trudności w porozumiewaniu się nie tylko badaczy z dziedzin pokrewnych, ale nawet pomiędzy tymi którzy zajmują się tą samą dziedziną wiedzy. Podręczniki i monografie tracą wartość użytkową dla eksperymentatora, a artykuły przeglądowe tylko wtedy są przydatne gdy są kompetentne, zwięzłe i bardzo szybko opublikowane.

Postępy Biochemii dążyć będą do tego, by czytelnik był sprawnie informowany o nowych osiągnięciach biochemii i aktualnym stanie głównych jej problemów i o implikacjach rozwoju biochemii dla innych nauk przyrodniczych. Cel *Postępów Biochemii* będzie osiągnięty wtedy, gdy młody badacz znajdzie w nich materiały dla pogłębienia swej wiedzy, a doświadczony — dla poszerzenia swych horyzontów.

Zarząd Główny
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

INA BUCHOWICZ*

Immunoglobuliny — własności i struktura

Immune-globulins — Properties and Structure

The paper describes the properties and structure of immune globulins and especially those of 7S gamma-globulins.

Immunoglobuliny są to białka pochodzenia zwierzęcego, posiadające aktywność przeciwciała oraz białka nie aktywne immunologicznie, ale podobne do przeciwciał pod względem struktury chemicznej i specyficzności antygenowej (66). Stanowią one około 11% białek surowicy, a obecne są także w moczu, w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w innych płynach ustrojowych i tkankach.

Przy elektroforezie w pH 8,6 immunoglobuliny mają najmniejszą ruchliwość, co było podstawą określenia tej grupy białek jako „gamma-globuliny”. Jak wykazali Tiselius i Kabat (cyt. wg 121), zawierają one prawie wszystkie przeciwciała, co było powodem często spotykanego identyfikowania γ -globulin i przeciwciał. Jest to niesłuszne, ponieważ aktywne przeciwciała, tj. białka zdolne do wiązania antygeny, stanowią nie więcej niż 50-75% γ -globulin nawet w surowicach hyperimmunizowanych zwierząt (82).

Immunoglobuliny są frakcją o dużej heterogenności. W skład ich wchodzi dwie komponenty o różnej rozpuszczalności: euglobuliny rozpuszczalne w roztworach soli oraz pseudoglobuliny rozpuszczalne w wodzie. W polu elektrycznym immunoglobuliny można rozdzielić na dwie frakcje (31). Szybsza komponenta, nazywana γ_1 -globuliną, β_2 -globuliną lub T-białkiem, ma punkt izoelektryczny przy pH 5,8. Frakcja zwana γ_2 -globuliną ma mniejszą ruchliwość elektroforetyczną i punkt izoelektryczny przy pH 7,3 (1). Skład aminokwasowy obu frakcji oraz ich własności chemiczne są zbliżone. Heterogenność immunoglobulin ujawnia się również przy badaniu w ultrawirówce. Główną ich część stanowi białko o stałej sedymentacji 7S. Oprócz tego w surowicach normalnych obecne są wysokocząsteczkowe

* mgr. st. asystent Centralnego Laboratorium Surowic i Szczepionek „Biomed”, Warszawa.

makroglobuliny o stałej sedymentacji 19S oraz mikroglobuliny o stałej sedymentacji 2-3,5S.

Ze względu na swoją rolę w procesach odpornościowych, immunoglobuliny były tematem licznych badań immunologicznych, a obecnie stały się przedmiotem szczególnie intensywnych studiów dotyczących ich budowy i własności fizykochemicznych. W ostatnich dwu — trzech latach z heterogennej mieszaniny, którą stanowią immunoglobuliny, udało się wyizolować kilka rodzajów cząsteczek odmiennych strukturalnie, o różnych własnościach fizykochemicznych i biologicznych. W surowicach normalnych obecne są następujące cztery frakcje immunoglobulin (101):

1) 6,6—7,7S γ -globuliny (wg nowej terminologii (57, 66) γ G lub IgG-globuliny) stanowią 85-90%. Mają one ciężar cząsteczkowy rzędu 150 000—160 000 i zawierają około 2-3% węglowodanów. Frakcja ta ma aktywność przeciwciał i jest najlepiej zbadaną wśród immunoglobulin.

2) 7-13S γ_{1A} -globuliny (γ A lub IgA-globuliny) mają ciężar cząsteczkowy zbliżony do IgG-globulin, ale charakteryzują się wysoką zawartością węglowodanów dochodzącą do 9%. W niektórych pracowniach IgA-globuliny były określane jako β_{2A} -globuliny (128). γ A-globuliny są immunologicznie aktywne.

3) 19S makroglobuliny (γ M lub IgM-globuliny) stanowią 5-10% immunoglobulin. Na podstawie immunoelektroforezy białka te określano jako γ_{1M} - lub β_{2M} -globuliny. Ciężar cząsteczkowy tej frakcji wynosi około 1 miliona. Makroglobuliny zawierają do 10% węglowodanów i mają aktywność przeciwciał.

4) 2-3,5S γ -globuliny, nazywane mikroglobulinami, obecne są w ilości nie przekraczającej 1%, a jedynie w niektórych stanach chorobowych stwierdza się ich znaczny wzrost. Białka te jako jedyne wśród immunoglobulin nie zawierają aktywnych przeciwciał.

Niniejszy przegląd poświęcony będzie omówieniu ważniejszych wyników badań nad strukturą i własnościami całej grupy immunoglobulin ze szczególnym uwzględnieniem γ G-globulin (7S γ -globulin), ponieważ dane dotyczące pozostałych immunoglobulin mają jeszcze charakter wstępny i raczej fragmentaryczny.

I. Otrzymywanie immunoglobulin

Warunkiem uzyskania bezpośrednich informacji o naturze badanego białka jest jego izolowanie w możliwie czystym, homogennym i niezmiennym stanie. Dlatego też niniejszy przegląd rozpoczyna się od krótkiego omówienia stosowanych obecnie metod izolowania i oczyszczania immunoglobulin. Metody takie jak: wysalanie, wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi i niektórymi kationami oraz rozdział elektroforetycz-

ny i chromatograficzny, wykorzystują własności fizykochemiczne wspólne dla całej grupy białek i prowadzą do otrzymania preparatu stanowiącego mieszaninę różnych przeciwciał. Izolowanie indywidualnych przeciwciał wymaga zastosowania bardziej swoistych sposobów oczyszczania i polega najczęściej na wykorzystaniu specyficznej reakcji antygen-przeciwciała.

1. Wysalanie

Klasyczną metodą jest wysalanie γ -globulin za pomocą siarczanu amonu (46). Przy 33% wysycenia wytrąca się stosunkowo czysta frakcja γ -globulin, ale już przy zwiększeniu stężenia soli do 40% preparat jest zanieczyszczony β -globulinami. Northrop (106) wysalając siarczanem amonu uzyskał krystaliczną antytoksynę błoniczą o zachowanej aktywności biologicznej. Kekwick (cyt. wg 74) zastosował do wysalania siarczan sodu, który daje rozdział białek surowicy na albuminy, α -, β -, i γ -globuliny i nie denaturuje białek. Metodę tę stosuje się często do izolowania γ -globulin i przeciwciał, szczególnie z surowicy normalnych i uodpornionych królików (99, 120). W 1961 roku Wołyński i Chadzyszew (148) przez wysalanie surowicy siarczanem sodu otrzymali homogenne efrakcje antytoksyny błoniczej.

2. Wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi

Cohn i wsp. (27, 108) opracowali metodę frakcjonowania surowicy ludzkiej alkoholem etylowym, która pozwala otrzymać czyste preparaty białkowe w stanie natywnym. Po wspólnym wytrąceniu γ -globulin, izoagglutynin, protrombiny i plazminogenu, ekstrahuje się γ -globuliny 20% i 17% alkoholem etylowym odpowiednio przy pH 7,2 i 5,2 oraz ponownie wytrąca się je z 25% alkoholu. Nicol i Deutsch (96) zastosowali podobną metodę frakcjonowania alkoholowego do izolowania γ -globulin z surowic hyperimmunizowanych zwierząt. Ponieważ białka plazmy są stosunkowo stabilne wobec eteru, frakcjonowanie surowicy eterem stosuje się czasem do izolowania albumin, γ -globulin, trombiny i fibrynogeny do użytku klinicznego (115).

3. Wytrącanie kationami

Niektóre kationy, na przykład cynk i miedź, wytrącają selektywnie γ -globuliny. Wykorzystując to Cohn (28) opracował schemat frakcjonowania surowicy solami cynku w obecności alkoholu. Isliker (77) wytrącał γ -globuliny 5mM mleczanem cynku, a Lewin (90) zaproponował prosty schemat otrzymywania γ -globuliny przez wytrącanie 0,1M $AlCl_3$. Krauze, Naimski i Zakrzewski (87) otrzymali czyste

γ -globuliny wytrącając je solami cynku i glinu. Opracowano również metody selektywnego wytrącania γ -globulin riwanolem (73) oraz riwanolem w obecności alkoholu (62).

4. Wytrącanie przy niskiej sile jonowej

Przy rozcieńczeniu surowicy wodą destylowaną w pobliżu punktu izoelektrycznego wytrącają się euglobuliny. W ten sposób Felton (cyt. wg 77) z surowicy antypneumokokowej otrzymał aktywną frakcję zawierającą wszystkie niemal przeciwciała. Metodę tę stosuje się najczęściej do otrzymania makroglobulin z surowicy ludzkiej (33, 37).

5. Elektroforeza

Metody elektroforezy preparatywnej nie znalazły szerszego zastosowania głównie z uwagi na ich niską wydajność. Cann i Kirkwood (16) opisali izolowanie γ -globulin bydłych i ludzkich metodą konwekcji elektroforetycznej. Otrzymany preparat był homogeny i zawierał tylko jedną komponentę 6,5S. W 1959 roku Fahey i Horbett (47) otrzymali γ -globuliny ludzkie metodą elektroforezy surowicy na blokach poliwinylu. Preparat ten był niejednorodny i oprócz głównej komponenty 6,6S zawierał 5-10% białka 18S. Podobne wyniki otrzymali Cohen i Freeman (24) przy elektroforezie pasmowej według Porath.

6. Metody chromatograficzne

W ostatnich latach szerokie zastosowanie znalazły metody chromatograficznego oczyszczania preparatów białkowych.

W roku 1956 Peterson i Sober (116, 117) opisali syntezę jonowymiennych pochodnych celulozy, które zastosowali do rozdzielania białek na kolumnach chromatograficznych. Użyte pochodne celulozy mają wysoką zdolność rozdzielczą, są bardzo trwałe i nie denaturują białka (97), co pozwala na izolowanie γ -globulin dla badania struktury i własności. Przy frakcjonowaniu całej surowicy na kolumnach, nie udaje się otrzymać jednorodnych preparatów, natomiast metoda ta jest bardzo przydatna dla oczyszczania ostatecznego. W związku z tym izolowanie γ -globulin składa się zazwyczaj z dwóch kolejnych etapów: początkowo γ -globuliny oddziela się od głównej masy białek surowicy przez wysalanie, wytrącanie alkoholem lub elektroforetycznie, a następnie otrzymany preparat oczyszcza się na kolumnach wypełnionych DEAE- lub CM-celulozą (25, 47, 83, 137).

Fahey i Horbett (47) przy rozdzielaniu γ -globulin ludzkich na DEAE-celulozie otrzymali 5 frakcji, z których cztery pierwsze zawierały γ -globuliny 6,6S a V frakcja była 19S makroglobuliną. Chromatografia

na CM-celulozie w pH 5,4—6,0 jest najbardziej przydatna do izolowania fragmentów γ -globulin, otrzymanych przez redukcję i degradację enzymatyczną (75, 98) i pozwala na oddzielenie fragmentów od nienaruszonych γ -globulin. Do izolowania γ -globulin oprócz pochodnych celulozy stosowano fosforan wapnia (84), a ostatnio opracowano metodę frakcjonowania surowicy na DEAE-*Sephadex* A-50 (3), która pozwala na otrzymanie γ -globuliny 7S, homogennej w immunoelektroforezie.

II. Otrzymywanie przeciwciał

Fracje immunoglobulin uzyskane opisanymi metodami, jednorodnie elektroforetycznie i chromatograficznie, są jednak mieszaniną różnych przeciwciał. Otrzymanie czystych, indywidualnych przeciwciał, które reagują tylko z określonym antygenem polega na utworzeniu kompleksu swoistego antygeny z przeciwciałem. Kompleks ten można następnie rozłożyć i wydzielić przeciwciało z roztworu. W przypadku antygeny wielocukrowego kompleks dysocjuje w 15% roztworze chlorku sodu. Metodą tą (150) otrzymano przeciwciała antypneumokokowe o czystości rzędu 80–100%.

Dysocjacja kompleksu przeciwciało-antygen białkowy następuje tylko pod wpływem energicznie działających czynników jak kwasy, alkalia, ogrzewanie i enzymy proteolityczne. Northrop otrzymał krystaliczną antytoksynę błoniczą trawiąc trypsyną kompleks toksyna-antytoksyna i wytrącając antytoksynę siarczanem amonu (107). W niektórych układach antygen ulega denaturacji pod wpływem rozcieńczonych kwasów i staje się nierozpuszczalny ułatwiając oddzielenie przeciwciała. W taki sposób Samner i Kirk oczyścili anty-ureazę, a Ramon — antytoksynę błoniczą (cyt. wg 150).

Oddzielenie przeciwciał od antygeny sprawia na ogół znaczne trudności, które jednak częściowo można ominąć stosując antygen połączony z nierozpuszczalnym nośnikiem, na przykład węglem lub kaolinem. Campbell i Sutherland (cyt. wg 77) donieśli, że perełki szklane o średnicy 44 mikronów wiążą owoalbuminę tak mocno, że mogą być stosowane jako swoisty adsorbent do izolowania antyowoalbuminy. Hagiwara (68) zastosował do izolowania przeciwciał cząsteczki lateksu pokryte antygenem. Szerokie zastosowanie znalazły ostatnio immunosorbenty, w których antygen utrwała się na nierozpuszczalnym nośniku poprzez wiązania kowalencyjne. Campbell i wsp. (13) w roku 1951 zsyntetyzowali nierozpuszczalny kompleks albuminy z dwuazowaną p-aminobenzylcelulozą. Jeden gram takiego immunosorbentu wiązał specyficznie około 10 mg antyalbuminy. Przy elucji przeciwciała kwasem solnym w pH 3,2 oczyszczenie sięgało 90%. Następnie Gurwicz (63, 64) rozwinął i nieco zmodyfikował tę metodę i obecnie stosuje się ją do izolowania oraz ilościowego oznaczania przeciwciał (65, 140). Ostatnio opisano

kilka nowych immunosorbentów, które pozwalają wyizolować oczyszczone przeciwciała zachowujące swoje właściwości specyficzne. Wśród nich wymienić można kompleks, w którym antygen połączony jest przez wiązania dwuazowe z polistyrenem (149) lub kompleksy antygeny i niektórych polimerów syntetycznych (6). W roku 1964 Weetal i Weliky (145) otrzymali immunosorbent pozwalający izolować przeciwciała na kolumnach chromatograficznych. Metoda polega na sprzęganiu benzydyny z CM-celulozą, dwuazowaniu wolnych grup aminowych benzydyny, do których następnie przyłącza się antygen. Czystość przeciwciał otrzymanych po elucji w pH 2,3 wynosi 80%. Michajłow i Pere (94) opisali adsorbowanie przeciwciał na żywej hodowli bakterii. Bakterie poddawano następnie działaniu ultradźwięków, co uwalniało do roztworu przeciwciała, zachowujące charakterystyczne własności biologiczne.

III. Własności fizykochemiczne

1. Wielkość cząsteczki

Wymiary makrocząsteczki γ -globuliny były przedmiotem nielicznych tylko prac. Cząsteczka γ -globuliny jest asymetryczna i stosunek osiowy wynosi 7—7,5 (9). W roku 1955 K r a t k y wykazał za pomocą niskokątnego rozproszenia promieni Rentgena (cyt. wg 45), że cząsteczka γ -globuliny jest cylindrem o przekroju eliptycznym i wymiarach $240 \times 57 \times 19 \text{ \AA}$.

Ciężar cząsteczkowy γ -globulin oznaczano wielokrotnie różnymi metodami i na preparatach różnego pochodzenia. Oznaczony dla γ -globuliny ludzkiej w ultrawirówce, na podstawie ciśnienia osmotycznego oraz rozproszenia światła, waha się on w granicach 150 000—190 000 (121). Ciężar cząsteczkowy końskiej γ -globuliny oznaczony w ultrawirówce (metodą Van Hold) wynosi 151 000 (111). Fleischman podaje, że γ -globulina królicza ma ciężar cząsteczkowy 140 000 (50). Oprócz frakcji γ -globuliny 7S surowica zawiera około 10% makroglobuliny 19S, o ciężarze cząsteczkowym około 1 000 000, a z ludzkiej surowicy hyperglobulinowej wyizolowano γ_1 -globulinę o ciężarze cząsteczkowym 400 000 (35). C a n n (14) na podstawie badań γ -globuliny izolowanej metodą elektroforezy konwekcyjnej sądzi, że ciężka komponenta powstaje jako artefakt w czasie frakcjonowania surowicy alkoholem. Z przypuszczeniem tym jednak trudno pogodzić fakt, że w niektórych stanach patologicznych obserwuje się wybiórczy wzrost zawartości makroglobulin w surowicach ludzkich. Dane dotyczące ciężaru cząsteczkowego poszczególnych przeciwciał są jeszcze bardzo fragmentaryczne. Dla różnych przeciwciał królika, a prawdopodobnie również i człowieka wartość ta mieści się w granicach 150 000-160 000. W końskich surowicach antypneumokokowych ciężar cząsteczkowy przeciwciała wynosi 990 000; podobną wartość znaleziono w surowicach i innych zwierząt.

2. Własności elektroforetyczne

γ -globuliny przy elektroforezie w pH 8,6 dają szeroką strefę rozmieszczenia o ruchliwości $-1,0 \cdot 10^{-5}$ cm²/sek.volt. W surowicach hyperimmunizowanych zwierząt obserwuje się powstawanie szybko wędrującego T-białka o ruchliwości $-1,0$ do $-2,0 \cdot 10^{-5}$ cm²/sek.volt. (9).

W określonym przedziale pH γ -globuliny tworzą jedno ruchome pasmo, co nie świadczy jednak o jednorodności tego białka. Alberty (1) oznaczał szybkość rozmywania gradientu γ -globuliny w punkcie izoelektrycznym, w którym wpływ pH i przewodnictwa jest minimalny. Rozmywanie następowało znacznie szybciej niżby to wynikało z szybkości dyfuzji, co wskazuje, że γ -globuliny stanowią mieszaninę cząsteczek o różnej, chociaż zbliżonej ruchliwości.

We frakcji γ -globulin znajdują się prawie wszystkie przeciwciała. Ich ruchliwość w polu elektrycznym nie jest identyczna: w surowicach ludzkich przeciwciała znajdują się we frakcji wolniejszej γ_2 -globuliny, w surowicach końskich ruchliwość przeciwciał zależy od sposobu podawania antygeny i czasu immunizacji; po krótkim okresie uodparniania przeciwciała antytoksyczne znajdują się we frakcji wolniejszej, a przy dalszej immunizacji także i w szybkiej γ_1 -globulinie (121).

3. Własności w roztworze

γ -globuliny charakteryzują się ograniczoną rozpuszczalnością w zakresie izoelektrycznym (pH 6,5-7,5). Przy sile jonowej 0,01 lub niższej następuje agregacja cząsteczek, ale zwiększenie siły jonowej do 0,1 hamuje ten proces (15). W środowisku alkalicznym zmienia się częściowo konformacja cząsteczki γ -globuliny (38, 133). Przy pH 9-11 obserwuje się zwiększenie lepkości i skręcalności, ale zmiany te są całkowicie odwracalne. Powyżej pH 11 znacznie wzrasta szybkość reakcji, a zmiany konformacji stają się częściowo nieodwracalne. γ -globuliny są bardzo wrażliwe na działanie detergentów kationowych i anionowych. W obecności dostatecznie dużych ilości siarczanu dodecyłu, tracą one zdolność specyficznego strącania antygeny, przy czym stała sedymentacji maleje do 5,5S. Zmiany te są odwracalne i po usunięciu detergentu γ -globuliny odzyskują zdolność reagowania z antygenem (19). W obojętnych roztworach przy dłuższym przechowywaniu cząsteczki γ -globuliny ulegają rozszczepieniu i powstają dwa nietypowe fragmenty γ_x oraz γ_y , które można wykryć za pomocą immunoelektroforezy (131). Proces ten zachodzi najszybciej w preparatach γ -globulin otrzymanych z ekstraktów łożyskowych. Z preparatów tych wytrąca się krystaliczny osad złożony głównie lub nawet wyłącznie z wolnej tyrozyny (36).

Ponieważ podobne zmiany obserwuje się przy działaniu niektórych enzymów proteolitycznych Š k w a ř i l przypuszcza, że „samoistne” roz-

szczępienie γ -globulin związane jest z trawieniem enzymatycznym; przemawia za tym możliwość zahamowania tego procesu przez kwas aminokapronowy (132). Na enzymatyczny charakter degradacji γ -globulin wskazują również dane Roberta i wsp., którzy przy dializie preparatów γ -globulin otrzymanych przez wytrącenie alkoholem, siarczanem sodu lub przez frakcjonowanie na kolumnie chromatograficznej, wyizolowali niskocząsteczkowe peptydy i glikopeptydy (125). James, Henney i Stanworth (78) stwierdzili, że zmiany strukturalne γ -globulin w roztworach przechodzą przez dwa etapy: początkowo zachodzi dimeryzacja i powstaje około 20% białka o stałej sedymentacji 10S, przy czym zmienia się konformacja cząsteczki, na co wskazuje zwiększenie lewoskrętności. W drugim etapie komponenta 10S ulega rozszczepieniu proteolitycznemu i w elektroforezie można stwierdzić obecność szybko wędrującej frakcji o stałej sedymentacji 3,5S.

4. Skład aminokwasowy

Skład aminokwasowy γ -globulin nie zależy w sposób istotny od ich pochodzenia. Typowym przykładem mogą być γ -globuliny ludzkie i królicze, których skład aminokwasowy ilustruje tablica 1.

Tablica 1

Skład aminokwasowy γ -globuliny ludzkiej i króliczej

Aminokwas	Ilość reszt na cząsteczkę białka*	
	Gamma-globulina ludzka	Gamma-globulina królicza
Lizyna	76,5	63
Histydyna	25	18
Arginina	36,2	39
Kwas asparaginowy	95	106
Treonina	97	144
Seryna	147	135
Kwas glutaminowy	121	120
Prolina	92,5	99
Glicyna	83	98
Alanina	65	73
Walina	112	118
Metionina	99	12
Izoleucyna	26,8	43
Leucyna	92	84
Tyrozyna	49,5	54
Fenylalanina	38,8	39
Cysteina	28,4	36
Tryptofan	19,8	22

* wartości obliczono na podstawie danych Crumpton'a (30) przyjmując ciężar cząsteczkowy γ -globuliny za 140 000

Oba preparaty charakteryzuje wysoka zawartość seryny, treoniny, waliny, lizyny, proliny oraz kwasu asparaginowego i glutaminowego, które w sumie stanowią około 60% reszt aminokwasowych cząsteczki. Ekstynkcja 1% roztworu ludzkiej γ -globuliny przy 280 m μ wynosi 13,6, a γ -globuliny króliczej 13,5. W 1960 roku Waldschmidt-Leitz podał, że w γ -globulinach ludzkich około 0,6-0,85% ogólnego azotu jest azotem hydroksylizyny (144). Doniesienie to wzbudziło znaczne zainteresowanie, ponieważ hydroksylizyna nie jest typowym aminokwasem białkowym i poza γ -globulinami dotychczas została znaleziona jedynie w kolagenie (141) i w trypsynie (143). W świetle tych obserwacji można było wiązać specyfikę struktury i funkcji γ -globulin z zawartością tego rzadkiego aminokwasu. Ostatnio jednak Crumpton i Wilkinson (30) przeprowadzili analizę składu aminokwasowego γ -globuliny ludzkiej i króliczej, nie znajdując w nich nawet śladowych ilości hydroksylizyny. Wobec tych rozbieżności, możliwość ewentualnego związku między czynnością biologiczną γ -globulin a zawartością w nich hydroksylizyny pozostaje kwestią otwartą.

5. Zawartość węglowodanów

Charakterystycznym składnikiem γ -globulin są węglowodany, których zawartość w γ -globulinach 7S wynosi około 2-3%. Skład węglowodanów γ -globulin 7S królika przedstawia tablica 2.

Tablica 2

Zawartość węglowodanów w γ -globulinie królika (50)

Węglowodan	Moli na mol białka
Heksoza { mannoza:galaktoza = 2:1 ślady fukozy	9,6
Heksozamina	8,2
Kwas sialowy	0,9

Rosevear i Smith (127) przeprowadzili trawienie papainą ludzkiej γ -globuliny i uzyskali glikopeptydy o ciężarze około 4000. W części wielocukrowej tych glikopeptydów znaleziono mannozę, galaktozę, fruktozę, glukozaminę i kwas sialowy w stosunku 5:3:2:8:1. Część peptydowa posiada sekwencję aminokwasów: Glu.Glu.Asp.-NH₂.Tyr.Glu.Asp.

Części peptydowa i wielocukrowa w glikopeptydach połączone są kowalencyjnym wiązaniem między β -karboksylem końcowego kwasu asparaginowego a grupą aminową glukozoaminy. W roku 1962 Nolan i Smith (104, 105) badając γ -globulinę króliczą i bydłącą wyizolowali

kilka glikopeptydów, które różniły się składem aminokwasowym oraz cukrowym, ale we wszystkich wielocukier związany był z polipeptydem przez β -karboksyl kwasu asparaginowego. Przypuszczali oni, że węglowodan znajduje się w jednym miejscu cząsteczki γ -globuliny, jako jeden łańcuch wielocukrowy. W roku 1964 Clamp i Putnam (23) otrzymali z γ -globuliny ludzkiej glikopeptyd o ciężarze cząsteczkowym około 2000 i wysunęli przypuszczenie, że w cząsteczce γ -globuliny 7S mogą być obecne dwa ugrupowania węglowodanowe. Dla ustalenia rozmieszczenia wielocukru w γ -globulinie niezbędne są dalsze badania.

6. Aminokwasy skrajne

Oznaczenie C- i N-końcowych aminokwasów pozwala sądzić o ilości łańcuchów polipeptydowych wchodzących w skład makrocząsteczki. Oznaczanie C-końcowych aminokwasów przy pomocy karboksypeptydazy wykazało, że w γ -globulinie ludzkiej i bydlęcej na końcu karboksylowym łańcucha polipeptydowego znajdują się seryna i glicyna (121). Ilość C-końcowych aminokwasów w γ -globulinie króliczej i ludzkiej wynosi 4 mole na 1 mol białka (4), co wskazuje na obecność czterech łańcuchów polipeptydowych. Wyniki oznaczania N-końcowych aminokwasów w różnych γ -globulinach stały się podstawą jednej z teorii struktury γ -globulin. Stwierdzono, że γ -globulina królicza zawiera jedną N-końcową resztę alaniny i ślady kwasu asparaginowego, natomiast ludzka γ -globulina — jedną N-końcową resztę kwasu asparaginowego i jedną lub dwie reszty kwasu glutaminowego. γ -globuliny końskie i bydlęce zawierają kilka różnych N-końcowych aminokwasów, przy czym zawartość żadnego z nich nie sięga jednego mola na mol białka. Dane te przedstawia tablica 3.

Tablica 3

N-końcowe aminokwasy γ -globulin (124)
moli na mol białka

γ -globulina	Alanina	Kwas asparaginowy	Kwas glutaminowy	Seryna	Walina
Ludzka fr. II	—	1,1	1,2	0,1	—
fr. II-1,2	—	1,1	1,7	0,1	—
Królicza	1,0	0,2—0,4	—	—	—
Końska	—	0,2	0,1	0,1	—
Bydlęca	0,1	0,1—0,2	0—0,1	0,1	0,1—0,4

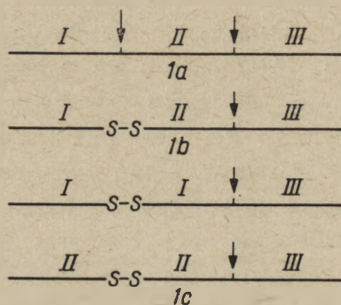
Można było zatem sądzić, że w cząsteczce γ -globulin pochodzących z różnych zwierząt ilość łańcuchów peptydowych nie jest jednakowa. Jednak zaobserwowane różnice mogą być związane z tym, że część N-końcowych aminokwasów nie reaguje z odczynnikiem i nie jest wykrywana. Nie wyklucza to możliwości istnienia określonych różnic międzygatunkowych w budowie cząsteczki γ -globulin.

IV. Struktura γ G (7S)-globulin

1. Rozszczepienia enzymatyczne

Szczególnie owocny kierunek w badaniu struktury γ -globulin reprezentują prace, w których zastosowano metodę enzymatycznego rozszczepienia makrocząstek na fragmenty o stosunkowo niskim ciężarze cząsteczkowym i prostej budowie. Jeszcze w roku 1936 Parfientiew stwierdził, że przy trawieniu końskiej antytoksyny błoniczej pepsyną w pH 4 zmniejszają się jej własności antygenowe, natomiast aktywność antytoksyczna pozostaje bez zmian (cyt. wg 121). Dane te zostały wkrótce potwierdzone w pracach Pope oraz Pope i Healey. Peterman i Pappenheimer zastosowali równolegle różne enzymy proteolityczne i zaobserwowali, że w wyniku trawienia końskiej antytoksyny błoniczej pepsyną powstaje fragment o ciężarze cząsteczkowym 113 000, który zachowuje całą aktywność antytoksyczną. Stosując trypsynę uzyskano aktywny fragment o ciężarze cząsteczkowym 90 000. γ -globulina ludzka po trawieniu pepsyną w pH 3,5 daje dwa fragmenty, z których każdy stanowi połowę wyjściowej cząsteczki. Pod wpływem papainy i bromeliny ta sama γ -globulina rozszczepia się na fragmenty, które stanowią 1/2 lub 1/4 wyjściowej cząsteczki (121). Przydatność tych obserwacji dla prac nad strukturą γ -globulin i przeciwciał docenił Porter, który w latach pięćdziesiątych podjął ten sam kierunek badań. Początkowo zastosował on surową papainę do trawienia antyowoalbuminy królika izolując fragment białkowy o ciężarze cząsteczkowym 40 000 (119). Trawienie przy pomocy krystalicznej papainy pozwoliło zmniejszyć ilość enzymu i otrzymać bardziej oczyszczony preparat rozszczepionego białka (120). Okazało się, że papaina w obecności cysteiny dodanej dla zaktywowania enzymów wywołuje ograniczone, ale bardzo specyficzne rozszczepienie γ -globuliny króliczej na mieszaninę produktów o stałej sedymentacji 3,5S. Produkty te Porter rozdzielił chromatograficznie na CM-celulozie w pH 5,5 i nazwał je frakcjami I, II i III, zgodnie z kolejnością ich wymywania z kolumny. Ilościowy stosunek frakcji I:II:III wynosi 1:0,9:1,25. Frakcja III krystalizuje w obojętnym środowisku w temperaturze 2°C, natomiast zarówno wyjściowa γ -globulina, jak i pozostałe dwie frakcje nie zostały dotychczas otrzymane w stanie krystalicznym. Frakcje I i II, zachowujące centrum wiążące przeciwciała, mają ciężar

cząsteczkowy około 50 000. Skład aminokwasowy tych frakcji jest bardzo zbliżony ale nie identyczny, na co wskazuje ich rozdział na kolumnie chromatograficznej. Seijen i Gruber (130) metodą „finger-print” otrzymali mapy peptydowe tych składników normalnej γ -globuliny i wykazali, że frakcja II zawiera dwa peptydy zasadowe nieobecne we frakcji I. Peptydy te nadają inny ładunek cząsteczce i w ten sposób mogą wpływać na rozmieszczenie tych frakcji γ -globulin na chromatogramach. Frakcja III o ciężarze około 80 000 ma odmienny skład aminokwasowy i zawiera około 2/3 węglowodanów wyjściowej cząsteczki γ -globuliny. Na podstawie tych wyników Porter zaproponował schemat struktury γ -globulin przedstawiony na rysunku 1a.



Rys. 1. Schematyczna budowa γ -globuliny

Strzałki wskazują miejsca, w których następuje rozerwanie łańcucha w wyniku trawienia papainą

Ponieważ frakcje I, II i III powstają w prawie równej ilości Porter sugerował, że cząsteczka γ -globuliny jest łańcuchem polipeptydowym, składającym się z trzech fragmentów, z których dwa mają prawie identyczny skład i własności.

Dalszych informacji o budowie γ -globulin dostarczają badania własności biologicznych otrzymanych fragmentów cząsteczki (120). Okazało się, że γ -globulina królika poddana działaniu papainy w obecności cysteiny traci zdolność strącania swoistego antygeny. Wykazano ponadto, że trawiona γ -globulina oraz wyizolowane frakcje I i II hamują reakcję antygeny z wyjściowym przeciwciałem. Obserwacje te świadczą, że w wyniku trawienia powstają dwa immunologicznie jednowartościowe fragmenty przeciwciała, które zachowują centrum aktywne i zdolność wiązania antygeny. Frakcja III nie jest aktywna jako przeciwciało, ale ma silne własności antygenowe, wiąże dopełniacz (139) i odpowiada prawdopodobnie za przechodzenie γ -globuliny przez błony płodowe (122). Edelman i wsp. (40) przeprowadzili trawienie ludzkiej γ -globuliny papainą i otrzymane fragmenty identyfikowali na podstawie ruchliwości w elektroforezie na żelu skrobiowym w pH 8,6. Frakcję poruszającą się wolno określono jako fragment „S” (*slow*). Stanowiła ona 2/3 wyjściowego białka i zachowała centrum aktywne, na co wskazuje zdolność wiązania antygeny bez powstawania precypitatu. Frakcja szybka nazywana fragmen-

tem „F” (*fast*) nie posiadała aktywności przeciwciała i otrzymano ją w stanie krystalicznym (71) podobnie jak frakcję III Portera. *Fahley* i *Askonas* (48) stwierdzili, że pod wpływem papainy i cysteiny również γ -globulina myszy ulega rozszczepieniu do fragmentów, z których 2 należą do typu „S” i wiążą antygen, a trzeci fragment „F” zachowuje własności antygenowe. Można sądzić zatem, że γ -globuliny różnego pochodzenia mają zbliżoną podstawową strukturę i złożone są z dwóch części, z których jedna (frakcja I i II Portera lub fragment „S”) odpowiada za własności immunologiczne, a druga (frakcja III Portera lub fragment „F”) określa specyficzność antygenową γ -globuliny. Komitet nomenklatury WHO zaproponował ujednoczenie nazwy fragmentów γ -globulin i wprowadzenie następujących określeń (57, 66):

Nazwa stara	Nazwa nowa
Frakcja I i II	Fab- fragment wiążący
Fragment „S”	antygen
Frakcja III	Fac- fragment krystalizujący
Fragment „F”	

Shu-Hsi Hsiao i *Putnam* (75) zastosowali metodę Portera do badania normalnej i patologicznej γ -globuliny ludzkiej oraz γ -globulin różnych gatunków zwierząt. Stwierdzili oni, że wszystkie badane preparaty pod wpływem papainy i cysteiny rozszczepiają się do fragmentów 3,5S, ale szybkość rozszczepienia zależy od gatunku zwierzęcia i zmniejsza się w następującym porządku: γ -globulina królicza, ludzka, bydłęca, końska, świńska. *Putnam* i wsp. donieśli, że oprócz papainy również inne enzymy proteolityczne, jak na przykład: ficyna, chymopapaina i bromelina, rozszczepiają γ -globulinę do fragmentów 3,5S, które charakteryzują się podobnymi własnościami fizycznymi, chemicznymi i immunologicznymi (123).

Cebra i wsp. (18) zastosowali do trawienia γ -globuliny rozpuszczalny preparat papainy, który aktywuje się w obecności nieznaczących ilości cysteiny i wykazali, że rozszczepienie natywnej γ -globuliny przebiega w dwóch kolejnych etapach. W początkowej fazie γ -globulina ulega bardzo ograniczonej proteolizie, w wyniku której następuje rozerwanie wiązania peptydowego w miejscu najbardziej czułym na działanie enzymu. Oddziela się przy tym frakcja III i zachodzą zmiany strukturalne, przy których wiązania dwusiarczkowe stają się bardziej labilne i dostępne dla czynnika redukującego. W następnym etapie, pod wpływem cysteiny, zachodzi redukcja wiązania dwusiarczkowego i cząsteczka rozpada się, dając fragmenty 3,5S. *Nisonoff* i wsp. (99) potwierdzili przypuszczenie, że fragmenty γ -globuliny połączone są w natywnej makrocząsteczce wiązaniami peptydowymi oraz wiązaniem dwusiarczkowym. Autorzy ci trawili γ -globuliny pepsyną, która w odróżnieniu od poprzednio stosowanych enzymów nie wymagała aktywacji związkami sulfhydrylowymi.

Stwierdzono, że w tym wypadku powstają tylko dwa fragmenty o różnej wielkości. Mniejszy z nich ma stałą sedymentacji 3,5S i jest prawdopodobnie identyczny z III frakcją Portera (fragment Fac). Większy fragment natomiast ma stałą sedymentacji 5S i reaguje z antygenem tworząc precipitat, co świadczy, że komponenta ta jest dwuwartościową pod względem immunologicznym. W obecności czynnika redukującego fragment 5S rozszczepia się na dwie jednowartościowe komponenty o ciężarze cząsteczkowym 56 000, które okazały się podobne do I i II frakcji Portera (fragment Fab). Z dalszych badań Nisonoffa (100) wynika, że komponenta 5S zawiera 14 wiązań dwusiarczkowych, z których jedno jest bardzo labilne i łatwo redukuje się 0,08M 2-merkaptetanolem. Przekształcenie komponenty 5S we fragmenty 3,5S jest wynikiem redukcji tego właśnie wiązania. Zwiększenie stężenia merkaptetanolu do 0,5 molarnego prowadzi do redukcji następnych pięciu wiązań dwusiarczkowych (91) ale stała sedymentacji i specyficzna aktywność otrzymanych fragmentów nie ulega zmianie. Wskazuje to, że fragmenty połączone są tylko jednym wiązaniem dwusiarczkowym. Cząsteczkę γ -globuliny złożoną z trzech fragmentów, z których dwa połączone są wiązaniem dwusiarczkowym przedstawiono schematycznie na rysunku 1b.

Palmer i Nisonoff (112) zwrócili uwagę na fakt, że proteolizie poddawane były zawsze preparaty wysoce heterogenne. Dla zmniejszenia heterogenności wyjściowy preparat γ -globuliny króliczej poddano wstępnemu frakcjonowaniu na kolumnie (CM-celuloza), po czym przeprowadzono trawienie enzymatyczne poszczególnych frakcji. γ -globulina ulegała rozszczepieniu do trzech fragmentów odpowiadających I, II i III frakcji według klasyfikacji Portera. Wyniki ilościowego oznaczania produktów proteolizy dla dwu skrajnych frakcji, wymywanych z kolumny najniższym (0,06M) i najwyższym (0,5M) stężeniem buforu podaje tablica 4.

Tablica 4

Produkty proteolizy frakcji γ -globuliny króliczej (112)

Frakcje γ -globuliny otrzymane z kolumny przy stężeniu buforu	Ilość w miligramach		
	Frakcja I	Frakcja II	Frakcja III
0,06M	20,8	3,8	11,5
0,5M	2,2	20,1	11,9

Obie komponenty γ -globuliny w wyniku trawienia dają równą ilość frakcji III, natomiast ilość frakcji I i II nie jest jednakowa i zależy od sposobu oczyszczenia chromatograficznego wyjściowego preparatu. Komponenta wymywana z kolumny 0,06M buforem zawiera prawie wyłącznie frakcję I, a komponenta otrzymana w 0,5M buforze — frakcję II. Autorzy

wysunęli przypuszczenie, że fragmenty I i II nie pochodzą z tej samej makrocząsteczki. W myśl tej interpretacji istnieją dwa zasadnicze, różne typy cząsteczek γ -globulin: jeden z nich złożony jest z dwóch fragmentów I i jednego fragmentu III. W skład cząsteczki drugiego typu natomiast obok jednego fragmentu III wchodzi dwa fragmenty II. Strukturę tę ilustruje schematycznie rysunek 1c. Do podobnych wniosków doszli Stelos i Radzinski (135) na podstawie stopnia jodowania przeciwciała antyhaptenu i jego fragmentów oraz Stoliński i Fudenberg (136) przy badaniu tak zwanych „kwaśnych” i „zasadowych” składników γ -globuliny wyizolowanych chromatograficznie na DEAE-celulozie. Gitlin (60) potwierdził przypuszczenie, że w cząsteczce γ -globuliny obecne są dwa jednakowe fragmenty. Wykazał on mianowicie, że w produktach proteolizy γ -globuliny udaje się zidentyfikować tylko połowę tej ilości peptydów, której należałoby się spodziewać na podstawie ilości jonów OH potrzebnych do utrzymania stałego pH w czasie trawienia. Rozbieżność taka jest możliwa tylko w wypadku, jeżeli w różnych częściach cząsteczki znajdują się identyczne peptydy.

Zastosowanie enzymów proteolitycznych oraz związków redukujących wykazało, że γ -globulina jest wysoce zorganizowaną i złożoną makrocząsteczką. W skład jej wchodzi kilka różnych komponent połączonych stosunkowo labilnymi wiązaniami, wśród których dominującą rolę odgrywają wiązania peptydowe i dwusiarczkowe. Stosując enzymy proteolityczne trudno było jednak ustalić, w jakim stopniu uzyskane w wyniku degradacji fragmenty białkowe związane są z obecnością odrębnych łańcuchów polipeptydowych w rodzimej makrocząsteczce, a w jakim zależą od wrażliwości różnych wiązań peptydowych tego samego łańcucha na działanie enzymu.

Niezbędne zatem było znalezienie nowych warunków degradacji, w których możliwe byłoby rozerwanie wiązań międzyłańcuchowych bez równoczesnej hydrolizy typowych wiązań peptydowych. Omówieniu wyników tego typu badań poświęcony będzie rozdział następny.

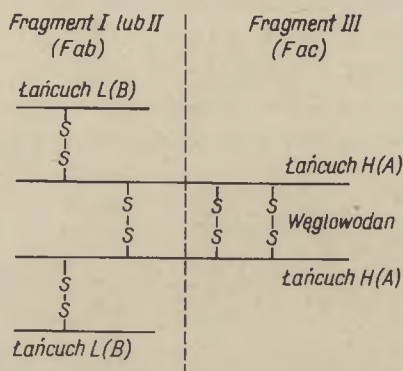
2. Łańcuchy polipeptydowe γ -globulin

Degradację γ -globulin na drodze chemicznej dla badania ich struktury przeprowadził po raz pierwszy Edelman w 1959 roku (89). Działał on czynnikiem redukującym w roztworze mocznika, powodującym rozfałdowanie białka, co ułatwiało redukcję wiązań dwusiarczkowych. W warunkach tych γ -globulina ludzka ulega rozszczepieniu do fragmentów o średnim ciężarze cząsteczkowym 48 000. Ponieważ nie obserwuje się przy tym powstawania nowych N-końcowych aminokwasów Edelman przypuszczał, że cząsteczka γ -globuliny złożona jest z podjednostek będących prawdopodobnie odrębnymi łańcuchami polipeptydowymi, połączonymi między sobą wiązaniami dwusiarczkowymi. W 1951 roku Edelman

i Poulik (41) przy pomocy chromatografii na CM-celulozie przeprowadzili częściowy rozdział tych podjednostek i wykazali, że w skład γ -globuliny wchodzi dwa rodzaje łańcuchów polipeptydowych: lekkie (L) o ciężarze około 17 000 oraz ciężkie (H) łańcuchy o ciężarze około 100 000. Następnie stwierdzono, że ciężar cząsteczkowy łańcuchów cięższych wynosi jednak 50 000, a wartość 100 000 wynikała prawdopodobnie z łatwej agregacji.

Redukcja γ -globuliny w 6M moczniku prowadzi do rozerwania 7 do 9 wiązań dwusiarczkowych, a otrzymany preparat traci rozpuszczalność w wodzie i rozcieńczonych solach. Franěk (53) zastosował do rozszczepienia γ -globulin S-sulfonowanie w 8M moczniku i otrzymał nierozpuszczalne produkty, nie posiadające aktywności biologicznej. Jak wykazali Kulberg i Tarchanowa, utrata aktywności biologicznej przy redukcji w moczniku związana jest ze zmianą struktury cząsteczki, w wyniku której zachodzi przestrzenne zablokowanie miejsca aktywnego przeciwciała (88). Dla uniknięcia denaturującego wpływu mocznika Fleischman (49) redukował γ -globuliny w roztworze wodnym; rozszczepia się wówczas 5 wiązań dwusiarczkowych makrocząsteczki, co jednak nie zmienia ciężaru cząsteczkowego wyjściowego białka. Po zakwaszeniu produktów redukcji 1n kwasem octowym lub propionowym powstające składniki można rozdzielić sączeniem przez *Sephadex G-75*. Fleischman nazwał uzyskane tą drogą produkty komponentami A i B. Komponenta A zawierała 73-75% wyjściowego białka i miała ciężar cząsteczkowy około 50 000, a resztę stanowiło komponentę B, o ciężarze cząsteczkowym 20 000. Pod względem wielkości odpowiadają więc one łańcuchom polipeptydowym H i L otrzymanym przez Edelmána w wyniku redukcji γ -globulin w roztworze mocznika. W odróżnieniu od łańcuchów Edelmána łańcuchy A i B zachowują częściowo aktywność biologiczną i są rozpuszczalne w roztworach wodnych (50). Nie wytwarzają one precypitatu z antygenem, ale łańcuch A specyficznie zwiększa czas precypitacji wyjściowej antysurowicy z antygenem. Łańcuch B w tej reakcji nie bierze udziału. Główna część węglowodanów cząsteczki (około 95%) związana jest z łańcuchem A. Łańcuch A zawiera determinanty antygenowe wspólne dla I, II i III frakcji Portera, podczas gdy w łańcuchu B obecne są determinanty właściwe tylko dla frakcji I i II. Oznacza to, że łańcuch B wchodzi w skład I i II frakcji, ale w przeciwieństwie do łańcucha A nie jest obecny w tej części cząsteczki, która w wyniku proteolizy daje frakcję III Portera. Obserwacja ta pozwoliła ustalić miejsce, w którym cząsteczka γ -globuliny rozszczepia się w czasie trawienia papainą. Na podstawie ciężaru cząsteczkowego łańcuchów A i B oraz wyjściowej γ -globuliny należy oczekiwać, że cząsteczka jej złożona jest z dwu lekkich i dwu ciężkich łańcuchów polipeptydowych. W 1962 roku Porter (cyt. wg 50) zaproponował schemat podstawowej budowy γ -globuliny przedstawiony na rysunku 2.

Według Portera makrocząsteczka γ -globuliny zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych (2A + 2B). Łańcuchy te połączone są pięcioma wiązaniami dwusiarczkowymi, z których trzy znajdują się między łańcuchami A, a dwa dalsze tworzą mostki pomiędzy łańcuchami A i B. W 1963 roku Crumpton i Wilkinson (30) w pracowni Portera



Rys. 2. Struktura γ -globuliny królika według Portera (50)

Linia przerywana wskazuje miejsca rozszczepienia cząsteczki przy trawieniu papainą

ra stwierdzili, że sumaryczny skład aminokwasowy łańcuchów A i B odpowiada składowi γ -globuliny, przy czym dwa łańcuchy każdego rodzaju zawierają w sumie taką ilość aminokwasów, jaka przypada na jedną cząsteczkę γ -globuliny. Dane te potwierdziły czterołańcuchową strukturę γ -globuliny proponowaną przez Portera. Nie ma jak dotąd dostatecznej ilości danych doświadczalnych, które potwierdziłyby proponowany schemat w całej jego rozciągłości. Niemniej jednak wyniki uzyskane w wielu innych pracowniach wskazują na obecność kilku łańcuchów polipeptydowych w cząsteczce γ -globuliny. Franěk i Nezlín (54) otrzymali łańcuchy H i L końskiej anatoksyny błoniczej i tężcowej przy sączeniu przez *Sephadex G-100* przeciwciał poddanych S-sulfonowaniu w roztworach wodnych. Parker (114), Cohen (25) oraz Noelken i wsp. (103) wykazali na preparatach różnego pochodzenia i otrzymanych różnymi metodami, że w skład cząsteczki γ -globuliny wchodzi dwa ciężkie i dwa lekkie łańcuchy polipeptydowe połączone wiązaniami dwusiarczkowymi.

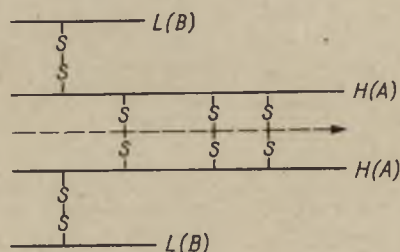
Najnowsze obserwacje wskazują na możliwość udziału więcej niż czterech łańcuchów polipeptydowych w budowie cząsteczki γ -globuliny. Comings (29) np. przypuszcza, że łańcuch A składa się z dwóch krótszych łańcuchów, a Franěk i Zikan (cyt. wg 95) sądzą, że w cząsteczce może być więcej niż dwa łańcuchy B.

3. Wiązania niekowalencyjne i rekombinacje łańcuchów γ -globulin

W budowie makrocząsteczki γ -globuliny istotną rolę odgrywają wiązania niekowalencyjne. Rozerwanie mostków dwusiarczkowych nie zmienia jeszcze wielkości cząsteczki. Dopiero w warunkach, w których pękają

wiązania polarne, apolarne oraz wiązania wodorowe, np. w stężonym roztworze mocznika lub jednonormalnym kwasie octowym następuje rozpad γ -globuliny na łańcuchy. Świadczy to, że wiązania niekowalencyjne są dostatecznie mocne aby utrzymać łańcuchy polipeptydowe w jednej cząsteczce.

Palmer i wsp. (113) stwierdzili, że zredukowana γ -globulina w warunkach bardzo łagodnej hydrolizy (pH 2,5) ulega rozpadowi na dwa równej wielkości fragmenty. Fragmenty te zawierają obydwie łańcuchy, co pozwala przypuszczać, że rozszczepienie przebiega w sposób uwidoczniony na rysunku 3. Proces ten jest odwracalny i przy zobojętnieniu na-



Rys. 3. Rozszczepienie γ -globuliny po redukcji i hydrolizie w pH 2,5

stępuje gwałtowna rekombinacja niektórych fragmentów z powstawaniem białka o stałej sedymentacji 5,9S, które zachowują miejsce aktywne przeciwciała. Ponieważ po redukcji grupy $-SH$ były zablokowane przez PCMB wydaje się, że połączenie podjednostek γ -globuliny następuje przez wiązania niekowalencyjne. Podobne zjawisko zachodzi również i w mieszaninach łańcuchów peptydowych γ -globulin. Franěk i Nezlin (55) opisali rekombinację łańcuchów H i L antytoksyny błoniczej i tężcowej. Edelman i wsp. obserwowali agregację wyodrębnionych łańcuchów przeciwciał antyfogowych (44).

W roku 1964 Olins i Edelman (107) przeprowadzili fizykochemiczne badania rekombinowanych białek i stwierdzili, że połączenie łańcuchów H i L prowadzi do powstawania w obojętnym środowisku wodnym około 30% białka 7S, które jest biologicznie aktywne. Białko to ma ciężar cząsteczkowy 160 000 i złożone jest z dwóch łańcuchów H i dwóch L połączonych prawdopodobnie tylko wiązaniami niekowalencyjnymi. Pod względem właściwości fizykochemicznych i immunologicznych jest ono podobne do γ -globuliny 7S zredukowanej i alkilowanej w nieobecności mocznika. Przy rekombinacji utlenionych łańcuchów H i L powstaje stabilne białko 7S z wiązaniami dwusiarczkowymi, które ulega ponownie dysocjacji tylko po redukcji. Właściwości immunologiczne tego białka, ruchliwość elektroforetyczna i rozmieszczenie na chromatogramach, a także jego ciężar cząsteczkowy są bardzo zbliżone do natywnej γ -globuliny.

Roholt i wsp. (126) stosując metody fizyko-chemiczne do badania rekombinacji łańcuchów γ -globulin stwierdzili, że łańcuchy te mają różną ruchliwość elektroforetyczną ale w mieszaninie poruszają się one jako jedno pasmo. Połączenie łańcuchów H i L prowadzi do utworzenia białka o stałej sedymentacji 6,0—6,1S, dającego w ultrawirówce symetryczną krzywą rozmieszczenia. Mieszanina łańcuchów zachowuje rozpuszczalność w roztworach wodnych po usunięciu kwasu propionowego, natomiast wyizolowane łańcuchy H w tych warunkach wytrącają się. Rekombinacja łańcuchów peptydowych γ -globuliny związana jest z powstawaniem miejsca aktywnego przeciwciała i częściowym odtworzeniem aktywności biologicznej.

Wyizolowane łańcuchy H i L wykazują silną tendencję do łączenia się w jedną cząsteczkę, na co wskazuje możliwość otrzymania hybrydów przeciwciał złożonych z heterologicznych łańcuchów H i L. Hybrydy te mają jednak mniejszą aktywność biologiczną niż przeciwciała rekombinowane z łańcuchów homologicznych (51). Niektóre hybrydy nie mają aktywności biologicznej w ogóle.

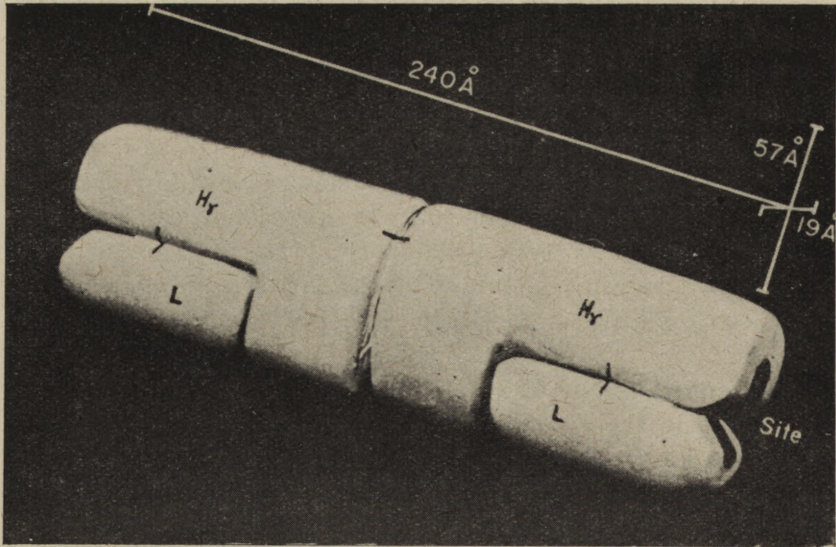
Badania nad rozszczepieniem γ -globuliny i reasocjacją fragmentów dały pewne informacje o miejscu aktywnym przeciwciała. W 1961 roku Edelman (42) zaobserwował, że łańcuchy H różnych przeciwciał miały jednakową ruchliwość elektroforetyczną, a łańcuchy L wykazywały określone różnice i sądził, że łańcuchy L określają specyficzność przeciwciała. Natomiast uzyskane w latach 1962—1963 w pracowni Portera wyniki przemawiały za tym, że miejsce aktywne przeciwciała znajduje się w łańcuchu H (50). Metzger i Singer (92) na podstawie metody pokrewnego znakowania (*affinity labelling*) wykazali, że łańcuch H bierze udział w budowie miejsca aktywnego przeciwciała. W roku 1964 Metzger, Wofsy i Singer stwierdzili, że istotnie w budowie miejsca aktywnego przeciwciała antyhaptenowego biorą udział reszty tyrozyny znajdujące się w łańcuchach H i L (93).

4. Model przestrzenny cząsteczki γ -globuliny

Całokształt uzyskanych dotychczas informacji pozwolił Edelmannowi i wsp. (45, 52) na zaproponowanie tymczasowego modelu podstawowej struktury γ -globulin bez uwzględnienia struktury drugo- i trzeciorzędowej.

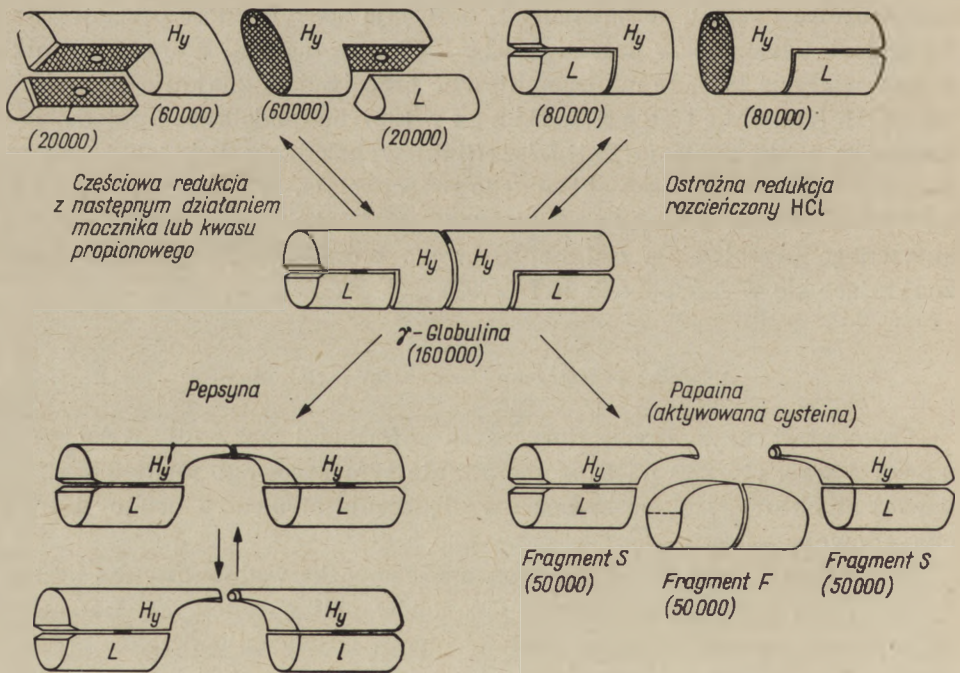
W myśl schematu Edelmana (rys. 4)* cząsteczka γ -globuliny ma kształt cylindra zbudowanego z czterech łańcuchów polipeptydowych. Łańcuchy H połączone są między sobą i z łańcuchami L wiązaniami dwusiarczkowymi i niekowalencyjnymi. Miejsca wiążące przeciwciała rozmieszczone

* Autorka dziękuje dr G. M. Edelmanowi za zezwolenie reprodukcji rysunku.



Rys. 4. Model cząsteczki przeciwciała 7S wg (45)

H_γ — łańcuchy polipeptydowe ciężkie, L — łańcuchy polipeptydowe lekkie. Kreski na modelu wskazują międzyłańcuchowe wiązania dwusiarczkowe (reprodukowany ze zezwoleniem G. M. Edelmann'a)



Rys. 5. Schemat ilustrujący mechanizm degradacji cząsteczek przeciwciała 7S

Liczby w nawiasach podają ciężar cząsteczkowy w przybliżeniu; H_γ — łańcuchy ciężkie, L — łańcuchy lekkie. Obszary zacieniowane są obszarami międzyłańcuchowych wiązań niekowalencyjnych; w nich zaznaczono również pozycję wiązań dwusiarczkowych

są na końcach cząsteczki i znajdują się w szczelinie między łańcuchami H i L. Model ten tłumaczy możliwość degradacji γ -globuliny przez redukcję i trawienie enzymatyczne, co przedstawiono na rysunku 5.

5. Struktura drugo- i trzeciorzędowa

Objętość cząsteczki γ -globuliny na podstawie modelu Edelmana wynosi $2 \times 10^5 \text{ \AA}^3$. Sposób ułożenia łańcuchów polipeptydowych wewnątrz cząsteczki oraz struktura drugo- i trzeciorzędowa γ -globuliny nie są jeszcze znane. Jirgenson (79, 81) badając dyspersję rotacyjną γ -globuliny ludzkiej znalazł niewielki udział α -spirali. Winkler i Doty (146) na podstawie podobnych badań przypuszczają, że γ -globulina nie zawiera α -spirali i złożona jest z niezwinionych łańcuchów polipeptydowych. Za strukturą spiralną przemawia obecność dużej ilości takich aminokwasów jak prolina, seryna i treonina, które przeszkadzają tworzeniu trwałej struktury heliksovej. Aminokwasy te mogą natomiast uczestniczyć w powstawaniu β -struktury. Jednakże badania w podczerwieni nie wykazały adsorpcji przy 1608 cm^{-1} charakterystycznej dla struktury β . Blout (8) w roku 1961 do badania struktury niektórych białek, między innymi γ -globulin, zastosował oznaczenie szybkości wymiany wodoru na deuter. W doświadczeniach Blouta w γ -globulinie wymiana ta następowała prawie całkowicie już w ciągu 10 min., co pozwalało przypuszczać, że białka te nie zawierają konformacji spiralnej. Jednakże Imahori i Momoi (76) stwierdzili, że w γ -globulinie tylko połowa wodorów ulega szybkiej wymianie na deuter; na tej podstawie autorzy sądzą, że w cząsteczce obecne są stosunkowo krótkie odcinki posiadające określoną, uporządkowaną strukturę, która nie musi być α -spiralą. Callaghan i Martin (11) sugerują natomiast, że cząsteczka γ -globuliny zawiera kompensujące się ilości prawoskrętnego α -heliksu i formy β . Międzyłańcuchowe i wewnątrzłańcuchowe wiązania wodorowe i hydrofobowe stabilizują cząsteczkę.

Do badania konformacji normalnej γ -globuliny Gould, Gill i Doty (61) zastosowali pomiary dyspersji rotacyjnej, szybkości wymiany wodoru na deuter oraz spektroskopię w ultrafiolecie i podczerwieni. Uzyskane wyniki wskazują, że w utrzymaniu trójwymiarowej struktury γ -globuliny główną rolę grają wiązania dwusiarczkowe oraz wiązania hydrofobowe. Autorzy nie wykluczają możliwości istnienia w cząsteczce odcinków o trwałej konformacji, które prawdopodobnie nie są ani α -spiralą, ani β -strukturą.

Interesujący schemat struktury γ -globuliny bydłcej przedstawił Troickij, Okylov i Kiriuchin (142). Na podstawie badań spektropolarymetrycznych stwierdzili oni obecność β -struktury i α -spirali. β -struktura znajduje się w głębi cząsteczki tworząc bardziej stabilne jądro γ -globuliny. Na peryferiach cząsteczki znajdują się łańcuchy heliksowe. Redukcja połowy wiązań dwusiarczkowych całkowicie niszczy tak jedną,

jak i drugą strukturę. Miejsca przejścia β -struktury i α -heliksu mają konformację nieuporządkowaną i są najbardziej wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych.

V. Inne immunoglobuliny

γ A-globuliny mają ciężar cząsteczkowy około 160 000, a oddzielono je od γ G-globulin na podstawie badań immunoelektroforetycznych (128). γ A-globuliny łatwo tworzą polimery o stałej sedymentacji 9-15S, które przy redukcji wiązań dwusiarczkowych ulegają dysocjacji do monomerów 7S (34). Struktura γ A-globulin nie jest jeszcze dokładnie znana. Ustalono, że cząsteczka złożona jest z czterech łańcuchów polipeptydowych, dwu lekkich i dwu ciężkich, połączonych między sobą wiązaniami dwusiarczkowymi. Łańcuchy lekkie γ A- i γ G-globulin są prawdopodobnie strukturalnie identyczne, natomiast łańcuchy ciężkie mają odmienną strukturę i własności.

Heremans i wsp. (70) wyizolowali oczyszczone γ A-globuliny z surowicy ludzkiej i stwierdzili, że zawierają one antytoksynę błoniczą i przeciwciała swoiste dla *Brucella abortus*. Na tej podstawie autorzy uważają, że γ A-globuliny są immunologicznie aktywne i stanowią określony typ przeciwciał (γ A-przeciwciała).

Wysokocząsteczkowe γ M-globuliny o ciężarze około 1 miliona są rozpuszczalne w roztworach soli, ale wytrącają się podczas dializy surowicy wobec wody, co jest podstawą metody ich izolowania i oczyszczania (33). Zawierają one 10-12% węglowodanów i mają tendencję do polimeryzacji na produkty o stałej sedymentacji 24 i 32S.

Do makroglobulin należą izohemaglutyniny, przeciwciała Rh, hemaglutyniny i różne przeciwciała, których powstawanie zależy od antygeny i sposobu jego wprowadzenia. Struktura makroglobulin nie jest ustalona.

Deutsch i Morton w roku 1957 (32) zaobserwowali, że makroglobuliny pod wpływem związków redukujących (cysteina, merkaptoetanol) rozszczepiają się w środowisku obojętnym na fragmenty o stałej sedymentacji 6,5S. Po usunięciu czynnika redukującego fragmenty łączą się ponownie tworząc makrocząsteczki o stałej sedymentacji 18S. Deutsch i Morton wysunęli przypuszczenie, że makroglobuliny są agregatami normalnej γ -globuliny o ciężarze cząsteczkowym 160 000, w których podjednostki połączone są między sobą wiązaniami dwusiarczkowymi. Depolimeryzacja makroglobulin jest wynikiem redukcji ośmiu spośród 27 wiązań dwusiarczkowych (37). Hipoteza Deutscha i Mortona nie znajduje potwierdzeń eksperymentalnych. Fragmenty makroglobulin po redukcji tiolami wykazują wprawdzie podobieństwo strukturalne do γ G-globuliny, ale nie są z nią identyczne, ponieważ zachowują determinanty antygenowe, swoiste dla wyjściowej makroglobuliny (89). Wysoka zawartość węglowodanów też przemawia przeciwko hipotezie Deutscha i Mortona.

γ M- i γ G-globuliny mają niewątpliwie wiele podobieństw strukturalnych na co wskazują analizy immunologiczne i chemiczne. Callagham i Martin (12) stwierdzili, że oczyszczone makroglobuliny z surowicy ludzkiej mają skręcalność optyczną zbliżoną do normalnej γ -globuliny i są prawdopodobnie mieszaniną prawoskrętnej spirali i formy β . Redukcja makroglobuliny prowadzi do powstawania fragmentów, które zawierają łańcuchy H i L (17). Ilość łańcuchów w cząsteczce oraz proporcja łańcuchów H i L nie zostały jeszcze ustalone. Na podstawie krzyżowych reakcji immunologicznych można przypuszczać, że łańcuchy L makroglobulin i normalnej γ -globuliny są identyczne, natomiast łańcuchy H są różne (21). Głównym argumentem przeciwko hipotezie Deutscha i Mortona było stwierdzenie, że makroglobuliny po redukcji całkowicie tracą aktywność przeciwciał (2, 20, 58, 134). Zdolność fragmentów makroglobuliny do wiązania antygeny wykazano metodami serologicznymi i potwierdzano w badaniach z zastosowaniem ultrawirówki (129). Onoue i Jagi (109) wykazali za pomocą radioimmunoelktroforezy, że fragmenty makroglobulin specyficznie wiążą znakowany antygen. Autorzy sugerują, że redukcja nie niszczy centrum aktywnego przeciwciała makroglobulinowego. Możliwe, że niektóre fragmenty powstałe po redukcji nie są aktywne, ponieważ w wyjściowej cząsteczce makroglobuliny może być więcej podjednostek niż miejsc wiążących.

Ostatnią grupę immunoglobulin stanowią białka o ciężarze cząsteczkowym rzędu 25 000-40 000 określane jako globuliny L lub mikroglobuliny. Należą do nich białka obecne w surowicach normalnych, jak również patologiczne białka surowicy i moczu wyizolowane w przypadkach szpiczaka. Mikroglobuliny nie zawierają węglowodanów (22) i nie mają aktywności przeciwciał. Zawartość ich w surowicach normalnych wynosi około 1%. Porath i Ui stwierdzili (118), że mikroglobuliny łatwo tworzą agregaty i tylko w bardzo polarnych rozpuszczalnikach występują jako monomery. Stosując rozpuszczalniki zawierające glicynę stwierdzili oni, że w surowicach normalnych zawartość mikroglobulin jest rzędu kilku procent.

Wyjaśnienie struktury niskocząsteczkowych γ -globulin z surowicy normalnej związane jest z badaniem patologicznego białka Bence-Jones'a, które znajduje się w dużych ilościach w moczu chorych na szpiczaka mnogiego. Białko to, po raz pierwszy opisane w roku 1847 przez Henry Bence-Jones'a, wytrąca się z roztworu wodnego po podgrzewaniu do temperatury 45-60°C, rozpuszcza się ponownie przy dalszym ogrzewaniu do temperatury wrzenia i znów się wytrąca po ochłodzeniu (123). Ciężar cząsteczkowy tego białka wynosi 38 000-43 000, a wymiary cząsteczki określone na podstawie niskokątowego rozproszenia światła stanowią $21 \times 43,3 \times 74,8$ Å (72). Białko Bence-Jones'a łatwo polimeryzuje

dając układy polimorficzne, co jest przyczyną heterogenności w elektroforezie na żelu skrobiowym (7).

Badania immunologiczne ujawniły podobieństwo antygenowe białek Bence-Jones'a i normalnej γ -globuliny, co wskazywało, że białko Bence-Jones'a może być fragmentem γ -globuliny. Edelman i Gally (143) za pomocą elektroforezy w żelu skrobiowym wykazali, że białko Bence-Jones'a po redukcji ma ruchliwość identyczną z ruchliwością łańcuchów L γ -globuliny tego samego chorego. Podobne wyniki otrzymano też badając zależność rozpuszczalności od temperatury, skład aminokwasowy oraz profil chromatograficzny na CM-celulozie.

Edelman i Gally wykazali, że białko Bence-Jones'a jest dime-rem łańcuchów L γ -globuliny. Istnieją dwie formy tych dimerów: dimery zdolne do dysocjacji, w których łańcuchy związane są tylko wiązaniami niekowalencyjnymi oraz dimery stabilne, w których między łańcuchami znajduje się wiązanie dwusiarczkowe i wiązania niekowalencyjne (59). Bergard i Edelman (5) stwierdzili, że mikroglobuliny surowicy normalnej podobnie jak białka Bence-Jones'a posiadają własności fizykochemiczne i antygenowe identyczne z łańcuchami L. Mikroglobuliny są więc wolnymi łańcuchami L i mogą być uważane za odpowiedniki białek Bence-Jones'a w surowicach normalnych.

Stany patologiczne określane jako szpiczak mnogi związane są z produkcją dużej ilości białek, podobnych fizykochemicznie i immunologicznie do normalnej γ -globuliny, ale nie posiadających aktywności przeciwciał. Oprócz cząsteczek złożonych z łańcuchów H i L nazywanych γ -globulinami szpiczaka, stwierdza się nadmiar wolnych łańcuchów L, obecnych jako białko Bence-Jones'a. W roku 1964 Franklin i inni (56) opisali pierwszy przypadek choroby, przy której w surowicy i moczu obecne jest białko o stałej sedymentacji 3,5S. Na podstawie badań serologicznych białko to zidentyfikowano jako wolne łańcuchy H i stan patologiczny otrzymał nazwę „choroby łańcuchów H”. Ponieważ łańcuchy H stanowiły około 90% γ -globulin u chorego, Franklin i wsp. przypuszczali, że choroba ta związana jest z syntezą dużego nadmiaru łańcuchów H przy bardzo nieznacznej ilości łańcuchów L. Następnie Osserman i Takatsuki (110) i Takatsuki i Osserman (138) opisali jeszcze kilka przypadków choroby H. Białko patologiczne surowicy i moczu o ciężarze 53 000 zawiera 8% heksoz, 7% heksozaminy, 4% kwasu sialowego i 2% fukozy. Analiza immunologiczna wykazała, że są to wolne łańcuchy γ_2 -globuliny. We wszystkich opisanych przypadkach notuje się znaczne obniżenie poziomu normalnej γ -globuliny i prawie całkowity brak odpowiedzi immunologicznej.

VI. Wzory molekularne immunoglobulin

Dane otrzymane w wielu pracowniach pozwalają przypuszczać, że wszystkie immunoglobuliny zawierają dwa rodzaje łańcuchów polipeptydowych: łańcuchy lekkie i łańcuchy ciężkie. Łańcuchy ciężkie są swoiste dla każdego typu immunoglobulin. Na Sympozjum w Pradze w roku 1964 zaproponowano nomenklaturę tych łańcuchów (65).

Immunoglobuliny	Łańcuchy ciężkie
γ G lub IgG	γ (gamma)
γ A lub IgA	α (alfa)
γ M lub IgM	μ (mi)

Łańcuchy lekkie są podobne lub nawet identyczne dla wszystkich immunoglobulin. Jednakże istnieją dwa typy antygenowe łańcuchów lekkich ludzkich immunoglobulin: typ I i typ II, które ostatnio określono jako typ K i typ L.

Immunoglobuliny	Łańcuchy lekkie
typ K (I)	κ (kappa)
typ L (II)	λ (lambda)

W myśl tych oznaczeń można przedstawić wzory molekularne różnych immunoglobulin.

Immunoglobuliny	Wzór molekularny
γ G lub IgG typ K	$\gamma_2 \kappa_2$
„ typ L	$\gamma_2 \lambda_2$
γ A lub IgA typ K	$\alpha_2 \kappa_2$
„ typ L	$\alpha_2 \lambda_2$
γ M lub IgM typ K	$(\mu_2 \kappa_2)_n$
„ typ L	$(\mu_2 \lambda_2)_n$
mikroglobuliny L	κ i λ
mikroglobuliny H	κ_2 i λ_2
	γ

VII. Struktura przeciwciał a ich specyficzność

Daleko idące podobieństwo struktury i składu różnych frakcji γ -globulin nasuwa pytanie, co warunkuje ich wysoką wybiórczość jako przeciwciał. B u c k l y i wsp. (10) stwierdzili, że jednowartościowy aktywny fragment przeciwciała królika skierowany przeciw albuminie bydłowej poddany całkowitemu rozfałdowaniu w 6M roztworze guanidyny po dializie spontanicznie odtwarza około 75% wyjściowej aktywności. Podobne wyniki otrzymali N o e l k e n i wsp. (102, 103) przy badaniu aktywnego fragmentu przeciwciała antyhaptenowego. Ponieważ rozfałdowanie w roz-

tworze guanidyny prowadzi do całkowitej utraty struktury drugo- i trzeciorzędowej autorzy przypuszczali, że specyficzność przeciwciała nie może być wynikiem określonego rozmieszczenia wiązań niekowalencyjnych i sposobu pofałdowania cząsteczki, lecz związana jest raczej z różnicami w sekwencji aminokwasów w całej cząsteczce lub w niektórych stosunkowo małych jej odcinkach.

Sprawdzenia wymagało jednak odtwarzanie aktywności przeciwciała po całkowitym rozfałdowaniu cząsteczki i redukcji wszystkich wiązań dwusiarczkowych. Odtworzenie aktywności przeciwciała uzyskali w roku 1964 Haber (67), a następnie Whitney i Tanford (147) przy badaniu aktywnego jednowartościowego fragmentu antyrybonukleazy i przeciwciała antyhaptenu.

Udoskonalenie metod analitycznych pozwoliło wykazać, że skład aminokwasowy różnych przeciwciał nie jest absolutnie identyczny (69). Koshland i wsp. (85-86) porównywali zawartość aminokwasów dwu wysoko oczyszczonych przeciwciał, z których jedno było specyficzne dla haptenu o ładunku ujemnym, a drugie — dla haptenu o ładunku dodatnim. Stwierdzili oni, że pierwsze z nich zawierało większe ilości argininy, natomiast drugie większą ilość kwasu asparaginowego. Oba przeciwciała miały identyczny ciężar cząsteczkowy. Nieznaczące różnice składu aminokwasowego oraz możliwość zmiany sekwencji aminokwasów mogą zapewne zmieniać strukturę aktywnego miejsca i tym samym specyficzność przeciwciał. Cohen i Porter (26) rozdzielając łańcuchy polipeptydowe przeciwciał na żelu skrobiowym zaobserwowali, że łańcuchy H nie wykazują znacznych różnic, natomiast łańcuchy L rozdzielają się na 10 frakcji, przy czym ilościowy stosunek tych frakcji w różnych przeciwciałach jest różny. Nie ulega wątpliwości, że dla ustalenia jakie cechy struktury makrocząsteczki γ -globuliny odpowiedzialne są za jej specyficzność niezbędne są dalsze systematyczne badania.

LITERATURA

1. Alberty R. A., w *The Proteins*, red. H. Neurath, K. Beiley, tom I, cz. A, New York 1953, str. 461.
2. Bauer D. C., Mathies M. J., Stawitsky A. B., *J. Exptl. Med.* **117**, 889 (1963).
3. Baumstark J. S., Laffin R. J., Bardawil W. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 514 (1964).
4. Beiser S. M., Bassett E. W., Tanenbaum S. W., *Fed. Proc.* **24**, 200 (1965).
5. Bergard J. I., Edelman G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 330 (1963).
6. Bernfeld P., Wem J., *Science* **142**, 678 (1963).
7. Bernier G. M., Putnam F. W., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 295 (1964).
8. Blout E. R., Lose C., Asadourian A. A., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1895 (1961).

9. Boyd W. C., w *The Proteins*, red. H. Neurath, K. Bailey, tom II, cz. A, New York 1954, str. 793.
10. Buckley C. E., Philip L., Tanford Ch., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 827 (1963).
11. Callaghan P., Martin N. H., *Biochem. J.* **87**, 225 (1963).
12. Callaghan P., Martin N. H., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 539 (1964).
13. Campbell D. H., Luescher E., Lerman L. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 575 (1951).
14. Cann J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4213 (1953).
15. Cann J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4218 (1953).
16. Cann J. R., Kirkwood J., *Aminokisloty i białki*, Moskwa (1952), str. 5.
17. Carbonara A. O., Heremans J. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 137 (1963).
18. Cebra J. J., Girol D., Silman H. J., Katchalski E., *J. Biol. Chem.* **236**, 1720 (1961).
19. Cebra J. J., *J. Immunol.* **92**, 977 (1964).
20. Chan P. C. S., Deutsch H. F., *J. Immunol.* **85**, 37 (1961).
21. Chaplin H., Cohen S., Press E. M., *Biochem. J.* **95**, 256 (1965).
22. Clamp J. R., Bernier G. M., Putnam F. W., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 149 (1964).
23. Clamp J. R., Putnam F. W., *J. Biol. Chem.* **239**, 3233 (1964).
24. Cohen S., Freeman F., *Biochem. J.* **76**, 475 (1961).
25. Cohen S., *Biochem. J.* **89**, 334 (1963).
26. Cohen S., Porter R. R., *Biochem. J.* **90**, 278 (1964).
27. Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L., Mulford D. J., Ashworth J. N., Melin M., Taylor H. L., *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 459 (1946).
28. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derouaux G., Gillespie J. M., Kahnt F. W., Lewer W. F., Liu C. H., Mittelman D., Mouton R. F., Schmid K., Uroma E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 465 (1950).
29. Comings D. E., *Lancet* **2**, 786 (1963).
30. Crumpton M. J., Wilkinson J. M., *Biochem. J.* **88**, 228 (1963).
31. Deutsch H. F., Albery R. A., Gosting L. J., Williams J. W., *J. Immunol.* **56**, 183 (1947).
32. Deutsch H. F., Morton J. J., *Science* **125**, 600 (1957).
33. Deutsch H. F., Morton J. J., *J. Biol. Chem.* **231**, 1607 (1958).
34. Deutsch H. F., *Fed. Proc.* **21**, 77 (1962).
35. Deutsch H. F., *J. Mol. Biol.* **7**, 662 (1963).
36. Doświadczenia własne Centralnego Laboratorium Surowic i Szczepionek.
37. Dougall E. J., Deutsch H. F., *Biochem. J.* **90**, 163 (1964).
38. Edelhoeh H., Lippoldt R. E., Steiner R. F., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2133 (1962).
39. Edelman G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3155 (1959).
40. Edelman G. M., Heremans J. F., Heremans M. Th., Kunkel H. J., *J. Exptl. Med.* **112**, 203 (1960).
41. Edelman G. M., Poulik M. D., *J. Exptl. Med.* **113**, 861 (1961).
42. Edelman G. M., Benacerraf B., Ovary Z., Poulik M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1751 (1961).
43. Edelman G. M., Gally J. A., *J. Exptl. Med.* **116**, 207 (1962).
44. Edelman G. M., Olins D. E., Gally J. A., Zinder N. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 753 (1963).
45. Edelman G. M., Gally J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 846 (1964).
46. Edsall J. T., *Adv. Protein Chem.* **3**, 436 (1947).

47. Fahey J. L., Horbett A. P., *J. Biol. Chem.* **234**, 2645 (1959).
48. Fahey J. L., Askonas B. A., *J. Exptl. Med.* **115**, 623 (1962).
49. Fleischman J. B., Pain R. H., Porter R. R., *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* **1**, 174 (1962).
50. Fleischman J. B., Porter R. R., Press E. M., *Biochem. J.* **88**, 220 (1963).
51. Fougereau M., Olins D. E., Edelman G. M., *J. Exptl. Med.* **120**, 349 (1964).
52. Fougereau M., Edelman G. M., *J. Exptl. Med.* **121**, 373 (1965).
53. Franěk F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 28 (1961).
54. Franěk F., Nezlin R. S., *Biochimija* **23**, 193 (1963).
55. Franěk F., Nezlin R. S., *Folia Microbiol.* **8**, 128 (1963).
56. Franklin E. C., Meltzer M., Guggenheim F., Lowenstein J., *Fed. Proc.* **22**, 264 (1963).
57. Franklin E. C., *J. Exptl. Med.* **120**, 691 (1964).
58. Fudenberg H. H., Kunkel H. G., *J. Exptl. Med.* **106**, 689 (1957).
59. Gally J. A., Edelman G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 175 (1965).
60. Gitlin D., Merler E., *Nature* **190**, 634 (1961).
61. Gould H. J., Gill F. J., Doty P., *J. Biol. Chem.* **239**, 2842 (1964).
62. Gubenko T. A., *Ukr. Biochim. Žurn.* **33**, 14 (1961).
63. Gurwicz A. Je., *Biochimija* **22**, 1028 (1957).
64. Gurwicz A. Je., Kapner R. B., Nezlin R. S., *Biochimija* **24**, 144 (1959).
65. Gurwicz A. Je., Kuzowlewa O. B., Tumanowa A. Je., *Biochimija* **27**, 246 (1962).
66. Gurwicz A. Je., Nezlin R. S., *Biochimija* **30**, 443 (1965).
67. Haber E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1099 (1964).
68. Hagiwara A., *Nature* **202**, 1019 (1964).
69. Haurowitz F., *Nature* **205**, 847 (1965).
70. Heremans J. F., Vaerman J. P., Vaerman C., *J. Immunol.* **91**, 11 (1963).
71. Hershgold E. J., Cordoba F. E., Charache P., Gitlin D., *Nature* **199**, 284 (1963).
72. Holasek A., Kratky O., Mittelbach P., Wawra H., *J. Mol. Biol.* **7**, 321 (1963).
73. Hořejší J., Smetana R., *Acta Med. Scand.* **155**, 65 (1956).
74. Hoppe-Seyler /Thierfelder, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, tom IV/1, Berlin 1960, str. 295).
75. Hsiao Shu-Hsi, Putnam F. W., *J. Biol. Chem.* **236**, 122 (1961).
76. Imahori K., Momoi H., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 236 (1962).
77. Isliker H. C., *Adv. Protein Chem.* **12**, 391 (1957).
78. James K., Henney C. S., Stanworth D. R., *Nature* **202**, 563 (1964).
79. Jirgensen B., *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 57 (1958).
80. Jirgenson B., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 235 (1958).
81. Jirgenson B., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 48 (1960).
82. Kabat E. A., Mayer M. M., *Experimental Immunochimistry*, wydanie II, USA, 1961, str. 336.
83. Kapusta M. A., Hallerstam D., *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 637 (1964).
84. Kibardin S. A., Nikołaewa T. A., *Žurn. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol.* **1**, 70 (1965).
85. Koshland M. E., Englberger F. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 61 (1963).
86. Koshland M. E., Englberger F. M., Shapanka R., *Science* **143**, 1330 (1964).

87. Krauze R., Naimski K., Zakrzewski K., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 209 (1961).
88. Kulberg A. Ja., Tarchanowa I. A., *Biochimija* **29**, 246 (1964).
89. Kunkel H. G., w *The Plasma Proteins*, red. F. W. Putnam, tom I, New York i Londyn, 1960, str. 279.
90. Lewin J., *Therapie* **9**, 523 (1954).
91. Mandy W. J., Nisonoff A., *J. Biol. Chem.* **238**, 206 (1963).
92. Metzger H., Singer S. J., *Science* **142**, 674 (1963).
93. Metzger H., Wofsy L., Singer S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 612 (1964).
94. Michajlow I. E., Pere I. F., *Žurn. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol.* **1**, 112 (1964).
95. Nezlin R. S., *Usp. Sowriem. Biol.* **58**, 201 (1964).
96. Nicol J. Ch., Deutsch H. F., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 80 (1948).
97. Nikolaew A. Ja., *Usp. chim.* **32**, 1087 (1963).
98. Nisonoff A., Wissler F. C., Lipman L. M., *Science* **132**, 1770 (1960).
99. Nisonoff A., Wissler F. C., Lipman L. M., Woernley D. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 230 (1960).
100. Nisonoff A., Markus G., Wissler F. C., *Nature* **189**, 293 (1961).
101. Nisonoff A., Thorbecke G. J., *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 355 (1964).
102. Noelken E., Tanford Ch., *J. Biol. Chem.* **239**, 1829 (1964).
103. Noelken E., Nelson C., Buckley C., *J. Biol. Chem.* **240**, 218 (1965).
104. Nolan C., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 446 (1962).
105. Nolan C., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 453 (1962).
106. Northrop J. H., Kunitz M., Herriot R. M., *Krystalliczeskije Fermenty*, Moskwa 1950, str. 181.
107. Olins D. E., Edelman G. M., *J. Exptl. Med.* **119**, 789 (1964).
108. Oncley J. L., Melin M., Richert D. A., Cameron J. W., Gross P. M., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 541 (1949).
109. Onoue K., Yagi J., *Science* **146**, 404 (1964).
110. Osserman E. F., Takatsuki K., *Medicine* **42**, 357 (1963).
111. Pain R. H., *Biochem. J.* **88**, 234 (1963).
112. Palmer J. L., Mandy W. J., Nisonoff A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 49 (1962).
113. Palmer J. L., Nisonoff A., Van Holde K. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 314 (1963).
114. Parker A., Small J., Kenn J. E., Lamm M. E., *Science* **142**, 393 (1963).
115. Pennell R. B., w *The Plasma Proteins*, red. F. W. Putnam, tom I, New York i Londyn 1960, str. 28.
116. Peterson E. A., Sober H. A., *Fed. Proc.* **13**, 273 (1954).
117. Peterson E. A., Sober H. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 751 i 756 (1956).
118. Porath J., Uin N., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 324 (1964).
119. Porter R. R., *Biochem. J.* **46**, 479 (1950).
120. Porter R. R., *Biochem. J.* **73**, 119 (1959).
121. Porter R. R., w *The Plasma Proteins*, red. F. W. Putnam, tom I, New York i Londyn 1960, str. 241.
122. Porter R. R., Press E. M., *Ann. Rev. Biochem.* **31**, 625 (1962).
123. Putnam F. W., Easley C. W., Lynn L. T., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 279 (1962).
124. Putnam F. W., w *The Proteins*, red. H. Neurath, wyd. II, tom III, New York, London 1965, str. 227.
125. Robert B., Bochman R., Crepin I., *Biochem. J.* **95**, 21P (1965).

126. Roholt O., Onoue K., Pressman D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 173 (1964).
127. Rosevear J. W., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 425 (1961).
128. Rowe D. S., *Biochem. J.* **88**, 2P (1963).
129. Schroheloher R. E., Kunkel H. G., Tomasi T. B., *J. Exptl. Med.* **120**, 1215 (1964).
130. Seijen H. G., Gruber M., *J. Mol. Biol.* **7**, 209 (1963).
131. Škwafil F., Grünberg D., *Nature* **185**, 475 (1960).
132. Škwafil R., Grünberg D., *Nature* **196**, 481 (1962).
133. Steiner R. F., Edelhoch H., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2139 (1962).
134. Stelos P., Taliaferro W. H., *J. Infect. Dis.* **104**, 105 (1959).
135. Stelos P., Radzimski G., Pressman D., *J. Immunol.* **88**, 572 (1962).
136. Stolinsky D., Fudenberg H., *Nutare* **200**, 856 (1963).
137. Strauss A. J., Kemp P. G., Vannier E. E., Goodman H. C., *J. Immunol.* **93**, 24 (1964).
138. Takatsuki K., Osserman E. F., *Science* **145**, 499 (1964).
139. Taranta A., Franklin E. C., *Science* **134**, 1981 (1961).
140. Tarchanowa I. A., Kulberg A. Ja., *Wopr. Med. Chim.* **8**, 163 (1962).
141. Tristram G. R., Smith R. H., *Adv. Protcin Chem.*, **18**, 290 (1963)
142. Troickij G. W., Okulow W. J., Kiriuchin I. F., *Biochimija* **30**, 268 (1965).
143. Viswarantha T., Irreverre F., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 564 (1960).
144. Waldschmidt-Leitz E., Bretzel G., Keller L., *Naturwiss.* **11**, 254 (1960).
145. Weetall H. H., Weliky N., *Nature* **204**, 896 (1964).
146. Winkler M., Doty P., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 448 (1961).
147. Whitney P. L., Tanford Ch., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 524 (1965).
148. Wolynsky A. S., Hadżiew K. H., *Biochimija* **26**, 217 (1961).
149. Yagi Y., Engel K., Pressman D., *J. Immunol.* **85**, 375 (1959).
150. Zabłocki B., Teoretyczne podstawy immunopatologii, PWN Warszawa 1963, str. 69.

JERZY ROGULSKI*

Swoistość przemian azotu aminokwasów w tkankach ssaków

The Specificity of the Amino Acids Nitrogen Metabolism in Mammalian Tissues

The specificity of amino acids nitrogen metabolism in various mammalian organs is discussed. The significance of each particular organ in amino acids metabolism and the role in general tissue metabolism are pointed out.

Głównymi elementami określającymi swoistość biochemiczną tkanek są: zróżnicowana struktura morfologiczna, różnice w aktywności poszczególnych reakcji lub ciągów reakcji, strukturalna współzależność układów enzymatycznych wewnątrz komórki (tzw. kompartmentacja), wreszcie charakterystyczna przepuszczalność błon komórkowych. Przedmiotem tego artykułu są przemiany azotu aminokwasów charakterystyczne dla różnych tkanek ssaków. Obejmuje on te tylko przemiany, które związane są bezpośrednio z przyswajaniem i usuwaniem azotu aminokwasowego. Starłem się podkreślić znaczenie poszczególnych narządów w przemianie azotu aminokwasów oraz istotny wpływ tych przemian na całość metabolizmu tkankowego. Wiadomości o przemianach poszczególnych aminokwasów, o mechanizmach reakcji enzymatycznych, kinetyce i własnościach enzymów oraz o przemianach łańcuchów węglowych aminokwasów znajdzie czytelnik w licznych obcojęzycznych artykułach przeglądowych Braunsteina (19), Cohena (36, 38, 39), Greenberga (56), Krebsa (78, 79), Meistersa (87-91) i Ratner (108-110) oraz w *Postęпах Biochemii* (1, 86, 105).

Ogólny metabolizm azotu aminokwasów obejmuje szereg różnorodnych procesów, takich jak: oksydacyjna dezaminacja, transaminacja, wiązanie amoniaku i synteza mocznika. Omawiane w tej pracy zagadnienia ujęto w następujące rozdziały:

- I. Znaczenie oksydatywnej dezaminacji i transaminacji w przemianie azotu aminokwasów

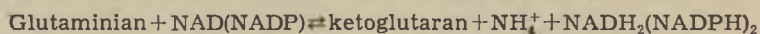
* Dr med., adiunkt Pracowni Biochemii Klinicznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

- II. Wiązanie amoniaku w tkankach — a) biosynteza aminokwasów, b) biosynteza karbamylfosforanu, c) synteza glutaminy
- III. Usuwanie amoniaku — cykl ornitynowy
- IV. Przemiany azotu aminokwasów jako wyraz biochemicznej swoistości tkanek.

I. Znaczenie oksydatywnej dezaminacji i transaminacji w przemianie azotu aminokwasów

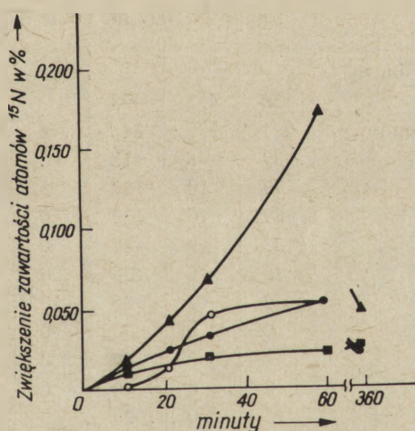
Wiadomo było od dawna (zob. 78, 88), że aminokwasy ulegają utlenieniu w tkankach ssaków. Dokładniejsze badania w tym kierunku przeprowadził K r e b s (77) w 1935 roku. Wykazał on obecność dwóch odrębnych układów enzymatycznych, tzw. oksydaz, katalizujących utlenianie L- i D-aminokwasów. W końcu lat trzydziestych w pracowni W a r b u r g a udało się wyizolować oczyszczony preparat oksydazy D-aminokwasów, który wykorzystano następnie jako układ modelowy do badania mechanizmu reakcji oksydoredukcyjnych (143, 144). Okazało się, że przemiana D-aminokwasów rozpoczyna się od utleniania na węglu α , a produktem pośrednim reakcji jest odpowiedni iminokwas, ulegający następnie hydrolizie z uwolnieniem jonu amonowego i ketokwasu. Sądono przez analogię, że podobnej przemianie podlegają też naturalne L-aminokwasy. Wpływ doświadczeń Krebsa i Warburga na późniejsze poglądy dotyczące katabolizmu aminokwasów był tak duży, że jeszcze obecnie proces oksydatywnej dezaminacji omawiany jest zwykle jako normalna droga katabolizmu naturalnych aminokwasów. Jednak nie ma żadnych przekonujących danych (zob. 39, 79, 88, 93) o istnieniu w tkankach ssaków fizjologicznie ważnych systemów oksydaz L-aminokwasów; jedynie w nerkach i wątrobie szczura (14, 77) stwierdzono ich obecność, przy czym oczyszczony preparat oksydazy L-aminokwasów wykazywał tak niską aktywność (14), że trudno przypisać mu jakiegokolwiek znaczenie. Wydaje się więc, że udział oksydatywnej dezaminacji w ogólnym metabolizmie L-aminokwasów w tkankach ssaków jest znikomy, a nawet może być w ogóle kwestionowany (125).

W niespełna trzy lata po opisanii przez Krebsa oksydatywnej dezaminacji aminokwasów wykryto w pracowni E u l e r a dehydrogenazę glutaminową (43, 48), która różni się od oksydaz aminokwasów przede wszystkim tym, że współdziała z nukleotydem pirydynowym, a ponadto wykazuje zupełną specyficzność w stosunku do substratu. Enzym ten występuje w wielu tkankach, w niektórych jego aktywność jest wysoka, otrzymano go też z wielu źródeł w stanie znacznego oczyszczenia (98, 129, 132). Dehydrogenaza ta katalizuje odwracalną reakcję utlenienia lub syntezy glutamianu:



Od początku jednak znaczenie tego enzymu upatrywano głównie, jeśli nie wyłącznie w działaniu utleniającym. Znalazło to wyraz i w nazwie enzymu, zaliczanego do odwodorowujących. Cytowane powszechnie dane Copenhavera i wsp. (41) porównujące aktywność dehydrogenazy glutaminowej w różnych tkankach opierają się też wyłącznie na pomiarze zużycia tlenu, podkreślając przez to oksydacyjny charakter enzymu. Dehydrogenaza glutaminowa jest jak dotąd jedynym enzymem katalizującym reakcję oksydatywnej dezaminacji w tkankach zwierzęcych.

Mniej więcej jednocześnie z odkryciami Krebsa i Eulera, Braunstein i Kritzman (24) wykazali po raz pierwszy występowanie w tkankach zwierzęcych procesu transaminacji, a w latach pięćdziesiątych nagromadzono już wiele faktów, które świadczyły o istotnym znaczeniu transaminacji w ogólnej przemianie aminokwasów (21, 22, 25, 40, 74, 75, 92). Wykazano powszechność występowania transaminaz w tkankach ssaków, przy czym w większości tkanek wykazują one bardzo znaczną aktywność (2, 29, 123, 145). Stwierdzono również, że istnieje wiele enzymów tego typu mniej lub bardziej specyficznych, a w procesie transaminacji biorą udział właściwie wszystkie aminokwasy z wyjątkiem może lizyny i treoniny (zob. 88). Istota transaminacji polega na bezpośrednim przeniesieniu grupy aminowej z cząsteczki aminokwasu na odpowiedni ketokwas, bez uwalniania się amoniaku jako produktu pośredniego re-



Rys. 1. Wbudowywanie izotopu azotu ^{15}N w metabolity azotowe wątroby po podaniu ^{15}N -L-leucyny (wg. 44)

Podano dożylnie 126 μmoli ^{15}N -L-leucyny (zwiększenie zawartości atomów ^{15}N -19%) szczurowi o wadze około 350 g; ▲ —▲ kwas glutaminowy; ● —● glutamina; □ —□ mocznik; ○ —○ glicyna

akcji (137); mechanizm ten wykazano również w warunkach *in vivo*. Po wstrzyknięciu znakowanego L-aminokwasu z izotopem azotu ^{15}N obserwuje się pojawienie się izotopu w grupie aminowej aminokwasów tkan-

kowych (44), głównie w grupie aminowej kwasu glutaminowego (zob. rysunek 1).

Rolę centralną (zob. 19, 20) w procesie transaminacji spełniają aminokwasy dwukarboksylowe, tj. kwas glutaminowy i asparaginowy oraz odpowiadające im ketokwasy, tj. ketoglutazarowy i szczawiooctowy. W większości tkanek największą aktywność wykazują właśnie swoiste transaminazy katalizujące odwracalną przemianę tych substratów (52). Stosunek aktywności poszczególnych transaminaz w różnych tkankach jest dość różnorodny (2, 29, 47, 61, 101, 145). Pomimo znacznych nieraz rozbieżności pomiędzy danymi różnych autorów istnieje ogólne przekonanie, że każdą tkankę cechuje swoisty zestaw aktywności transaminaz. Tablica 1 przedstawia przykładowo dane Awapara'y i Sele'a (2) dla wątroby, nerek i mięśnia sercowego szczura.

Tablica 1

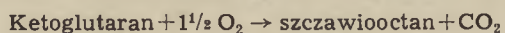
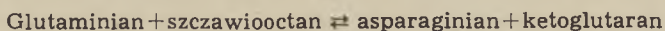
Transaminacje z udziałem α -ketoglutaranu i pirogronianu w różnych tkankach szczura (wg 2)

	Mięsień sercowy	Wątroba	Nerka	Mięsień sercowy	Wątroba	Nerka
	Kwas glutaminowy			Alanina		
	μ mole N-NH ₂ na gram tkanki i godz.					
Kwas glutaminowy				95	0	0
Alanina	130	422	98			
Kwas asparaginowy	291	235	241	4	83	0
Leucyna	87	8	112	5	53	5
Izoleucyna	79	10	122	5	6	8
Walina	89	10	122	0	25	6
Glicyna	23	9	18	0	0	10
Metionina	10	9	28	20	35	10
Fenylalanina	3	12	25	10	58	0
Arginina	0	0	30	0	0	0
Lizyna	0	0	0	0	0	0
Prolina	0	6	0	0	0	0
Treonina	15	0	25	0	0	0
Seryna	—	—	—	20	23	0

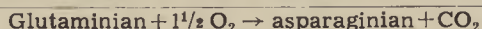
W ujęciu Braunsteina (19, 20) i Meistera (87-89) znaczenie transaminacji polegać ma głównie na tym, że wszystkie aminokwasy w reakcjach katalizowanych przez swoiste transaminazy przekazują swoje grupy aminowe na cząsteczkę ketoglutaranu, bądź wprost, bądź przez pośrednią transaminację ze szczawiooctanem. W ten sposób azot wszystkich aminokwasów zostaje włączony w jeden ciąg przemian kwasu glu-

taminowego (23). Ten ostatni miałby ulegać oksydatywnej dezaminacji przy udziale swoistej dehydrogenazy. Ujęcie to jest wyrazem ogólnego i bardzo zakorzonego przekonania, że oksydacyjna dezaminacja, w takiej czy innej formie, jest istotną drogą katabolizmu aminokwasów.

W ostatnich jednak latach nagromadziło się szereg faktów wyraźnie sprzecznych z tym ujęciem. Olson i Anfinsen (99), badając kryształiczną dehydrogenazę glutaminową z wątroby wołu stwierdzili, że równowaga reakcji jest przesunięta wybitnie w kierunku syntezy glutaminianu; aktywność właściwa enzymu dla utleniania glutaminianu wynosi 90, natomiast dla syntezy aż 950. W latach pięćdziesiątych uzyskano też pewne bezpośrednie przesłanki, wskazujące, że utlenianie glutaminianu może odbywać się innymi drogami (96). Dopiero w roku 1960 jednak (17, 80) wykazano niezależnie w kilku pracowniach, że utlenianie glutaminianu rozpoczyna się głównie przez transaminację, nie zaś przez odwodorowanie. Krebs i Bellamy (80) stwierdzili, że po dodaniu glutaminianu do homogenatów tkanek różnych zwierząt zostaje on prawie ilościowo zamieniony w kwas asparaginowy według reakcji:



suma:

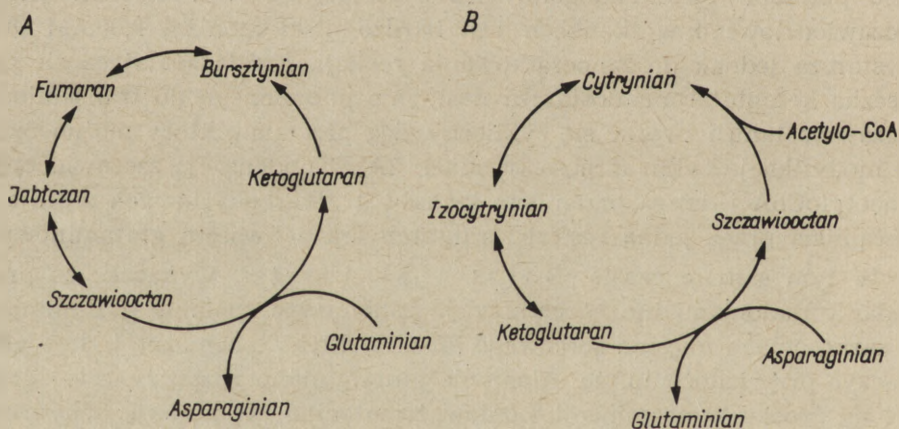


Istotnie, zużycie tlenu odpowiadało w doświadczeniach autorów dokładnie takiemu przebiegowi reakcji transaminacji. Do zapoczątkowania procesu potrzebny jest endogeny kwas szczawiooctowy. Poziom kwasu szczawiooctowego w tkankach jest bardzo niski (poniżej 0,05mM (80)), wystarcza jednak do zapoczątkowania reakcji. Każda spalająca się cząsteczka ketoglutaranu dostarcza następnie potrzebnego do transaminacji szczawiooctanu i tworzy się cykliczny ciąg przemian, który można uznać za modyfikację cyklu Krebsa (rysunek 2A). Kondensacja szczawiooctanu z acetyloCoA i dalsza przemiana kwasów trójkarboksylowych zostaje tu zastąpiona przez jedną reakcję transaminacji z kwasem glutaminowym.

W tym samym czasie Borst i Slater (17) wykazali, że przez dodanie malonianu można całkowicie zahamować spalanie glutaminianu w sarkosomach mięśnia sercowego szczura. Efekt ten można było wytłumaczyć przy założeniu, że utlenianie glutaminianu rozpoczyna się głównie na drodze transaminacji, ponieważ malonian nie hamuje dehydrogenazy glutaminowej, a w stosowanych warunkach doświadczenia nie nagromadzał się ketoglutaran, który mógłby tę dehydrogenazę hamować kompetycyjnie. Malonian hamuje po prostu odtwarzanie z ketoglutaranu kwasu szczawiooctowego, potrzebnego do transaminacji z glutaminianem. W zgodzie z tym jest fakt znoszenia zahamowania wywołanego malonianem przez bezpośrednie prekursorzy szczawiooctanu (jabłczan, fumaran).

Podobne rezultaty osiągnięto z mitochondriami i homogenatami gruczołu mlekowego, mózgu, wątroby i nerek (4, 5, 16-18, 33, 59, 60-63, 66, 67). Świadczy to, że utlenianie glutaminianu może być co prawda, zapoczątkowane dwiema różnymi drogami — bądź przez odwodorowanie w reakcji dehydrogenazy glutaminowej, bądź przez transaminację ze szczawiooctanem, jednak w większości tkanek udział dehydrogenazy jest znikomym. Zupełne zahamowanie przez malonian spalania glutaminianu w sarkosomach mięśnia sercowego (16-18) i mitochondriach gruczołu mlekowego (66, 67) świadczy, że tkanki te są całkowicie pozbawione aktywności dehydrogenazy glutaminowej, a spalanie glutaminianu odbywa się w nich wyłącznie na drodze transaminacji. W mózgu (4, 5) i w nerkach (61) wydajność tej przemiany przekracza 90% utlenionego glutaminianu, a nawet w mitochondriach wątroby, wykazujących bardzo dużą aktywność dehydrogenazy glutaminowej — około 70% glutaminianu spala się przez transaminację (4, 5, 60). Mówi się obecnie o istnieniu kompetycji między procesem transaminacji a działaniem dehydrogenazy glutaminowej; jednym z czynników decydujących o nieznacznym udziale dehydrogenazy w spalaniu glutaminianu jest zapewne stosunek formy zredukowanej do utlenionej nukleotydów pirydynowych (72).

Istnieją dowody (62, 80), że również spalanie kwasu asparaginowego i alaniny w homogenatach i mitochondriach różnych tkanek przebiega głównie na drodze transaminacji z ketoglutaranem. W reakcjach tych jeden aminokwas ulega prawie ilościowej zamianie w inny. Dla zapoczątko-



Rys. 2. Utlenianie glutaminianu (A) lub asparaginianu (B) na drodze transaminacji

wania przemiany potrzebny jest endogeny ketoglutaran (jego poziom w tkankach wynosi 1-2mM), a jego regeneracja zachodzi poprzez wbudowanie łańcucha węglowego spalanego aminokwasu w kwas cytrynowy. W przypadku asparaginianu dzieje się to przez reakcję powstającego szczawiooctanu z endogenym acetyloCoA, a w przypadku alaniny po-

wstający z niej kwas acetylooctowy jest źródłem acetyloCoA, łączącego się następnie z endogennym szczawiooctanem. Wydaje się, że spalanie wszystkich innych aminokwasów (40, 75) sprowadza się także do transaminacji z ketoglutaranem i do wprowadzenia części lub całego łańcucha węglowego aminokwasu w cykl Krebsa. Przemiany te można również przedstawić jako modyfikację cyklu Krebsa, w której oksydacyjna dekarboksylacja ketoglutaranu i ciąg przemian kwasów dwukarboksylowych zostały zastąpione przez reakcję transaminacji ze szczawiooctanem (rysunek 2B). Zużycie tlenu towarzyszące tym przemianom odpowiada reakcji transaminacji i jest wyrazem zmian w obrębie łańcucha węglowego aminokwasu.

Spośród tkanek ssaków tylko wątroba posiada pewną zdolność oksydacyjnej dezaminacji aminokwasów w wyniku skojarzonego działania transaminaz i dehydrogenazy glutaminowej, w innych tkankach zachodzą tylko transaminacje. Znaczenie ich jako czynnika warunkującego labilność azotu aminokwasów polega na regulacji stosunków stężeń aminokwasów w tkankach. Reakcje transaminacji wpływają także stymulująco na cykl Krebsa dostarczając kluczowych ketokwasów biorących w nim udział.

II. Wiązanie amoniaku w tkankach

W wytwarzaniu amoniaku w organizmie tylko bardzo ograniczone znaczenie mają reakcje bezpośredniej dezaminacji (oksydacyjna i nieoksydacyjna dezaminacja D- i L-aminokwasów). Istotne znaczenie mają natomiast reakcje, w których ma miejsce przeniesienie grupy aminowej lub amidowej aminokwasu na akceptor inny niż ketokwas. Wymienić tu należy wszystkie reakcje biosyntezy, w których aminokwasy spełniają rolę donatorów azotu — a więc syntezę aminocukrów połączoną z transdezamidacją glutaminy (104) oraz szereg reakcji w procesie biosyntezy nukleotydów purynowych i pirymidynowych (26, 116), w których donatorami azotu są glutamina lub asparaginian. W reakcjach tych ma miejsce odłączenie z cząsteczki aminokwasu azotu, który bezpośrednio zostaje wbudowany w cząsteczki innych metabolitów; dalsze przemiany tych metabolitów prowadzą jednak z reguły przez etap dezaminacji — następuje odszczepienie azotu w postaci wolnego amoniaku. Wymienione reakcje stanowią więc tylko ogniwo pośrednie w obiegu azotu aminokwasów. Praktyczne znaczenie spośród tych reakcji wydaje się mieć jedynie aminacja kwasu inozynowego (zob. 105), polegająca na kondensacji asparaginianu z kwasem inozynowym (42). Produktem pośrednim reakcji jest kwas adenylobursztynowy, który rozpada się na kwas adenylowy i fumaran. Braunstein ujmuje tę reakcję jako istotną w proponowanym schemacie łańcuchowej dezaminacji oksydacyjnej aminokwasów (19). Sugestie Braunsteina znajdują oparcie głównie w fakcie szybkiego wbudowywania azotu ^{15}N w grupę 6-aminową AMP (97). Szybka wymia-

na azotu grupy 6-aminowej AMP świadczy o szybkim cyklicznym obiegu azotu w skojarzonych z sobą reakcjach aminacji i dezaminacji nukleotydu. Skojarzone działanie obu reakcji odpowiada właściwie dezaminacji asparaginianu; amoniak uwalnia się w ilości równoważnej w stosunku do fumaranu. Fakt, że znaczniejsze ilości amoniaku w mięśniach stwierdza się tylko przy intensywnej pracy mięśniowej (100) można wytłumaczyć tym, że normalnie amoniak z AMP, podobnie jak i z innych metabolitów azotowych jest szybko i skutecznie wiązany w tkankach obwodowych. Wydaje się nie ulegać obecnie wątpliwości, że przemiana kwasu adenylobursztynowego jest głównym źródłem amoniaku w ustroju. Bez porównania bardziej obfite źródło amoniaku stanowią wprawdzie reakcje bakteryjne w jelicie, są to jednak przemiany zachodzące poza właściwą pulą metaboliczną ustroju (zob. 13).

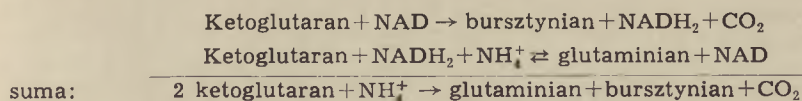
W tkankach ssaków istnieją trzy główne reakcje, w których następuje wiązanie amoniaku, a mianowicie: synteza kwasu glutaminowego, synteza karbomylofosforanu oraz synteza glutaminy. Wiązanie amoniaku w postaci karbomylofosforanu ma miejsce wyłącznie w wątrobie, synteza glutaminianu ograniczona jest głównie do wątroby oraz w znacznie mniejszym stopniu do nerek i mózgu — natomiast synteza glutaminy ma znaczenie uniwersalne.

Synteza kwasu glutaminowego Kwas glutaminowy spełnia centralną rolę w biosyntezie aminokwasów. Jako jedyny z aminokwasów powstaje on w wyniku bezpośredniej aminacji ketoanalogu, katalizowanej przez swoistą dehydrogenazę (21, 22, 64, 81, 82). Synteza pozostałych aminokwasów ma się odbywać wtórnie w wyniku transaminacji między glutaminianem a odpowiednimi ketoanalogami. Dowodów dostarczyły głównie prace z laboratorium Braunsteina. Wykazano tam mianowicie (21, 22), że biosynteza aminokwasów jest zależna od regeneracji ketoglutaranu w cyklu Krebsa; zablokowanie cyklu np. fluorocytrynianem znosi zupełnie syntezę aminokwasów. Stwierdzono też, że podawanie zwierzętom związków blokujących *in vivo* aktywność enzymów pirydoksalowych lub karmienie dietą pozbawioną pirydoksyny wybitnie zmniejsza syntezę wszystkich aminokwasów z wyjątkiem glutaminianu. Dotychczas nie udało się wykazać z całą pewnością bezpośredniej aminacji innych ketokwasów poza ketoglutaranem, brak też danych o występowaniu w tkankach ssaków innych dehydrogenaz aminokwasów poza dehydrogenazą glutaminową. Stwierdzono natomiast (55, 98, 133), że *in vitro* można spowodować dysocjację kompleksu dehydrogenazy glutaminowej na podjednostki, które wykazują wówczas aktywność dehydrogenazy alaniny (138). W zjawisku tym należałoby szukać przyczyny sporadycznych doniesień (7, 8) o występowaniu dehydrogenazy alaniny w tkankach ssaków. Nie wiadomo jednak czy ma to jakieś znaczenie fizjologiczne *in vivo*.

Podstawowym substratem w syntezie aminokwasów jest więc ke-

toglutaran, jeden z metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych. Jest zrozumiałe, że wszystkie substraty zasilające cykl Krebsa stymulują powstawanie glutaminianu; z drugiej zaś strony wydajna synteza aminokwasów może powodować usuwanie z cyklu znacznych ilości ketoglutaranu. Zwykle regeneruje się on sprawnie przez transaminację ze szczawiooctanem; w warunkach zwiększonej aminacji ketoglutaranu może to z kolei powodować brak szczawiooctanu do syntezy kwasu cytrynowego i w konsekwencji zwolnienie a nawet zahamowanie biegu cyklu Krebsa (12, 115). W normalnych warunkach istnieje sprawny mechanizm przeciwdziałający zaburzeniom w obrębie cyklu Krebsa wynikającym z syntezy aminokwasów; jest to regeneracja szczawiooctanu z kwasu asparaginowego. Teoretycznie mogą być brane pod uwagę wszystkie reakcje, w których asparaginian oddając grupę aminową przekształca się w metabolit cyklu. Praktyczne znaczenie mają tu jednak tylko dwie reakcje, tj. reakcja syntezy i rozpadu kwasu argininobursztynowego w cyklu ornitynowym (zob. 108, 11) i, w mniejszym stopniu, reakcja syntezy i rozpadu kwasu adenilobursztynowego (19, zob. też 105) w przemianie nukleotydów purynowych. W tych zatem tkankach, które wykazują żywy metabolizm tych dwu substratów proces syntezy aminokwasów może przebiegać wydajnie bez równoczesnych zaburzeń w ogólnej przemianie energetycznej.

Wydajność syntezy aminokwasów w danej tkance jest określana w pierwszym rzędzie aktywnością dehydrogenazy glutaminowej; miarą tej aktywności jest wydajność reduktywnej aminacji ketoglutaranu (por. str. 40). Od czasu pierwszych doświadczeń K r e b s a i wsp. (81, 82) przyjęło się pojęcie tzw. dyzmutacji ketoglutaranu, w której jedna cząsteczka ketoglutaranu dostarcza wodór do reduktywnej aminacji drugiej cząsteczki:



Skojarzenie tych dwu reakcji, tj. oksydatywnej dekarboksylacji ketoglutaranu i jego reduktywnej aminacji uważano przez długi czas za podstawowy proces w syntezie glutaminianu. W tym ujęciu ketoglutaran jest zarówno donatorem łańcucha węglowego jak i donatorem wodoru. Chociaż dane Krebsa i wsp. (82) wskazywały wyraźnie na udział innych donatorów wodoru, np. cytrynianu, niemniej do niedawna jeszcze przyjmowano ogólnie preferencję ketoglutaranu (20).

W tabelicy 2 porównano wydajność syntezy aminokwasów z ketoglutaranu w różnych tkankach szczura (119, 122). W stosowanych warunkach doświadczenia istniały możliwości transaminacji powstającego glutaminianu z endogennym szczawiooctanem a więc powstawania asparaginianu i regeneracji ketoglutaranu. Obserwowany przyrost azotu amino-

wego wyraża zatem maksymalną zdolność tkanki do syntezy aminokwasów z ketoglutaranu.

Jak widać wydajność tego procesu jest w wątrobie przeszło 15 razy większa niż w nerkach; a w tych z kolei około 3-5 razy większa niż w innych tkankach. Istotny wpływ na syntezę aminokwasów ma ATP — w jego obecności w wątrobie ulega aminacji przeszło 80% ketoglutaranu, w nerce i w mózgu synteza wzrasta 5-7 razy. Dane te świadczą, że w procesie biosyntezy aminokwasów wątroba góruje zdecydowanie nad pozostałymi tkankami, z których tylko nerki i mózg mogą mieć jeszcze istotne znaczenie. Serce mimo wydajnego spalania ketoglutaranu zupełnie nie syntetyzuje aminokwasów, co jest zgodne z poprzednimi danymi (16-18, 66, 67, 76) o braku w tej tkance aktywności dehydrogenazy glutaminowej.

Tablica 2

Synteza aminokwasów z α -ketoglutaranu i amoniaku w różnych tkankach szczura

(J. Rogulski, S. Angielski, Dane niepublikowane)

Tkanki	a*)	b**)	$\frac{a}{b}$	a*)	b**)	$\frac{a}{b}$
	bez ATP			z ATP		
	$\mu\text{mole na gram tkanki i godz.}$					
Wątroba	291.0	160.0	1.8	298.5	237.0	1.25
Nerki	105.0	11.0	9.5	267.5	54.0	4.95
Mózg	23.0	3.0	7.7	130.5	22.0	5.9
Mięśnie szkieletowe	34.0	2.0	17.0	51.0	5.5	9.3
Mięsień sercowy	150.0	2.5	60.0	297.0	3.5	85.0
Śledziona	27.5	2.0	13.7	32.5	5.5	9.3
Jądra	33.5	2.5	13.4	30.5	2.0	15.2
Płuca	27.5	3.5	7.9	31.0	3.5	10.3
Śluzówka jelita	21.4	0,0	—	25.5	0.0	—

* — zużycie ketoglutaranu

** — przyrost N_{NH_2}

Zjawisko zwiększania się syntezy aminokwasów w obecności ATP Braunstein próbował tłumaczyć (20) stymulacją przemian w cyklu Krebsa i w konsekwencji zwiększoną dyzmutacją ketoglutaranu. Wydaje się obecnie, że działanie ATP dodanego z zewnątrz lub powstającego endogennie można wytłumaczyć w oparciu o zjawisko odwrócenia biegu elektronów z bursztynianu. Wiadomo od niedawna głównie dzięki pracom Chance'a (30-32), że kosztem odwrócenia fosforylacji oksydatywnej elektrony z bursztynianu mogą być skierowane na nukleotyd pirydynowy i w konsekwencji mogą być zaangażowane w reakcjach redukcji, m.in. w reduktywnej aminacji ketoglutaranu (46, 70, 71). W rzeczywistości

jednak wszystkie reakcje odwodorowania w cyklu Krebsa mogą być sprzężone z syntezą glutaminianu (120, 121, 134—136), chociaż udział ich w tym procesie nie jest jednakowy i prawdopodobnie także różny w różnych tkankach. W wątrobie największe znaczenie w reduktywnej aminacji przypisuje się obecnie odwodorowaniu bursztynianu (120, 128, 134, 136), w nerce na pierwszym miejscu postawić należy reakcję odwodorowania izocytrynianu (121, 129); udział dyzmutacji ketoglutaranu okazał się w obu tkankach niespodziewanie mały (120, 134).

Synteza glutaminianu jest procesem dosyć złożonym i wymaga jednocześnie obecności ketoglutaranu, amoniaku i wodoru w postaci NADH_2 lub NADPH_2 . Pierwszym etapem syntezy jest przyłączenie do enzymu zredukowanej formy nukleotydu pirydynowego. Dopiero wytworzony w ten sposób kompleks wiąże amoniak i cząsteczkę ketoglutaranu (53). Istotnym czynnikiem w syntezie glutaminianu jest zatem dostateczna podaż wodoru. Wydaje się, że o wydajności syntezy aminokwasów decyduje nie tylko aktywność dehydrogenazy glutaminowej, lecz w dużej mierze także i kompetycja między tym enzymem a układem oddechowym o zredukowaną formę nukleotydów pirydynowych.

Synteza karbamylofosforanu Mechanizm wiązania amoniaku w postaci karbamylofosforanu jest złożony i dotychczas nie doczekał się zupełnego wyjaśnienia (36, 38, 58). W reakcji ma miejsce wiązanie dwóch substratów dwutlenku węgla i amoniaku, a powstający produkt jest związkiem wysokoenergetycznym. Wiadomo obecnie, że pierwszym etapem reakcji jest aktywacja CO_2 , drugim natomiast również endoergiczne wiązanie jonu amonowego. Oba etapy reakcji zależą bezwzględnie od obecności N-acylo pochodnych glutaminianu (57, 58, 94, 95); związki te spełniają rolę aktywatorów zmieniając stabilność konfiguracji enzymów (49, 50, 107).

Dalsza przemiana karbamylofosforanu może pójść w dwu kierunkach; nieznaczna jego część ulega kondensacji z kwasem asparaginowym (85, zob. też 116) i zapoczątkowuje proces biosyntezy zasad pirymidynowych, większość natomiast przez kondensację z ornityną (28, 57) rozpoczyna ciąg przemian w tzw. cyklu ornitynowym. W tablicy 3 porównano aktywność syntetazy karbamylofosforanu oraz transkarbamyłaz ornitynowej i asparaginowej w różnych tkankach szczura (65).

Widać wyraźnie, że zdolność wiązania amoniaku w postaci karbamylofosforanu ograniczona jest wyłącznie do wątroby. Z pozostałych tkanek tylko nerki, śluzówka jelita i śliniaki wykazują ślad aktywności. Po nadto wątroba jest praktycznie jedynym narządem, w którym azot karbamylofosforanu zostaje wprowadzony do cyklu ornitynowego. Natomiast aktywność transkarbamyłazy asparaginowej, enzymu kierującego azot karbamylofosforanu do syntezy zasad pirymidynowych, daje się wykazać w większości tkanek i jest w nich tego samego rzędu co w wątrobie.

W wątrobie aktywność transkarbamyłazy ornitynowej przewyższa blisko stukrotnie aktywność transkarbamyłazy asparaginowej.

Synteza glutaminy Synteza glutaminy występuje powszechnie; wykazano ją we wszystkich badanych tkankach ssaków, przy czym najwyższe aktywności stwierdzano zwykle w wątrobie, mózgu i nerkach (118, 130).

Tablica 3

Porównanie aktywności syntetazy karbamylofosforanu oraz transkarbamyłazy ornitynowej i asparaginowej w różnych tkankach szczura (wg 65)

Tkanki	Syntetaza karbamylofosforanu	Transkarbamyłaza ornitynowa	Transkarbamyłaza asparaginowa
	μmole produktu na gram tkanki i godz.		
Wątroba	284	4110	50
Śluzówka jelitowa	10	100	97
Nerki	8	5	34
Ślinianki	10	12	—
Mózg	4	0	21
Trzustka	3	2	16
Śledziona	0	0	21
Mięsień sercowy	0	0	1
Mięsień szkieletowy	0	0	7
Płuca	0	2	28
Plazma	0	0	1
Erytrocyty	0	0	1

Mechanizm syntezy glutaminy nie jest jeszcze dostatecznie poznany (zob. 86, 91), jednak ostatnie badania z pracowni Meistera (83, 84) wskazują na pośrednią aktywację grupy γ -karboksylowej glutaminianu jako na warunek łączenia się substratu z enzymem. Wytworzony kompleks ma reagować z amoniakiem dając glutaminę, ADP i fosforan.

Istnieje szereg zasadniczych różnic między wiązaniem amoniaku w reakcji syntezy glutaminianu i w reakcji syntezy glutaminy. W pierwszej następuje wbudowanie amoniaku w grupę α -karbonylową ketoglutaranu z utworzeniem grupy aminowej. Aminacja połączona jest z redukcją, w której zużywane są dwa atomy wodoru. Związanie zatem jednego mola amoniaku w postaci glutaminianu wymaga energii równoważnej 3 molom ATP, ponadto cząsteczka ketoglutaranu zostaje wyłączona z przemiany w cyklu Krebsa. Synteza glutaminy polega natomiast na wbudowaniu

amoniaku w grupę γ -karboksylową kwasu glutaminowego z utworzeniem ugrupowania amidowego i odbywa się kosztem energii równoważnej 1 molowi ATP (91). Wiązanie amoniaku w grupie amidowej glutaminy jest więc procesem bardziej oszczędnym.

Tablica 4

Wpływ hepatektomii na poziom aminokwasów w tkankach
psa (wg 54)

Tkanki	Czas po hepatek- tomii (w godz.)	Całko- wita zawartość N-NH ₂	Gluta- mina	Kwas glutami- nowy
	mg N na 100ml lub na 100g tkanki			
Plazma	0	3.6		
	5—8	8.5		
	13—24	8.0		
Mięśnie szkieletowe	0	19.6	4.4	4.0
	5—8	21.0	8.0	0.7
	13—24	23.0	9.9	1.0
Mózg	0	23.8	5.2	12.2
	5—8	36.2	12.8	12.7
	13—24	54.0	27.4	12.6

W większości tkanek, poza wątrobą, aktywność syntetazy glutaminy przewyższa, częstokroć bardzo znacznie, aktywność dehydrogenazy glutaminowej. Wydaje się, że synteza glutaminy jest podstawowym procesem wiązania amoniaku w tkankach obwodowych. Możliwe jest oczywiście skojarzone działanie obu enzymów, nawet w takim zestawieniu, w którym aktywność dehydrogenazy glutaminowej ogranicza wydajność całego procesu.

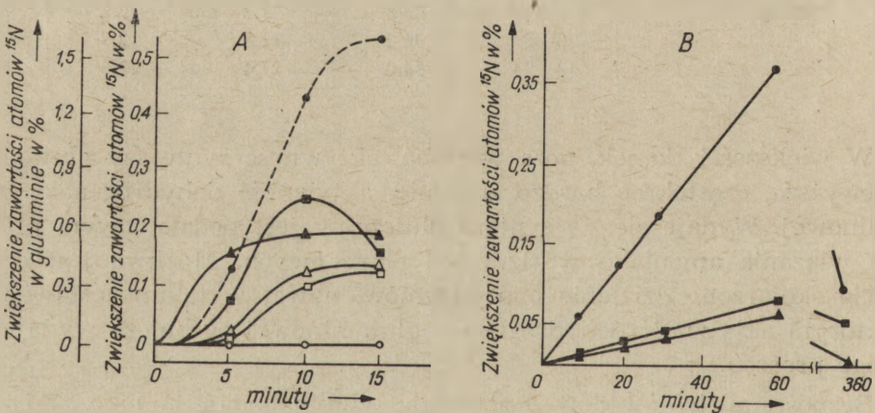
Bezpośrednich dowodów dostarczają wyniki badań *in vivo*. Flock i wsp. (54) wykazali na przykład, że wzrost zawartości aminokwasów w tkankach obwodowych występujący u zwierząt po hepatektomii, jest nierównomierny i w największym stopniu dotyczy glutaminy. Poziom kwasu glutaminowego pozostaje niezmieniony (w mózgu), lub nawet ulega wyraźnemu obniżeniu (w mięśniach szkieletowych). Dane te zawarte w tablicy 4 wskazują, że w mózgu wiązanie amoniaku odbywa się w równej mierze w obu reakcjach, pomimo, że aktywność syntetazy glutaminy przewyższa w tej tkance znacznie aktywność dehydrogenazy glutaminowej. Świadczy to o ścisłej współzależności i skojarzonym dzia-

łaniu obu układów enzymatycznych, przy czym szybkość syntezy glutaminianu byłaby w mózgu czynnikiem ograniczającym wydajność całego procesu.

W mięśniach szkieletowych natomiast istotne znaczenie wydaje się mieć wyłącznie syntetaza glutaminy operująca tu niezależnie i ze znacznie większą wydajnością niż dehydrogenaza glutaminowa, czego wyrazem jest wzrost zawartości glutaminy przy jednoczesnym i prawie równoważnym spadku zawartości kwasu glutaminowego.

Podobne dane dotyczące wiązania amoniaku w mózgu i mięśniach szkieletowych uzyskali du R u i s s e a u i wsp. (124) po podaniu szczurom soli amonowych w dawce LD₉₉. Jednocześnie autorzy ci wykazali, że zmiany zawartości aminokwasów w wątrobie są zupełnie innej natury i odpowiadają mobilizacji cyklu ornitynowego. Najbardziej istotną cechą tych zmian jest dramatyczny wzrost poziomu kwasu asparaginowego. Stymulacja cyklu ornitynowego przez wcześniejsze podanie szczurom argininy zwiększa w sposób istotny wiązanie amoniaku w wątrobie, co wskazywałoby, że czynnikiem ograniczającym jest tu poziom endogennych substratów cyklu ornitynowego.

Duda i Handler (44) wykazali w badaniach izotopowych, że po podaniu szczurom mleczanu amonu znakowanego azotem ¹⁵N 80% związanego we wszystkich tkankach izotopu znajduje się w grupie amidowej glutaminy. Badając następnie rozmieszczenie izotopu w różnych związ-



Rys. 3. Wbudowywanie izotopu azotu ¹⁵N w metabolity azotowe wątroby po podaniu ¹⁵N-mleczanu amonu (A) lub ¹⁵N-D-leucyny (B) (wg 44)

(A) Podano dożylnie 58,5 μmola ¹⁵N-mleczanu amonu (zwiększenie zawartości atomów ¹⁵N—34%)

(B) Podano dożylnie 119 μmoli ¹⁵N-D-leucyny (zwiększenie zawartości atomów ¹⁵N—10%)

▲—▲ kwas glutaminowy; ●—● glutamina; ■—■ mocznik; ○—○ glicyna;
△—△ alanina; □—□ kwas asparaginowy

kach azotowych wątroby stwierdzili, że wbudowywanie izotopu w glutaminian lub mocznik odbywa się około 3 razy wolniej niż w glutaminę; jeszcze wolniej wbudowuje się izotop w asparaginian i alaninę. W rezultacie w czasie 10-20 min. po wstrzyknięciu soli amonowych zawartość

izotopu w glutaminie jest około 7 razy większa niż w którymkolwiek z pozostałych badanych związków (rysunek 3A). Podobne rozmieszczenie izotopu w wątrobie stwierdzono po wstrzyknięciu szczurom znakowanej D-izoleucyny (rysunek 3B), z czego wynika, że losy amoniaku powstającego w przemianie są identyczne z losami amoniaku podanego z zewnątrz. Z porównania danych przedstawionych na rysunkach 1 i 3B widać istotną różnicę w przemianie azotu L- i D-aminokwasów. Pierwsza prowadzi przez transaminację, druga natomiast przez oksydatywną deaminację (zob. 39, 45, 79, 93).

Duda i Handler wnioskuje z rozważań kinetycznych, m.in. z porównania szybkości maksymalnych i stałych Michaelisa, że mechanizm wiązania amoniaku w wątrobie zależy w dużej mierze od jego stężenia. Przy niskich stężeniach jest on wbudowywany głównie w glutaminę a dopiero przy wysokich stężeniach w mocznik. Widać stąd, że nie ma sprzeczności między danymi tych autorów a wynikami du Ruisseau i wsp.. Pierwsi stosowali niewielkie stosunkowo ilości soli amonu i stwierdzali pojawianie się izotopu głównie w glutaminie, drudzy natomiast podając LD₉₉ znaleźli w wątrobie przede wszystkim wzrost zawartości kwasu asparaginowego i mocznika.

Szczególnie ciekawe wyniki dotyczące przemiany amoniaku *in vivo* uzyskano ostatnio w pracowni Waelsha (9-11). Stwierdzono mianowicie, że po podaniu dożylnym soli amonowych znakowanych azotem ¹⁵N w mózgu najwięcej izotopu można znaleźć w azocie amidowym glutaminy oraz, w mniejszym stopniu, w azocie α-aminowym glutaminy (tablica 5). Ilość izotopu w tym ostatnim przewyższa około 4-13 razy ilość izotopu w azocie α-aminowym glutaminianu.

Stwierdzono ponadto, co wykazali również inni autorzy (6, 54), że wzrostowi zawartości glutaminy w mózgu nie towarzyszy odpowiadający spadek glutaminianu. Na podstawie tych danych autorzy wyciągnęli wniosek o istnieniu w mózgu kompartmentacji kwasu glutaminowego. Wyróżniono dwie pule: dużą, wolno wymieniającą izotop oraz małą pulę szybko wymieniającą izotop i pozostającą w równowadze z glutaminianem syntetyzowanym w mózgu *de novo* z ketoglutaranu i amoniaku. Wymiana izotopu między obiema pulami zachodzi stosunkowo wolno. Substratem dla syntezy glutaminy jest wyłącznie glutaminian małej, szybko metabolizowanej puli. Tłumaczy to dobrze różnice w ilości izotopowego azotu w grupach aminowych glutaminy i glutaminianu. Tego rodzaju kompartmentacja wyjaśnia też utrzymywanie się stałego poziomu glutaminianu pomimo wydajnej nawet syntezy glutaminy. Konsekwencją tego stanu rzeczy jest możliwość szybkiego wyczerpywania się endogennego ketoglutaranu i zahamowania biegu cyklu Krebsa. Berli i wsp. przedstawili pewne dowody (9) świadczące o istnieniu mechanizmu wyrównawczego w postaci syntezy szczawiooctanu *de novo* przez

karboksylację pirogronianu; nie wiadomo jednak czy wydajność tego procesu *in vivo* jest dostatecznie duża. Zawartość ketoglutaranu w mózgu w przebiegu śpiączki wątrobowej lub w doświadczalnym zatruciu amoniakiem zdaje się wskazywać mimo wszystko na niedobór metabolitów cyklu Krebsa (35, zob. też 13).

Tablica 5

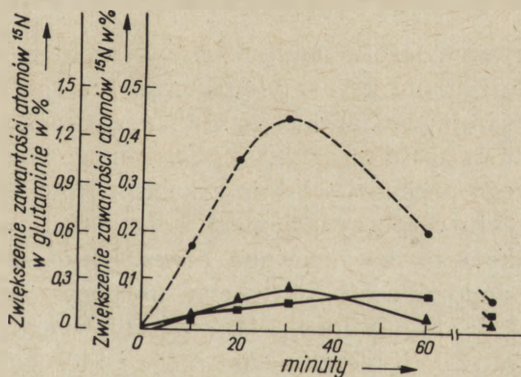
Rozmieszczenie azotu ^{15}N w metabolitach krwi, mózgu i wątroby kota po infuzji soli amonowych (wg 10)

	Mózg		Wątroba		Krew	
	^{15}N na gram tkanki	% całości izotopu w tkance	^{15}N na gram tkanki	% całości izotopu w tkance	^{15}N na gram tkanki	% całości izotopu w tkance
	μmole		μmole		μmole	
Ekstrakt tkankowy (kwasem trójchlo- rooctowym)	10.4	100.0	22.8	100.0	6.4	100.0
Glutamina (N-amidowy)	4.3	41.3	0.34	1.5	0.06	0.9
Glutamina (N-aminowy)	1.2	11.8	0.08	0.4	0.01	0.2
Kwas glutaminowy	0.15	1.4	0.95	4.2	0.009	0.2
Kwas asparaginowy	0.02	0.2	1.84	8.1	0.005	0.1
Kwas γ -aminomasłowy	0.02	0.2	—	—	—	—
Glutation (kwas glutaminowy)	0.008	0.1	0.11	0.5		
Mocznik (NH_3)	0.14	1.4	2.2	9.6	1.32	20.6
Amoniak	4.4	42.1	10.7	47.1	5.0	78.1
Suma		98.6		71.4		100.1

Innego rodzaju kompartmentację glutaminianu stwierdzono w wątrobie (9). Wyróżniono tam mianowicie pulę szybko wymieniającą izotop i pozostającą w równowadze, poprzez transaminację, z asparaginianem. Glutaminian tej puli podlega tylko powolnej wymianie z glutaminianem spoza puli i glutaminą wątroby. Przyjęcie tego rodzaju kompartmentacji tłumaczy brak różnic w zawartości azotu izotopowego w glutaminianie i glutaminie w wątrobie i wskazuje, że nawet wydajna synteza glutaminy nie prowadzi do zubożenia tego narządu w metabolity cyklu Krebsa.

Glutaminę można porównać do swoistego układu buforowego w stosunku do wolnego amoniaku — powszechnie zresztą określa się ją jako rezerwuar grup aminowych lub jonu amonowego. Dezamidacja glutaminy (zob. 118 i 86) odbywa się dwiema drogami; albo wprost pod działa-

niem glutaminazy (117, 124), albo w wyniku transaminacji z różnymi ketokwasami (47, 92). W obu typach reakcji uwalnia się z grupy amidowej amoniak, jednak dalsze jego losy są już w pewnym stopniu zdeterminowane. Dotyczy to w każdym razie glutaminy nerek i wątroby. Wiadomo (146), że dezamidacja glutaminy jest podstawowym i prawie wyłącznym źródłem amoniaku moczu. Produkowany przez glutaminazę nerkową amoniak zostaje w tej postaci w całości wydany z ustroju (stanowi to około 5% wydalonego azotu), rozkład glutaminy jest tu więc równoznaczny z usuwaniem azotu. Jest to wyrazem zachowanej przez nerki ssaków zdolności ustrojów niższych do wydalania wolnego amoniaku do zewnętrznego środowiska wodnego. W wątrobie natomiast glutamina wydaje się być bezpośrednim prekursorem amoniaku kierowanego do syntezy karbamylfosforanu. Istnieją nawet poglądy (3, 27, 68), że azot amidowy glutaminy służy wprost do syntezy karbamylfosforanu bez pośredniego uwalniania amoniaku, lub że glutamina wbudowuje swój azot amidowy w mocznik na innej zupełnie drodze (zob. 68). Zagadnienie to, podobnie jak i sam mechanizm syntezy karbamylfosforanu czeka jeszcze na ostateczne wyjaśnienie. Mimo braku bezpośrednich dowodów szereg przesłanek wskazuje, że azot amidowy glutaminy jest bezpośrednim prekursorem amoniaku wbudowywanego w mocznik. Można przyjąć w oparciu o dane Dudy i Handlera (44), że w tkankach obwodo-



Rys. 4. Wbudowywanie izotopu azotu ^{15}N w metabolity wątroby po podaniu glutaminy znakowanej azotem ^{15}N w grupie amidowej (wg 44)

Podano dożylnie $46,2 \mu\text{mola } ^{15}\text{N}$ (amid)-glutaminy (zwiększenie zawartości atomów ^{15}N —32,2%) szczurowi o wadze około 350 g; ▲ —▲ kwas glutaminowy; ○ —○ glutamina; ■ —■ mocznik

wych wiązanie amoniaku odbywa się prawie wyłącznie w reakcji syntezy glutaminy, a mimo to poziom glutaminy jest stosunkowo niski, znacznie niższy od poziomu w plazmie (139). Rozkład glutaminy w tkankach obwodowych uwalnia równoważne w stosunku do glutaminianu ilości amoniaku, dla którego jedyną właściwie drogą przemiany jest ponowne wbudowanie w cząsteczkę glutaminy (zob. rysunek 4). Jest zatem zrozumiałe,

że regeneracja glutaminianu z glutaminy zachodzić może praktycznie jedynie w wątrobie, tylko tam bowiem istnieje możliwość związania uwolnionego amoniaku w reakcji syntezy karbamylofosforanu. D u d a i H a n d l e r (44) wykazali, że izotopowy azot amidowy glutaminy pojawia się wyłącznie i stosunkowo wolno w moczniku i w kwasie glutaminowym (rysunek 4).

Z rozważań kinetycznych autorzy ci wnioskują, że przemiana glutaminy w wątrobie dostarcza dostatecznych ilości amoniaku potrzebnego do syntezy mocznika. Glutamina jest więc nie tylko rezerwuarem jonu amonowego lecz również formą jego transportu. Amoniak związany w tkankach obwodowych w postaci glutaminy jest w tej właśnie formie transportowany z krwią do wątroby, gdzie po dezamidacji służy bezpośrednio do syntezy karbamylofosforanu, lub zostaje ponownie wbudowany w glutaminę. Znaczna różnica w przepuszczalności komórek wątrobowych dla glutaminy i kwasu glutaminowego (127) wskazywałaby, że glutaminian zregenerowany w wątrobie z glutaminy nie wraca z krwią do tkanek obwodowych, lecz ulega przemianie w asparaginian dostarczając drugi atom azotu do syntezy mocznika. W tym hipotetycznym częściowo ujęciu glutamina byłaby prekursorem obu atomów azotu mocznika i stanowiłaby istotny etap w katabolizmie azotu aminokwasów w tkankach ssaków.

III. Usuwanie azotu aminokwasów — cykl ornitynowy

Funkcję usuwania azotu aminokwasów spełnia cykl ornitynowy. W pierwszym jego etapie karbamylofosforan, którego azot pochodzi pośrednio z grupy aminowej aminokwasów ulega kondensacji z ornityną na cytrulinę. Połowa azotu mocznika wytwarzanego w dalszych reakcjach cyklu ornitynowego pochodzi właśnie z karbamylofosforanu (108).

Drugi etap cyklu rozpoczyna kondensacja cytruliny z kwasem asparaginowym. Reakcja ta, katalizowana przez syntetazę argininobursztynową, przebiega endoergicznie, przy czym ugrupowanie ureidowe cytruliny ulega redukcji do ugrupowania gwanidynowego kwasu argininobursztynowego. W reakcji bierze udział ATP, z którego uwalnia się pirofosforan; jego rozkład katalizowany przez pirofosfatazę jest czynnikiem ograniczającym szybkość syntezy kwasu argininobursztynowego; ten ostatni rozpada się następnie do argininy i kwasu fumarowego (111-113). W ten sposób azot grupy aminowej asparaginianu zostaje wbudowany w bezpośredni prekursor końcowego produktu przemiany — argininę. Połowa azotu wydalonego z ustroju w postaci mocznika zostaje wprowadzona do cyklu ornitynowego tą właśnie drogą (zob. 108, 110). Kwas asparaginowy jest specyficznym donatorem grupy aminowej. Grupy aminowe pozostałych aminokwasów mogą być przeniesione na cytrulinę tylko po uprzednim wbudowaniu w cząsteczkę asparaginianu (74) w wyniku transaminacji. Przez zablokowanie *in vivo* enzymów pirydoksalo-

wych lub przez zablokowanie syntezy kwasu argininobursztynowego kwasem α -metylo D-,L-,asparaginowym (antymetabolit kwasu asparaginowego) można prawie całkowicie zahamować uwalnianie amoniaku z naturalnych aminokwasów (25). Proces usuwania azotu aminokwasów zapoczątkowują transaminacje z udziałem ketoglutaranu — powstaje glutaminian, który transaminuje następnie ze szczawiooctanem; w reakcji odtwarza się ketoglutaran a powstający asparaginian oddaje swoją grupę aminową na cytrulinę. Powstający w tym etapie fumaran ulega przemianie w szczawiooctan. Dzięki temu działa cykliczny ciąg reakcji kierujący azot aminokwasów do końcowego produktu przemiany i jednocześnie regenerujący łańcuch węglowy metabolitów cyklu Krebsa.

Wątroba jest jedynym narządem posiadającym pełny zestaw enzymów zaangażowanych w syntezie mocznika z amoniaku (65). Niektóre tkanki, w tym nerki (65, 111) i mózg (114, 131, 142) wykazują dość znaczne, porównywalne z wątrobą aktywności trzech ostatnich enzymów cyklu ornitynowego, jednak enzym syntetyzujący cytrulinę wykazuje w nerce np. tylko 1/1000 aktywności wątroby (65); dlatego też nerki nie mają żadnego znaczenia w produkcji mocznika z amoniaku, mogą jednak produkować mocznik z cytruliny (tablica 6). Aktywność tej syntezy w nerce

Tablica 6

Porównanie aktywności enzymów cyklu ornitynowego w nerce i wątrobie szczurów (wg 65)

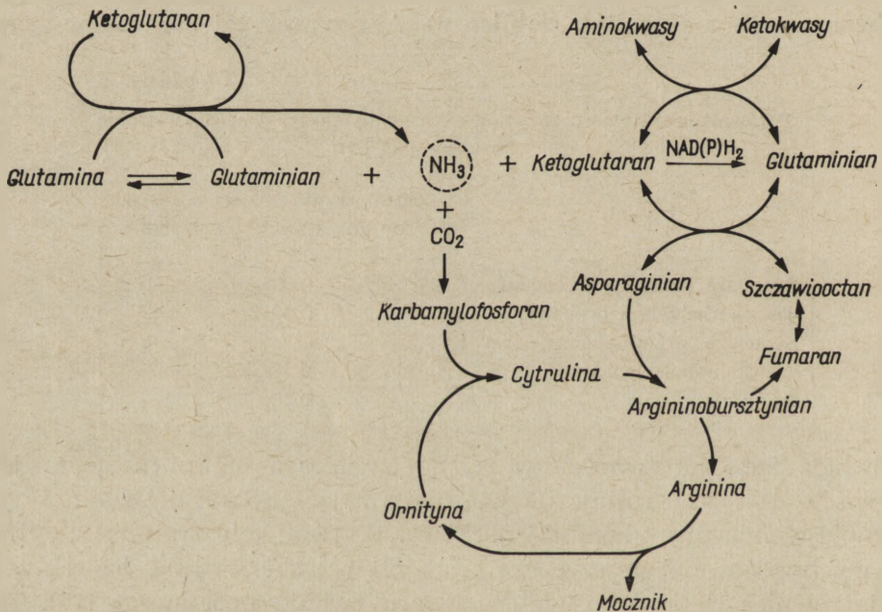
Enzym	Stosunek aktywności w nerce do aktywności w wątrobie
Syntetaza karbamylfosforanu	0.035
Transkarmylaza ornitynowa	0.001
Syntetaza argininobursztynowa i argininobursztynaza	0.3
Arginaza	0.2

odpowiada 20% aktywności wątroby. Czynnikiem ograniczającym jest oczywiście dowóz cytruliny z krwią dopływającą do nerki i zdolność jej wychwytywania przez komórki nerkowe. Wytwarzanie argininy z cytruliny wychwytywanej przez nerkę z przepływającej krwi ma istotne znaczenie również w procesie syntezy kwasu gwanidynoocetowego (15). Ten prekursor kreatyny powstaje w wyniku transamidynacji (zob. 109) argininy z glicyną. W podobnej reakcji powstawać może kwas γ -gwanidynomasłowy (103). Powstaje on przede wszystkim w mózgu (102) z argininy (jak się obecnie przyjmuje endogennej wytwarzanej z cytruliny dostarczonej z krwią) i z kwasu γ -aminomasłowego. Związkom tym przypisuje się w metabolizmie tkanki mózgowej poważną, choć dotychczas jeszcze niejasną rolę (6, 139). Zdolność nerki i mózgu do wychwytywania cytruliny i jej kondensacji z asparaginianem ma istotne znaczenie, ponie-

waż jest to podstawowa reakcja regeneracji szczawiooctanu. W tkankach takich jak nerki i mózg, zdolność aminacji ketoglutaranu decyduje z grubsza o ich wrażliwości na działanie amoniaku. Wydajność tej reakcji w nerce jest zapewne dość znaczna, w mózgu raczej niewielka, a jej znaczenie biologiczne uwidacznia się zwłaszcza w stanach zaburzeń metabolicznych wątroby.

IV. Przemiany azotu aminokwasów jako wyraz swoistości biochemicznej tkanek

W pierwszych trzech rozdziałach omówiono swoistość przemian azotu aminokwasów w tkankach ssaków na tle ogólnego obrazu tych przemian. Wydaje się, że dość wyraźnie zarysowała się przy tym przeciwstawność wątroby i tkanek obwodowych. Wątroba odgrywa w przemianach aminokwasów rolę centralną, dzięki występowaniu w tym narządzie wszystkich prawie układów enzymatycznych związanych z metabolizmem aminokwasów (rysunek 5). Wydaje się, że to właśnie jest istotnym wyrazem

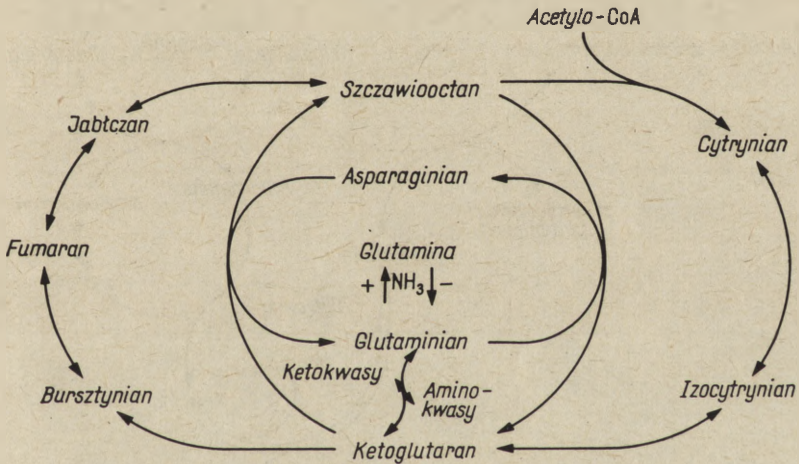


Rys. 5. Uproszczony schemat przemian azotu aminokwasów w wątrobie ssaków

biochemicznej swoistości wątroby. Specyfikę przemian aminokwasów w innych tkankach określać będzie w pierwszym rzędzie to, o ile uboższy jest zestaw enzymatyczny danego narządu w porównaniu z wątrobą. Celowym wydaje się zestawienie i porównanie głównych ciągów reakcji w przemianie azotu aminokwasów w tych tkankach, w których jest ona najlepiej poznana.

Wątroba — Najpoważniejsze źródło amoniaku w ustroju stanowią reakcje zachodzące w jelicie (13). W związku z tym poziom amoniaku w krwi trzewnej — docierającej przez żyłę wrotną do wątroby znacznie przewyższa poziom amoniaku w krwi obwodowej (zob. 34, 51). Wątroba jest więc narządem w największym stopniu obciążonym amoniakiem i odpowiedzialnym za jego związanie. Jako jedyny z narządów wątroba posiada wszystkie możliwe mechanizmy wiązania amoniaku, jakimi dysponują organizmy ssaków. Są to reakcje syntezy: glutaminy, kwasu glutaminowego i karbamylofosforanu. Pierwsza z nich jest reakcją zupełnie dla wątroby niespecyficzną i zachodzi we wszystkich badanych tkankach, ostatnia natomiast ma miejsce wyłącznie w wątrobie. Synteza glutaminy, mimo że zachodzi również w niektórych innych tkankach (nerki i mózg) największą aktywność wykazuje właśnie w wątrobie.

Wątroba i tu spełnia najpoważniejszą funkcję tym bardziej że posiada sprawny system regenerujący metabolity cyklu Krebsa z kwasu asparaginowego. Istotnym ogniwem tego mechanizmu jest reakcja syntezy i rozpadu kwasu argininobursztynowego, jednego z członów cyklu ornitynowego. Cykl ten, podstawowy w procesie usuwania azotu aminokwa-



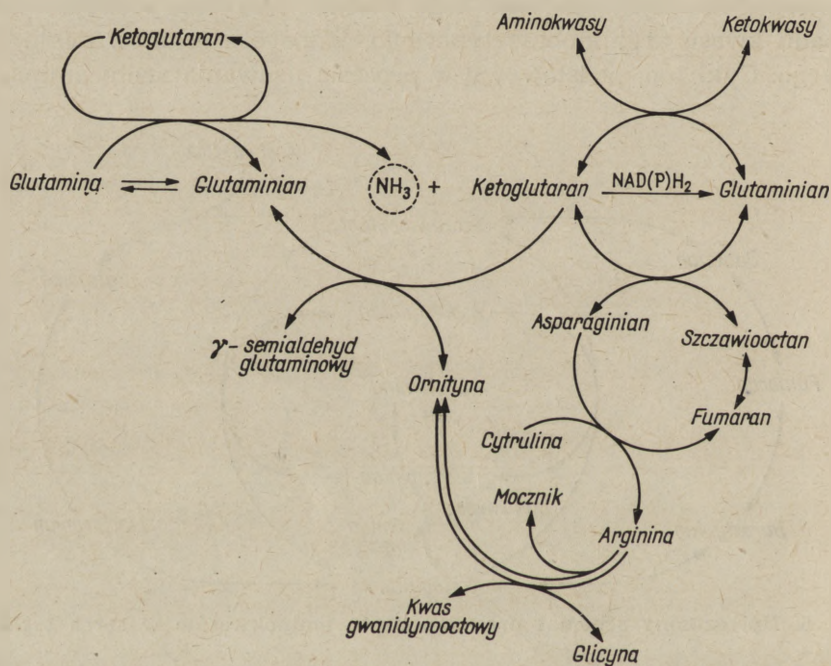
Rys. 6. Uproszczony schemat przemian azotu aminokwasów w sercu ssaków

sów występuje w całości tylko w wątrobie. Wiązanie amoniaku w postaci karbamylofosforanu i jego kondensacja z ornityną są to reakcje charakterystyczne tylko dla wątroby. Dalsze reakcje cyklu, m.in. synteza i rozpad argininobursztynianu zachodzą także w innych tkankach (nerki i mózg) jednak w znacznie mniejszym stopniu. Istotnym elementem specyfiki tkankowej wątroby są zapewne reakcje transaminacji. Trudno pokusić się o dokładniejszą ilościową charakterystykę tych układów enzymatycznych, stwierdzić można jedynie, że największe znaczenie mają tu, podobnie jak i w innych tkankach, aminokwasy związane bezpośrednio

nio z przemianą w cyklu Krebsa. Pewnym wydaje się również, że transaminaza glutaminowo-alaninowa wykazuje w wątrobie wyższą aktywność niż w innych tkankach. Warto też zwrócić uwagę, że w wątrobie istnieje dodatkowa, pośrednia droga dezamidacji glutaminy przez transaminację z ketoglutaranem; poza wątrobą reakcję tę wykazano tylko w nerce.

Mięsień sercowy — Jest to narząd, w którym przemiana azotu aminokwasów najżywiej kontrastuje z przemianą w wątrobie. Praktycznie zachodzą tu wyłącznie reakcje transaminacji połączone z częściowym spalaniem łańcuchów węglowych aminokwasów (rysunek 6). Istnieje również możliwość syntezy i rozpadu glutaminy.

Brak jest natomiast zupełnie aktywności dehydrogenazy glutaminowej, co stanowi skuteczne zabezpieczenie przed możliwością interferencji amoniaku z egzoergicznymi przemianami cyklu kwasów trójkarboksylowych.

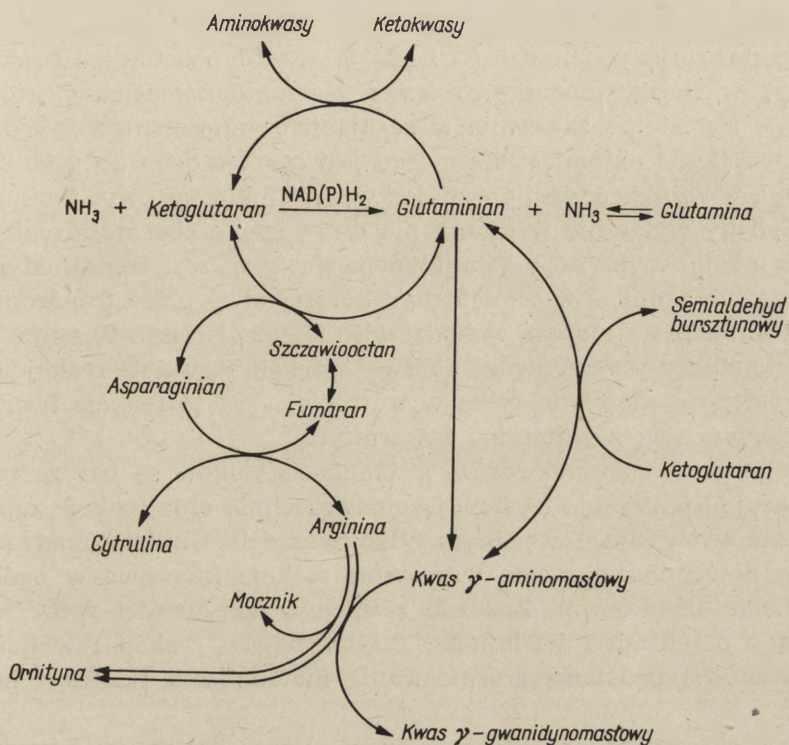


Rys. 7. Uproszczony schemat przemian azotu aminokwasów w nerkach ssaków

wych. Brak tu także zupełnie enzymów cyklu ornitynowego. Nadzwyczaj uboga przemiana azotowa w mięśniu sercowym jest wyrazem swoistości biochemicznej tego narządu determinowanej przede wszystkim przez stałą pracę mechaniczną, stwarzającą olbrzymie zapotrzebowanie energetyczne.

Mózg i nerki — Przemiana azotu aminokwasów w tych narządach wykazuje najwięcej podobieństwa do przemiany w wątrobie (rysunki 7

i 8). W obu tych tkankach stwierdza się wyraźną aktywność dehydrogenazy glutaminowej, w obu też ma miejsce synteza mocznika z cytruliny i kwasu asparaginowego. Wydaje się, że w tkankach, które wykazują aktywność dehydrogenazy glutaminowej istnieje kompetycja o wspólny substrat między tym enzymem, a dehydrogenazą ketoglutarową i układem



Rys. 8. Uproszczony schemat przemian azotu aminokwasów w mózgu ssaków

oddechowym. Wydatna synteza glutaminianu, spowodowana np. zwiększoną zawartością w tkankach amoniaku usuwa z cyklu Krebsa znaczne ilości ketoglutaranu i zużywa jednocześnie równoważne ilości zredukowanej formy nukleotydów pirydynowych. Wynikające stąd zwolnienie biegu cyklu Krebsa prowadzić może do zaburzeń energetycznych ujawniających się w mózgu objawami niedotlenienia i śpiączki (12, 13), a w nerce zmianami w procesach sekrecji i resorpcji kanalikowej. Wrażliwość mózgu na działanie amoniaku jest bez porównania większa niż drażliwość nerki. Wydaje się, że istotne znaczenie mają tu takie czynniki jak: a) specyficzna współzależność dehydrogenazy glutaminowej i syntetazy glutaminy w mózgu, która determinuje *in vivo* szybkość i wydatną amidację syntetyzowanego endogennie glutaminianu z ketoglutaranem, b) większa w nerce szybkość przemiany metabolitów cyklu Krebsa, c) zdolność nerki do wychwytywania znacznych ilości ketoglutaranu, d) znacznie większa w ner-

ce aktywność reakcji kondensacji cytruliny z kwasem asparaginowym (aktywność tej reakcji w nerce stanowi około 20-30% aktywności wątroby). Ten cząstkowy cykl ornitynowy obejmujący tylko drugi etap syntezy mocznika ma istotne znaczenie w metabolizmie obu tych tkanek stanowi bowiem drogę regeneracji metabolitów cyklu Krebsa z kwasu asparaginowego.

Wspólną cechą obu narządów stanowią także reakcje transamidynacji. W nerce powstaje w ten sposób kwas γ -gwanidynoocetowy — prekursor kreatyny, w mózgu dodatkowo kwas γ -gwanidynomasłowy, któremu przypisuje się istotne znaczenie w regulacji czynności nerwowych. Zupełnie specyficzną natomiast dla mózgu jest reakcja dekarboksylacji glutaminianu, w wyniku której powstaje kwas γ -aminomasłowy. Aminokwas ten spotykany wyłącznie w mózgu ma dwie, znane obecnie, drogi przemian: zamianę w kwas γ -gwanidynomasłowy przez transamidynację z arginina, lub zamianę w semialdehyd bursztynowy przez transaminację z ketoglutaranem — tą drogą wchodzi więc w cykl Krebsa. W nerce z kolei zwrócić należy jeszcze uwagę na dwie względnie swoiste reakcje (poza nerką występują właściwie tylko w wątrobie) — są to reakcje transaminacji ketoglutaranu z glutamina i z ornityną.

Drogi przemian aminokwasów w tkankach ssaków są bardzo różnorodne i obejmują reakcje występujące powszechnie oraz reakcje zupełnie specyficzne występujące w jednym tylko narządzie. Swoistość narządową przemian determinują przede wszystkim reakcje kluczowe w ogólnym metabolizmie tkankowym. Znaczne różnice w aktywności tych reakcji decydują o przebiegu i wydajności całych ciągów reakcji i w konsekwencji stanowią podstawę zróżnicowania metabolizmu tkanek i narządów.

Wydaje się, że reakcją, która w dużej mierze determinuje specyfikę narządową przemian aminokwasów jest reduktywna aminacja ketoglutaranu. Dehydrogenaza glutaminowa jest enzymem, w którego działaniu zespala się proces asymilacji azotu i regulacja biegu cyklu Krebsa. Można przypuszczać, że *in vivo* istnieje w większym lub mniejszym stopniu kompetycja między dehydrogenazą ketoglutarową i dehydrogenazą glutaminową o wspólny substrat. Ma to istotne znaczenie dla ogólnego metabolizmu tkankowego. Kompetycja między tymi dwoma enzymami o cząsteczkę ketoglutaranu jest w gruncie rzeczy kompetycją między ciągiem reakcji cyklu kwasów trójkarboksylowych z jednej, a ciągiem reakcji biosyntezy aminokwasów z drugiej strony. Jest niejako kompetycją między procesami utleniania i redukcji, degradacji i biosyntezy.

LITERATURA

1. Angielski S., *Post. Biochem.* **4**, 449 (1958).
2. Awapara J., Seale B., *J. Biol. Chem.* **194**, 497 (1952).
3. Bach S. J., Smith M., *Biochem. J.* **64**, 417 (1956).
4. Balazs R., *Biochem. J.* **89**, 44P (1963).
5. Balazs R., Magyar K., Richter D., w *Comparative Neurochemistry*, red. D. Richter, Londyn 1964, str. 225.
6. Baxter C. F., Roberts E., w *Neurochemistry of Nucleotides and Amino Acids*, red. R. O. Brady, D. B. Tower, New York 1960, str. 127.
7. Berezowska N. N., *Biochimija* **21**, 733 (1956).
8. Berezowska N. N., *Biochimija* **23**, 125 (1958).
9. Berl S., Chang S. C., Waelsch H., w *Comparative Neurochemistry* red. D. Richter, Londyn 1964, str. 207.
10. Berl S., Takagaki G., Clarke D. D., Waelsch H., *J. Biol. Chem.* **237**, 2562 (1962).
11. Berl S., Takagaki G., Clarke D. D., Waelsch H., *J. Biol. Chem.* **237**, 2570 (1962).
12. Bessman S. P., Bessman A. N., *J. Clin. Invest.* **32**, 622 (1955).
13. Bessman S. P., *Advances Clin. Chem.*, red. H. Sobotka, C. P. Stewart, New York 1959, tom 2, str. 135.
14. Blanchard M., Green D. E., Nocito V., Ratner S., *J. Biol. Chem.* **161**, 583 (1945).
15. Borsook H., Dubnoff J. W., *J. Biol. Chem.* **138**, 389 (1941).
16. Borst P., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 256 (1962).
17. Borst P., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 170 (1960).
18. Borst P., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 362 (1961).
19. Braunstein A. E., *Adv. Enzymol.* **19**, 335 (1957).
20. Braunstein A. E., *Proceedings of the IVth Intern. Congr. of Biochem.*, Vienna 1958, red. W. Auerswald, O. Hoffmann-Ostenhof, Londyn, 1959, tom 14, str. 63.
21. Braunstein A. E., Azarkh Z. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 634 (1957).
22. Braunstein A. E., Azarkh Z. M., *Biochimija* **22**, 430 (1957).
23. Braunstein A. E., Byczkow S. M., *Nature* **144**, 751 (1939).
24. Braunstein A. E., Kritzman M. C., *Enzymologia* **2**, 129 (1937).
25. Braunstein A. E., Severina J. S., Babska J. E., *Biochimija* **21**, 738 (1956).
26. Buchanan J. M., Hartman S. C., *Adv. Enzymol.* **21**, 199 (1959).
27. Burke T. W., Miller L. L., *Cancer Res.* **16**, 330 (1956).
28. Burnett G. H., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **229**, 337 (1957).
29. Cammarata P. S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **187**, 439 (1950).
30. Chance B., I.U.B. /I.U.B.S. Symp. on Biological Structure and Function, Stockholm 1960, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, Londyn 1961, tom 2, str. 119.
31. Chance B., Hollunger G., *Fed. Proc.* **16**, 163 (1957).
32. Chance B., Hagihara B., *Proceedings of Vth Intern. Congr. of Biochem.* Moscow 1961, Pergamon Press, Londyn 1963, tom 5, str. 3.
33. Chappel J. B., Greville G. D., *Nature* **190**, 502 (1961).
34. Christensen H. N., *Mammalian Protein Metabolism*, red. H. N. Munro, J. B. Allison, New York 1964, tom 1, str. 105.
35. Clark G. N., Eiseman B., *New England J. Med.* **259**, 178 (1958).
36. Cohen P. P. w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1962, tom. 6, str. 477.

37. Cohen P. P., Hekhuis G. L., *J. Biol. Chem.* **149**, 19 (1943).
38. Cohen P. P., Marschall M. w The Enzymes, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1962, tom 6, str. 327.
39. Cohen P. P., Sallach H. J., w Metabolic Pathways, red. D. M. Greenberg, New York 1961, tom 2, str. 1.
40. Coon M. J., Abrahamsen N. S. B., Greene G. S., *J. Biol. Chem.* **199**, 75 (1952).
41. Copenhaver J. H., Jr., Mc Shan W. H., Mayer R. K., *J. Biol. Chem.* **183**, 73 (1950).
42. Dawey C. L., *Nature* **183**, 995 (1959).
43. Dewan J. G., *Biochem. J.* **32**, 1378 (1938).
44. Duda G. D., Handler P., *J. Biol. Chem.* **232**, 303 (1958).
45. Dunn J. T., Perkoff G. T., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 327 (1963).
46. Ernster L., I.U.B. (I.U.B.S. Symp. on Biological Structure and Function, Stockholm 1960, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, Londyn 1961, tom 2, str. 139.
47. Errera M., Greenstein J. P., *J. Biol. Chem.* **178**, 495 (1948).
48. Euler H., Adler E., Gunter G., Das N. B., *Z. Physiol. Chem.* **254**, 61 (1938):
49. Fahieu L. A., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1925 (1964).
50. Fahieu L. A., Schooler J. M., Gehred G. A., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1935 (1964).
51. Felix K. w Thanhauser's Textbook of Metabolism and Metabolic Disorders, red. N. Zollner, S. Estron, New York i Londyn 1962, tom 1, str. 331.
52. Fincham J. R. S., Boulter A. B., *Biochem. J.* **62**, 72 (1956).
53. Fisher H. F., *J. Biol. Chem.* **235**, 1830 (1960).
54. Flock E. V., Block M. A., Grindlay J. H., Mann F. C., Bollman J. L., *J. Biol. Chem.* **200**, 529 (1953).
55. Frieden C., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 431 (1958).
56. Greenberg D. M., w Metabolic Pathways, red. D. M. Greenberg, New York 1961, tom 2, str. 79 i 173.
57. Grisolia S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **204**, 753 (1953).
58. Grisolia S., Raijman L., *Adv. Chem. Ser.* **44**, 128 (1964).
59. Gutfreund H., Ebner K. E., Mendiola L., *Nature* **192**, 820 (1961).
60. Haan de E. J., Tager J. M., Slater E. C., *Biochim Biophys. Acta* **89**, 375 (1964).
61. Haslam R. J., Krebs H. A., *Biochem. J.* **88**, 566 (1963).
62. Hird E. J. R., Morton D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 222 (1960).
63. Hird E. J. R., Morton D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 353 (1964).
64. Hunter F. E., Hixon W. H., *J. Biol. Chem.* **181**, 67 (1949).
65. Jones M. E., Anderson C., Hodes S., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 499 (1961).
66. Jones E. A., Gutfreund H., *Biochem. J.* **79**, 608 (1961).
67. Jones E. A., Gutfreund H., *Biochem. J.* **84**, 46 (1962).
68. Kamin H., Handler P., *Ann. Rev. Biochem.* **26**, 419 (1957).
69. Kennan A. L., Cohen P. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **106**, 170 (1961).
70. Klingenberg M., I.U.B. /I.U.B.S. Symp. on Biological Structure and Function, Stockholm 1960, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, Londyn 1961, tom 2, str. 227.
71. Klingenberg M., Proceedings of Vth Intern. Congr. of Biochem., Moscow 1961, Pergamon Press, Londyn 1963, tom 5, str. 46.
72. Klingenberg M., Slenczka W., *Biochem. Z.* **331**, 486 (1959).
73. Klingman J. D., Handler P., *J. Biol. Chem.* **232**, 369 (1958).

74. Kluge I. V., *Biochimija* **21**, 516 (1956).
75. Knox W. C., May-Knox M., *Biochem. J.* **49**, 686 (1951).
76. Kochakian C. D., Endahl B. R., Endahl G. L., *Amer. J. Physiol.* **197**, 129 (1959).
77. Krebs H. A., *Biochem. J.* **29**, 1620 (1935).
78. Krebs H. A., *Biochem. Soc. Symp.* Nr 1, red. R. T. Williams, Cambridge 1948, str. 2.
79. Krebs H. A., w *Mammalian Protein Metabolism*, red. H. N. Munro, J. B. Allison, New York 1964, tom 1, str. 125.
80. Krebs H. A., Bellamy D., *Biochem. J.* **75**, 523 (1960).
81. Krebs H. A., Cohen P. P., *Biochem. J.* **33**, 1895 (1939).
82. Krebs H. A., Eggleston L. K., Hems R., *Biochem. J.* **43**, 406 (1948).
83. Krishnaswamy P. R., Pamiljans V., Meister A., *Fed. Proc.* **19**, 349 (1960).
84. Krishnaswamy P. R., Pamiljans V., Meister A., *J. Biol. Chem.* **235**, PC. 39 (1960).
85. Lowenstein J. M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **220**, 57 (1956).
86. Makarewicz W., *Post. Biochem.* **8**, 237 (1962).
87. Meister A., *Adv. Enzymol.* **16**, 319 (1955).
88. Meister A., *Biochemistry of the Amino Acids*, New York 1957.
89. Meister A., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1962, tom 6, str. 193.
90. Meister A., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy K. Myrback, New York 1962, tom 6, str. 247.
91. Meister A., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1962, tom 6, str. 443.
92. Meister A., Tize S. V., *J. Biol. Chem.* **187**, 173 (1950).
93. Meister A., Wellner D., Scott S. J., *J. Natl. Cancer Inst.* **24**, 31 (1960).
94. Metzberg R. L., Marschall M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **233**, 1560 (1958).
95. Metzberg R. L., Hall L. M., Marschall M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **229**, 1019 (1957).
96. Muting D., Bette L., *Nature* **203**, 192, (1964).
97. Newton A. A., Perry S. V., *Biochem. J.* **74**, 122 (1960).
98. Olson J. A., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **197**, 67 (1952).
99. Olson J. A., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **202**, 841 (1953).
100. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W., *Biochem. Z.* **188**, 15 (1927).
101. Peraino C., Pitot H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 222 (1963).
102. Pisano J. J., Udenfriend S., *Fed. Proc.* **17**, 403 (1958).
103. Pisano J. J., Mitoma C., Udenfriend S., *Nature* **180**, 1125 (1957).
104. Purzycka J., *Post. Biochem.* **10**, 359 (1964).
105. Raczyńska-Bojanowska K., Bełżecka K., *Post. Biochem.* **6**, 163 (1960).
106. Raijman L., Grisolia S., *J. Biol. Chem.* **239**, 1272 (1964).
107. Ratner S., *Adv. Enzymol.* **15**, 319 (1954).
108. Ratner S., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1962, tom 6, str. 267.
109. Ratner S., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1962, tom 6, str. 495.
110. Ratner S., Anslow W. P., Petrack B., *J. Biol. Chem.* **204**, 115 (1953).
111. Ratner S., Pappas A., *J. Biol. Chem.* **179**, 1183 (1949).
112. Ratner S., Petrack B., *J. Biol. Chem.* **200**, 175 (1953).

113. Ratner S., Petrack B., *J. Biol. Chem.* **200**, 175 (1953).
114. Ratner S., Morell H., Carvalho E., *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 280 (1960).
115. Recknagel R. P., Potter V. R., *J. Biol. Chem.* **191**, 263 (1951).
116. Richterich R., Goldstein L., *Am. J. Physiol.* **195**, 316 (1955).
117. Richterich R., Goldstein L., Cohen E., *Z. Physiol. Chem.* **312**, 45 (1958).
118. Roberts E., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, New York 1960, tom 4, str. 285.
119. Rogulski J., Dane nieopublikowane.
120. Rogulski J., Angielski S., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 1 (1963).
121. Rogulski J., Angielski S., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 125 (1963).
122. Rogulski J., Angielski S., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 133 (1963).
123. Rowsell E. V., *Biochem. J.* **64**, 235 i 246 (1956).
124. Ruisseaudu J. P., Greenstein J. P., Winitz M., Birnbaum S. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 161 (1957).
125. Salvatore F., Zappia V., Abstracts of Vith Intern. Congr. of Biochem., New York 1964, sec. IV-147, str. 331.
126. Sayre F. W., Roberts E., *J. Biol. Chem.* **233**, 1128 (1958).
127. Schwerin P., Bessman S. P., Waelsch H., *J. Biol. Chem.* **184**, 37 (1950).
128. Slater E. C., Tager J. M., Snoswell A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 177 (1962).
129. Snoke J. E., *J. Biol. Chem.* **223**, 271 (1956).
130. Speck J., F., *J. Biol. Chem.* **179**, 1405 (1949).
131. Sporn M. D., Dingman W., Defalco A., Davies R. K., *J. Neurochem.* **5**, 62 (1959).
132. Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **211**, 915 (1954).
133. Strecker H. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **32**, 448 (1951).
134. Struck J., Sizer I. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 260 (1960).
135. Tager J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 258 (1963).
136. Tager J. M., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 227 (1963).
137. Tager J. M., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 246 (1963).
138. Tanenbaum S. W., *J. Biol. Chem.* **218**, 733 (1956).
139. Tomkins G. M., Yielding K. L., Curran J. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 270 (1961).
140. Tower D. B., Proceedings of IVth Intern. Congr. of Biochem., Vienna 1958, red. W. Auerswald, O. Hoffman-Ostenhof, Londyn 1959, tom 3, str. 213.
141. Tower D. B., w *Neurochemistry of Nucleotides and Amino Acids*, red. R. O. Brady, D. B. Tower, New York 1960, str. 173.
142. Wajzer J., Weber R., Lérique J., Nekhorochef J., *Nature* **178**, 1287 (1956).
143. Walker J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **98**, 7 (1958).
144. Warburg O., Christian W., *Biochem. Z.* **296**, 294 (1938).
145. Warburg O., Christian W., *Biochem. Z.* **298**, 150 (1938).
146. Woodman R. J., Mc Ilwain H., *Biochem. J.* **81**, 83 (1961).
147. Van Slyke D. D., Phillips R. A., Hamilton P. B., Archibald R. M., Futcher P. H., Hiller A., *J. Biol. Chem.* **150**, 481 (1943).
148. Vitti T. G., Vukmirovich R., Gaebler O. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 475 (1964).

JANUSZ Z. BEER*, OLGIERD ROSIEK*, JAN M. SABLŃSKI*

Niektóre poliaminy alifatyczne i ich znaczenie biologiczne

Some Aliphatic Polyamines and their Biological Role

Biochemistry of putrescine, cadaverine, spermidine, spermine and related compounds is presented. The occurrence in living cells, biosynthesis and metabolism as well as the present views on the role of these compounds are reviewed.

Powszechne występowanie alifatycznych związków aminowych w organizmach żywych jest faktem znanym od dawna. Sperminę jako składnik nasienia ludzkiego wykryto już w XVII w., a przed mniej więcej dziewięćdziesięciu laty określono jej charakter chemiczny. Strukturę sperminy ustalono ostatecznie w latach dwudziestych. Historia spermidyny jest krótsza i liczy sobie tylko czterdzieści lat, natomiast putrescyna i kadaweryna znane są już od r. 1885. W roku 1948 stwierdzono, że związki te są czynnikami wzrostowymi bakterii. Liczne dane jakie zgromadzono do dnia dzisiejszego nie wyjaśniają jednak biologicznej roli tej grupy związków. Ostatnie lata przyniosły wiele nowych obserwacji. Spośród nich szczególnie zainteresowanie budzi doświadczalne potwierdzenie istnienia powinowactwa chemicznego pomiędzy aminami alifatycznymi a kwasami nukleinowymi i wynikające z niego konsekwencje.

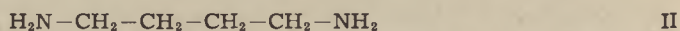
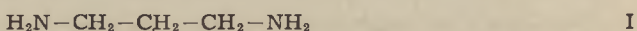
Wyczerpujący przegląd piśmiennictwa z zakresu biochemii i farmakologii amin alifatycznych oraz zwięzły przegląd technik analitycznych stosowanych w badaniach tej grupy związków znajdzie czytelnik w trzech doskonałych artykułach T a b o r a i wsp. (220, 231, 232), obejmujących piśmiennictwo aż do ostatniego okresu. Dawniejsze dane zebrane są w klasycznej monografii G u g g e n h e i m a „Die biogenen Amine” (77). Pewne aspekty biochemii amin alifatycznych omówione zostały w artykule K ą c z k o w s k i e g o pt. „Dwuaminoksydaza i jej znaczenie w biosyntezie alkaloidów” opublikowanym w Postęпах Biochemii (111), a udział amin w metabolizmie roślin opisali S t r o g o n o w i S z e w j a k o w a (213).

* Dr. adiunkt Zakładu Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych, Warszawa.

W niniejszej pracy poza przedstawieniem najważniejszych osiągnięć biochemii amin alifatycznych pragniemy szerzej omówić te ich właściwości, które wydają się mieć największe znaczenie dla wyjaśnienia roli biologicznej tej grupy związków.

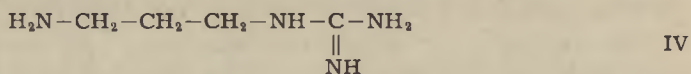
W piśmiennictwie biochemicznym utarło się określenie „poliaminy” dla grupy obejmującej spermidynę, sperminę, homologii 1,3-dwuaminopropanu i ich pochodne. Nazwa ta nie jest, naszym zdaniem, najszcześniejsza dla określenia związków, które zawierają dwie, trzy lub cztery grupy aminowe w cząsteczce. Dla prostoty jednak, w pracy niniejszej będziemy się posługiwać tą nazwą.

W organizmach żywych występuje wiele związków charakteryzujących się obecnością pierwszorzędowych grup aminowych na dwu krańcach alifatycznego łańcucha węglowego. Do najprostszych związków tej klasy należą homologii 1,3-dwuaminopropanu (I), które reprezentowane są w przyrodzie, poza wymienionym związkiem, przez 1,4-dwuaminobutan — putrescynę (II) i 1,5-dwuaminopentan — kadawerynę (III):

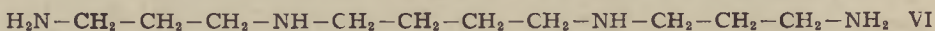
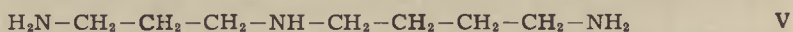


Aminy te występują w organizmach żywych zwykle w postaci niezwiązanej. Wyodrębniono jednak również niewielkie ich ilości w postaci pochodnych monoacetylowych. Znane są również ich pochodne metylowe takie jak czterometylo-1,4-dwuaminobutan (122, 253) wyodrębniony z roślin należących do rodzaju *Hyoscyamus*.

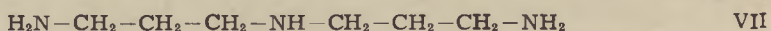
Obok alifatycznych dwuamin wymieniana jest zwykle, zarówno ze względu na podobne właściwości, jak i podobne położenie na szlakach metabolicznych, agmatyna — 1-amino-3-guanidylpropan (IV):



Spermidyna (V) i spermina (VI) zawierają łańcuchy trój- i czterowęglowe, łączące się poprzez drugorzędowe grupy aminowe:

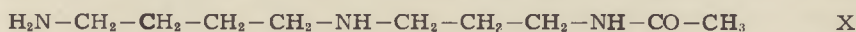
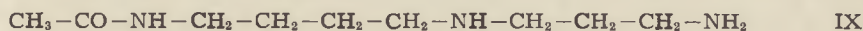


Do grupy utworzonej przez te szeroko rozpowszechnione związki zaliczyć należy również bis-3(aminopropilo)-aminę (VII) znaną w niektórych wirusach roślin zawierających kwas rybonukleinowy (104):



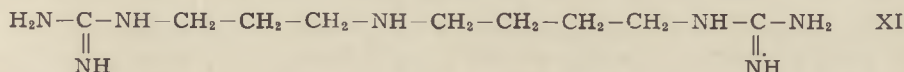
Spermidyna i spermina wyodrębniane były zarówno w postaci wolnej, jak i różnorodnych połączeń ze związkami o charakterze kwasowym. Zna-

ne są dwie izomeryczne pochodne acetylowe spermidyny — monoacetyl-spermidyna A (IX) i B (X):



Spermidynę natomiast wydzielono w postaci pochodnych mono- i dwuacetylowych, w których zacetylowane były jedna lub obie pierwszorzędowe grupy aminowe.

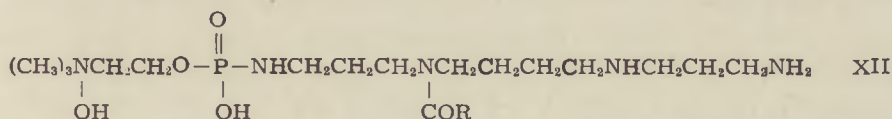
Stwierdzono również występowanie pochodnej dwuamidynowej spermidyny — hiruoniny (XI). Związek ten wyodrębniono z pijawki lekarskiej (*Hirudo medicinalis* L.) (182):



Połączenia sperminy i 1,3-dwuaminopropanu z kwasami fenolowymi takimi, jak na przykład kwas p-hydroksyfenylopirogrońowy, występują w trującej wydzielinie pająka *Pamphobetus tetracantus* (56).

Dubin i Rosenthal (47, 48) wydzili z bakterii *Escherichia coli* połączenie spermidyny o składzie podobnym do glutationu. Związek ten w wyniku hydrolizy kwaśnej rozpadał się na spermidynę, glicynę, kwas glutaminowy i kwas cysteinowy w stosunku 1:2:2:1. Z bakterii rosnących na pożywce z dodatkiem sperminy ci sami badacze wydzili podobny związek, zawierający sperminę. Tabor i wsp. (231) opisali inny związek, w cząsteczce którego związana jest spermidyna oraz kilka aminokwasów.

Wiele prac poświęcono fosfolipidowi zawierającemu spermidynę tzw. „malignolipinie”. Związek ten wykryty został w tkankach nowotworowych przez Kosaki'ego i wsp. (124). Badacze ci postulowali, że jest on specyficznym składnikiem nowotworów (123, 125-131), jednakże ich wyniki znalazły tylko częściowe potwierdzenie w pracach innych autorów (80, 92, 101, 105, 155, 193, 233). Według Kosaki'ego malignolipina zawierać ma równomiarne ilości fosforanu, choliny, sperminy i kwasu tłuszczowego, które razem mogłyby tworzyć cząsteczkę typu XII (124):



Układ spermidyny, a być może w niektórych przypadkach nawet układ sperminy, stanowi część szkieletu trzech ostatnio poznanych alkaloidów roślinnych: pitekolobiny (250-252), palustryny (19, 45, 51) i lunaryny (23, 24, 170, 171). Reszta putrescyny jest również częścią składową feruloilo-putrescyny — związku występującego w roślinach cytrusowych (248).

Poliaminy w organizmach żywych

Występowanie poliamin w tkankach zwierzęcych. Spośród omawianych poliamin w tkankach zwierzęcych występują w największych stężeniach spermina i spermidyna. Stężenia dwuamin, tj. 1,3-dwuaminopropanu, putrescyny i kadaweryny są niewielkie i niekiedy dokładne określenie zawartości tych związków w tkankach i narządach ssaków napotyka na poważne trudności. W tabelicy 1 podane są stężenia sperminy w róż-

Tabela 1

Występowanie sperminy w narządach i tkankach ludzkich (84)

Narząd, tkanka	Stężenie sperminy $\mu\text{mol/g}$ świeżej tkanki	Narząd, tkanka	Stężenie sperminy $\mu\text{mol/g}$ świeżej tkanki
Gruczoł krokowy	2,40	Grasica	0,30
Trzustka	0,55	Mózdzek	0,08
Śledziona	0,22	Mózg	0,05
Wątroba	0,28	Żołądek	0,14
Nerka	0,15	Macica	0,08
Serce	0,08	Jajnik	0,06
Płuca	0,08	Ślinianka	0,16
Jądra	0,16	Szpic	0,73
Tarczycyca	0,08	Nadnercze	0,19
Mięśnie	0,07	Krew	0,10
		Nasienie*)	16,3

*) wg 187.

nych tkankach u człowieka. Jak wynika z tabelicy 1 najwyższe stężenia sperminy występują w płynie nasiennym, gruczole krokowym, szpiku i trzustce. Występowanie sperminy i spermidyny w różnych tkankach myszy, szczura i świnki morskiej przedstawiono w tabelicy 2.

Poza tym obecność spermidyny wykazano w krwi ludzkiej (173), mózgu świni (116) i wołu (203) oraz w zarodkach kury (174), a obecność sperminy w mózgu (203) i sercu (2) wołu oraz w zarodkach kury (174). R a i n a i wsp. (176) stwierdzili, że w regenerującej wątrobie szczura zwiększa się stężenie sperminy i spermidyny. Obecność poliamin stwierdzono także w grasicy, jelitach, skórze i w krwinkach białych szczura oraz w różnych tkankach nowotworowych u myszy (187). Obecność 1,3-dwuaminopropanu stwierdzono w wątrobie szczura i świnki morskiej oraz w nasieniu człowieka (242). Putrescynę wykryto w trzustce (55, 231) i wątrobie (242) różnych gatunków zwierząt, w płucach (55) i mózgu (203) wołu oraz w nasieniu ludzkim (242).

Występowanie poliamin w bakteriach i wirusach. Poliaminy wykryto u wielu różnych gatunków bakterii. Zawartość poliamin waha się od śla-

dowych ilości u niektórych gatunków bakterii do bardzo dużych stężeń u innych. Na uwagę zasługuje fakt, że w bakteriach gramododatnich poliaminy nie występują w ogóle, lub występują w bardzo małych ilościach, natomiast w bakteriach gramujemnych stwierdza się obecność poliamin w dużych stężeniach (88).

Tablica 2

Zawartość spermidyny i sperminy w narządach i tkankach niektórych ssaków ($\mu\text{mol/g}$ świeżej tkanki) (187)

Narząd, tkanka	Związek	Mysz	Szczur	Świnka morska
Trzustka	Spermidyna	2,8	8,6	2,1
	Spermina	1,0	1,0	1,4
Gruczoł krokowy	Spermidyna		7,7	
	Spermina		5,7	
Wątroba	Spermidyna	1,4	1,6	0,2
	Spermina	1,1	1,2	0,4
Nerka	Spermidyna	0,5		0,3
	Spermina	0,7		0,5
Jądra	Spermidyna		0,4	
	Spermina		0,5	
Mózg	Spermidyna		0,7	
	Spermina		0,2	
Mięśnie	Spermidyna	0,1		
	Spermina	0,2		

Do grupy bakterii, w których poliaminy występują w dużych stężeniach należy między innymi *Escherichia coli*. Według Dubina i wsp. (47-49) oraz Tabora i wsp. (229), *E. coli* hodowane na minimalnych pożywkach zawierają na 1g świeżej masy: 15 μmoli putrescyny, 1,5 μmola spermidyny, 0,3 μmola monoacetyloputrescyny, 0,1 μmola monoacetylo-spermidyny oraz 0,5 μmola pochodnej spermidyny o składzie podobnym do glutationu. Tabor i wsp. (231) zwracają uwagę, że *E. coli* hodowane na minimalnych pożywkach nie syntetyzują zwykle związków, które nie są niezbędne dla ich rozwoju. Tak więc obecność dużych ilości poliamin w *E. coli* wskazuje na istotną rolę biologiczną tej grupy związków. Duże ilości poliamin stwierdzono również u *Azotobacter vinelandii* (229). Bakterie tego szczepu zawierają 13 μmoli dwu- i trójamin na 1g świeżej masy. Do grupy bakterii, zawierających jedynie śladowe ilości poliamin należy między innymi *Staphylococcus aureus* (185).

Znaczne różnice w zawartości poliamin występują również wśród wirusów. Istotne znaczenie ma w tym przypadku fakt, że ilość poliamin w wirusach zależy od stężenia tych związków w komórkach gospodarza. U niektórych wirusów, takich jak wirus choroby mozaikowej tytoniu, wirus polio (9, 104), fag T₃ *E. coli* oraz fag P₂₂ *Salmonella typhimurium*

(8), stwierdzono jedynie śladowe ilości poliamin. Natomiast bakteriofagi T_2 , T_4 i „3” *E. coli* zawierają poliaminy w bardzo dużych stężeniach (8, 9, 109). U faga T_4 łączne stężenie putrescyny i spermidyny wynosi około 250 μ moles na 1g świeżej masy (231). Jest to najwyższe ze znanych stężenie poliamin w materiale biologicznym.

Poliaminy jako czynniki wzrostu bakterii. W roku 1948 Herbst i Snell (87) stwierdzili, że szczep 7901 *Haemophilus parainfluenzae* nie rośnie na pożywce nie zawierającej poliamin. Normalny wzrost tego szczepu bakterii można było uzyskać po dodaniu do podłoża niewielkich ilości putrescyny, 1,3-dwuaminopropanu, spermidyny, sperminy lub innych poliamin. W 1955 roku Sneath (209) opisał mutanta *Aspergillus nidulans*, który posiada bezwzględne zapotrzebowanie na putrescynę. Istnienie mutantów bakterii bezwzględnie wymagających poliamin wskazuje na istotną rolę biologiczną tej grupy związków. Na uwagę zasługuje fakt, iż u *E. coli* syntetyzujących bardzo duże stężenia poliamin nie wykryto takich mutantów (p. str. 67).

Poliaminy dodane do podłoża przyspieszają wzrost wielu gatunków bakterii, jak np. *Neisseria perflava*, *Pasteurella tularensis* i *Lactobacillus casei* (57, 117, 136, 138, 148, 235). Zdaniem Tabora i wsp. (231) w niektórych przypadkach może to być skutkiem zwiększenia oporności bakterii na liżę w środowiskach o małej sile jonowej, spowodowanego oddziaływaniem poliamin na fosfolipidy oraz reszty kwasowe błony komórkowej (231).

Większe stężenia poliamin hamują rozwój wielu gatunków bakterii. Tak np. spermina w stężeniu 0,01M przy pH 7 powoduje całkowite zahamowanie wzrostu *E. coli* (231). Poliaminy mają antagonistyczne działanie wobec takich środków bakteriostatycznych jak: atebryna (153, 204, 205), proflawina (108), tryptoflawina (149) i streptomycyna (30). Sevagi i wsp. (200, 201) wykazali, że spermina i spermidyna zapobiegają powstawaniu odpornych na antybiotyki mutantów *S. aureus*, *E. coli* i *Aerobacter aerogenes*. Na uwagę zasługuje również oddziaływanie poliamin z bakteriofagami. Stwierdzono, że poliaminy zapobiegają niszczącemu bakteriofagi działaniu wysokiej temperatury i zamrażania (231), a także zmniejszają aktywność surowicy anti- T_2 (70, 158).

Działanie poliamin na komórki roślin. W komórkach roślin hodowanych w obecności putrescyny obserwowano różnego rodzaju zmiany w chromosomach. Tak na przykład Marquardt (146) stwierdził występowanie pęknięć chromosomów w komórkach *Oenothera* hodowanych w 1,5% roztworze putrescyny. Davidson i Anderson (42) postulują, że endogenne poliaminy odgrywają istotną rolę w przebiegu procesów spiralizacji i despiralizacji chromosomów. Badali oni wpływ mniejszych stężeń putrescyny (0,5mM) na chromosomy komórek stożka wzrostu *Vicia faba*. Putrescyna nie powodowała pęknięć chromosomów, wy-

woływała jednak znaczną kondensację chromosomów w stadium metafazy i opóźnianie despiralizacji w stadium telofazy. Wyniki uzyskane przez Davidsona i Andersona potwierdzili Ziembak i wsp. (265). Wykazali oni ponadto, że podobne zmiany występowały pod wpływem aminoguanidyny — inhibitora oksydazy dwuamin. Natomiast w komórkach *Vicia faba* hodowanych w obecności tego enzymu obserwowano przyspieszenie procesu despiralizacji chromosomów. Można więc przypuszczać, że poliaminy występujące w komórkach roślin wpływają na spiralizację i despiralizację chromosomów. Istotne znaczenie może tu mieć tworzenie kompleksów między putrescyną i dezoksyrybonukleoproteina-
mi.

Działanie poliamin na komórki zwierzęce in vitro. W 1960 r. Amand i wsp. (5) wykazali, iż agmatyna powoduje wyraźne skrócenie czasu trwania mitozy neuroblastów zarodka konika polnego. W środowisku, zawierającym agmatynę w stężeniu 0,005M czas trwania okresu od prometafazy do metafazy ulegał skróceniu o ok. 30%, a czas trwania wczesnej telofazy o ok. 35%. Whitefield i wsp. (249) stwierdzili, że agmatyna w stężeniach od 0,05 do 0,1M zapobiega opóźnieniu podziałów mitotycznych komórek myszy, które *in vitro* napromieniowano dawką 1000 r promieni X. Ostatnio Ham (79) wykazał, że putrescyna, spermidyna albo spermina w stężeniach 10^{-6} M powodowały zwiększenie liczby i rozmiarów kolonii komórek chomika *in vitro*.

Farmakologiczne działanie poliamin u ssaków. Spermia podana pozajelitowo w dawkach od 0,075 do 0,15 mmoli/kg ciężaru ciała powoduje niewydolność nerek u myszy, szczurów, królików i psów (186). Po mniejszych dawkach sperminy obserwowano spadek ciśnienia krwi, zwolnienie czynności serca i częstości oddechów (219, 254). Małe stężenia sperminy powodują skrócenie czasu krzepnięcia heparynizowanej krwi a duże stężenia przedłużenie czasu krzepnięcia (213). Rosiek i wsp. (188) wykazali, że dwukrotne dożylnie wstrzyknięcie putrescyny królikom w dawkach 100 mg/kg ciężaru ciała powoduje wyraźne, przejściowe zwiększenie liczby retikulocytów w krwi obwodowej oraz zwiększenie odsetka erytroblastów w szpiku. Jednocześnie putrescyna nie wpływa na czas życia krwinek czerwonych znakowanych ^{51}Cr , wydaje się więc, że pobudza ona aktywność erytropoetyczną szpiku u królików.

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie poliamin. Znajomość wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia poliamin ułatwiłaby wyjaśnienie ich roli biologicznej. Na podstawie przeprowadzonych dotychczas nielicznych badań w tym zakresie nie można wysnuć wniosków o występowaniu poliamin w poszczególnych strukturach subkomórkowych. Badania te utrudnia duże powinowactwo poliamin do kwasów nukleinowych i fosfolipidów (p. str. 78-83). Dlatego po zniszczeniu struktury komórki poliaminy mogą gromadzić się we frakcjach subkomórkowych, zawierających duże ilości kwasów nukleinowych i fosfolipidów.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki badań Cohena i Lichtensteina (37). Wykazali oni, że około 15% poliamin zawartych w *E. coli* znajduje się w rybosomach, przy czym poliaminy te nie wymieniają się z poliaminami obecnymi w wyciągu bakteryjnym. Obecność poliamin w rybosomach *E. coli* i rybosomach komórek wątroby wykryli także Spahr (211) oraz Zillig i wsp. (266). Możliwe, że zawarte w rybosomach poliaminy odgrywają istotną rolę w procesie syntezy białka (p. str. 85).

Ze względu na wyraźne powinowactwo poliamin do kwasów nukleinowych oraz stwierdzony wpływ poliamin na zależną od DNA syntezę RNA (p. str. 84), istotne znaczenie miałyby zbadanie występowania poliamin w jądrze komórkowym.

Biosynteza i metabolizm poliamin

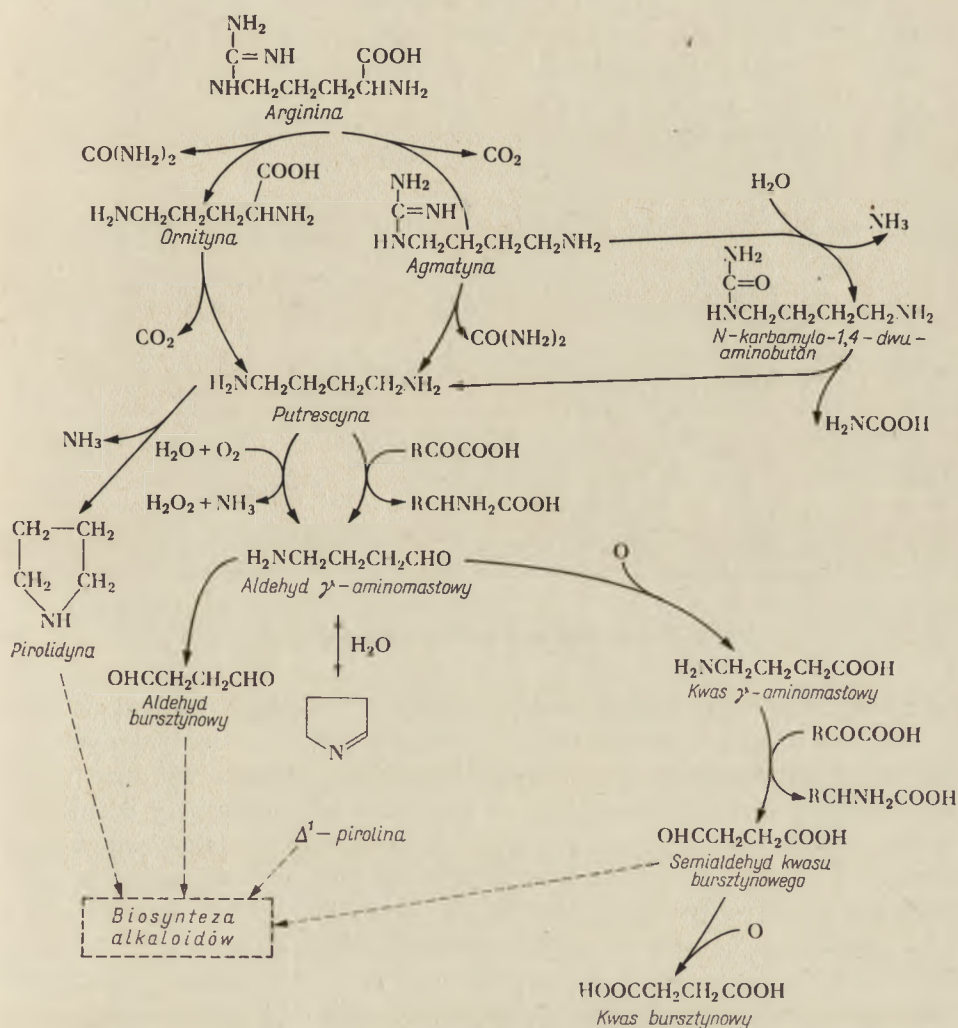
Biosynteza i metabolizm dwuamin. Ogólną przemianą biochemiczną, w której tworzą się aminy, a wśród nich i interesujące nas putrescyna, kadaweryna i agmatyna, jest reakcja dekarboksylacji aminokwasów zachodząca w obecności dekarboksylaz aminokwasowych. Enzymy te mogą być syntetyzowane przez bakterie, przy czym synteza ich w komórkach bakteryjnych stymulowana jest zarówno przez kwaśne środowisko (pH 2,5—5,5) jak i w większości przypadków przez obecność specyficznego substratu (62, 64, 66, 67, 69). Dekarboksylazy te odznaczają się wybitną specyficznością i z tego względu znajdują zastosowanie przy oznaczaniu szeregu aminokwasów metodą manometryczną.

Dekarboksylazy ornitynowa, argininowa i inne znajdowano także w materiale roślinnym (206). Występowanie wysokich stężeń agmatyny i putrescyny w roślinach z niedoborem potasu wiązane jest z obecnością tych właśnie enzymów (39, 40, 181, 206, 207). Dekarboksylazy aminokwasowe zawierają fosforan pirydoksalu jako koenzym, przy czym nie może on być zastąpiony przez fosforan pirydoksaminy, ani przez fosforan pirydoksyny. Aktywność dekarboksylaz aminokwasowych, podobnie jak i innych enzymów, w skład których wchodzi fosforan pirydoksalu, zależy od obecności wielowartościowych kationów metalicznych (78, 150, 152). Eggleston (50) stwierdził, że prawie wszystkie kationy dwuwartościowe podwyższają o około 40% aktywność wydzielonych z *Escherichia coli* i *Clostridium welchii* dekarboksylaz lizyny, argininy i ornityny, jak również dekarboksylazy glutaminy. Natomiast jednowartościowe kationy takie jak K^+ , Li^+ i NH_4^+ praktycznie nie mają wpływu na aktywność tych dekarboksylaz.

Reakcja tworzenia się kadaweryny z L-lizyny (por. rys. 2) katalizowana jest przez dekarboksylazę lizynową (66, 69). Enzym ten znaleziono w bakteriach, ale dotychczas nie udało się stwierdzić jego obecności ani w materiale zwierzęcym, ani roślinnym. Wielu autorów (12, 39, 66, 121,

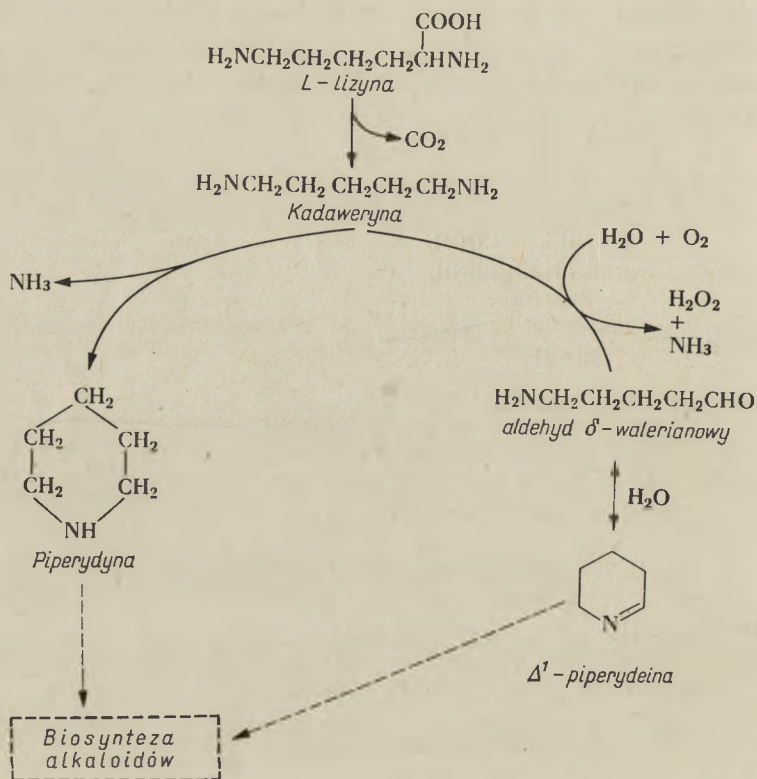
161, 174, 184) wykazało, że putrescyna powstaje z L-ornityny w obecności dekarboksylazy ornitynowej (por. rys. 1). Reakcja taka zachodzi również w układach zawierających preparaty enzymatyczne z wątroby (41).

Przemiana L-argininy w agmatynę w obecności dekarboksylazy argininowej (rys. 1) może również prowadzić do powstania putrescyny: powstająca agmatyna może ulegać hydrolizie bądź to z bezpośrednim wytworzeniem putrescyny i mocznika, bądź z powstawaniem N-karbamylo-1,4-dwuaminobutanu jako produktu przejściowego. W komórkach bakteryjnych występują również enzymy, które katalizują przejście arginina → ornityna → putrescyna (por. rys. 1) (63, 66, 136, 161, 180, 206, 207, 208, 264).



Rys. 1. Biosynteza i metabolizm putrescyny

Nie został dotychczas wyjaśniony sposób powstawania 1,3-dwuamino-propanu, występującego w komórkach niektórych gatunków bakterii. Wydaje się, że podobnie do innych dwuamin związków ten mógłby powstawać przez dekarboksylację odpowiedniego aminokwasu, tzn. kwasu α, γ -dwuaminomasłowego. Mógłby on również pochodzić z degradacji spermidyny lub sperminy.



Rys. 2. Biosynteza i metabolizm kadaweryny

Przemiany jakim ulegać mogą putrescyna i kadaweryna badane były w różnych układach biologicznych. Zebrano znacznie więcej danych dotyczących metabolizmu putrescyny, jednak ze względu na duże podobieństwo obydwu związków dane te mogą być użyteczne przy ocenie roli biologicznej zarówno putrescyny jak i kadaweryny. Podstawową reakcją jakiej ulegać mogą obydwie związki jest oksydatywna dezaminacja, prowadząca do wytworzenia odpowiednich aminoaldehydów (97, 224) (rys. 1 i 2). Reakcja ta katalizowana jest przez oksydazę dwuamin (71, 72, 262, 263) — enzym identyczny z wyodrębnioną w r. 1929 przez Besta (21) histaminazą. Właściwości tego enzymu, mechanizm jego działania i udział w procesach metabolicznych, a zwłaszcza w biosyntezie alkaloidów opisał

K ą c z k o w s k i w *Postęпах Biochemii* (111). Ostatnio enzym ten w znacznym stopniu oczyszczono (93, 94, 247). Oksydaza dwuamin występuje zarówno w tkankach zwierzęcych (11, 107, 215, 234, 263) jak i roślinnych (65, 103, 156, 168, 178, 189, 192, 245). Najwyższe aktywności w organizmach zwierzęcych spotykane są w nerkach, a w roślinach w młodych kiełkach zwłaszcza takich roślin jak groch, lucerna, koniczyna i soja. W grochu najwyższą aktywność oksydazy dwuamin obserwuje się w szóstym dniu rozwoju rośliny (244).

K i m i T c h e n (118—120) zwrócili ostatnio uwagę na istnienie w komórkach bakterii *Escherichia coli* innego mechanizmu degradacji dwuamin. Wykazali oni mianowicie, że w wyciągach z bakterii zachodzi transaminacja między dwuaminą i ketokwasem. W wyniku takiej reakcji podobnie jak i wskutek oksydatywnej dezaminacji z putrescyny powstaje aldehyd γ -aminomasłowy (rys. 1).

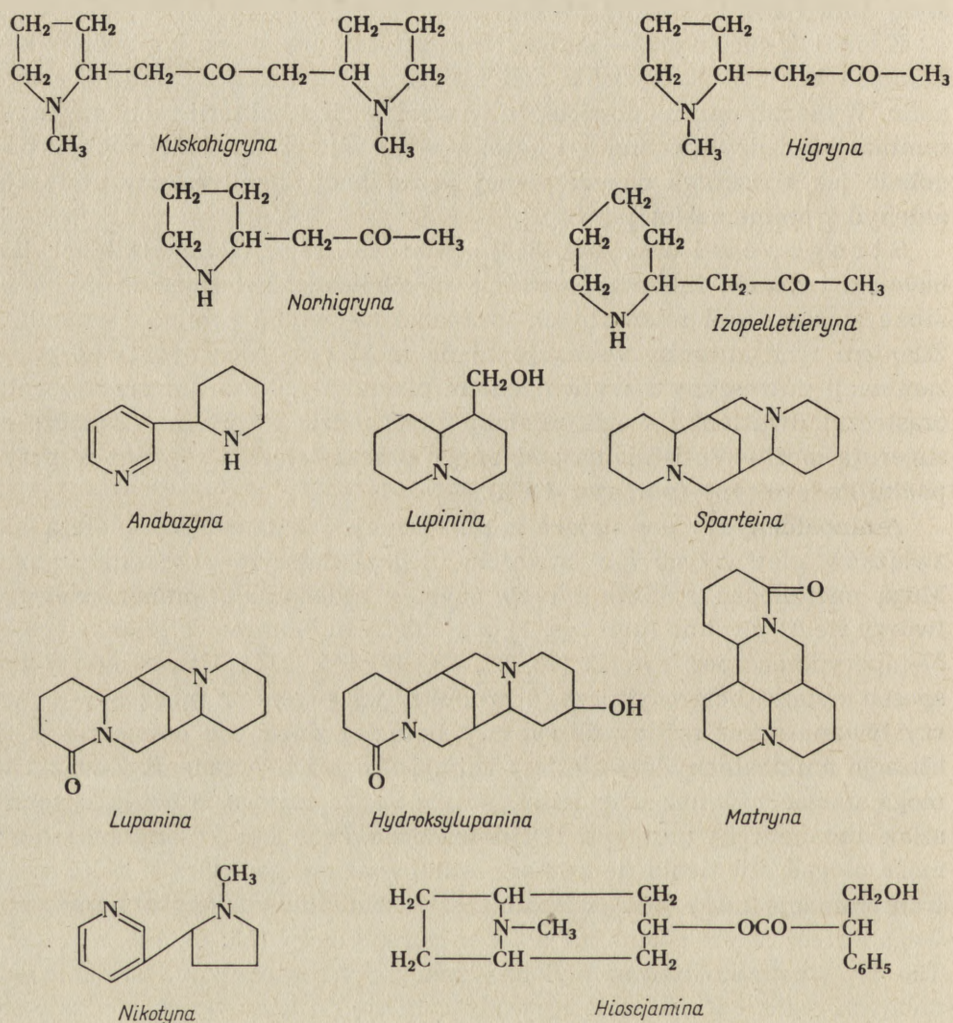
S t r o g o n o w i wsp. (212, 213) stwierdzili, że w takich roślinach jak bawełna i koński ząb przy wzroście na podłożu zawierającym podwyższone stężenia soli mineralnych gromadzi się wolna prolina i amoniak. Zdaniem tych autorów wskazuje to na możliwość nieoksydatywnej dezaminacji putrescyny z wytworzeniem pirolidyny, która po przyłączeniu cząsteczki dwutlenku węgla miałaby przechodzić w prolinę. Badacze ci sugerują możliwość istnienia podobnego przekształcenia również w przypadku kadaweryny (por. rys. 1 i 2).

Aminoaldehydy powstające z putrescyny i kadaweryny należą do związków nietrwałych i z łatwością ulegają dalszym przekształceniom. Mogą one ulegać cyklizacji przy czym z aldehydu γ -aminomasłowego tworzy się Δ^1 -pirolina (por. rys. 1), a z aldehydu δ -aminowalerianowego — Δ^1 -piperydeina (por. rys. 2) (73, 82, 83, 97, 145, 214). Utworzone w ten sposób związki heterocykliczne i produkty ich przemian mogą być wykorzystywane przez rośliny do syntezy bardziej złożonych cząsteczek. Cyklizacja aminoaldehydów nie jest jedyną drogą ich przemian. Związki te mogą ulegać również utlenieniu, a reakcja ta zapoczątkowuje odrębny szlak metaboliczny (por. rys. 1). Stwierdzono, że aldehyd γ -aminomasłowy może ulegać utlenieniu do kwasu γ -aminomasłowego, który z kolei przez transaminację może przekształcać się w semialdehyd kwasu bursztynowego i przez dalsze utlenienie w kwas bursztynowy (13, 18, 103, 118, 120). Ten typ przemian badany był na pochodnych putrescyny, istnienie podobnych reakcji w układzie wywodzącym się od kadaweryny wydaje się jednak bardzo prawdopodobne.

Dwuaminy a biosynteza alkaloidów. Wiele danych wskazuje na udział dwuamin i produktów ich degradacji w biosyntezie alkaloidów. Na rys. 3 zestawione zostały wzory alkaloidów, których prekursorami są putrescyna lub kadaweryna.

Włączanie ^{14}C -putrescyny i ^{14}C -kadaweryny do alkaloidów zaobserwowano w układach doświadczalnych zawierających izolowane pędy, liście

lub korzenie roślin. Niestety, mechanizm przejść pośrednich został wyjaśniony tylko w nieznacznym stopniu. Pewne aspekty tego zagadnienia zostały przedstawione w *Postęпах Biochemii* w artykułach Kąckiego (110, 111), ograniczymy się więc jedynie do podania najważniejszych faktów. ^{14}C -kadaweryna włączana jest do lupininy (196, 210), spar-



Rys. 3. Alkaloidy, których prekursorami są putrecyna lub kadaweryna

teiny (195, 196, 198), lupaniny i hydroksylupaniny (193), matryny (197) i anabazyne (134, 160). ^{14}C -putrecyna włączana jest do nikotyny (133) i hioscjami (44, 112, 159), nie wyjaśniono jednak czy putrecyna jest prekursorem hioscjami również w warunkach naturalnych. Podczas utleniania kadaweryny w obecności surowych wyciągów z grochu tworzy

się anabazyna (81), a utlenianie kadaweryny lub putrescyny pod działaniem oksydazy dwuamin w środowisku zawierającym kwas acetylooctowy prowadzi do utworzenia, odpowiednio, izopelletieryny lub norhigryny (34). W mieszaninie zawierającej N-metylo-1,4-dwuaminobutan i kwas acetylooctowy po dodaniu oksydazy dwuamin zachodzi synteza higryny. W tym samym układzie, po zastąpieniu kwasu acetylooctowego kwasem acetonodwukarboksylovym tworzy się higryna i kuskohigryna (237).

Niektóre metabolity dwuamin powstające przez utlenienie odpowiednich aminoaldehydów (patrz niżej), jak np. kwas aminomasłowy, mogą również brać udział w biosyntezie alkaloidów (85, 183), a heterocykliczne związki powstające przez cyklizację aminoaldehydów mogą być przekształcane w niealkaloidowe związki o znaczeniu biologicznym, takie jak np. kwas nikotynowy.

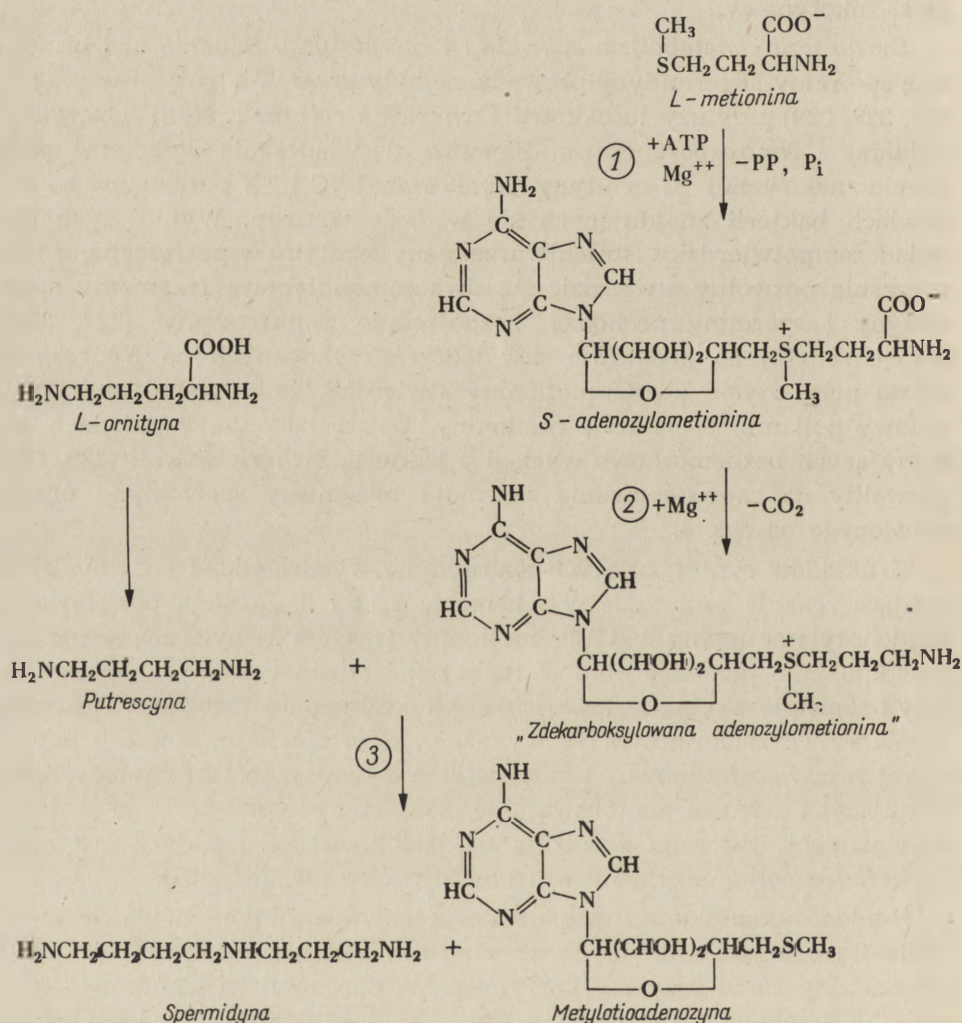
Biosynteza i metabolizm sperminy i spermidyny. Badania nad biosyntezą sperminy i spermidyny prowadzone były przez T a b o r a i wsp. (218, 227, 228, 229) przy użyciu bakterii *Escherichia coli* oraz pleśni *Aspergillus nidulans* i *Neurospora crassa*. Pierwsze doświadczenia wykonano przy użyciu znakowanej ^{14}C -ornityny i znakowanej ^{14}C i ^{15}N putrescyny na hodowlach bakterii znajdujących się w fazie wzrostu. Wyniki tych doświadczeń potwierdziły istnienie przemiany ornityny w putrescynę, a jednocześnie pozwoliły stwierdzić, że dwuaminobutanowe fragmenty spermidyny i sperminy pochodzą bezpośrednio z putrescyny (227, 229). Greene (75) na podstawie doświadczeń wykonanych na *Neurospora crassa* przy użyciu (α - ^{14}C)-metioniny stwierdził, że fragment aminopropylowy poliamin pochodzi z metioniny. Dalsze badania w układach zawierających bezkomórkowe wyciągi z bakterii *Escherichia coli* (228, 229) pozwoliły na zaproponowanie schematu biosyntezy spermidyny przedstawionego na rys. 4.

Z układów syntetyzujących spermidynę wyodrębniono enzymy katalizujące reakcje oznaczone w schemacie 1, 2 i 3. Reakcja powstawania S-adenozylometioniny z ATP i metioniny (reakcja 1) była znana już poprzednio jako pierwszy etap w reakcjach transmetylacji (32). Katalizujący tę reakcję wyciąg z *Escherichia coli* oczyszczono 1500 razy. Doświadczenia z ATP znakowanym ^{32}P wykazały, że ortofosforan powstaje z końcowej reszty fosforanowej, a pirofosforan z dwu grup fosforanowych sąsiadujących z resztą pentozową (230, 232). Szczegółowe badania nad odszczepianiem fosforanu wskazują na podobieństwa pomiędzy enzymem *Escherichia coli* a enzymami wątroby i drożdży (32, 162, 231).

S-adenozylometionina w toku biosyntezy spermidyny ulega dekarboksylacji (reakcja 2). Enzym *Escherichia coli* katalizujący tę reakcję został oczyszczony 20-50 razy (217). Wymaga on obecności kationów magnezowych, a hamowany jest przez cyjanki. Produkt reakcji — „zdekarboksylowaną adenozylometioninę” wydzielono chromatograficznie.

Przeniesienie fragmentu aminopropylowego na putrescynę (reakcja 3) jest przemianą podobną do transmetylacji z tym jednak, że zamiast grupy metylowej ulega przeniesieniu inny rodnik. Enzym *Escherichia coli*, który katalizuje tę reakcję oczyszczono około 1000 razy (218). Stwierdzono, że katalizuje on tylko syntezę spermidyny; w układach zawierających ten enzym nie wytwarzała się spermina.

Na możliwość syntetyzowania spermidyny i sperminy przez komórki ssaków wskazuje wstępne doniesienie o włączaniu znakowanej ^{14}C i ^{15}N putrescyny do frakcji poliaminowej w tkankach gruczołu krokowego szczura (227) oraz wyniki doświadczeń na wątrobie szczura przy użyciu etioniny jako antymetabolitu metioniny (175). Raina (172, 174) bada-

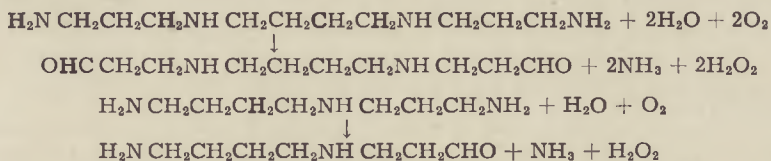


Rys. 4. Biosynteza spermidyny (wg 231)

jąc rozwijające się zarodki kury wykazał, że putrescyna i metionina znakowane ^{14}C włączają się do spermidyny i sperminy.

Poliaminy, które występują w komórkach zwierzęcych mogą pochodzić z pożywienia albo z bakteryjnej flory jelitowej. Obecność poliamin stwierdzono w tkankach zwierząt hodowanych w warunkach jałowych (*germ-free animals*) i otrzymujących standardowe pożywienie (169, 187), a także w tkankach zwierząt, otrzymujących specjalnie przygotowane pożywienie i hodowanych w warunkach nie jałowych (187). Wykonanie badań u zwierząt, otrzymujących specjalną dietę i hodowanych w warunkach jałowych mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia czy w komórkach zwierzęcych odbywa się synteza poliamin.

Najdokładniej zbadaną przemianą spermidyny i sperminy w układach biologicznych jest, podobnie jak w przypadku dwuamin, oksydacyjna dezaminacja. Spermidyna i spermina nie są jednak utleniane w obecności oksydazy dwuamin (106) ani oksydazy monoamin (223) lecz w wyniku działania oksydazy sperminowej z osocza występującej we krwi przeżuwaczy i niektórych innych zwierząt (25-28, 95, 96, 190, 223, 238, 239). Ciężar cząsteczki tego enzymu ma ciężar ok. 250 000 (255) i zawiera miedź (257, 258, 260). Obecność cynku była stwierdzana w mniej oczyszczonych preparatach (74), a obecność pirydoksalu nie została ostatecznie udowodniona (257, 259). Oksydazę sperminową z osocza otrzymali ostatnio w postaci krystalicznej Y a m a d a i wsp. (256). Zbadanie produktów powstających w wyniku oksydacyjnej dezaminacji spermidyny i sperminy nastęrczało wiele trudności, ze względu na nietrwałość powstających aminoaldehydów (223, 232, 239). Dopiero w 1964 r. T a b o r i wsp. (221) ustalili ich strukturę. Badacze ci poddali produkty oksydacyjnej dezaminacji poliamin redukcji borowodorkiem sodowym, wyodrębnili powstające aminoalkohole i porównali je z wzorcowymi substancjami syntetycznymi. Prace te pozwoliły ustalić, że oksydaza sperminowa z osocza katalizuje następujące reakcje:

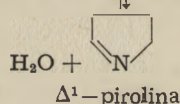
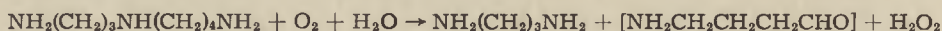


Wiadomo, że oksydaza sperminowa z osocza utlenia również, choć znacznie mniej aktywnie, związki takie jak benzyloamina, homosulfanilamid, fenetyloamina, kynuramina, pewne alifatyczne monoaminy oraz dwuaminy o dłuższym łańcuchu węglowym (223, 246, 256). Podczas prób utleniania tryptaminy, 5-hydroksytryptaminy, norepinefryny, epinefryny, histaminy, putrescyny, kadaweryny, tyraminy i meskaliny albo nie stwierdzano zużycia tlenu, albo też zużycie to było nieznaczące (223, 256).

Dawniej przypuszczano, że oksydaza aminowa z osocza utlenia sper-

minę do putrescyny a spermidyna jest produktem przejściowym w tej reakcji (16, 219, 239). Tabor i wsp. (221) nie uzyskali danych, które mogłyby wskazywać, że spermidyna jest produktem przejściowym enzymatycznego utleniania sperminy, ani że putrescyna czy 1,3-dwuaminopropan powstają jako bezpośrednie produkty utleniania sperminy albo spermidyny. Stwierdzili oni natomiast (222), że produkty oksydatywnej dezaminacji sperminy ulegają dalszej nieenzymatycznej degradacji. Prawdopodobnie monoaldehydowa pochodna sperminy w wyniku β -eliminacji ulega rozpadowi z wydzieleniem spermidyny, a dwualdehydowa pochodna sperminy wydziela po rozpadzie putrescynę. Drugim produktem tej przemiany jest prawdopodobnie akroleina, której obecność stwierdził Alarcón (1) w mieszaninie otrzymywanej przez ogrzewanie produktów utleniania sperminy.

Preparaty bakteryjne degradową sperminę i spermidynę, jednakże charakter enzymów biorących udział w tych przemianach jest mało znany (205). Badania nad nimi prowadzono przy użyciu całych komórek lub surowych wyciągów *Pseudomonas pyocyaneae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Neisseria perflava*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* (18, 177, 178, 189, 241, 242). Stwierdzono, że w układach tych powstawanie enzymów utleniających sperminę i spermidynę jest indukowane przez obecność substratów w środowisku. Jednym z produktów utleniania spermidyny w tych układach jest 1,3-dwuaminopropan (178, 242). Bachrach (14, 15) wydzielił z *Serratia marcescens* enzym, który katalizuje następujące przekształcenie:



Enzym ten utlenia spermidynę i bis-(3-aminopropyl)-aminę, ale cyklizacja powstającego aminoaldehydu możliwa jest tylko w przypadku spermidyny. Spermina, dwuaminy i monoaminy nie są substratami enzymu wydzielonego przez Bachracha.

Δ^1 -pirolina daje żółte zabarwienie z aldehydem o-aminobenzoesowym. Reakcja ta w połączeniu z zastosowaniem enzymu z *Serratia marcescens* jest podstawą specyficznej metody oznaczania spermidyny (17, 97, 194).

Przedstawiliśmy najlepiej poznane szlaki metaboliczne poliamin. Z pewnością nie wyczerpują one listy możliwych przemian tych związków w układach biologicznych. Świadczy o tym chociażby istnienie dwu reakcji zachodzących w pewnych układach: karbamylacja poliamin (59), a również ich transamidacja. Ta ostatnia reakcja jest szczególnie interesująca, gdyż prowadzi ona do włączania amin do cząsteczek białek w wyniku zastąpienia grupy NH_2 glutaminy przez resztę aminy. Waelsch

i wsp. (35, 36, 163, 165, 191) stwierdzili, że wyodrębniony z wątroby świnki morskiej enzym, który katalizuje tę reakcję, jest stymulowany przez kationy wapniowe. Substratami w tym układzie mogą być różne aminy, a m.in. putrescyna, kadaweryna, spermidyna i spermina, a akceptorami — takie białka jak insulina, fibrynogen, kazeina, pepsyna, β -laktoglobulina i γ -globulina. Bliższe poznanie tych reakcji i ich produktów jest niezbędne dla pełnego wyjaśnienia roli biologicznej poliamin.

Powinowactwo poliamin do kwasów nukleinowych i innych związków

W ostatnich latach poczyniono wiele bardzo interesujących obserwacji, wskazujących na powinowactwo poliamin do niektórych cząsteczek o znaczeniu biologicznym, a w szczególności do kwasów nukleinowych. O istnieniu silnych połączeń tego typu świadczy szereg zjawisk obserwowanych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Wiadomo na przykład, że fagi *Escherichia coli* parzystej serii T zawierają pewne ilości poliamin, które nie ulegają wymianie z poliaminami zawartymi w środowisku, prawdopodobnie ze względu na nieprzepuszczalność otoczki białkowej. Poliaminy fagów wstrzykiwane są do komórek bakteryjnych razem z DNA (8, 9, 89), chociaż wiązanie pomiędzy kwasem nukleinowym i poliaminami nie ma charakteru kowalentnego. Spermina ochrania aktywność transformującą kwasu dezoksyrybonukleinowego podczas denaturacji cieplnej (225). Do najciekawszych należą niewątpliwie obserwacje poczynione w toku badań nad transformacją komórek zwierzęcych. Szybalska i Szybalski (216), którzy opisali taką transformację w hodowli komórek ludzkich, stwierdzili, że obecność sperminy w układzie jest niezbędnym czynnikiem umożliwiającym przeprowadzenie transformacji.

W latach czterdziestych w toku badań nad antybakteryjną czynnością sperminy i spermidyny stwierdzono antagonistyczne działanie kwasów nukleinowych w stosunku do poliamin (22). W późniejszych pracach Razin i Rozansky (179) stwierdzili, że spermina i inne poliaminy wytrącają kwasy nukleinowe, przy czym związki aminowe odnajduje się w osadzie. Stwierdzono również, że spermina wytrąca RNA wirusa mozaiki tytoniowej (20) i wirusa żółtej mozaiki rzepy (154), sRNA (31), a również szereg polinukleotydów (100). Połączenia kompleksowe sperminy z kwasami nukleinowymi są nierozpuszczalne w 66% alkoholu etylowym (113, 114, 261). O łatwości z jaką tworzą się połączenia pomiędzy syntetycznymi polinukleotydami i poliaminami świadczy fakt, że dodanie sperminy do roztworu soli barowej kwasu poliurydylowego powoduje uwolnienie kationów barowych, a polinukleotyd wytrąca się w postaci kompleksu z aminą (53).

Badania charakteru połączeń pomiędzy poliaminami i kwasami nukleinowymi utrudnia słaba ich rozpuszczalność przy wyższych stężeniach

amin, i silną tendencją do adsorbowania się na powierzchniach stałych. Wiadomo jednak, że istotny wpływ na trwałość kompleksów poliamin z kwasami nukleinowymi mają siła jonowa i *pH* środowiska, a również skład nukleotydowy kwasu nukleinowego. nierozpuszczalne kompleksy kwasów rybonukleinowych i dezoksyrybonukleinowych z poliaminami tworzą się z łatwością w wodzie destylowanej. Przy otrzymywaniu DNA metodą fenolową poliaminy pozostają razem z kwasem nukleinowym w warstwie wodnej i tworzą osad (8, 202). Podwyższenie sily jonowej roztworu prowadzi do rozpuszczenia się osadu (20, 141, 179, 226). Wielokrotne wytrącanie DNA alkoholem etylowym z roztworów o wysokiej sily jonowej pozwala na oddzielenie poliamin.

Zależność rozpuszczalności połączeń poliamin i kwasów nukleinowych od *pH* środowiska i od składu nukleotydowego kwasów nukleinowych została wykazana w badaniach *Cantoni*'ego (31) oraz *Huanga* i *Felsenfelda* (100). *Cantoni*, stosując wytrącanie za pomocą sperminy uzyskał częściowe rozfrakcjonowanie sRNA wątroby królika. Otrzymane przez niego frakcje były 2-3 razy bogatsze w sRNA przenoszący walinę i prolinę. Jednakże przeprowadzenie frakcjonowania było możliwe tylko przy ściśle kontrolowanym *pH*. Najlepszy rozdział otrzymywano przy *pH* 5,6, słabszy w *pH* 5,2, natomiast frakcjonowanie nie zachodziło podczas wytrącania sperminą w *pH* 4,8 lub 6,0. Podobne wyniki uzyskali *Huang* i *Felsenfeld* w badaniach nad kompleksami syntetycznych polirybonukleotydów ze sperminą (100): w *pH* 6,5 poliA i poliI były całkowicie wytrącone, natomiast do wytrącania poliC lub poliU w tych samych warunkach niezbędny był nadmiar sperminy. PoliAU był nierozpuszczalny w obecności sperminy w zakresie *pH* 4,5—6,8, podczas gdy poliIC był przy *pH* 5,1—6,8 praktycznie całkowicie rozpuszczony, wyraźne wytrącanie rozpoczynało się przy *pH* 4,5, a w *pH* 4,1 70% kompleksu przechodziło do osadu.

Felsenfeld i *Huang* (52, 54) badali również tworzenie się połączeń między poliaminami a DNA i sRNA metodą konduktometryczną. Stosowali oni roztwory o niskich stężeniach, w których tworzące się kompleksy pozostają rozpuszczone i stwierdzili, że w takich warunkach cząsteczki kwasów nukleinowych wiążą jeden równoważnik sperminy na mol fosforanu.

Wiele danych uzyskano za pomocą metody spektrofotometrycznej. *Keister* (114) stwierdził, że dodanie sperminy obniża gęstość optyczną roztworów wodnych RNA przy 260 m μ . *Felsenfeld* i *Huang* (52, 53) obserwowali wyraźny efekt hypochromowy po dodaniu putrescyny, kadaweryny lub 1,10-dwuaminodekanu do roztworu mieszaniny poliA i poliU. Podobnie zachowuje się mieszanina poliI i poliC (100). Efekty hypochromowe tego rodzaju związane są z tworzeniem się układu podwójnej spirali z jednoniciowych polinukleotydów. Mechanizm takich przejść

jest z pewnością złożony, ale wydaje się, że na pierwszym ich etapie udział poliamin polega na zubożeniu reszt fosforanowych. Silne ładunki ujemne zgromadzone na tych ugrupowaniach są z pewnością przeszkodą w zbliżeniu dwóch cząsteczek polinukleotydowych. Podobne efekty hypochromowe wywołują jony magnezowe, które są nawet bardziej efektywne.

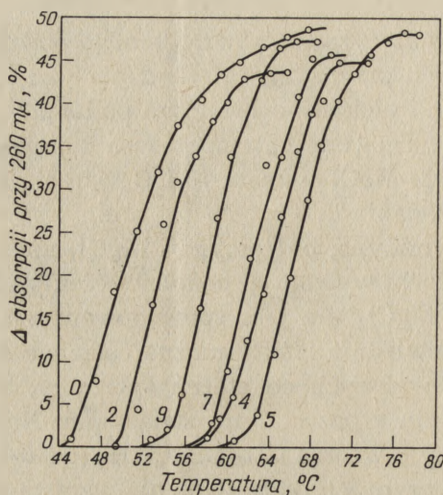
Do bliższego scharakteryzowania wzajemnego oddziaływania poliamin i kwasów nukleinowych przyczyniły się badania nad cieplną denaturacją kwasów nukleinowych i efektem ochronnym poliamin (139, 142, 151, 226). Stwierdzono (226), że T_m (t.zw. „temperatura topnienia”) DNA grasicy cielej, która w 0,03M NaCl wynosi 76,1°C wzrasta o 2°C w obecności 10^{-6} M sperminy, a dodanie $1,7 \cdot 10^{-5}$ M tej aminy powoduje podwyższenie T_m aż o 9°C. Spermidyna, putrescyna i $MgCl_2$ użyte jednak w znacznie wyższych stężeniach wywołują podobne efekty. Podwyższenie T_m DNA przez aminy i $MgCl_2$ nie jest spowodowane zmianą siły jonowej środowiska, gdyż odpowiednie efekty można osiągnąć dopiero przy stężeniach NaCl 10^5 razy wyższych od stężeń sperminy, a 10^2 lub 10^3 razy wyższych w porównaniu z pozostałymi związkami. Należy nadmienić, że alifatyczne monoaminy o wzorze $CH_3/CH_2/nNH_2$ ($n=0-6$) osłabiają termostabilność DNA, przy czym ich oddziaływanie wzrasta proporcjonalnie do długości łańcucha (151).

Efekt stabilizacji termicznej DNA przez poliaminy jest zależny od wielu parametrów. Podwyższenie tzw. „temperatury topnienia” jest proporcjonalne do stężenia poliaminy w środowisku, dla określonego przedziału stężeń. Po przekroczeniu górnej granicy tego przedziału obserwuje się efekt nasycenia, dalsze dodawanie poliaminy nie potęguje efektu stabilizacji, a „temperatura topnienia” pozostaje na nowym, podwyższonym poziomie. Wyraźny wpływ na efekt stabilizacji ma siła jonowa środowiska. Oddziaływanie poliamin na przebieg termicznej denaturacji DNA jest słabsze w roztworach o wyższej sile jonowej. Świadczy to o jonowym lub wysoce polarnym charakterze wiązań pomiędzy cząsteczkami amin i kwasów nukleinowych. Stwierdzono również (141), że efekt stabilizacji DNA zależy od wielkości cząsteczki dwuaminy. Zależność tę przykładowo ilustruje rysunek 5.

Jak widać najsilniejszy efekt obserwuje się w przypadku kadaweryny. Wpływ innych amin na podwyższenie „temperatury topnienia” ulega wyraźnemu osłabieniu zarówno w miarę wydłużania jak i skracania łańcucha.

Podobne doświadczenia z kwasami dezoksyrybonukleinowymi wyodrębnionymi z grasicy cielej, faga T_2 oraz wielu mikroorganizmów, wykazały zależność pomiędzy efektem wywoływany przez aminy a składem nukleotydowym DNA (141—143). Okazało się, że podwyższenie „temperatury topnienia” jest proporcjonalne do zawartości adeniny i tyminy

w DNA. Na podstawie ekstrapolacji danych doświadczalnych można przewidywać, iż wartość przyrostu „temperatury topnienia” dla składu nukleotydowego $A+T = 0\%$, $G+C = 100\%$ spadłaby do zera, a zatem należy oczekiwać, że efekt podwyższenia „temperatury topnienia” nie wystąpi dla poliGC.



Rys. 5. Przebieg denaturacji cieplnej DNA grasicy cielęcej w zależności od długości aminy dodanej do środowiska

0 — bez amin, 2-9 — liczby oznaczają ilość grup metylenowych w cząsteczce dodanej aminy. Aminy dodawane były do uzyskania stężenia $10^{-3}M$ w wodnometanolowym roztworze o niskiej sile jonowej (wg 141)

Poliaminy ochraniają DNA przed denaturacją przez rozpuszczalniki takie jak: glikol etylenowy, dwumetylosulfotlenek i N,N-dwumetyloformamid. Modyfikują one również denaturację zachodzącą pod wpływem środowiska o niskim pH, jednakże ten efekt jest niezależny od długości łańcucha aminy (151).

Poliaminy stabilizują zarówno DNA pochodzenia naturalnego jak i polidAdT, natomiast nie wpływają stabilizująco na jednoniciowy DNA, RNA ani tzw. „kwaśny” kwas poliadenylowy, który może służyć jako model dwuniciowego RNA. Oznacza to, że dla wystąpienia efektu stabilizacji pod wpływem poliaminy nie wystarcza ani dwuniciowa struktura, ani jej układ spiralny, ani obecność dezoksyrybozy. Zebrane dotychczas dane nie wyjaśniają charakteru tego efektu. Wydaje się, że jednym z głównych czynników jest tu częściowe znoszenie odpychania pomiędzy ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi łańcucha DNA. Jednak znacznie wyższe efekty uzyskiwane za pomocą poliamin w porównaniu z innymi kationami dwuwartościowymi wskazują, że wchodzi tu w grę bardziej złożony mechanizm niż zwykle zobojętnianie. Najbardziej prawdopodobnym miejscem przyłączenia przynajmniej jednego z krańców poliaminy jest reszta fosforanowa znajdująca się w łańcuchu DNA. W wią-

zaniu drugiego krańca cząsteczki poliaminy może grać szczególną rolę adenina lub tymina, albo też para utworzona przez te dwie zasady. Na możliwość taką wskazują zależności efektu stabilizacji od składu nukleotydowego DNA i od długości łańcucha związków aminowych (141).

Poza licznymi danymi charakteryzującymi oddziaływanie poliamin na kwasy nukleinowe znane są fakty wskazujące na powinowactwo poliamin do innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym. Dla przykładu przytoczymy dane świadczące o oddziaływaniu pomiędzy poliaminami i fosfolipidami. Wiadomo, że lecytyny znoszą przeciwbakteryjne działanie sperminy (22, 76, 179), a fosfolipidy w rozcieńczonych roztworach tworzą kompleksy z poliaminami (179). Niektórzy badacze tłumaczą stabilizację błon komórkowych przez poliaminy oddziaływaniem pomiędzy nimi a fosfolipidami. Istnieją również dane wskazujące na tworzenie się kompleksów pomiędzy sperminą i spermidyną a heparyną (6, 7, 137, 219).

Rola biologiczna poliamin — fakty i hipotezy

Poliaminy a różnicowanie komórkowe. Pewne przesłanki wskazują na możliwość udziału poliamin w procesach różnicowania komórkowego. Dominujące obecnie poglądy na temat mechanizmów różnicowania komórek można przedstawić następująco. Z zygoty zawierającej całą informację dziedziczną danego organizmu powstają drogą podziałów mitotycznych wszystkie komórki ustroju wielokomórkowego. Mitoza zapewnia równomierny podział materiału dziedzicznego, zatem wszystkie komórki w organizmie wielokomórkowym zawierają taką samą informację dziedziczną. Niemniej jednak możemy w wielokomórkowym organizmie wyróżnić co najmniej 100 typów komórek. Przyjmując, iż różnicowanie komórkowe jest procesem realizacji informacji dziedzicznej musimy dojść do wniosku, że w procesie tym zachodzi realizacja części informacji dziedzicznej. Mówiąc inaczej, w różnych typach komórek funkcjonują różne geny, podczas gdy czynność pozostałych genów jest zablokowana. Powstaje oczywiście pytanie: jakie jest miejsce tej blokady w łańcuchu procesów od genu do produktu? Ze względów energetycznych najbardziej korzystna wydaje się blokada początkowego ogniwa tego łańcucha czyli blokada samych genów. Obecnie prawie powszechnie uważa się, że materiałem dziedzicznym u znakomitej większości gatunków jest DNA, występujący w komórce najprawdopodobniej w kompleksie z histonami. Wielu autorów przypuszcza, iż właśnie histony odgrywają rolę czynnika blokującego różne geny (29, 236), hamując matrycową funkcję DNA w stosunku do RNA. Doświadczenia wykonane w celu sprawdzenia słuszności hipotezy o represorowej roli histonów wykazały, że po usunięciu z nukleohistonu składnika histonowego znacznie wzrasta wydajność syntezy RNA zależnej od DNA (3, 4, 98). Natomiast dodanie histonu do układów bezkomórkowych, hamuje syntezę RNA zależną od

DNA (3, 98, 99). Także pewne obserwacje cytologiczne przemawiają za hipotezą o represorowej roli histonów w stosunku do genów (102, 147). W sposób najbardziej przekonujący przemawiają za słuszością przedstawionych tu poglądów badania Bonnera i wsp. (29) nad wpływem histonów na syntezę białek w zarodkach grochu. Ts'o i Bonner (236) dokonali ostatnio przeglądu możliwych mechanizmów dysocjacji kompleksu DNA-histon. Ich zdaniem dysocjacja taka może zachodzić w komórce na skutek:

- 1) lokalnego zwiększenia stężenia elektrolitów,
- 2) oddziaływania wzajemnego z polianionami, np. kwaśnymi białkami lub kwasami nukleinowymi,
- 3) oddziaływania wzajemnego z polikationami np. z poliaminami,
- 4) enzymatycznej hydrolizy histonu,
- 5) zmiany konformacji DNA i histonu w kierunku zmniejszania ich wzajemnego powinowactwa.

Autorzy ci faworyzują udział poliamin w dysocjacji kompleksu DNA-histon. Obecnie brak jeszcze wielu ważnych informacji koniecznych dla ugruntowania tej hipotezy. Zbyt mało wiemy o wpływie poliamin na dysocjację kompleksu DNA-histon, nie znamy dokładnie stężenia, lokalizacji ani przemiany tych związków wewnątrz komórki. Istnieją jednak fakty, które hipotezę tę czynią atrakcyjną. Mamy tu na myśli przede wszystkim wyniki badań nad wpływem poliamin na zależną od DNA syntezę komplementarnego RNA. Reakcja ta katalizowana jest przez polimerazę RNA a dla jej przebiegu konieczna jest obecność w układzie nukleozydo-trójfosforanów wszystkich czterech zasad, wchodzących w skład RNA oraz dwuwartościowych kationów Mn^{++} , Co^{++} , Mg^{++} a także „primera” DNA. W przedstawionych tu badaniach stosowano nieoczyszczoną polimerazę zawartą w wyciągu z *E. coli* (46, 234) a później oczyszczone preparaty enzymu pochodzące z *Micrococcus lysodeiicticus* (58, 243) i *Azotobacter vinelandii* (132). Jako „primer” służył natywny lub zdenaturowany DNA z grasicy cielęcej, wątroby szczura, plemników łososia, plemników jeżowca oraz z *A. aerogenes*, *S. marcescens*, *P. fluorescens*, *M. lysodeiicticus*, *E. coli*, fagów T_2 i T_4 . Stwierdzono, że putrescyna, spermina, spermidyna i kadaweryna w małych stężeniach powodują znaczną, niekiedy trzykrotną, stymulację syntezy RNA. Poliaminy w wyższych stężeniach, powodując wytrącanie się DNA, hamują tę reakcję. Optymalny efekt uzyskuje się przy różnych stężeniach poszczególnych poliamin. Interesujące jest, że stymulację syntezy RNA obserwuje się po dodaniu poliamin (sperminy) na początku inkubacji, jak również po wprowadzeniu ich do układu po 60 min. inkubacji. Ilość poliamin niezbędna dla uzyskania maksymalnej wydajności syntezy zależy od stężenia DNA. Stymulujący efekt poliamin występuje w przypadku zastosowania jako „primera” natywnego DNA, a nie występuje kiedy rolę

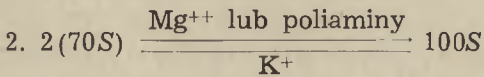
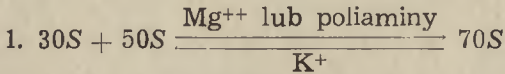
tę spełnia cieplnie zdenaturowany DNA. Ustalono ponadto, że poliaminy hamują czynność polimerazy RNA, jeśli katalizowała ona syntezę homopolimeru, tzn. jeśli układ zawierał trójfosforanową pochodną tylko jednej zasady (zamiast czterech) i natywny DNA (58) lub też jeśli jako „primer” zastosowano syntetyczne poliribonukleotydy (132).

Mechanizm stymulacji syntezy RNA pod wpływem poliamin nie jest znany. Doerfler i wsp. (46), którzy prowadzili badania z nieoczyszczoną polimerazą RNA, postulowali, że działanie poliamin polega na hamowaniu nukleaz, zawartych w preparatach enzymatycznych. Poliaminy chronią wprowadzie DNA i RNA przed degradacją zarówno w układach zawierających całe komórki jak i w homogenatach komórkowych (10, 61, 86, 114), efekt ten nie jest jednak równoznaczny ze specyficznym hamowaniem nukleaz. Badania wykonane na układach zawierających oczyszczone nukleazy i poliaminy nie dały jednoznacznych wyników. W niektórych przypadkach uzyskiwano słabą aktywację DN-azy i RN-azy, a w innych ich hamowanie (10, 114, 154). Ochronne działanie poliamin może być również spowodowane wiązaniem przez nie kwasów nukleinowych lub zmniejszonym uwalnianiem utajonych nukleaz w wyniku stabilizacji struktur subkomórkowych.

Należy podkreślić, że stymulację syntezy RNA pod wpływem poliamin obserwowano także w układach praktycznie nie zawierających nukleaz. Jak już wspomniano pod wpływem poliamin stymulowane są tylko niektóre reakcje katalizowane przez polimerazę RNA. Uwzględniając te fakty Krakow (132) oraz Weiss i Fox (243) postulują, iż poliaminy mogą wzmacniać uwalnianie nowoutworzonego mRNA z miejsca jego syntezy. Dalsze badania wykażą, jaki mechanizm jest rzeczywiście odpowiedzialny za stymulujące biosyntezę RNA działanie poliamin.

Poliaminy a synteza białka. Wielu autorów badało wpływ poliamin na syntezę białka, stosując bezkomórkowe układy pochodzące z bakterii, drożdży (147, 164, 234), wątroby szczura (90, 91) i z białaczkowych komórek myszy linii L 1210 (166). Z badań tych wynika, iż spermina, spermidyna, putrescyna i agmatyna zastosowane w małych stężeniach zwiększają syntezę białka, natomiast w większych stężeniach syntezę tę hamują. Interesujące jest, że stymulujący wpływ poliamin na syntezę białka jest szczególnie wyraźny przy suboptymalnych stężeniach jonów Mg^{++} . Mechanizm tej stymulacji nie jest dostatecznie jasny. Martin i Ames (147) stwierdzili, że w układzie syntetyzującym białko *in vitro*, do którego nie dodawano poliamin, tylko niewielki odsetek rybosomów posiadał współczynnik sedymentacji 100S, natomiast większość zawarta była we frakcji 70S. Po dodaniu poliamin wzrastał udział procentowy frakcji rybosomów 100S, przy czym wzrost ten ilościowo odpowiadał stymulacji syntezy białka przez poliaminy. Wyniki tych badań sugerują więc, że zwiększenie syntezy białka *in vitro* pod wpływem poliamin polega na

wzmoczeniu przekształcania rybosomów 70S na rybosomy 100S. Obserwacje Martina i Amesa są zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów, iż większe cząstki rybosomów uzyskuje się u *E. coli* (37, 38) i *S. typhimurium* (147) po dodaniu poliamin do pożywki lub do płynów używanych przy izolowaniu rybosomów. Cohen i Lichtenstein (37) postulowali, że Mg^{++} i spermidyna są u bakterii naturalnymi klamrami łączącymi podjednostki wchodzące w skład cząstek rybosomalnych. W konsekwencji przy małych stężeniach Mg^{++} i spermidyny większe cząstki rybosomalne rozpadają się na podjednostki. Watson (240) przedstawia to w następującej, bardziej ogólnej postaci:



Mechanizm tego spinania mógłby polegać na tworzeniu przez Mg^{++} lub poliaminy wiązań jonowych pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi RNA rybosomów. Według Watsona (240) w związku z powyższą hipotezą, należy zwrócić uwagę na dwa momenty:

1) Na podstawie badań *in vitro* w układach nie zawierających jonów K^+ stwierdzono, iż przy optymalnym dla syntezy białka stężeniu jonów magnezu ($10^{-2}M$) około 50% cząstek rybosomalnych wchodzi w skład frakcji 70S a 50% w skład frakcji 100S. Jednakże w rosnących komórkach bakteryjnych stężenie jonów potasu wynosić ma co najmniej 0,1M. W tych warunkach, jak wynika z badań Capocchi (33) odsetek rybosomów 100S jest znacznie zmniejszony, co podważa tezę o udziale tych cząstek w syntezie białka *in vivo*.

2) Aldehyd mrówkowy w odpowiednim stężeniu zapobiega łączeniu się cząstek 30S i 70S. Uważa się, że jest to spowodowane blokowaniem wolnych grup aminowych adeniny, guaniny i cytozyny. Pozwala to przypuszczać, iż cząstki 30S i 50S mogą łączyć się za pomocą swoistych wiązań wodorowych pomiędzy zasadami nukleotydowymi. Rola jonów magnezu i poliamin polegałaby w konsekwencji głównie na neutralizacji ładunków na sąsiadujących grupach fosforanowych.

Ostatnio Ochoa i Weinstein (167) sugerują inny punkt zaczepienia dla sperminy w układzie syntetyzującym białko. Autorzy ci stosowali układ bezkomórkowy pochodzący z białaczkowych komórek myszy linii L 1210, jako mRNA służył poliU, zaś miernikiem syntezy białka było włączanie do polipeptydu ^{14}C -fenyloalaniny. W układzie tym spermina w stężeniach od $10^{-6}M$ do $10^{-4}M$ zwiększała włączanie fenyloalaniny. Natomiast w obecności sperminy w stężeniu $2 \cdot 10^{-4}M$ synteza polipeptydu była dwukrotnie wolniejsza. Ochoa i Weinstein stwierdzili następnie, że w układzie nie zawierającym sperminy zwiększenie stężeń

poliU, sRNA lub mikrosomów powyżej stężeń optymalnych powoduje zwolnienie włączania fenyloalaniny. W układach zawierających sperminę o stężeniu hamującym $2 \cdot 10^{-4} M$ zwiększenie stężenia poliU lub sRNA osłabia hamujący wpływ sperminy. Natomiast równoważne ilości mikrosomów (zawierające równe ilości RNA) nie znoszą hamującego działania sperminy. Tak więc wydaje się, że spermina działa na mRNA i sRNA, ale nie na RNA mikrosomów. Nie wykluczono jednak możliwości iż spermina łączy się łatwiej z mRNA i sRNA i w ten sposób wyłączona zostaje możliwość jej reagowania z mikrosomami. Zgodnie ze współczesnymi poglądami na syntezę białka poszczególne cząsteczki sRNA przyłączają się do określonych kodonów mRNA za pomocą wiązań kodonowych. Można oczekiwać, iż zubożenie lub przesłonięcie reszt fosforanowych sRNA i mRNA zwiększy stabilność wiązań kodonowych. To mogłoby zdaniem Ochoa i Weinsteina tłumaczyć zdolność stymulowania syntezy białka przez sperminę w niskich stężeniach. Natomiast spermina w wysokich stężeniach hamowałaby tę syntezę na skutek nadmiernej stabilizacji wiązań kodonowych, co zakłócałoby odczytywanie informacji z mRNA. Warto dodać, iż ostatnio Friedman i Weinstein (60) stwierdzili, stosując układ bezkomórkowy pochodzący z *Bacillus stearothermophilus*, że spermina zwiększała zdolność poliU do kodowania leucyny, izoleucyny i seryny. Zdaniem tych autorów polikationy mogą wzmacniać przyłączanie się sRNA do kodonów zawierających zamiast trzech tylko dwa komplementarne nukleotydy. Mogłoby to być osiągnięte przez skuteczniejszą neutralizację grup fosforanowych sRNA i mRNA lub w wyniku powstania wiązań krzyżowych pomiędzy sRNA i kodonami.

Jak wynika z niniejszego przeglądu poliaminy są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie organizmów żywych i wpływają w istotny sposób na przebieg wielu ważnych procesów biologicznych, odbywających się na różnych poziomach organizacji materii żywej. Szczególnie interesujący i wymagający dalszych badań jest udział poliamin w procesie odczytywania informacji genetycznej a także w regulacji syntezy kwasów nukleinowych i białek. Dalsze badania powinny również wyjaśnić wpływ poliamin na podziały komórkowe oraz ich oddziaływanie ze strukturami subkomórkowymi.

Na podstawie wyników przeprowadzonych dotychczas badań nie można jeszcze ustalić czy istnieje i na czym polega jednolity mechanizm biologicznego działania tej grupy związków. Interesujące mogłoby być opracowanie jednolitej teorii biologicznego działania poliamin w oparciu o ich polikationowy charakter. Należy jednak wątpić, czy wszystkie efekty działania poliamin wyjaśnić może fakt, że są one organicznymi polikationami.

LITERATURA

1. Alarcon R. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 240 (1964).
2. Alarcon R. A., Foley G. E., Modest E. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 540 (1961).
3. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 414 (1963).
4. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1590 (1962).
5. Amand S. G. A., Anderson N. G., Gaulden M. E., *Exptl. Cell Res.* **20**, 71 (1960).
6. Amann R., Werle E., *Klin. Wschr.* **34**, 207 (1956).
7. Amann R., Werle E., *Klin. Wschr.* **35**, 22 (1957).
8. Ames B. N., Dubin D. T., *J. Biol. Chem.* **235**, 769 (1960).
9. Ames B. N., Dubin D. T., Rosenthal S. M., *Science* **127**, 814 (1958).
10. Amos H., Kearns K. E., *Exptl. Cell Res.* **32**, 14 (1963).
11. Arvidsson U. B., Pernow B., Swedin B., *Acta Physiol. Scand.* **35**, 338 (1956).
12. Asatoor A. M., Lacey B. W., London D. R., Milne M. D., *Clin. Sci.* **23**, 285 (1962).
13. Bachrach U., *Biochem. J.* **77**, 417 (1960).
14. Bachrach U., *J. Biol. Chem.* **237**, 3443 (1962).
15. Bachrach U., *Nature* **194**, 377 (1962).
16. Bachrach U., Bar-Or R., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 545 (1960).
17. Bachrach U., Oser I. S., *J. Biol. Chem.* **238**, 2098 (1963).
18. Bachrach U., Persky Y., Razin S., *Biochem. J.* **76**, 306 (1960).
19. Bauman C. G., Dietsche W., Eugster C. H., *Chimia* **14**, 85 (1960).
20. Bawden F. C., Pirie N. W., *J. Gen. Microbiol.* **21**, 438 (1959).
21. Best C. H., *J. Physiol.* **67**, 256 (1929).
22. Bichowsky-Slomnitzky L., *J. Bact.* **55**, 33 (1948).
23. Bladon P., Chaigneau M., Janot M., Le Men J., Potier P., Mele-
ra A., *Tetrahedron Letters* No 10, 321 (1961).
24. Bladon P., Ikan R., Spring F. S., Tait A. D., *Tetrahedron Letters*
No 9, 18 (1959).
25. Blaschko H., *Adv. Comp. Physiol. Biochem.* **1**, 67 (1962).
26. Blaschko H., Bonney R., *Proc. Roy. Soc. B.* **156**, 268 (1962).
27. Blaschko H., Friedman P. J., Hawes R., Nilsson K., *J. Physiol.* **145**,
384 (1959).
28. Blaschko H., Hawes R., *J. Physiol.* **145**, 124 (1959).
29. Bonner J., Huang R. C., Gilden R. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**,
414 (1963).
30. Bragg P. D., Polglase W. J., *J. Bact.* **85**, 590 (1963).
31. Cantoni G. L., *Nature* **188**, 300 (1960).
32. Cantoni G. L., Durell J., *J. Biol. Chem.* **225**, 1033 (1957).
33. Capecchi M., zgłoszona do druku w *J. Mol. Biol.*, wg Watson J. D., *Bull.*
Soc. Chim. Biol. **46**, 1399 (1964).
34. Clarke A. J., Mann P. J. C., *Biochem. J.* **71**, 596 (1959).
35. Clarke D. D., Mycek M. J., Neidle A., Waelsch H., *Arch. Biochem.*
Biophys. **79**, 338 (1959).
36. Clarke D. D., Neidle A., Sarkar N. K., Waelsch H., *Arch. Biochem.*
Biophys. **71**, 277 (1957).
37. Cohen S. S., Lichtenstein J., *J. Biol. Chem.* **235**, 2112 (1960).
38. Colbourn J. L., Whitterspoon B. H., Herbst E. J., *Biochim. Biophys.*
Acta **49**, 422 (1961).

39. Coleman R. G., Hegarty M. P., *Nature* **179**, 376 (1957).
40. Coleman R. G., Richards F. J., *Ann. Bot. Lond. N. S.* **20**, 393 (1956).
41. Dakin H., *J. Biol. Chem.* **1**, 171 (1905—1906).
42. Davidson D., Anderson N. G., *Exptl. Cell Res.* **20**, 610 (1960).
43. De Marco C., Coletta M., Bombardieri G., *Nature* **205**, 176 (1965).
44. Diaper D. G. M., Kirkwood S., Marion L., *Canad. J. Chem.* **29**, 964 (1951).
45. Dietsche W., Eugster C. H., *Chimia* **14**, 353 (1960).
46. Doerfler W., Zillig W., Fuchs E., Albers M., *Hoppe-Seyl. Z.* **330**, 96 (1962).
47. Dubin D. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 262 (1959).
48. Dubin D. T., Rosenthal S. M., *Fed. Proc.* **19**, 1 (1960).
49. Dubin D. T., Rosenthal S. M., *J. Biol. Chem.* **235**, 776 (1960).
50. Eggleston L. V., *Biochem. J.* **68**, 557 (1958).
51. Eugster C. H., Dietsche W., Baumann C. G., *Angew. Chem.* **72**, 271 (1960).
52. Felsenfeld G., w *The Molecular Basis of Neoplasia*, str. 104—119, University of Texas Press, Austin (1962).
53. Felsenfeld G., Huang S., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 425 (1960).
54. Felsenfeld G., Huang S. L., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 19 (1961).
55. Fischer F. G., Bohn H., *Hoppe-Seyl. Z.* **308**, 108 (1957).
56. Fischer F. G., Bohn H., *Ann.* **603**, 232 (1957).
57. Fleming D. E., Foshay L., *Bact. Proc.* str. 106 (1957).
58. Fox C. F., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 175 (1964).
59. Friedman S. M., *Fed. Proc.* **16**, 183 (1957).
60. Friedman S. M., Weinstein J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 988 (1964).
61. Frisch-Niggemeyer W., Hoffmann-Ostenhof O., *Biochimija* **22**, 404 (1957).
62. Gale E. F., *Biochem. J.* **33**, 392 (1940).
63. Gale E. F., *Biochem. J.* **34**, 853 (1940).
64. Gale E. F., *Biochem. J.* **35**, 66 (1941).
65. Gale E. F., *Biochem. J.* **36**, 64 (1942).
66. Gale E. F., w *Advances in Enzymology*, red. F. F. Nord., vol. 6. str. 1—32, Interscience Publ., New York (1946).
67. Gale E. F., Epps H. M. R., *Biochem. J.* **36**, 600 (1942).
68. Gale E. F., Epps H. M. R., *Biochem. J.* **38**, 232 (1944).
69. Gale E. F., Epps H. M. R., *Biochem. J.* **38**, 250 (1944).
70. Gill T. J., Kunz H. W., Friedman E., Doty P., *J. Biol. Chem.* **238**, 108 (1963).
71. Gorjaczekowa E. W., *Biochimija* **21**, 249 (1956).
72. Gorjaczekowa E. W., *Biochimija* **21**, 323 (1956).
73. Gorjaczekowa E. W., *Dodkł. Akad. Nauk SSSR* **123**, 898 (1958).
74. Gorkin W. Z., *Wopr. Med. Chim.* **7**, 632 (1961).
75. Greene R. C., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3929 (1957).
76. Grossowicz M., Razin S., Rozansky R., *J. Gen. Microbiol.* **13**, 436 (1955).
77. Guggenheim M., *Die biogenen Amine*, S. Karger, Basel (1951).
78. Guirard B. M., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4745 (1954).
79. Ham R. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 34 (1964).
80. Hara Y., Hasegawa K., *Gann (suppl.)* **50**, 267 (1959).
81. Hasse K., Berg P., *Biochem. Z.* **331**, 349 (1959).

82. Hasse K., Maisack H., *Biochem. Z.* **327**, 296 (1955).
83. Hasse K., Schuhrer K., *Biochem. Z.* **336**, 20 (1962).
84. Hämäläinen R., *Acta Soc. Med. „Duodecim”*, Ser. A **23**, 97 (1941).
85. Hegnauer R., *Pharm. Tijdschr.* **36**, 35 (1959).
86. Herbst E. J., Doctor B. P., *J. Biol. Chem.* **234**, 1497 (1959).
87. Herbst E. J., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **176**, 989 (1948).
88. Herbst E. J., Weaver R. H., Keister D. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 171 (1958).
89. Hershey A. D., *Virology* **4**, 237 (1957).
90. Hershko A., Amoz S., Mager J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 46 (1961).
91. Hershko A., Amoz S., Mager J., *Bull. Res. Council Israel* **10A**, 37 (1961).
92. Hill J. H., *Cancer* **16**, 542 (1963).
93. Hill J. M., Mann P. J. G., *Biochem. J.* **85**, 198 (1962).
94. Hill J. M., Mann P. J. G., *Biochem. J.* **91**, 171 (1964).
95. Hirsch J. G., *J. Exptl. Med.* **97**, 327 (1953).
96. Hirsch J. G., *J. Exptl. Med.* **97**, 345 (1953).
97. Holmstedt B., Tham R., *Acta Physiol. Scand.* **45**, 152 (1959).
98. Huang R. C., Bonner J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1216 (1962).
99. Huang R. C., Bonner J., *J. Mol. Biol.* **8**, 54 (1964).
100. Huang S. L., Felsenfeld G., *Nature* **188**, 301 (1960).
101. Hughes P. E., *Stain Techn.* **35**, 41 (1960).
102. Izawa M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 544 (1963).
103. Jakoby W. B., Fredericks J., *J. Biol. Chem.* **234**, 2145 (1959).
104. Johnson M. W., Markham R., *Virology* **17**, 276 (1962).
105. Kamat V. B., *Nature* **196**, 1206 (1962).
106. Kapeller-Adler R., *Biochem. J.* **44**, 70 (1949).
107. Kapeller-Adler R., Mac Farlane H., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 542 (1963).
108. Kay D., *Biochem. J.* **73**, 149 (1959).
109. Kay D., Flides P., *J. Gen. Microbiol.* **26**, 143 (1962).
110. Kączkowski J., *Post. Biochem.* **6**, 97 (1960).
111. Kączkowski J., *Post. Biochem.* **7**, 431 (1961).
112. Kączkowski J., Marion L., *Canad. J. Chem.* **41**, 2651 (1963).
113. Keister D. L., *Fed. Proc.* **17**, 84 (1958).
114. Keister D. L., Ph. D. thesis, 1958, University of Maryland.
115. Kenten R. H., Mann P. J. G., *Biochem. J.* **50**, 360 (1951).
116. Kewitz H., *Naturwiss.* **46**, 495 (1959).
117. Kihara H., Snell E. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43**, 867 (1957).
118. Kim K., *J. Bact.* **86**, 320 (1963).
119. Kim K., *J. Biol. Chem.* **239**, 783 (1964).
120. Kim K., Tchen T. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 99 (1962).
121. Kiziel A. R., *Ucz. zap. imperat. Mosk. Un-ta, Otd. jest.-ist., wyp.* **41**, 1916.
122. Konowalowa R. A., Magidson O. J., *Arch. Pharm. (Berlin)* **266**, 449 (1928).
123. Kosaki T., Hasegawa S., Kotani Y., Nakagawa S., *Proc. Japan Acad.* **36**, 516 (1960).
124. Kosaki T., Ikeda T., Kotani Y., Nakagawa S., Saka T., *Science* **127**, 1176 (1958).
125. Kosaki T., Kotani Y., *Mio Med. J.* **10**, 411 (1960).

126. Kosaki T., Kotani Y., Nakagawa S., Muraki K., *Proc. Japan Acad.* **36**, 524 (1960).
127. Kosaki T., Kotani Y., Saka T., Nakagawa S., *Proc. Japan Acad.* **36**, 527 (1960).
128. Kosaki T., Nakagawa S., Saka T., *Proc. Japan Acad.* **36**, 362 (1960).
129. Kosaki T., Muraki K., Nagayasu N., Nakagawa S., *Proc. Japan Acad.* **38**, 693, 695 (1962).
130. Kosaki T., Nagayasu N., *Proc. Japan Acad.* **39**, 679 (1963).
131. Kosaki T., Saka T., *Proc. Japan Acad.* **39**, 677, 682 (1963).
132. Krakow J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 566 (1963).
133. Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2162 (1958).
134. Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4393 (1958).
135. Linneweh F., *Hoppe-Seyl. Z.* **205**, 126 (1932).
136. Mager J., *Nature* **176**, 933 (1955).
137. Mager J., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 529 (1959).
138. Mager J., Traub A., Grossowicz N., *Nature* **174**, 747 (1954).
139. Mahler H. R., Dutton G., Mehrotra B. D., *Fed. Proc.* **23**, 217 (1964).
140. Mahler H. R., Mehrotra B. D., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 252 (1962).
141. Mahler H. R., Mehrotra B. D., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 211 (1963).
142. Mahler H. R., Mehrotra B. D., Sharp C. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 79 (1961).
143. Mandel M., *J. Mol. Biol.* **5**, 435 (1962).
144. Mann P. J. G., *Biochem. J.* **79**, 623 (1961).
145. Mann P. J. G., Smithies W. R., *Biochem. J.* **61**, 89 (1955).
146. Marquardt H., *Experientia* **5**, 401 (1949).
147. Martin R. G., Ames B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2171 (1962).
148. Martin W. H., Pelczar M. J., Hansen P. A., *Science* **116**, 483 (1952).
149. Massart L., *Nature* **162**, 779 (1948).
150. McCullough W. G., Piligian J. F., Daniel I. J., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 628 (1957).
151. Mehrotra B. D., Mahler H. R., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 78 (1964).
152. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 648 (1954).
153. Miller A. K., Peters L., *Arch. Biochem.* **6**, 281 (1945).
154. Mitra S., Kaesberg P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 146 (1963).
155. Miyaki K., Fuse Y., Uzuki F., *J. Pharm. Soc. Japan* **82**, 1530 (1962).
156. Miyaki K., Momiyama H., *Seikagaku* **27**, 765 (1956).
157. Moore B. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 1018 (1963).
158. Mora P. T., Young B. G., Rizvi S., *J. Biol. Chem.* **237**, 157 (1962).
159. Mothes K., Schütte H. R., *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* **2**, 341 (1962).
160. Mothes K., Schütte H. R., Simon H., Weygand F., *Z. Naturf.* **146**, 49 (1959).
161. Møller V., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **36**, 158 (1955).
162. Mudd S. H., *J. Biol. Chem.* **238**, 2156 (1963).
163. Mycek M. J., Clarke D. D., Neidle A., Waelsch H., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 528 (1959).
164. Nathans D., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 497 (1961).
165. Neidle A., Mycek M. J., Clarke D. D., Waelsch H., *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 227 (1958).
166. Ochoa M. Jr., Weinstein I. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 3834 (1964).
167. Ochoa M. Jr., Weinstein I. B., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 176 (1965).
168. Owen C. A., Karlson A. G., Zeller E. A., *J. Bacteriol.* **62**, 53 (1951).

169. Pfeffer M., Phillips A. W., *Bact. Proc.* str. 68 (1963).
170. Potier P., Le Men J., Janot M., Bladon P., *Tetrahedron Letters* No 18, 36 (1960).
171. Potier P., Le Men J., Janot M., Bladon P., Brown A. G., Wilson C. S., *Tetrahedron Letters* No. 5, 293 (1963).
172. Raina A., *Acta Chem. Scand.* **16**, 2463 (1962).
173. Raina A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **14**, 318 (1962).
174. Raina A., *Acta Physiol. Scand.* **60**: (suppl.), 218 (1963).
175. Raina A., Jänne J., Siimes M., *Acta Chem. Scand.* **18**, 1804 (1964).
176. Raina A., Jänne J., Siimes M., Abstr. 2nd Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc., Vienna 1965, A 114.
177. Razin S., Bachrach U., Gery I., *Nature* **181**, 700 (1958).
178. Razin S., Gery I., Bachrach U., *Biochem. J.* **71**, 551 (1959).
179. Razin S., Rozansky R., *Arch. Biochem. Biophys.* **81**, 36 (1959).
180. Reinwein H., Kochinski K. L., *Z. Biol.* **81**, 291 (1924).
181. Richards E. J., Coleman R. G., *Nature* **170**, 460 (1952).
182. Robin Y., Van Thoai, N., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **252**, 1224 (1961).
183. Robinson R., *J. Chem. Soc.* **111**, 762, 876 (1917).
184. Rodwell A. W., *J. Gen. Microbiol.* **8**, 238 (1953).
185. Rosenthal S. M., Dubin D. T., *J. Bacteriol.* **84**, 859 (1962).
186. Rosenthal S. M., Fisher E. R., Stohlman E. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol.* **80**, 432 (1952).
187. Rosenthal S. M., Tabor C. W., *J. Pharmacol.* **116**, 131 (1956).
188. Rosiek O., Sabliński J., Kowalski E., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **12**, 451 (1964).
189. Roulet F., Zeller E. A., *Helv. Chim. Acta* **28**, 1326 (1945).
190. Sakamoto Y., Ogawa Y., Hayashi K., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 292 (1963).
191. Sarkar N. K., Clarke D. D., Waelsch H., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 451 (1957).
192. Satake K., Fujita H., *J. Biochem. (Tokyo)* **40**, 547 (1953).
193. Sax S. M., Harbison P. L., Sax M., Baugham R. H., *J. Biol. Chem.* **238**, 3817 (1963).
194. Schöpf C., Komzak A., Braun F., Jacobi E., *Ann.* **559**, 1 (1948).
195. Schütte H. R., *Arch. Pharm.* **293**, 1006 (1960).
196. Schütte H. R., *Atompraxis* **7**, 91 (1961).
197. Schütte H. R., Aslanow H., Schäfer C., *Arch. Pharm.* **295**, 34 (1962).
198. Schütte H. R., Bohlmann F., Reusche W., *Arch. Pharm.* **294**, 610 (1961).
199. Schütte H. R., Nowacki E., Schäfer C., *Arch. Pharm.* **295**, 20 (1962).
200. Sevag M. G., Drabble W. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 446 (1962).
201. Sevag M. G., Ashton B. A., *Nature* **203**, 1323 (1964).
202. Shepherd G. R., Hopkins D. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 103 (1963).
203. Shimizu H., Kakimoto Y., Sano I., *J. Pharmacol.* **143**, 199 (1962).
204. Silverman M., Evans E. A., *J. Biol. Chem.* **150**, 265 (1943).
205. Silverman M., Evans E. A., *J. Biol. Chem.* **154**, 521 (1944).
206. Smith T. A., *Phytochemistry* **2**, 241 (1963).
207. Smith T. A., Richards F. J., *Biochem. J.* **84**, 292 (1962).
208. Smith T. A., Garraway J. L., *Phytochemistry* **3**, 23 (1964).
209. Sneath P. H. A., *Nature* **175**, 818 (1955).
210. Souček M., Schütte H. R., *Angew. Chem.* **74**, 901 (1962).

211. Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **4**, 395 (1962).
212. Strogonow B. P., Ostapienko L. A., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **54**, 369 (1946).
213. Strogonow B. P., Szewjakowa N. I., *Usp. Sowriem. Biol.* **54**, 44 (1962).
214. Suzuki T., Hagihara F., *J. Pharm. Soc. Japan* **74**, 546 (1954).
215. Swedin B., *Acta Physiol. Scand.* **42**, 1 (1958).
216. Szybalska E. H., Szybalski W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2026 (1962).
217. Tabor C. W., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, vol. 5, str. 756—760, Academic Press, New York (1962).
218. Tabor C. W., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, vol. 5, str. 761—765, Academic Press, New York (1962).
219. Tabor C. W., Rosenthal S. M., *J. Pharmacol.* **116**, 139 (1956).
220. Tabor C. W., Rosenthal S. M., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, vol. 6, str. 615, Academic Press, New York (1963).
221. Tabor C. W., Tabor H., Bachrach U., *J. Biol. Chem.* **239**, 2194 (1964).
222. Tabor C. W., Tabor H., McEwen C. M., Kellogg P. D., *Fed. Proc.* **23**, 385 (1964).
223. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M., *J. Biol. Chem.* **208**, 645 (1954).
224. Tabor H., *J. Biol. Chem.* **188**, 125 (1951).
225. Tabor H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 228 (1961).
226. Tabor H., *Biochemistry* **1**, 496 (1962).
227. Tabor H., Rosenthal S. M., Tabor C. W., *Fed. Proc.* **15**, 367 (1956).
228. Tabor H., Rosenthal S. M., Tabor C. W., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2978 (1957).
229. Tabor H., Rosenthal S. M., Tabor C. W., *J. Biol. Chem.* **233**, 907 (1958).
230. Tabor H., Tabor C. W., *Fed. Proc.* **19**, 6 (1960).
231. Tabor H., Tabor C. W., *Pharmacol. Rev.* **16**, 245 (1964).
232. Tabor H., Tabor C. W., Rosenthal S. M., *Ann. Rev. Biochem.* **30**, 579 (1961).
233. Tago H., Takemsa Y., Koyama Y., Ishii T., *Gann* **50**, suppl., 266 (1959).
234. Tissières A., Hopkins J. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 2015 (1961).
235. Traub A., Mager J., Grossowicz N., *J. Bacteriol.* **70**, 60 (1955).
236. Ts'o O. P., Bonner J., w *The Nucleohistones* red. Ts'o O. P., Bonner J., New York (1964).
237. Tuppy H., Faltaus M. S., *Monatshefte Chem.* **91**, 167 (1960).
238. Unemoto T., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **12**, 65 (1964).
239. Unemoto T., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **11**, 1255 (1963).
240. Watson J. D., *Bull. Soc. Chim Biol.* **46**, 1399 (1965).
241. Weaver R. H., Herbst E. J., *J. Biol. Chem.* **231**, 647 (1958).
242. Weaver R. H., Herbst E. J., *J. Biol. Chem.* **231**, 637 (1958).
243. Weiss S. B., Fox C. F., w *The Nucleohistones* red. Ts'o O. P., Bonner J., New York (1964).
244. Werle E., Beaucamp G., Schirren U., *Planta* **53**, 125 (1959).
245. Werle E., Pechman E., *Ann.* **562**, 44 (1949).
246. Werle E., Roewer F., *Biochem. Z.* **325**, 550 (1954).
247. Werle E., Trautschold I., Aures D., *Hoppe-Seyl Z.* **326**, 200 (1961).
248. Wheaton T. A., Stewart I., *Nature* **206**, 620 (1965).
249. Whitfield J. F., Rixon R. H., Youdale T., *Exptl. Cell Res.* **27**, 143 (1962).

250. Wiesner K., Mac Donald D. M., Bankiewicz C., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 6348 (1953).
251. Wiesner K., Mac Donald D. M., Valenta Z., Armstrong R., *Canad. J. Chem.* **30**, 761 (1952).
252. Wiesner K., Orr D. E., *Tetrahedron Letters* No. 16, 11 (1960).
253. Willstätter R., Heubner W., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **40**, 3869 (1907).
254. Wrede F., *Hoppe-Seyl. Z.* **153**, 291 (1926).
255. Yamada H., Gee P., Ebata M., Yasunobu K., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 165 (1964).
256. Yamada H., Yasunobu K. T., *J. Biol. Chem.* **237**, 1511 (1962).
257. Yamada H., Yasunobu K. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 387 (1962).
258. Yamada H., Yasunobu K. T., *J. Biol. Chem.* **237**, 3077 (1962).
259. Yamada H., Yasunobu K. T., *J. Biol. Chem.* **238**, 2669 (1963).
260. Yamada H., Yasunobu K. T., Yamano T., Masom H. S., *Nature* **198**, 1092 (1963).
261. Yoshikawa H., Maruo B., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 270 (1960).
262. Zeller E. A., *Helv. Chim. Acta* **21**, 1645 (1938).
263. Zeller E. A., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, vol. 8, str. 313—355, Academic Press, New York (1963).
264. Zeller E. A., Van Orden L. S., Vögtli W., *J. Biol. Chem.* **209**, 429 (1954).
265. Ziemba-Zak B., Rosiek O., Sabliński J., *Folia Biologica*, Kraków **13**, 183 (1965).
266. Zillig W., Krone W., Albers M., *Hoppe-Seyl. Z.* **317**, 131 (1959).

HALINA AUGUSTYNIAK*

Budowa i własności 2,5-dwuketopiperazyny

The Structure and Properties of 2,5-diketopiperazine

Available data on chemistry and occurrence of 2,5-diketopiperazine (DKP) are reviewed. Despite the simplicity of the molecule some problems of its structure and reactivity still requiring additional research are pointed out.

Układ 2,5-dwuketopiperazyny (DKP) budził swego czasu duże zainteresowanie w związku z bezwodnikową hipotezą budowy białek. Obecnie hipoteza ta stała się nieaktualna, jednak niektórzy autorzy, m.in. *Segal* (88) dyskutują nadal możliwość występowania w białkach układów DKP. Dotychczasowe badania nie potwierdzają tego poglądu, gdyż w białkach o znanej strukturze nie znaleziono układów typu DKP, a sporadyczne doniesienia jakoby DKP ulegała działaniu enzymów proteolitycznych nie zostały potwierdzone. Z układem DKP spotykamy się jednak często w praktyce analitycznej w chemii białek. Uważa się też, że jest on bardzo ważnym stadium przejściowym przy syntezach aminokwasów i peptydów. Ostatnio zaś pochodne DKP stały się interesujące z uwagi na możliwość ich zastosowania jako antybiotyków (56, 99). Ponadto ten ciekawy cykliczny dwuamid stanowi często modelowy związek w badaniach nad strukturą amidów, chociaż liczne aspekty jego budowy oraz własności do dnia dzisiejszego nie są w pełni poznane i wymagają bardziej szczegółowych badań.

I. Warunki tworzenia się 2,5-dwuketopiperazyn

Pierwsze doniesienie o związku prawdopodobnie będącym 3,6-dwuizobutylo-2,5-dwuketopiperazyną pojawiło się w 1849 r. w pracy *Boppa* (32) dotyczącej własności tyrozyny i leucyny wyizolowanych z hydrolizatów niektórych białek. Preparatykę tego związku opisali następnie *Hesse* (55) w 1860 r. i *Kohler* (65) w 1865 r. Ten ostatni stwierdził, że przy ogrzewaniu glicyny w strumieniu HCl powstaje DKP. Stosując właśnie tę metodę, otrzymano bezwodniki fenyloalaniny (43), alaniny

* Dr, adiunkt Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

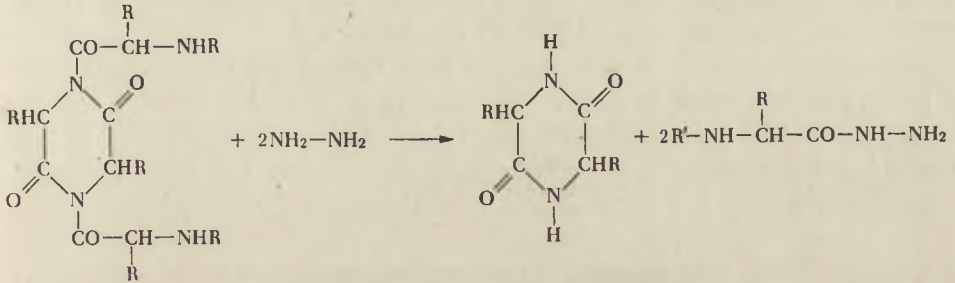
(78) i sarkozyny (73). Nieco później *Curtius* (40) zauważył, że wilgotny ester etylowy glicyny spontanicznie przekształca się w DKP i ester etylowy trójglicyloglicyny. *Balbiano* i *Trasciatti* (26, 27) obserwowali podobną kondensację glicyny przy ogrzewaniu jej w glicerolu. Pośrednim produktem był ester glicerolowy aminokwasu, a głównymi produktami końcowymi — DKP i nierozpuszczalny w wodzie polimer. W 1901 r. *Fisher* i wsp. (45) donosili o szczególnie łatwej cyklizacji estrów dwupeptydów. W porównaniu z innymi dwupeptydy zawierające prolinę lub hydroksyprolinę wykazują znacznie większą skłonność do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z utworzeniem układu DKP (81, 92). Wyraźną tendencję do tworzenia układów DKP mają zwłaszcza wolne estry dwupeptydów prolinowych. Przy podwyższonych temperaturach również same dwupeptydy wykazują znaczną tendencję do przechodzenia w DKP.

W dalszych badaniach stwierdzono, że pochodne DKP tworzą się łatwo zarówno z wolnych aminokwasów jak i z całego szeregu ich pochodnych. I tak łatwemu, a czasem spontanicznemu przekształceniu w układy DKP ulegają estry aminokwasów nawet w wodnych roztworach w normalnej temperaturze. Nie jest to jednak regułą, gdyż estry etylowe m.in. tyrozyny, alaniny, leucyny, fenyloalaniny nie przekształcają się w odpowiednie DKP w wodnym środowisku, chociaż takie przekształcenie jest łatwo osiągalne przy ogrzewaniu tych estrów w zamkniętych probówkach w temp. 150-180°C. Przekształcenie estrów metylowych α -aminokwasów z trzeciorzędowym α atomem C (np. kwasu α -amino-izomasłowego) do odpowiednich DKP przebiega z małymi wydajnościami (47).

Zauważono (12, 44), iż ogólnie szybkość tworzenia się DKP spada ze wzrostem ciężaru cząsteczkowego zarówno aminokwasów jak i podstawników estrowych, oraz że wymagana jest w takim przypadku wyższa temperatura, a wydajności są mimo to niskie.

Tworzenie się DKP zamiast odpowiednich hydrazydów zaobserwowano również przy działaniu hydrazyną na estry metylowe N-(trójfluoro-acetylo)-dwupeptydów (97). DKP tworzyły się z wydajnością 70-80%, a oczekiwane odpowiednie hydrazydy powstawały jedynie w przypadku, kiedy estry N-(trójfluoroacetylo)-dwupeptydów posiadały na końcu łańcucha zawadę przestrzenną np. grupę metylową, jak w estrze metylowym N-(trójfluoroacetylo)-L-walylo-L-alaniny. Podobny wpływ wywierała hydrazyna na aktynomycyny: *Brockmann* i wsp. (34) otrzymali na tej drodze bezwodnik D,L-N-metylo-walylo-sarkozyny. Przy działaniu hydrazyną na N,N'-dwaacylowane i N,N'-dwa-(aminoacylowane)-DKP następuje transacylacja z utworzeniem odpowiedniej DKP i acylo- względnie aminoacylo-hydrazidu (schemat 1). Reakcja ta może służyć do wykrywania grup acylowych względnie aminoacylowych w pochodnych DKP (21).

Również laktony niektórych hydroksy-aminokwasów, np. laktony kwasu α -amino- γ -hydroksy-walerianowego przy dłuższym staniu w temp. pokojowej przekształcają się w odpowiednie DKP (46).



Schemat 1. Działanie hydrazyny na N,N' -dwu-(aminoacylo)-DKP (wg 21)

Wreszcie w hydrolizatach białek i peptydów układy DKP mogą pojawiać się jako artefakty, często zmieniające w sposób istotny wyniki analiz (98). O b a t a i wsp. (74) wyizolowali z kwaśnego hydrolizatu odtłuszczonych strąków soi mieszane DKP, które zidentyfikowali jako pochodne L -izoleucylo- L -waliny. T a m u r a i wsp. (96) niedawno donieśli również o izolacji kilku mieszanych DKP z handlowego preparatu peptonu.

Podczas hydrolizy białek rozcieńczonymi kwasami istnieje możliwość zmiany porządku aminokwasów w peptydach, prawdopodobnie poprzez odpowiednie DKP. Np. S a n g e r i T h o m p s o n (84) ogrzewając glicylo-walinę w rozcieńczonym kwasie solnym w temp. 110°C stwierdzili jej częściową przemianę w walilo-glicynę.

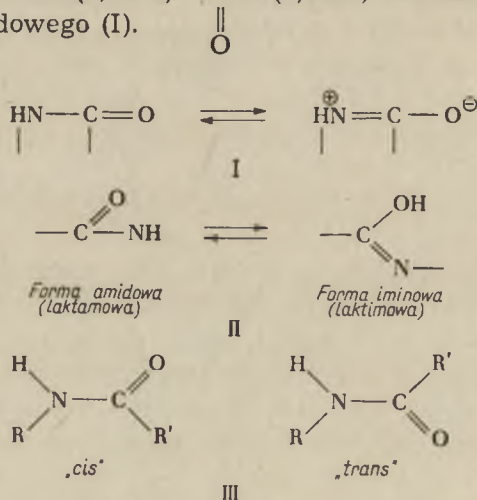
Przy preparatywnym otrzymywaniu DKP wychodzi się najczęściej z wolnych aminokwasów bądź dwupeptydów. Symetryczne dwuketopiperazyny otrzymuje się łatwo ogrzewając odpowiedni aminokwas w glicerolu bądź w glikolu etylenowym (85, 90). Mieszane DKP otrzymuje się przeważnie z odpowiednich dwupeptydów przez ogrzewanie ich roztworu lub zawiesiny w glikolu etylenowym w temp. $170\text{--}180^\circ\text{C}$ (76, 85), względnie przez ogrzewanie odpowiednich dwupeptydów powyżej ich temperatury topnienia (53).

Jak wspomniano, w praktyce analitycznej w chemii białek i aminokwasów pojawianie się DKP jest często źródłem błędnej interpretacji wyników. Z jednej strony DKP mogą powodować obniżenie oznaczanych ilości tych aminokwasów, z których się utworzyły, a z drugiej prowadzić do podwyższenia innych, gdyż ewentualnie powstałe dwupeptydy mogą być mylnie oznaczane jako aminokwasy. Ponadto z DKP mogą się tworzyć w warunkach kwaśnej hydrolizy nie poznane bliżej pochodne (prawdopodobnie kondensaty pośrednich produktów hydrolizy układów DKP), które reagują z ninhydraną w sposób typowy dla aminokwasów, choć same DKP nie tworzą z ninhydraną barwnych produktów (25). Powstałe

związki o układzie bezwodnikowym można na chromatogramach wybarwić metodą Rydona-Smitha (80), a w roztworach przy pomocy kwasu pikrynowego w środowisku alkalicznym lub meta-dwunitrobenzenu (87). Ilościowo oznacza się DKP mierząc przyrost ekstynkcji kompleksów miedziowych przed i po hydrolizie tych układów DKP. W ten sposób określono np. ilości DKP w produktach polikondensacji estrów α -aminokwasów, gdzie tworzą się one obok linearnych polipeptydów (76, 77). Wyraźnie jednak odczuwa się brak specyficznej i prostej metody wykrywania i ilościowego oznaczania tych układów, tym bardziej, że możliwość powstawania DKP podczas hydrolizy białek lub peptydów wymaga sprawdzenia ich obecności w hydrolizacie.

II. Budowa 2,5-dwuketopiperazyny

DKP była pierwszym krystalicznym peptydem badanym przy pomocy promieni X (39). Badania te wykazały, że jest ona płaskim heksagonem (z wyjątkiem atomów wodoru grup metylenowych), a kąty pomiędzy wiązaniami wynoszą $120^\circ \pm 3^\circ$. Skrócenie odległości $\text{CH}_2\text{-N}$ do 1,41 Å i $\text{CH}_2\text{-C}$ do 1,47 Å w porównaniu z normalnymi wartościami dla wiązań pojedynczych (1,47 Å i 1,54 Å) Corey przypisuje hiperkoniugacji (38). Długość wiązania C=O (1,25 Å) i C-N (1,33 Å) również świadczą o mezoimerii układu amidowego (I).



W przypadku β -glicyloglicyny długość wiązania C=O wynosi 1,23 Å, a C-N 1,29 Å; kąty pomiędzy wiązaniami $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{N} \end{array}$ wynoszą 125° (28). Dla acetamidu średnia długość wiązania C=O przybiera natomiast wartość 1,28 Å. Dla amidów w ogóle przyjmuje się średnią długość wiązania $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{N}-\text{C} \end{array}$ jako 1,36 Å (89). Jak więc widać w DKP odpowiednie odległości

są znacznie krótsze niż w normalnych lub w N-podstawionych amidach. Łącznie z symetrycznością kątów pomiędzy wszystkimi wiązaniami w pierścieniu i płaską budową DKP wydaje się to przemawiać za znacznym sprzężeniem typu aromatycznego w tym związku. W przeciwieństwie do kryształów aminokwasów, kryształy DKP są bardzo proste, co jest wynikiem geometrycznej prostoty cząsteczki. Pomiedzy grupami NH a atomami tlenu istnieją wiązania wodorowe o długości 2,85 Å, które układają cząsteczki DKP w płaskie równoległe łańcuchy lub wstęgi. Przylegające łańcuchy są utrzymywane przy pomocy sił Van der Waalsa (39). Komórka Bravais dla kryształów DKP zawiera 2 cząsteczki, które nie są powiązane wiązaniami wodorowymi, stąd vibracje siatki krystalicznej mają niskie częstotliwości (91).

Tablica 1

Obserwowane (ν_o) i obliczone (ν_c) częstotliwości DKP (w cm^{-1}) i jej deuterowanej pochodnej oraz ich interpretacja (wg 49)

$\text{CH}_2\text{CO-NH}_2$		$(\text{CH}_2\text{CO-ND})_2$		Interpretacja
ν_o	ν_c	ν_o	ν_c	
1690	1657	1675	1639	C=O drg. rozciągające
1443	1450			NH drg. zginające w płaszczyźnie
1340	1383	1349	1381	C-N drg. rozciągające i C-CH ₂ drg. rozciągające
		1232	1195	N-D drg. zginające w płaszczyźnie i N-CH ₂ drg. rozciągające
1075	1056			N-CH ₂ drg. rozciągające i C=O drg. zginające w płaszczyźnie
		970	1010	N-CH ₂ drg. rozciągające i N-D drg. zginające w płaszczyźnie
910	892			C-CH ₂ drg. rozciągające, C=O drg. zginające w w płaszczyźnie i C-N drg. rozciągające
		887	812	C-CH drg. rozciągające i N-D drg. zginające w płaszczyźnie
806	728	780	720	CH ₂ -C-N drg. deform. i C-N-CH ₂ drg. deformacyjne
449	403	446	401	C=O drg. zginające w płaszczyźnie i N-CH ₂ drg. rozciągające

DKP była obiektem licznych badań spektroskopowych w podczerwieni. Miały one na celu pełną interpretację widma tego związku i jego deuterowanej pochodnej — a więc przypisanie poszczególnych pasm absorpcji określonym typom drgań, oraz ustalenie, która z możliwych form

tautomerycznych dominuje w określonych warunkach. Chodziło więc również o ustalenie, czy DKP tworzy trwałe formy enolowe i czy wiązanie podwójne w ewentualnym enolu jest umiejscowione pomiędzy C i N czy też pomiędzy dwoma atomami C. Rozwiązanie pierwszych z wyżej wymienionych zagadnień zawdzięczamy głównie pracom uczonych japońskich (49, 70, 71, 91). DKP służyła w ich badaniach jako modelowa substancja przy analizie wzajemnego oddziaływania drgań rozciągających wiązań C=O i C-N oraz drgań zginających grup NH. Ponadto badacze ci dążyli do określenia położenia pasm grupy *cis* amidowej. Oprócz preparatów DKP krystalizowanych z wody stosowano również próbki krystalizowane z D₂O. Badania te, oraz inne doprowadziły do pełnej charakterystyki widma DKP w podczerwieni, przy czym na podkreślenie zasługuje fakt, że częstości drgań obliczone dla poszczególnych wiązań dosyć dobrze zgadzały się z wartościami wyznaczonymi doświadczalnie. Charakterystyczne pasma absorpcji DKP są przedstawione w tabeli 1.

Amidy kwasowe posiadające atom wodoru przy azocie zdolne są do przemiany tautomerycznej amidowo-iminowej (II).

Mimo że tautomerycznej odmiany iminowej nie wydzielono, udało się stwierdzić dla podstawionych amidów zahamowanie swobodnego obrotu

wokół wiązania N-C[∥]O i w konsekwencji ich występowanie w formach *cis* i *trans* (III).

Na podstawie wielu prac dotyczących widm w podczerwieni monodstawionych amidów ustalono, że grupy CO-NH *trans* wykazują I pasmo amidowe przy 1650 cm⁻¹ i II przy 1550 cm⁻¹, podczas gdy grupy CO-NH *cis* tylko I pasmo amidowe. W widmie DKP w której występuje układ *cis*, pasmo to leży przy 1690 cm⁻¹, a w związku deuterowanym przy 1675 cm⁻¹ (70). 70% energii potencjalnej tego pasma jest związane z drganiami rozciągającymi wiązania C=O, a więc udział drgań rozciągających wiązania C-N, a szczególnie drgań zginających wiązania N-H w tym paśmie jest nieznacznym (71).

Grupy *cis* i *trans* amidowe wykazują również absorpcję odpowiednio przy 3200 cm⁻¹ i 3100 cm⁻¹ oraz przy 3300 i 3100 cm⁻¹ (70). D a r m o n i wsp. (42) przypisują pasma przy 3060 cm⁻¹ i 3100 cm⁻¹ drganiom rozciągającym grup νNH amidów cyklicznych (np. w γ butyrolaktamie, 3,3,6,6-tetrametylo 2,5-dwuketopiperazynie) w fazie skondensowanej. Te dwa pasma powstały z *cis* konfiguracji grup CO-NH. Znikają one w rozcieńczonym CCl₄, gdzie nie ma możliwości wiązań wodorowych, natomiast pojawia się pasmo przy 3420 cm⁻¹. Mizushima (72) na przykładzie δ-walerolaktamu, ε-kaprolaktamu i DKP przypisuje *cis* konfiguracji pasma przy 3210—3240 cm⁻¹ i 3070 cm⁻¹. Bellamy (29) zwraca uwagę na pasmo przy 3175 cm⁻¹ występujące w widmie laktamów, w których

istnieje możliwość powstawania wyłącznie układów *cis* amidowych. F u k u s h i m a i wsp. (49) zajmując się określeniem normalnej wibracji DKP i jej deuterowanej pochodnej, określili położenie tzw. pasm *cis* amidowych I, II, III i IV przy następujących częstościach:

1690	cm ⁻¹	—	<i>cis</i>	amidowe	pasmo	I
1443	„	—	„	„	„	II
1340	„	—	„	„	„	III
449	„	—	„	„	„	IV

Przy deuterowanej pochodnej położenie pasm *cis* amidowych I, III i IV nie ulega dużym zmianom, przesunięte jest jedynie pasmo *cis* amidowe II (silnie sprzężone z drganiami rozciągającymi C-N i C-C występującymi przy 1195 i 812 cm⁻¹).

Widmo elektronowe DKP w H₂O wykazuje maksimum przy 1850 Å. H a m i wsp. (54) przypisują je addytywnej absorpcji obu grup CO-NH. Porównując to pasmo z odpowiednimi pasmami widma dwupeptydów łańcuchowych, autorzy zauważyli mniejszą intensywność absorpcji DKP, co próbują wytłumaczyć skróceniem wiązania N-H poza płaszczyznę grup CO-N wynikłą z utworzenia pierścienia. S a i d e l badając absorpcję wiązania peptydowego w UV (82) porównywał widmo DKP w H₂O z widmami glicyny i poliglicyny i stwierdził, że jest ono różne od widma glicyny o równoważnym stężeniu (podobna prawidłowość występuje w przypadku alaniny i jej bezwodnika (83)).

Badania spektroskopowe mające na celu wyjaśnienie możliwości powstawania enolowych form DKP nie doprowadziły jeszcze do wyciągnięcia ostatecznych konkluzji. Wiadomo, że forma ketonowa ugrupowania amidowego charakteryzuje się znaczną energią rezonansu, forma enolowa (laktimowa) posiada jednak korzystniejsze warunki dla aromatycznego sprzężenia wiązań podwójnych wewnątrz pierścienia, z czym wiąże się również znaczna energia rezonansu. Obecność azotu, którego wolna para elektronów stwarza różne możliwości oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych wpływa na złożoność krzywych absorpcji. Porównując widma DKP i jej 3,3,6,6-tetrametylowej pochodnej w rejonie 3571—2778 cm⁻¹ K e l l n e r (61) wykazuje duże podobieństwo cech obu tych substancji. Ten fakt oraz brak pasma -OH przy 3485 cm⁻¹ a także pasma grup =CN przy 3090 cm⁻¹ i 3030 cm⁻¹ wskazuje wg niej, że DKP w stanie krystalicznym występuje w formie ketonowej. Wykluczając możliwość istnienia formy enolowej o wiązaniach podwójnych pomiędzy atomami C (enol C=C), autorka dopuszcza jednak nieznaczny udział enolu typu N=C w widmie formy ketonowej DKP. S h i b a t a i wsp. (90) na podstawie swych badań spektroskopowych dochodzą do wniosku, że również w roztworach wodnych DKP, N,N-dwumetylo- i 3,6-dwumetylo-2,5-dwuketopiperazyne występują w formach ketonowych.

Często o równowagach tautomerycznych związków decyduje pH roztworu, wpływając tym samym na widoczną zmianę położenia względnie intensywności poszczególnych pasm absorpcji. W przypadku DKP Sa i d e l (82) stwierdza, że zmiany pH mają mały wpływ na widmo elektrowne tego związku.

Ciekawe są wyniki badania struktury wolnych rodników DKP wytworzonych pod wpływem naświetlania promieniami X. Lin i wsp. (68) proponują strukturę wolnego rodnika (IV) przedstawioną na str. 104. Zauważyli oni występowanie znacznej gęstości niesparowanego elektronu przy węglu C_4 i przyjmują, że rodnik tworzy strukturę w której wolny elektron łączy orbitale π obejmujące atomy C_2 , N_3 , C_4 i O_8 (V).

III. Problem enolizacji 2,5-dwuketopiperazyny

Budowa cząsteczki DKP sugeruje możliwość występowania tego związku w wielu enolowych formach tautomerycznych. Nad otrzymaniem i charakterystyką tych form pracowano od dawna. W 1926 r. A b d e r h a l d e n i wsp. (2, 3, 4) opisali metodę otrzymywania jednej z takich form, polegającą na ogrzewaniu DKP z tyrozyną w glicerolu w temperaturze $200^\circ C$, lub samej DKP w anilinie, względnie glicyloglicyny w dwufenyloaminie. Autorzy ci podawali, że przejście formy ketonowej w enolową nie zachodzi ilościowo. Otrzymanie nienasyconej formy N,N'-dwumetylo-2,5-dwuketopiperazyny, która miała własności podobne do formy enolowej DKP, miało być wg A b d e r h a l d e n a i wsp. (4) dowodem, że powyższymi metodami otrzymano enol typu $C=C$, tym bardziej, że w porównywalnych warunkach nie udało się autorom otrzymać takiej formy z 3,3,6,6-tetrametylo-2,5-dwuketopiperazyny (10). Ponieważ uzyskane wyniki wydawały się szczególnie interesujące w związku z panującą wówczas hipotezą budowy białek, autorzy starali się potraktować zagadnienie szerzej. W kolejnych pracach (5, 8) donieśli oni o otrzymaniu enolowej formy bezwodnika leucynowo-glicynowego, który scharakteryzowali badając szybkość jego hydrolizy oraz syntetyzując jego metylową pochodną. Donieśli także o otrzymaniu enolowej formy 3,6-dwumetylo-2,5-dwuketopiperazyny, wychodząc z estru etylowego alaniny (4). Enolową formę DKP przekształcili również w dwupeptyd, wykazujący jakoby nienasycony charakter (5). Poczynili także pewne obserwacje nad własnościami otrzymanych „enoli”. I tak: forma enolowa DKP była łatwiej rozpuszczalna w H_2O , silniej adsorbowała się na węglu aktywnym, przy $90-100^\circ C$ przechodziła w formę ketonową, szybciej się rozkładała, przy rozpadzie zachowując się inaczej niż forma ketonowa. Ulegała także z dobrą wydajnością reakcji ozonolizy, miała wyższy współczynnik refrakcji oraz tworzyła z łatwością eter metylowy (3, 5, 6, 8, 9, 18). Działaniem kwasu benzoosowego na enolową formę Abderhalden i wsp. otrzymali jednopodstawioną pochodną benzoilową (4). Nawet trudności w izo-

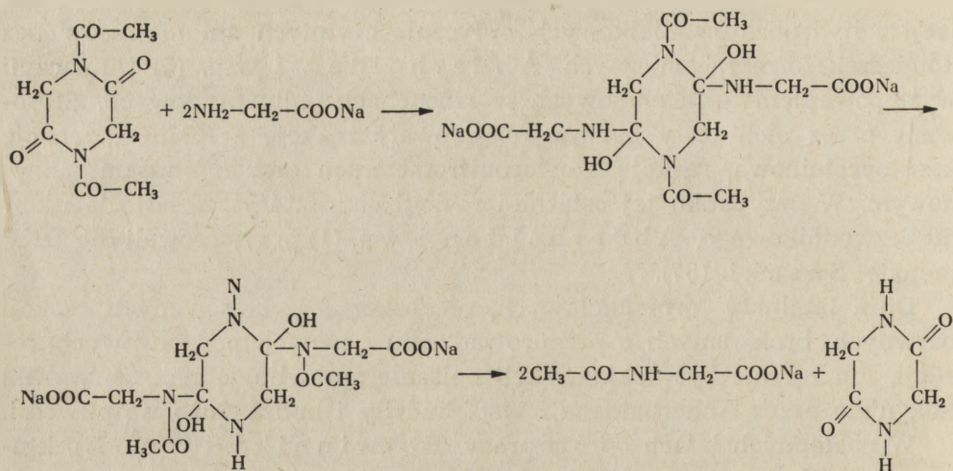
lacji z hydrolizatów białkowych optycznie czynnych aminokwasów bez domieszek form racemicznych *Abderhalden* i wsp. (5) tłumaczyli występowaniem form enolowych w łańcuchach polipeptydowych. Stosowane przez nich testy barwne obejmowały reakcje z KMnO_4 , reakcję ksantoproteinową, reakcję z czteronitrometanem oraz z kwasem pikrynowym. W przypadku tej ostatniej reakcji charakterystycznej dla układu bezwodnikowego, *Abderhalden* i wsp. (1) przystosowali dla DKP metodę *Sasaki* (87).

Duża labilność form enolowych, niedoskonałość stosowanych reakcji barwnych, brak danych o przeprowadzeniu pewnych podstawowych reakcji, lub też niezbyt dokładne ich opisanie sprawiło jednak, że wyniki osiągnięte przez *Abderhaldena* i wsp. budziły i budzą dużo wątpliwości.

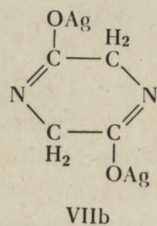
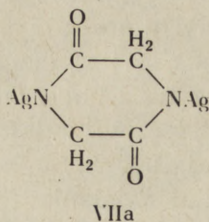
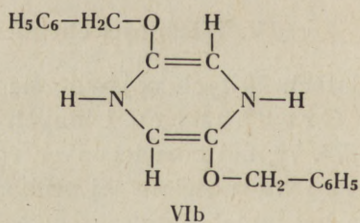
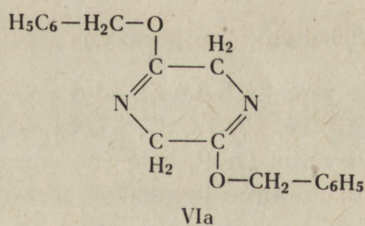
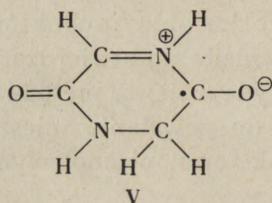
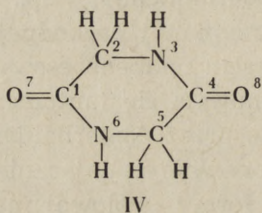
W następnych latach oprócz pracy *Botwinnika* i wsp. (33), którzy donosili, że otrzymali również formę enolową metodą ogrzewania z aniliną, nie było publikacji mówiących o otrzymaniu tej formy DKP metodą opisaną przez *Abderhaldena* i wsp.. *Botwinnik* i wsp. wykazali nienasycony charakter otrzymanej pochodnej DKP poprzez „utlenienie” wiązania podwójnego kwasem nadbenzoesowym. Ciekawe, że *Kellner* (61), która w 1937 r. zajmowała się tautomerią DKP, nie badała preparatu enolu DKP opisanego przez *Abderhaldena* i wsp. Ostatnio *Augustyniak* i wsp. (25) ponownie badając niektóre własności DKP, próbowali uzyskać preparat formy enolowej metodą *Abderhaldena* i wsp.. Dokładne spektroskopowe badanie produktów otrzymanych wyżej wymienioną metodą doprowadziło do stwierdzenia, że nie są to formy enolowe tego bezwodnika. Wydaje się, że metoda *Abderhaldena* i wsp. w najlepszym razie prowadzi do powstania mieszaniny różnych pochodnych DKP nie będących jednak formami enolowymi.

IV. Własności chemiczne 2,5-dwuketopiperazyny

W latach 20-tych pojawiło się wiele prac *Abderhaldena*, *Karrera*, *Granachera* i innych (11, 13, 16, 17, 19, 37, 47, 51, 52, 58, 59, 60, 69, 75, 79, 86) poświęconych reaktywności DKP, oraz metodom otrzymywania i własnościom jej pochodnych. Pomimo jednak obszernej literatury na ten temat, cały szereg reakcji nie jest wyjaśnionych i nie w pełni poznana została budowa wielu z otrzymanych pochodnych. I tak np. *Abderhalden* i wsp. (7) donosili w 1924 r. o otrzymaniu działaniem chlorku tionylu na DKP ciekawego połączenia o wzorze $\text{C}_4\text{N}_2\text{OH}_2\text{Cl}_3$, którego struktura dotychczas nie została ostatecznie wyjaśniona. Podobnie nie jest ustalona budowa związku zawierającego fosfor, a otrzymanego przez *Gawriłowa* i wsp. (51) w wyniku działania PCl_5 na DKP. Wydaje się, że dalszych badań wymagają także proponowane (schemat 2) przez *Akimową* i wsp. (20) i *Pietrową* i wsp. (75) mechanizmy opisanej wcześniej (30, 36) reakcji pomiędzy DKP a aminami, gdyż autorzy



Schemat 2. Schemat reakcji dwuacetylo-pochodnej DKP z aminami (wg 20)



Uwaga: we wzorze IV powinno być



ci niedostatecznie szczegółowo podali charakterystykę wyizolowanych produktów pośrednich postulowanych reakcji.

Wyjaśnienia wymagają także różnice w zachowaniu się soli srebrowych DKP wobec różnych czynników. Sole srebrowe DKP były stosowane przez K a r r e r a i wsp. (52, 58, 59, 60) jako substancje wyjściowe przy otrzymywaniu szeregu innych pochodnych DKP. Przy działaniu na sól srebrową jodkiem metylu, K a r r e r i wsp. otrzymali z 50% wydajnością N,N'-dwumetylową pochodną DKP, jednak reakcja z chlorkiem benzylu miała całkowicie inny przebieg i prowadziła do utworzenia się dwubenzylowego eteru 2,5-dwuhydropirazyny (VIa).

Substancja ta reagując z jodkiem metylu dawała N,N'-dwumetylo-2,5-dwuketopiperazynę. Po hydrolizie kwasem siarkowym otrzymano z niej glicynę i alkohol benzylowy. Związek VI może występować w dwóch postaciach tautomerycznych VIa i VIb. Autorzy na podstawie otrzymanych produktów rozpadu i zachowania się w kwaśnym środowisku oraz w oparciu o inne obserwacje uważają, że związek posiada raczej strukturę przedstawioną wzorem VIa, jednak ostateczne rozstrzygnięcie wymaga dalszych dowodów doświadczalnych.

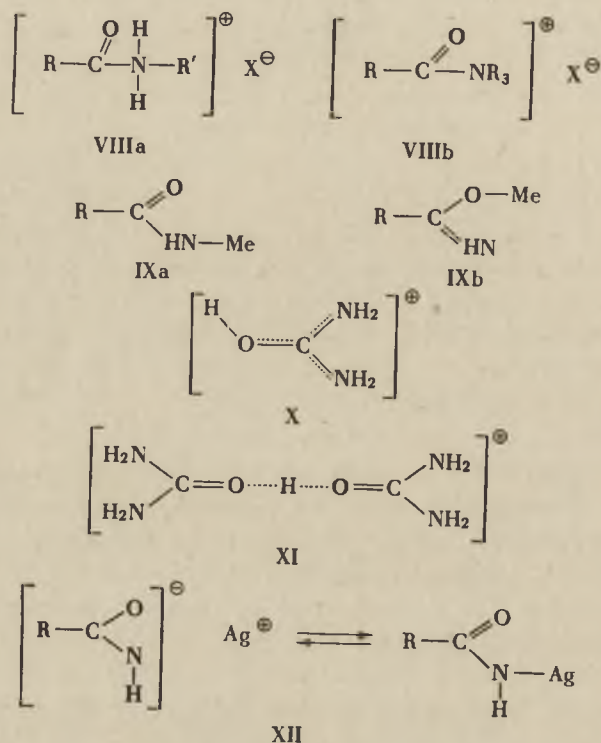
Alkilowaniem DKP zajmował się również G r a n a c h e r i wsp. (52). Opisał on otrzymywanie z dobrą wydajnością N,N'-dwubenzylpochodnych DKP i udowodnił budowę uzyskanego preparatu reakcjami rozpadu z utworzeniem chlorowodoru N-benzylglicyny, wrażliwością wobec kwasów, a także otrzymaniem N,N'-duarylopchodnych. Opisał również preparatykę N,N'-dwubenzylpochodnych wyższych homologów bezwodnika glicyny — alaniny i leucyny.

Ostatnio A u g u s t i n (24) doniósł o nowych interesujących syntezach pochodnych DKP podstawionych na azocie. Substancją wyjściową do tych syntez była N,N'-dwuchlorometylo-2,5-dwuketopiperazyna, gdyż jak wynikało z prac C h e r b u l i e z i wsp. (37) oba atomy chloru są bardzo aktywne. Podstawienie ich fenolem, *o*-krezolem, *p*-krezolem, α -naftolem w reakcji Friedla-Craftsa dawało z wysoką wydajnością (rzędu 60-95%) całkowicie nierozpuszczalne w wodzie N,N'-dwo(*o*-hydroksyarylometylo)-2,5-dwuketopiperazyny. Przez wprowadzenie grupy sulfonowej do arylowego podstawnika Augustin otrzymał związki łatwo rozpuszczalne. Z prac K a r r e r a i wsp. (58, 59, 60) wynikało, że z soli srebrowej DKP można otrzymać pochodne podstawione zarówno na azocie jak i na tlenie. Takie rezultaty mogą być wynikiem występowania soli srebrowej w dwóch postaciach (VIIa i VIIb).

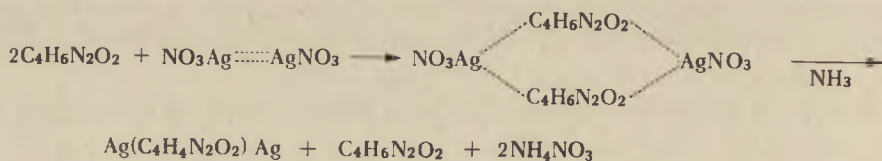
Sprawa soli srebrowych wiąże się z ogólnym problemem tworzenia soli przez DKP. Dokładna struktura tych połączeń nie jest znana, ale prawdopodobnie jest taka sama jak soli amidów. Amidy nie posiadają wyraźnego charakteru kwaśnego ani zasadowego i w odpowiednich warunkach mogą tworzyć sole amidoniowe z kwasami (VIIIa, VIIIb), względnie sole metaliczne (IXa i IXb).

W przypadku mocznika udowodniono (64), że jego kation w solach z silnymi kwasami ma strukturę (X).

W pewnych przypadkach (z niektórymi anionami np. PtCl_6) możliwe jest utworzenie się soli „nienormalnej”, w której kation ma strukturę przedstawioną wzorem XI.



W przypadku DKP łatwiej tworzą się związki addycyjne, niż sole o charakterze jonowym. I tak, jak wykazała *Asahina* (23) przy otrzymywaniu soli srebrowych DKP tworzy się również przejściowy produkt addycyjny, który można wyizolować. Właściwa sól srebrowa, opisana po raz pierwszy przez *Curtiusa* i *Goebbla* (41), byłaby końcowym produktem następującej reakcji.



Schemat 3. Powstawanie soli srebrowych DKP (wg 23)

Solą srebrową DKP zajmował się również *Lenormant* (66, 67) w badaniach nad strukturą amidów i analizą widm w podczerwieni wią-

zania peptydowego. Uważa on, że pochodne srebrowe podobnie jak i rtęciowe (które w przeciwieństwie do innych pochodnych metalicznych są trwałe w wodzie i łatwe do wyizolowania), oprócz możliwości dawania jonów, tworzą również wiązania koordynacyjne. Przyjmuje on istnienie równowagi przedstawionej wzorem XII.

W przypadku przewagi formy jonowej w widmie w podczerwieni występuje pasmo przy 1560 cm^{-1} , a w przypadku przewagi formy kowalენტnej — przy 1667 cm^{-1} . Lenormant donosi również, że DKP tworzy w wodnych alkalicznych roztworach pochodne sodowe, trwałe przy nadmiarze kationu sodowego. W widmie w podczerwieni takiej pochodnej występuje tylko pasmo przy 1560 cm^{-1} . Według Lenormant intensywność pasm przy 1667 i 1560 cm^{-1} zależy również od charakteru podstawników na azocie np. pasmo przy 1560 cm^{-1} występuje przy podstawnikach silnie dodatnich, podczas gdy jest ono nieobecne przy podstawnikach silnie elektroujemnych.

W trakcie własnych badań (25a) określono widmo w podczerwieni adycyjnego połączenia srebrowego oraz właściwej soli srebrowej i pochodnej sodowej DKP.

Pierwsze zawiera pasma charakterystyczne dla AgNO_3 jak i dla DKP. W widmie właściwej soli srebrowej brak pasma przy 1560 cm^{-1} , silnie zaznacza się natomiast pasmo przy 1667 cm^{-1} . Przy przyjęciu wyników uzyskanych przez Lenormant za poprawne wskazywałoby to, że srebro wiąże się z cząsteczką DKP raczej koordynacyjnie.

W przypadku pochodnej sodowej badania elektroforetyczne i spektralne w podczerwieni wykazały, że w warunkach opisanych przez Lenormant „pochodna sodowa DKP”, jak należało oczekiwać (48), jest w rzeczywistości solą sodową glicyloglicyny.

W pracach nad poznaniem chemizmu DKP stosunkowo mało uwagi poświęcono reakcjom redukcji. Abderhalden i wsp. (14, 15) opisali redukcję DKP i niektórych jej pochodnych sodem we wrzącym alkoholu. Otrzymali oni jednak tylko 20% spodziewanej ilości piperazyny, a oprócz tego szereg innych produktów. Przyczyną otrzymania małej ilości piperazyny było prawdopodobnie alkaliczne środowisko powodujące hydrolizę DKP. Większe wydajności otrzymał Gawriłow (50), który zastosował redukcję elektrolityczną. Ostatnio Langebeck i wsp. (65) ponownie podjęli ten temat zachęteni pracami Stolla i wsp. (93), którzy przy pomocy wodorku litowo-glinowego zredukowali bezwodniki L-leucynowo-L-prolinowy, L-fenylalaninowo-D-prolinowy do odpowiednich pochodnych piperazyny. Przy pomocy wodorku litowo-glinowego w czterohydrofuranie Langebeck i wsp. zredukowali DKP, N,N-dwumetylo-, N,N'-dwubenzyl-, 3,6-dwumetylo-, 3,6-dwuetylo-, 3,6-dwuizopropyl- i 3,6-dwuizo(sec)butyl-2,5-dwuketopiperazynę do odpowiednich piperazyn z wydajnością 38-62%, jednak dopiero po 165 godzinach ogrzewania

w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Pochodne aromatyczne (np. bezwodniki histydyny, tyrozyny, fenyloalaniny) nie ulegają w tych warunkach redukcji.

Jak widać z powyżej przedstawionych wyników układ DKP jest stosunkowo odporny na redukcję, a niskie wydajności otrzymywanych pochodnych piperazyiny wskazują na wielokierunkowość przebiegających reakcji.

V. Uwagi końcowe

Dane dotyczące występowania DKP w organizmach żywych są skąpe i pojawiają się raczej sporadycznie. Niektórzy badacze (Vining (100) uważają, że DKP są naturalnymi metabolitami mikroorganizmów, stanowiąc pośrednie ogniwa w biosyntezie metabolitów zawierających pierścień 1,4-pirazyny. Johnson i wsp. (57) donieśli m.in. o izolacji bezwodnika L-leucynowo-prolinowego z bliżej nieokreślonego szczepu *Streptomyces*. Ponieważ bezwodnik ten występuje tylko w prefermentowanym podłożu, autorzy skłonni są uważać to połączenie za naturalny metabolit. Również szczep *Streptomyces noursei* jak wykazali Vondraček i wsp. (101) oraz Brown i wsp. (35) produkuje pochodne DKP. Znalaziono tam: 3-benzylideno-6-izobutylideno-2,5-dwuketopiperazynę, 3,6-dwubenzylideno-2,5-dwuketopiperazynę, 3-benzylideno-6-benzylideno-2,5-dwuketopiperazynę i 3,6-dwubenzylideno-2,5-dwuketopiperazynę. Stoll i wsp. (94) badając alkaloidy sporyszu znaleźli w nich również układ DKP. Kibrick i wsp. (62) donieśli niedawno o znalezieniu w moczu ludzkim DKP-propylohydroksyproliny. Z układem DKP spotykamy się też w wielu innych związkach pochodzenia naturalnego (31, 95).

Obecnie DKP budzi zainteresowanie głównie ze względu na zastosowanie przy otrzymywaniu cyklicznych depsyptydów (22), oraz przy syntezie antybiotyków (56, 99). Można bowiem oczekiwać, że pewne pochodne tego cyklicznego peptydu będą posiadały własności antybakteryjne.

Pomimo prostoty budowy DKP, jej chemizm — jak wynika z powyższego przeglądu — nie jest dokładnie poznany. Wiele pochodnych DKP zdołano otrzymać syntetycznie, niektóre z nich wymagają jednak dalszych badań w celu jednoznacznego ustalenia ich budowy. To samo dotyczy problemu przypuszczalnego występowania DKP w formie enolowej (iminolowej). Wyniki uzyskane przez Abderraldena w tym zakresie są mało przekonujące. Skąpe i niejednoznaczne są też dane dotyczące redukcji układu DKP jak również tworzenia przez DKP soli. Mało poznany jest mechanizm kwasowej hydrolizy DKP.

Mimo, że DKP była szeroko wykorzystywana w badaniach spektroskopowych w podczerwieni jako związek modelowy, znane jest dotychczas widmo tej substancji tylko jako ciała stałego. Bardzo wskazane byłoby

przeprowadzenie podobnych badań tego związku w postaci roztworu w różnych rozpuszczalnikach. Dotychczas brak także dostatecznych danych dotyczących wpływu pH na widmo DKP w UV, a byłoby to pomocą w pracach nad otrzymaniem ewentualnych enoli tego związku.

L I T E R A T U R A

1. Abderhalden E., Komm E. *Z. Physiol. Chem.* **139**, 181 (1924).
2. Abderhalden E., Haas R. *Z. Physiol. Chem.* **153**, 146 (1926).
3. Abderhalden E., Schwab E. *Z. Physiol. Chem.* **149**, 100 (1925).
4. Abderhalden E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **153**, 83 (1926).
5. Abderhalden E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **152**, 88 (1926).
6. Abderhalden E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **149**, 299 (1925).
7. Abderhalden E., Klarmann E., *Z. Physiol. Chem.* **139**, 64 (1924).
8. Abderhalden E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **149**, 299 (1925).
9. Abderhalden E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **157**, 140 (1926).
10. Abderhalden E., Gebelein F., *Z. Physiol. Chem.* **152**, 125 (1926).
11. Abderhalden E., Komm E., *Z. Physiol. Chem.* **139**, 147 (1924).
12. Abderhalden E., Suzuki S., *Z. Physiol. Chem.* **176**, 101 (1928).
13. Abderhalden E., Quast H., *Z. Physiol. Chem.* **151**, 145 (1926).
14. Abderhalden E., Klarmann E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **135**, 180 (1924).
15. Abderhalden E., Schwab E., *Z. Physiol. Chem.* **139**, 68 (1924).
16. Abderhalden E., Haas R., *Z. Physiol. Chem.* **151**, 114 (1926).
17. Abderhalden E., Klarmann E., *Z. Physiol. Chem.* **135**, 199 (1924).
18. Abderhalden E., Haas R., *Z. Physiol. Chem.* **155**, 195 (1926).
19. Abenius P. W., Widman O., *Chem. Ber.* **21**, 1662 (1888).
20. Akimowa L. N., Gawriłow N. I., *Žurn. Obščej Chimii* **21**, 294 (1951).
21. Akimowa L. N., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **112**, 1047 (1957).
22. Antonow W. K., Szczełokow W. U., Szemiakin M. M., *Izwestia Akad. Nauk SSSR, Ser. chim.* **6**, 1145 (1963).
23. Asahina T., *Z. Physiol. Chem.* **179**, 83 (1928).
24. Augustin M., *J. Prakt. Chem.* **24**, 113 (1964).
25. Augustyniak H., Augustyniak J., Praca w druku.
- 25a. Augustyniak H., Doniesienie na Konwersatorium z zakresu spektroskopii cząsteczkowej, Poznań 1965.
26. Albano L., *Chem. Ber.* **34**, 1501 (1901).
27. Albano L., Trasciatti D., *Chem. Ber.* **33**, 2323 (1900).
28. Bates W. W., Hobbs M. E., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2151 (1951).
29. Bellamy L. J., *The Infra Red Spectra of Complex Molecules*, London, New York 1960 str. 203.
30. Bergmann M., du Vigneaud V., Zervas L., *Bhem. Ber.* **62**, 1909 (1929).
31. Birkinshaw J. H., Mohammed Y. S., *Biochem. J.* **85**, 523 (1962).
32. Bopp F., *Ann.*, **69**, 28 (1849).
33. Botwinnik M. M., Gawriłow N. I., *J. Prakt. Chem.* **148**, 170 (1937).
34. Brockmann H., Bohnsack G., Süling C. H., *Angew. Chemie* **68**, 66 (1956).
35. Brown R., Kelley Ch., Wiberley S. E., *J. Org. Chem.* **30**, 277 (1965).
36. Brunner K., Halswanter F., *J. Biol. Chem.* **133**, 48 (1935).

37. Cherbuliez E., Feer E., *Helv. Chim. Acta* 5, 678 (1922).
38. Corey R. B., *Adv. Protein Chem.* 4, 385 (1948).
39. Corey R. B., *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, Springer Verlag, 1951, tom 8 str. 310.
40. Curtius T., *Chem. Ber.* 16, 753 (1883).
41. Curtius T., Goebel F., *J. Prakt. Chem.* 37, 175 (1888).
42. Darmon S. E., Sutherland G. B. B. M., *Nature* 164, 440 (1949).
43. Erlenmeyer E., Lipp A., *Ann.* 219, 179 (1883).
44. Fischer E., *Chem. Ber.* 34, 433 (1901).
45. Fischer E., Forneau E., *Chem. Ber.* 34, 2868 (1901).
46. Fischer E., Leuchs H., *Chem. Ber.* 35, 3787 (1902).
47. Franchimont M. M. A. P. N., Friedmann H., *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 27, 192 (1908).
48. Fruton J. S., *Adv. Protein Chem.* 5, 5 (1949).
49. Fukushima K., Ideguchi Y., Miyazawa T., *Bull. Chem. Soc. Japan* 37, 349 (1964).
50. Gawriłow N. I., Koperina A. W., *Žurn. Obszczey Chimii* 9, 1394 (1939).
51. Gawriłow N. I., Pietrowa R. G., Poddubnaja N. A., *Žurn. Obszczey Chimii* 21, 284 (1951).
52. Gránacher Ch., Wolf G., Weidinger A., *Helv. Chim. Acta* 11, 1228 (1928).
53. Guadiano G., Ricca A., *Gazz. Chim. Ital.* 87, 789 (1957).
54. Ham J. S., Platt J. R., *J. Chem. Phys.* 20, 335 (1952).
55. Hesse O., Limpricht H. *Ann.* 116, 201 (1860).
56. Izumiya N., Kato T., Fujita Y., Ohno M., Kondo M., *Bull. Chem. Soc. Japan* 37, 1809 (1964).
57. Johnson J. L., Jackson W. G., Eble Th. E., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 2947 (1951).
58. Karrer P., Gránacher C., Schlosser A., *Helv. Chim. Acta* 5, 139 (1922).
59. Karrer P., Gránacher Ch., Schlosser A., *Helv. Chim. Acta* 6, 1108 (1923).
60. Karrer P., Gránacher Ch., *Helv. Chim. Acta* 7, 763 (1924).
61. Kellner L., *Nature* 140, 193 (1937).
62. Kibrick A. C., Milhorat A. T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 118, 62 (1965).
63. Kohler H., *Ann.* 134, 369 (1865).
64. Kutzelnigg W., Mecke R., *Chem. Ber.* 94, 1706 (1961).
65. Langebeck V., Augustin M., Möhm R., Hoffmann S., *J. Prakt. Chem.* 25, 301 (1964).
66. Lenormant H., *Bull. Soc. Chim. France* 7, 33 (1948).
67. Lenormant H., *Ann. Chim. (Paris)* 5, 459 (1950).
68. Lin W. C., Mc Dowel C. A., *Canad. J. Chem.* 41, 9 (1963).
69. Mason A. T., Winder G. R., *J. Chem. Soc.* 65, 190 (1894).
70. Miyazawa T., *J. Mol. Spectr.* 4, 155 (1960).
71. Miyazawa T., Shimanouchi T., Mizushima S., *J. Chem. Phys.* 24, 408 (1955).
72. Mizushima S., Shimanouchi T., Tsuboi M., *Nature* 166, 406 (1950).
74. Obata Y., Mizutani J., *J. Jap. Biochem. Soc.* 29, 929 (1958) cyt. za C 1959 str 1211.
73. Mylius F., *Chem. Ber.* 17, 286 (1884).
75. Pietrowa R. G., Akimowa L. N., Gawriłow N. I., *Žurn. Obszczey Chimii* 24, 2230 (1954).

76. Poddubnaja N. A., Lawrenowa G. J., *Wiestnik Mosk. Uniwer. ser. mat.* **13**, 165 (1958).
77. Poroschin K. T., Kosarenko T. D., Churgin J. I., *Izwiestia Akad. Nauk SSSR ser. chim.* **7**, 773 (1955).
78. Pr u J., *Ann.* **134**, 372 (1865).
79. Rosenmund K. W., *Chem. Ber.* **42**, 4470 (1909).
80. Rydon H. N., Smith P. W. G., *Nature* **169**, 922 (1952).
81. Rydon H. N., Smith P. W. G., *J. Chem. Soc.*, 3642 (1956).
82. Saidel L., *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 45 (1955).
83. Saidel L., Lieberman H., *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 401 (1958).
84. Sanger F., Thompson E. O. P., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 225 (1952).
85. Sannie C., *Bull. Soc. Chim. France* **9**, 487 (1942).
86. Sasaki T., *Chem. Ber.* **54 B** 163 (1921).
87. Sasaki T., *Biochem. Z.* **114**, 63 (1921).
88. Segal J., Dronberger-Schiff K., Kalaidjew A., *Globular Protein Molecules*, Berlin 1960.
89. Senti F., Harker D., *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 2008 (1940).
90. Shibata Y., Asahina T. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1**, 71 (1926). cyt. za C 1926 II str. 219.
91. Shimanouchi T., Harada J., *J. Chem. Phys.* **41**, 2651 (1964).
92. Smith E. L., Bergmann M., *J. Biol. Chem.* **153**, 627 (1944).
93. Stoll A., Hoffmann A., Petrzilka Th., *Helv. Chim. Acta* **34**, 1544 (1951).
94. Stoll A., Petrzilka Th., Becker B., *Helv. Chim. Acta* **33**, 57, (1950).
95. Szemiakin M. M., Owczinnikow Ju. A., Antonow W. K., Kiriuszkin A. A., Iwanow W. T., Szczełkow W. I., Szkrob I. M., *Izwiestia Akad. Nauk SSSR, ser. chim.* **12**, 2233 (1963).
96. Tamura S., Suzuki A., Aoki Y., Otaka N., *Agr. Biol. Chem.* **28**, 650 (1924) cyt. za Chem. Abstr. **62** 5471 (1965).
97. Weygand F., Swodenk W., *Chem. Ber.* **93**, 1693 (1960).
98. Wiewiórowski M., Augustyniakowa H., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 399 (1962).
99. Winitz M., Szumiya N., *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 292 (1964).
100. Vining L. C., *Canad. J. Chem.* **41**, 2903 (1963).
101. Vondráček M., Vanek Z. *Chem. Ind.* str. 1686 (1964).

III Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych Warszawa, 4—7 kwietnia 1966 roku

Na Zebraniu Rady Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (Federation of European Biochemical Societies) w Wiedniu, w kwietniu 1965 roku zapadła uchwała o powierzeniu Polskiemu Towarzystwu Biochemicznemu organizacji III Zjazdu Federacji. Zgodnie ze statutem Federacji Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — prof. Kazimierz Zakrzewski został Przewodniczącym Federacji. Jej Sekretarzem jest Prof. W. J. Whelan (Londyn).

Poprzednie Zjazdy Federacji odbyły się w Londynie (marzec 1964) i Wiedniu (kwiecień 1965). Federacja zrzesza około dziesięciu tysięcy biochemików należących do 21 towarzystw członków Federacji w Austrii, Belgii, Bułgarii, Czechosłowacji, Danii, Finlandii, Francji, Hiszpanii, Holandii, Izraelu, Jugosławii, Niemczech, Norwegii, Polsce, Portugalii, Szwajcarii, Szwecji, na Węgrzech, Wielkiej Brytanii i we Włoszech.

Program III Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych przewiduje Sympozjum Struktura i Funkcja Elementów Genetycznych, organizowane przez Prof. Dawida Shugara (Warszawa), Kollokwium Biochemia Mitochondriów, organizowane przez Prof. E. C. Slatera (Amsterdam) wraz z Doc. Zbigniewem Kaniugą oraz Doc. Lechem Wojtczakiem (Warszawa), Kollokwium Biochemia Płytek Krwi, organizowane przez Prof. Edwarda Kowalskiego (Warszawa) i Doc. Stefana Niewiarowskiego (Białystok), a ponadto sekcje komunikatów różnych. Miejscem obrad będzie Sala Kongresowa i inne sale Pałacu Kultury i Nauki. W czasie trwania Zjazdu odbędą się dwa wieczorne przyjęcia dla uczestników.

Do chwili obecnej nadesłano około 500 komunikatów z zagranicy i ponad 100 z Polski. Swoje uczestnictwo zgłosiło ponad 2000 biochemików z zagranicy i około 500 z kraju. Wiele firm zgłosiło swój udział w wystawie aparatury i sprzętu laboratoryjnego, która będzie miała miejsce w Pałacu Kultury i Nauki w czasie trwania Zjazdu. Są to m.in. MSE, LKB, Beckman, Whatman, Eureka, Unipan, Reanal.

Prace przygotowawcze prowadzą następujące agendy: Komitet Naukowy (Przewodniczący — Prof. Józef Heller, Sekretarz — Dr Zofia Lassota), Komitet Organizacyjny (Przewodniczący — Prof. Kazimierz Zakrzewski, Sekretarz — Dr T. Kłopotowski), Komitet Redakcyjny (Przewodniczący — Dr Krzysztof Murawski), Biuro Zjazdu (Kierownik — Dr Stanisław Lewak). Adresem dla korespondencji Zjazdu jest w zasadzie adres Sekretariatu III Zjazdu FEBS, Warszawa 40, ul. Freta 16.

Sekretariat apeluje do wszystkich członków Towarzystwa, szczególnie tych, którzy władają biegle obcymi językami o zgłaszanie się do pracy w organizacji Zjazdu.

MARIA M. JEŻEWSKA*, T. SAWICKA**

Wolne nukleotydy u zwierząt

Free Nucleotides of Some Animals

The occurrence of free nucleotides in some vertebrates and invertebrates is reviewed.

Nukleotydy występujące w stanie wolnym w komórce pełnią szereg funkcji jako związki wysokoenergetyczne, prekursorzy kwasów nukleinowych i koenzymy w wielu procesach syntezy i z tego względu budzą coraz większe zainteresowanie. W biochemii porównawczej badania frakcji wolnych nukleotydów mają na celu przede wszystkim ustalenie i porównanie jej składu ilościowego i jakościowego w różnych tkankach zwierzęcia. Pozwala to wnioskować o rodzaju zachodzących w nich procesów, przewadze jednych procesów nad innymi, a zatem pośrednio, o roli metabolicznej danej tkanki. Drugi kierunek badań poszukuje odpowiedzi, czy skład nukleotydowy określonego organu czy też płynu fizjologicznego jest właściwy tylko dla danego gatunku zwierząt, czy też jest jednakowy dla większej grupy systematycznej np. przeżuwaczy czy gryzoni bądź dla wszystkich zwierząt. Trzeci kierunek badań zajmuje się zagadnieniem zmian składu nukleotydowego tkanki w zależności od jej stanu fizjologicznego i patologicznego.

Dokładniejsze badania frakcji wolnych nukleotydów prowadzone są dopiero od piętnastu lat. Początkowo dotyczyły one roli nukleotydów jako prekursorów kwasów nukleinowych, później ich roli jako koenzymów. Na rozwój badań wolnych nukleotydów wpłynęło zastosowanie chromatografii kolumnowej. Stosowanie tej metody pozwala na rozdzielenie i identyfikację znacznie większych ilości materiału niż chromatografia bibułowa i elektroforeza. Używając kolumn o dużych rozmiarach można rozdzielać ekstrakty otrzymane nawet z kilkudziesięciu gramów świeżej tkanki. Użycie tej metody doprowadziło do wykrycia i zidentyfikowania szeregu nowych związków nukleotydowych, których lista stale się zwiększa.

* dr, adiunkt Zakładu Biochemii Ewolucyjnej IBB

** mgr, str. asystent Zakładu Biochemii Ewolucyjnej IBB

Spis używanych skrótów: A—adenina, G—guanina, C—cytozyna, U—uracyl, FA—kwas mrówkowy, AmF—mrówczan amonu

Kolumnę z anionitem *Dowex-1* w celu rozdzielenia produktów hydrolyzy kwasów nukleinowych po raz pierwszy zastosował *Cohn* (9) w 1950 r. W kilka lat później *Hurlbert* i wsp. (14) zmodyfikowali tę metodę. Stosowali oni dwa układy płynów wymywających z wzrastającym gradientem stężeń:

- układ kwasu mrówkowego (H_2O) \rightarrow (4M FA) \rightarrow (4M FA; 0,2M, AmF) \rightarrow \rightarrow (4M FA; 0, 4M AmF) \rightarrow (4M FA; 0,8 M AmF)
- układ mrówczanu amonu (H_2O) \rightarrow (1M AmF) \rightarrow (2M AmF) \rightarrow (2M AmF) \rightarrow \rightarrow (2M AmF; 0,75 FA)

Przy pH 7-8, jakie stosuje się zwykle w ekstraktach nakładanych na kolumnę, nukleotydy mają ładunek ujemny. W miarę obniżania pH, ładunek ten zmniejsza się i wiązanie nukleotydów przez kolumnę ulega osłabieniu. Przy przepuszczaniu przez kolumnę roztworu kwasu o wzrastającym stężeniu początkowo eluują się nukleotydy słabiej zaadsorbowane, te zaś które silniej zaadsorbowały się, są eluowane dopiero w obecności soli o wzrastającym stężeniu. W pierwszych próbkach eluatu wodnego opuszczają kolumnę wolne zasady purynowe i pirymidynowe oraz ich nukleozydy, a przy gradiencie mrówczanowym — nukleotydy. Wyjątek stanowi tu kwas moczowy, który eluuje się wraz z nukleotydami. Kolejność wymywania się z kolumny nukleotydów mono-, dwu- i trójfosforanowych cytozyny, uracylu, adeniny i guaniny w układach kwasu mrówkowego i mrówczanu przedstawia schemat 1.

		Układ I			
Stężenie FA	0	\rightarrow 4MFA	\rightarrow 4MFA	\rightarrow 4MFA	\rightarrow 4MFA
Stężenie AmF		0	\rightarrow 0,2M AmF	\rightarrow 0,4M AmF	\rightarrow 0,8M AmF
1 (P)	C A G U				
2 (P)	C A G U				
3 (P)	C A G U				
		Układ II			
Stężenie AmF	0	\rightarrow 1M AmF	\rightarrow 2M AmF	\rightarrow 2M AmF	
Stężenie FA				0	\rightarrow 0,75 MFA
1 (P)	C U A G				
2 (P)	C U A G				
3 (P)	C U A G				
Nr Nr frakcji	50	100	150	200	250

Schemat 1. Kolejność elucji nukleotydów z kolumny *Dowex-I* (wg 14)

Układ I: kolumna 12 \times 1 cm, kolba mieszadło 250 ml, frakcje około 5 ml

Układ II: Kolumna 20 \times 1 cm, kolba mieszadło 500 ml, frakcje 5 ml

Nukleotydy: 1 P mono-

2 P dwu- fosforanowe

3 P trój-

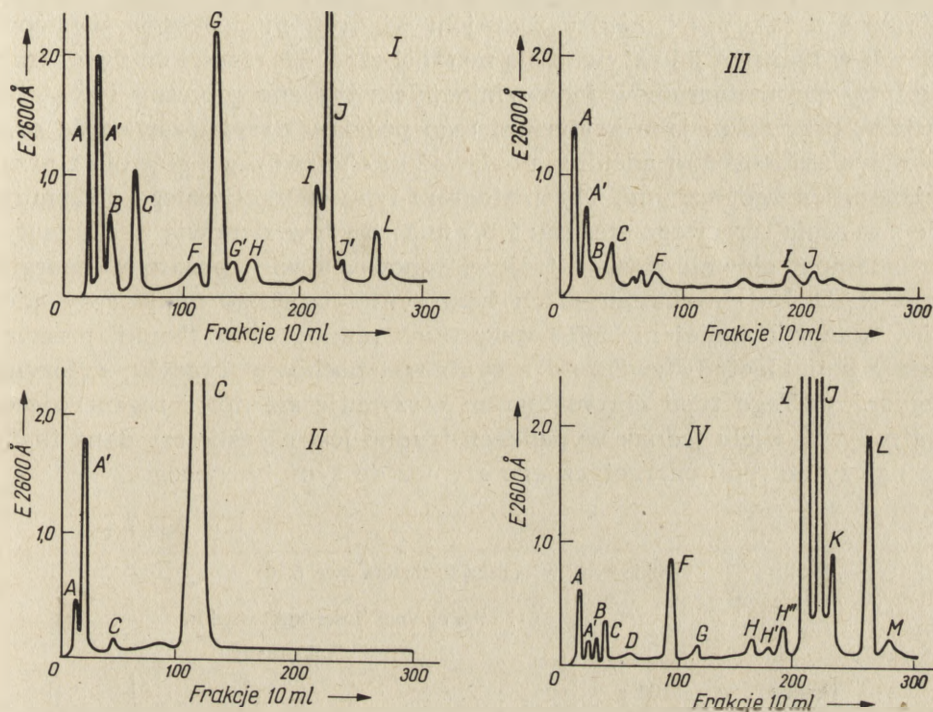
C cytydylowe

A adenylowe

G guanylowe

U urydynowe

Za pomocą tej metody rozdziela się także koenzymy urydynowe, NAD i NADP, IMP, GDP-mannozę, ADP-rybozę i inne, jak to widać na chromatogramach otrzymanych z ekstraktów mleka (rysunek 1). Poszczególne szczyty otrzymywane podczas chromatografii kolumnowej są często jeszcze mieszaninami związków. W celu ich identyfikacji stosuje się rechromatografię w innym układzie, chromatografię bibułową, elektroforezę, analizę spektralną, oznaczenie stosunku zasad do pentoz i fosforanu, reakcje enzymatyczne i inne. Przy porównywaniu ilościowych danych



Rys. 1. Chromatogramy frakcji wolnych nukleotydów mleka w układzie kwasu mrówkowego

I — ze 100 ml krowiego mleka w 8 dniu laktacji, II — ze 100 ml krowiego mleka w 121 dniu laktacji, III — ze 100 ml kobiecego mleka w 9 dniu laktacji, IV — z 60 ml kobylego mleka w 11 dniu laktacji

Fracja A zawiera CMP-5'; A' — kwas moczowy; B — AMP-5'; C — cykliczny AMP i niezidentyfikowany związek; D — GMP-5' i NADP; F — UMP-5'; G — kwas orotowy; G' — ADP-5'; H — GDPM; H' — niezidentyfikowane związki; I — UDP-acetyloglukozoaminę i UDP-acetylogalaktozoaminę; J — UDP-glukozaaminę i UDP-galaktozoaminę; K — GDP; L — UDP i UDP-kwas uronowy; M — niezidentyfikowane związki (wg 16)

z chromatografii kolumnowej należy brać pod uwagę sposób preparatyki badanego materiału. W zależności bowiem od warunków ekstrakcji związków nukleotydowych udział procentowy mono-, dwu- i trój-fosforanowych nukleotydów jest różny (12, 17) a szereg związków nukleotydowych jak np. koenzymy urydynowe może ulegać rozpadowi. Najprościej jest porównywać udział procentowy poszczególnych puryn i pirymidyn przy-

mując sumę wszystkich ich pochodnych za 100%. W ten właśnie sposób przeprowadzono poniżej fragmentaryczne porównania składu nukleotydowego tkanek różnych zwierząt.

Wolne nukleotydy u ssaków

Wolne nukleotydy w różnych tkankach ssaka. Spośród kręgowców najlepiej stosunkowo zbadano frakcję wolnych nukleotydów w tkankach i płynach fizjologicznych ssaków. W 1961 r. Schmitz (24) wysunął hipotezę o zależności między rodzajem wolnych nukleotydów występujących w tkance a jej aktywnością metaboliczną. Wyróżniał on dwa skrajne typy chromatogramów jonowymiennych: typ energetyczny i syntetyzujący, przy czym jako kryterium tego podziału przyjął zawartość procentową nukleotydów adeniny, ponieważ są one związane głównie z przemianami energetycznymi. Chromatogram typu energetycznego otrzymuje się z mięśnia sercowego szczura: 90% nukleotydów stanowią tu nukleotydy adeniny, głównie dwu- i trójfosforanowe, a więc bogate w energię, oraz NAD. Na chromatogramach typu syntetyzującego nukleotydy adeniny stanowią mniej niż 50% wszystkich nukleotydów tkanki, przeważają zaś nukleotydy związane z syntezą — pochodne uracylu, cytozyny i guaniny. Tego typu chromatogram otrzymuje się np. z regenerującej wątroby. W wielu jednak wypadkach trudno jest określić czy dana tkanka należy do typu energetycznego czy też do syntetyzującego.

Tablica 1

Nukleotydy w tkankach szczura (wg 6,10)

Tkanka	μmole na 100 g świeżej tkanki	% ogólnej ilości nukleotydów					
		Nukleotydy					IMP
		A	G	C	U		
Całkowite	Koenzy- urydyno- we						
Śledziona	556	57	13	7	22	11	1
Mózg	300	55	16	4	12	6	13
Wątroba	433	40	13	+	35	21	13
Krew	55	76	14	—	5	5	5
Gruczoł mleczny	50	68	+	+	20	+	—

Najlepiej zbadany jest skład nukleotydowy poszczególnych tkanek u szczura (tablica 1). Poziom nukleotydów w śledzionie, mózgu i wątrobie szczura wynosi kilkaset μmoli na 100g tkanki (5), w mięśniach znaleziono 300-400 μmoli ATP na 100g (1). Udział procentowy związków adeniny w wolnych nukleotydach śledziony i mózgu jest podobny i wynosi powy-

żej 50%. W wątrobie związki adeniny stanowią tylko 40%. Udział procentowy związków guaniny jest w przybliżeniu jednakowy we wszystkich trzech tkankach, a także we krwi i gruczole mlecznym. Natomiast udział związków urydynowych różni się znacznie: w mózgu znajduje się ich trzykrotnie mniej niż w wątrobie, a dwukrotnie mniej niż w śledzionie. Za te różnice odpowiedzialne są głównie koenzymy urydynowe, co wskazuje na szczególnie żywe procesy syntezy cukrowców w wątrobie. Związki cytozyny, biorące udział w przemianach tłuszczowych w największej ilości występują w śledzionie i mózgu. W śledzionie obok rybonukleotydów cytozyny znaleziono także dezoksyrybonukleotydy, między innymi dezoksy-CDP-cholinę i dezoksy-CDP-etanolaminę (5).

Znacznie mniej nukleotydów zawierają: krew (6) oraz gruczoł mlekowy szczura (27) (tablica 1). Ilość nukleotydów jest prawie jednakowa w obu tych tkankach, lecz udział procentowy poszczególnych nukleotydów różni się znacznie. W gruczole mlecznym uderza szczególnie duża zawartość adeniny i związków urydynowych, przy czym nie są to koenzymy urydynowe, które w spoczywającym gruczole znajdują się jedynie w ilościach śladowych, a ilość ich zwiększa się dopiero w okresie laktacji, a więc syntezy laktozy. We krwi znajduje się najwięcej związków adeninowych, z czego dużą ilość stanowią nukleotydy pirydynowe: NAD i NADP (około 9%). Procentowa zawartość NADP jest we krwi największa spośród wszystkich omawianych tkanek. Z powyższego przeglądu można wyciągnąć wniosek, że poszczególne tkanki danego gatunku zwierzęcia mają odrębny skład nukleotydowy, zapewne w zależności od procesów, które w nich przeważają.

Wolne nukleotydy w analogicznych organach różnych ssaków. Porównawcze badania wolnych nukleotydów przeprowadzono we krwi, mózgu i gruczole tarczycowym. Uderzający jest fakt, że niezależnie od gatunku zwierzęcia, dana tkanka zawiera tę samą w przybliżeniu ilość ogólną (lub sumaryczną) wolnych nukleotydów. We krwi ludzkiej i szczurzej znaleziono około 55 μ moli na 100ml krwi (6). W mózgu szczura, myszy, świnki morskiej i królika w 100g świeżej tkanki znajduje się 270-300 μ moli wolnych nukleotydów (12), a w gruczole tarczycowym wołu, barana oraz człowieka około 125 μ moli (11).

Przy tej samej jednak ogólnej ilości nukleotydów w danej tkance, mogą występować zależnie od gatunku zwierzęcia różnice w składzie ilościowym i jakościowym nukleotydów poszczególnych zasad purynowych i pirymidynowych. We krwi ludzkiej 95% ogólnej ilości nukleotydów znajduje się w czerwonych ciałkach krwi. Nukleotydy adeniny stanowią aż 87% wszystkich nukleotydów krwinek, dlatego też przed zastosowaniem metody rozdziału na kolumnie sądzono, że w erytrocytach występują wyłącznie nukleotydy adeniny. We krwi szczura związki adeniny stanowią tylko 67% ogólnej ilości nukleotydów. Różnica w zawartości

ATP jest jeszcze większa: we krwi ludzkiej ATP stanowi 73%, a w szczurzej tylko 37%. Przy pomocy chromatografii kolumnowej stwierdzono, że we krwi szczurzej i ludzkiej oprócz mono-, dwu- i trójfosforanów adenozyne występują także NAD i NADP, nukleotydy guaniny, uracylu i cytozyny w różnym stopniu ufosforylowania, IMP i urydynowe koenzymy. We krwi ludzkiej ilość nukleotydów nieadenylowych jest prawie dwukrotnie mniejsza niż we krwi szczura (6).

Wolne nukleotydy w tkance mózgowej porównywano u szczura, myszy, świnki morskiej i królika (12). U wszystkich tych zwierząt nukleotydy adeniny stanowią 57-65%, guaniny 10-13%, a uracylu 12-15% ogólnej ilości nukleotydów. Związki cytozyny i IMP występują w ilościach nieznacznych. W mózgu nukleotydy adeniny i guaniny występują głównie jako trójfosforany: np. u myszy ATP stanowi 95% wszystkich związków adeniny, a GTP 91% związków guaninowych. Ze związków uracylu więcej niż połowa przypada na koenzymy urydynowe, zaś 1/3 stanowi UTP. Tkanka mózgowa badanych zwierząt ma identyczny skład jakościowy frakcji wolnych nukleotydów i zbliżony udział procentowy pochodnych poszczególnych zasad, być może dlatego, że wszystkie te zwierzęta należą do jednej grupy systematycznej — rzędu gryzoni.

W gruczole tarczycowym wołu, barana i człowieka (11) udział procentowy nukleotydów poszczególnych zasad jest podobny i wynosi dla nukleotydów adeniny 45-55%, guaniny 10-12%, a uracylu 20-25%. Pomimo tego stałego udziału procentowego związków poszczególnych puryn i pirymidyn w badanych tarczycach występują pewne odrębności gatunkowe. W tarczycy ludzkiej znaleziono CDP-cholinę, która nie występuje w tarczycach zwierzęcych. W tarczycy ludzkiej występuje tylko kwas moczowy, natomiast u wołu i barana znaleziono obok tego związku również ksantynę. Ilość ATP i GTP w stosunku do mono- i dwufosforanów adenozyne i guanozyne jest znacznie wyższa w tarczycy ludzkiej niż w tarczycach zwierzęcych. We wszystkich badanych tarczycach występuje kwas adenylobursztynowy. W przypadku ludzkich tarczyc patologicznych udział procentowy nukleotydów nie zmienia się, a jedynie ich ogólna ilość waha się w szerokich granicach od 80-320 μ moli na 100g świeżej tkanki.

Największe różnice stwierdzono dotychczas w składzie frakcji nukleotydowej mleka różnych ssaków (10, 16). W mleku występują bardzo rozmaite ilości nukleotydów od kilkunastu do kilkuset μ moli na 100ml (tablica 2). Najmniej nukleotydów znajduje się w mleku ludzkim, najwięcej w sianie owcy (około 30 razy więcej niż w sianie ludzkiej); nawet u zwierząt należących do jednego rzędu systematycznego przeżuwaczy jak krowa, koza i owca, ilość nukleotydów w mleku jest bardzo różna. Zmienia się ona także u jednego i tego samego zwierzęcia w zależności od okresu laktacji; na ogół siara i mleko pierwszych dni laktacji są znacz-

nie bogatsze w nukleotydy niż mleko późniejszego okresu. Także i skład nukleotydowy mleka jest bardziej różnorodny we wczesnym okresie laktacji w porównaniu z późniejszym okresem, w którym niektóre nukleotydy w ogóle zanikają (rysunek 1).

Wspólną cechą mleka wszystkich omawianych ssaków jest przewaga nukleotydów uracylu (48-93%), przy czym są to głównie koenzymy urydylowe. Wyjątkową pozycję zajmuje mleko ludzkie, w którym największą część puli nukleotydowej stanowią związki cytydynowe. Ludzkie mleko

Tablica 2

Nukleotydy i kwas moczowy w mleku (wg 10,16)

	Okres laktacji	μmole na 100 ml świeżego mleka	% ogólnej ilości związków purynowych i pirymidynowych					
			Nukleotydy					Kwas moczowy
			A	G	C	U	Kwas orotowy	
Klacz	Siara	238	1	5	+	90	—	4
	132 dzień	44	+	5	+	93	—	2
Krowa	Siara	58	4	2	4	48	15	26
	105 dzień	80	+	—	3	—	92	6
Koza	Siara	271	7	4	+	89	+	1
	172 dzień	139	15	15	+	57	12	1
Owca	Siara	500				75		
	Mleko	100				65	10	
Człowiek	Siara	17	13	13	21	17	—	36
	Mleko	14	7	9	32	22	—	30

zawiera także większy procent związków adeniny i guaniny i szczególnie dużo kwasu moczowego w porównaniu do innych ssaków.

W składzie nukleotydowym mleka przeżuwaczy: kozy i krowy znaleziono szereg różnic; w mleku kozim znajduje się znacznie większa procentowo ilość związków adeniny, guaniny i uracylu, zaś w mleku krowim większy jest udział procentowy kwasu orotowego, moczowego i związków cytozyny. Znaczenie tych różnic nie jest jasne ze względu na podobną zawartość laktozy, kazeiny i tłuszczu w mleku obu tych przeżuwaczy. Wydaje się natomiast, że cechą wspólną mleka przeżuwaczy jest obecność kwasu orotowego, którego ilość wzrasta w późniejszym okresie laktacji, stanowiąc u krowy nawet 92% wszystkich związków purynowych i pirymidynowych mleka. Jak można wnioskować z badań porównawczych nad składem nukleotydowym gruczołu mlecznego i krwi, w których nie znaleziono kwasu orotowego, związek ten powstaje w gruczole i szybko przechodzi do mleka. W kozim gruczole mlekowym nie znaleziono także cyklicznego AMP występującego w mleku, a poziom szeregu związków jest w nim znacznie niższy niż w mleku. Ogólnie nie stwierdzono równo-

ległości między składem i poziomem nukleotydów w mleku i gruczole mlecznym.

Wpływ stanów fizjologicznych na skład nukleotydowy tkanki. Skład frakcji wolnych nukleotydów zmienia się nie tylko w zależności od rodzaju tkanki, lecz może być różny dla jednej i tej samej tkanki w zależności od jej stanu fizjologicznego. Czynniki wpływającymi na poziom wolnych nukleotydów jest ciąża i laktacja, głodowanie, wiek itp.

Frakcję wolnych nukleotydów w okresie ciąży i laktacji badano w gruczole mlecznym szczura (27). Ogólna ilość nukleotydów wzrasta w okresie ciąży i do 8 dnia laktacji (tablica 3), pozostając następnie na stałym

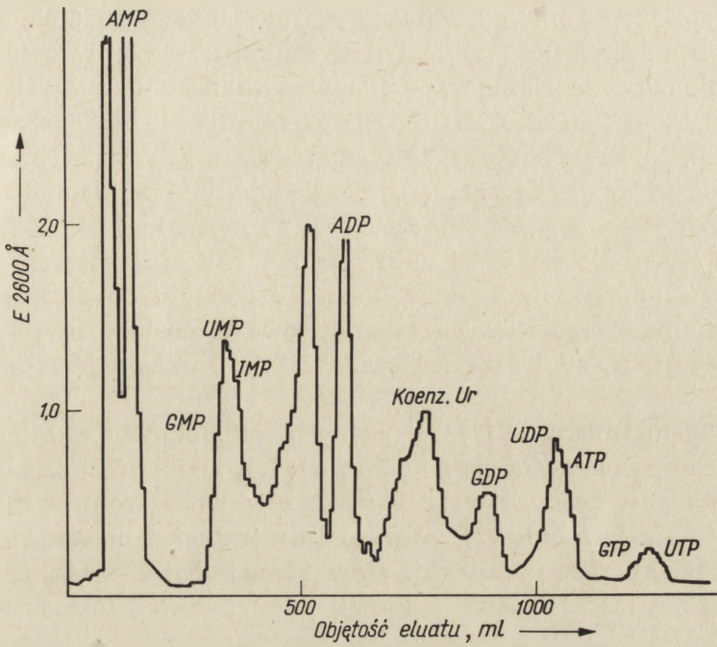
Tablica 3

Nukleotydy w gruczole mlecznym (wg 16, 27)

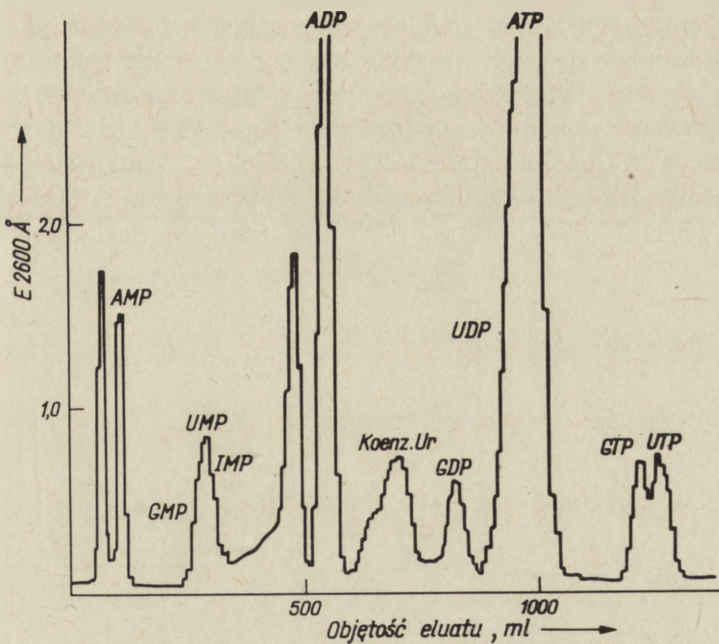
	Okres	μmole na 100g świeżej tkanki	% ogólnej ilości nukleotydów					
			Nukleotydy					
			A Całko- wite	ATP	G	C	U Całkowite	Koenzymy urydynowe
Koza	Sztucznie wywołana laktacja	181	45		14	+	38	17
Szczur	Ciąża, 17 dzień Laktacja	50	68	20	+	+	20	+
	1 dzień	183	50	15	9		33	14
	8 dzień	278	48	10	8		37	17
	20 dzień	272	48	15	11		37	23

poziomie. W tkance gruczołu mlecznego przeważają w czasie ciąży nukleotydy adeniny, a w okresie laktacji nukleotydy nieadenylowe, przy czym wzrasta szczególnie ilość związków uracylu, głównie koenzymów urydynowych, a także guaniny. Według kryterium Schmitza (24) w gruczole mlecznym tkanka typu energetycznego w miarę postępującej ciąży zmienia się w tkankę typu syntetyzującego.

Wpływ hormonów na poziom niektórych nukleotydów obserwowano na mięśniu macicy szczura. Adrenalina powoduje spadek ilości ATP i ADP, przy czym ilość AMP pozostaje ta sama. Można zatem przypuszczać, że następuje dezaminacja związków adeniny do IMP i inozyny, bądź też utworzenie cyklicznego 3',5'-fosforanu adenozyiny (8); związek taki powstaje z ATP w wielu tkankach (24). Pod wpływem estradiolu w mięśniu macicy następuje wzrost ilości ATP o około 100%, a fosforanów urydyny i guanozyny łącznie o 250%. Progesteron natomiast, nie wpływając na poziom nukleotydów adeniny, powoduje wzrost ilości urydynodwufosfo-N-acetyloglukozoaminy i fosforanów guanozyny (26).



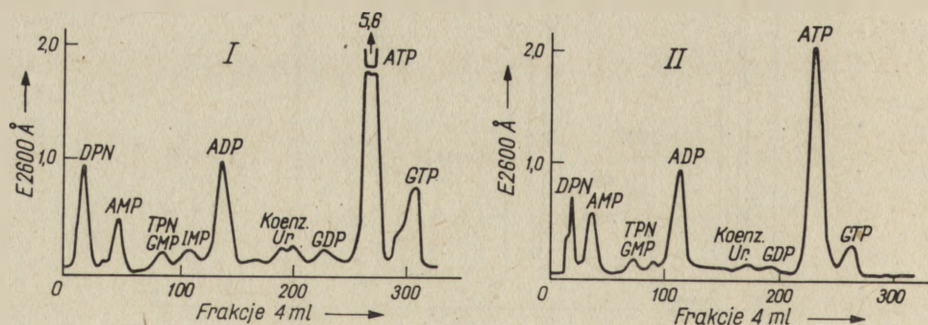
Rys. 2. Chromatogram frakcji wolnych nukleotydów wątroby szczura; w układzie kwasu mrówkowego (wg 2)



Rys. 3. Chromatogram frakcji wolnych nukleotydów wątroby szczura w stanie głodu białkowego; w układzie kwasu mrówkowego (wg 2)

W cytoplazmie komórek wątroby szczura poddanego 6-ciu tygodniowej głodowce ogólna ilość nukleotydów zmniejsza się o około 40% (2). Za to obniżenie odpowiedzialne są przede wszystkim nukleotydy UMP, UDP, GMP i GDP; natomiast AMP i ADP utrzymują się ilościowo w granicach normy, co wskazywałoby, że system enzymatyczny potrzebny do ich syntezy nie ulega uszkodzeniu. Bezwzględna ilość nukleotydów trójfosforanowych jest większa niż u szczurów na normalnej diecie (rysunki 2 i 3). To zwiększenie się ilości nukleotydów trójfosforanowych jest równoległe do zahamowania syntezy RNA. Po dodaniu do diety glikokolu, kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego, co umożliwiła wznowienie syntezy RNA, stwierdza się spadek ilości nukleotydów polifosforanowych.

Przykładem zmian we frakcji wolnych nukleotydów w zależności od wieku może być soczewka oka. Mandel i Klethi (22) oznaczali wolne nukleotydy w różnych warstwach soczewki oka wołu, a mianowicie w warstwie powierzchniowej, korowej i centralnej. Komórki powierzchniowe z biegiem czasu przesuwają się w stronę centrum, tak, że komórki centrum są najstarsze spośród komórek całej soczewki. Poziom nukleotydów AMP, UMP i IMP oraz ADP jest znacznie wyższy w warstwie centralnej niż w korze i części powierzchniowej. Ilość innych nukleotydów dwufosforanowych i wszystkich nukleotydów trójfosforanowych jest większa w warstwie powierzchniowej i korowej. Komórki młode zawierają zatem znacznie więcej nukleotydów polifosforanowych niż stare. Podobnie w komórkach tkanek gwałtownie rosnących przeważają nukleotydy polifosforanowe jak np. w raku szczurzym Flexner-Joblinga, gdzie występują prawie wyłącznie nukleotydy trójfosforanowe (20). Ciekawe jest występowanie w komórkach tego raka obok ATP także dezoksy-ATP w ilości około 1% ogólnej ilości ATP. W młodych komórkach nie tylko ilość nukleotydów polifosforanowych lecz także ogólna ilość nukleotydów jest większa niż w starych. W niedojrzałych postaciach krwinek



Rys. 4. Chromatogramy frakcji wolnych nukleotydów krwinek czerwonych szczurów: I — w 21 dni po naświetleniu *in vivo* dawką 700 r; II — nienaświetlonych; w układzie kwasu mrowkowego (wg 7)

czerwonych — retikulocytach, nukleotydy, znajdują się w większych ilościach niż w erytrocytach (7). Po naświetleniu szczura dawką subletalną promieni X (700 r) początkowo następuje zablokowanie przenikania erytrocytów ze szpiku do krwi, a następnie pojawienie się we krwi retikulocytów. Podczas pierwszego z tych okresów (około 7 dni po naświetleniu) we krwi szczura następował nieznaczny spadek ilości ATP oraz duże zmniejszenie się ilości GDP, GTP i koenzymów urydynowych. W drugim okresie (21 dni po naświetleniu) wraz z pojawieniem się retikulocytów we krwi, ilość nukleotydów znacznie wzrastała: ATP, GDP i koenzymów urydynowych około dwóch razy, a GMP i GTP prawie trzykrotnie (rysunek 4). Podobne zwiększenie się ilości nukleotydów polifosforanowych we krwi, związane z retikulocytozą obserwuje się po wstrzyknięciu fenylhydrazyny (7).

Próba podsumowania omówionych prac byłyby następujące wnioski: 1) w większości tkanek badanych ssaków wolne nukleotydy adeniny występują w znacznie większych ilościach niż wolne nukleotydy innych zasad purynowych i pirymidynowych; 2) skład nukleotydowy różnych tkanek danego gatunku zwierzęcia różni się zarówno pod względem ogólnej ilości wolnych nukleotydów jak również udziałem procentowym nukleotydów pochodnych poszczególnych zasad; zawartość nukleotydów zależy także od stanu fizjologicznego tkanki; 3) w analogicznych tkankach różnych ssaków ogólna ilość wolnych nukleotydów jest zbliżona, lecz występują różnice w składzie jakościowym frakcji nukleotydowej.

Wolne nukleotydy u bezkręgowców

Wolne nukleotydy w świecie zwierząt bezkręgowych są znacznie mniej zbadane niż u kręgowców. Badanie puli wolnych nukleotydów u tych zwierząt jest interesujące ze względu na biochemiczne odrębności jakie mogły wytworzyć się w toku ewolucji tych dwóch gałęzi drzewa filogenetycznego świata zwierząt.

Szczególne trudności nastręcza ekstrakcja wolnych nukleotydów z niektórych tkanek bezkręgowców jak np. z *hepatopancreas* mięczaków, z powodu dużej ilości substancji barwnych, dobrze rozpuszczalnych białek i wielocukrów. Lunt i Kent (21) porównali szereg metod ekstrakcji i oczyszczania frakcji wolnych nukleotydów z *hepatopancreas* krabów *Carcinus*, stwierdzając, że najlepsze wyniki daje ekstrakcja wrzącą wodą, a nie zimnym HClO_4 . W naszej pracowni najlepsze wyniki w przypadku *hepatopancreas* ślimaków *Helix pomatia* dawała ekstrakcja zimnym alkoholem 66%. Jednakże uzyskanie powtarzalnych wyników ilościowych jest bardzo trudne.

Badania tkanki mięśniowej pierścienicy *Lumbricus terrestris* (23) i ostryg *Crassostrea gigas* (28) wykazały podobieństwo jej składu nu-

kleotydogo do składu puli nukleotydogej mięśni kręgowców. Podobnie jak u tych ostatnich, nukleotydy adeniny stanowią 70-80% wszystkich nukleotydogów, a zawartość procentowa nukleotydogów urydynowych, guaninowych i cytydynowych jest również zbliżona. Natomiast bezwzględna ilość nukleotydogów w tkance pierścienic wynosi 1/3 ilości znajdującej się w mięśniach królika, a u ostryg jest jeszcze mniejsza. Można by stąd wnosić, że przemiany zachodzące w mięśniach kręgowców są takie same, a tylko ich intensywność byłaby znacznie mniejsza u zwierząt bezkręgowych. Z drugiej jednak strony u szeregu bezkręgowców jak kraby, raki i mięczaki znaleziono ilości ATP tego samego rzędu, co u kręgowców, a nawet większe (18).

Podobieństwo mechanizmu przenoszenia energii u bezkręgowców i kręgowców sugerują H e s l o p i R a y (13) porównując stosunek ATP do fosfagenu oraz stosunek trój- do dwufosforanów guanozyny w tkance nerwowej szarańczy i w mózgu szczura. Stosunek $P_{(ATP)}$ do $P_{(fosfokreatyny)}$ u szczura i $P_{(ATP)}$ do $P_{(fosfoargininy)}$ u szarańczy jest jednakowy i wynosi 0,79. Stosunek $P_{(GTP)}$ do $P_{(GDP)}$ u szczura wynosi 1,10, a u szarańczy 1,01. Również poziom NAD i NADP są zbliżone.

Występowanie u zwierząt bezkręgowych koenzymów urydynowych sugeruje, że mechanizm syntezy wielocukrów u kręgowców i bezkręgowców jest jednakowy. Np. w *hypodermis* krabów i homarów, miejscu syntezy chityny, występuje UDP-N-acetylglukozaamina (19, 21). U owadów ilość koenzymów urydynowych zmienia się wzrastając w okresach intensywnej syntezy wielocukrów. Na przykład u owadów *Platysamia ce-*

Tablica 4

Nukleotydy w ciele tłuszczowym jedwabnika
Hyalophora cecropia (wg 4)

	μmole na 1 g świeżej tkanki	
	Diapauza	Rozwój motyla
GMP	—	0,1
AMP	—	0,002
ADP	0,01	0,04
ATP	0,04	0,25
UDP-pochodne	0,22	0,35
UTP	0,02	—

cropia w epidermie skrzydeł, w której zachodzi synteza chityny, ilość koenzymów urydynowych w okresie rozwoju motyla wzrasta od 0,8 μmola/1 g do 4 μmoli/1 g, a więc pięciokrotnie. Ilość pochodnych urydynowych w hemolimfie poczwarek w czasie diapauzy wynosi 0,2—0,9 μmola/1 ml a w okresie rozwoju motyla wzrasta do 1,5 μmola/1 ml. Jest

to głównie UDP-N-acetylogalaktozoamina, potrzebna prawdopodobnie do syntezy występującego w hemolimfie glikoproteidu zawierającego N-acetylogalaktozaminę (3). Ciekawe, że jedynymi nukleotydami występującymi w hemolimfie owadów są pochodne urydynowe. Brak jest zupełnie związków adeniny, występujących w krwinkach kręgowców w ilości przeważającej nad innymi nukleotydami. Nasze badania wykazały, że hemolimfa ślimaków *Helix pomatia* w okresie hibernacji również nie zawiera nukleotydów (15). Hemolimfa odpowiadałaby więc pod względem zawartości nukleotydów raczej osoczu krwi kręgowców.

U bezkręgowców w okresie snu zimowego przewaga związków urydynowych występuje również w organach odpowiadających wątrobie kręgowców, a mianowicie w *hepatopancreas* ślimaków (15) i w ciele tłuszczowym owadów (4). Związki nukleotydowe w tym organie u *Cecropia* przedstawia tablica 4. Podczas diapauzy związki urydynowe stanowią 76% sumy wszystkich nukleotydów ciała tłuszczowego poczwarki, a w okresie rozwoju 49%. Jest to związane z kilkakrotnym wzrostem ilości ATP w tym okresie. Wydaje się, że w czasie aktywnego życia owadów ich ciało tłuszczowe nie różni się w sposób zasadniczy od wątroby kręgowców pod względem składu jakościowego nukleotydów.

Przedstawione dane wskazują raczej na biochemiczną jedność świata zwierzęcego pod względem składu frakcji wolnych nukleotydów.

LITERATURA

1. Bergkvist R., *Acta Chem. Scand.* **8**, 1880 (1954).
2. Busch S., Weill J. D., Ledig M., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 1497 (1958).
3. Carey F. G., Wyatt G. R., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 178 (1960).
4. Carey F. G., Wyatt G. R., *J. Insect. Physiol.* **9**, 317 (1963).
5. Chambon P., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **41**, 715 (1959).
6. Chambon P., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **41**, 989 (1959).
7. Chambon P., Karoń H., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 127 (1961).
8. Clauser H., Gautheron D., Volfin P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 103 (1961).
9. Cohn W. E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1471 (1950).
10. Deutsch A., Nilsson R., *Z. Physiol. Chem.* **321**, 246 (1960).
11. Gregoire J., Limozin N., Gregoire J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **44**, 765 (1962).
12. Harth S., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 969 (1961).
13. Heslop J. P., Ray J. W., *J. Insect. Physiol.* **7**, 121 (1961).
14. Hurlbert R. B., Schmitz H., Brumm A. F., Van Potter R., *J. Biol. Chem.* **209**, 23 (1954).
15. Jeżewska M. M., dane niepublikowane.
16. Johke T., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 388 (1963).
17. Jones N. R., Murray J., *Biochem. J.* **66**, 5P (1957).
18. Ken-Ichi Arai Tsuneyuki Saito, *Nature* **192**, 451 (1961).
19. Kent P. W., Lunt M. R., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 657 (1958).

20. Le Page G. A., *J. Biol. Chem.* **226**, 135 (1957).
21. Lunt M. R., Kent P. W., *Biochem. J.* **78**, 128 (1961).
22. Mandel P., Klethi J., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 199 (1958).
23. Nilsson R., *Acta Chem. Scand.* **11**, 1003 (1957).
24. Rau T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **232**, 1065 (1958).
25. Schmitz H., w *Zur Bedeutung der Freien Nucleotide*, Berlin Springer Verlag (1961).
26. Volfin P., Clauser H., Gautheron D., Ebooue D., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 107 (1961).
27. Wang D. Y., Greenbaum A. L., *Biochem. J.* **77**, 552 (1960).
28. Wylie V., Smith M., *Can J. Biochem.* **42**, 1347 (1964).

WŁADYSŁAW GAŁASIŃSKI*

Aktynomycyny i ich antymetaboliczne działanie

Actinomycines and Their Antimetabolic Activity

A review concerning the antimetabolic activity of actinomycins is presented. The influence on the protein and nucleic acid metabolism and the resulting various biological effects are discussed.

Budowa aktynomycyn oraz niektóre ich własności chemiczne zostały szczegółowo opisane przez K o r z y b s k i e g o (72). Artykuł niniejszy ma na celu przegląd piśmiennictwa dotyczącego antymetabolicznego działania aktynomycyn ze szczególnym uwzględnieniem wpływu tych związków na przemianę białek, kwasów nukleinowych i wynikających stąd różnorodnych skutków biologicznych. Aktynomycyny są antybiotykami należącymi do grupy antymetabolitów, związków hamujących procesy przemiany materii. Działają one u podstaw metabolizmu hamując syntezę kwasów nukleinowych i białek, a więc i enzymów, regulujących całą przemianę.

Istnieje cała grupa aktynomycyn o zbliżonej do siebie budowie. Są one produkowane przez różne gatunki promieniowca (głównie *Streptomyces antibioticus*, *S. parvus*, *S. chrysomalus*), ale stwierdzono ją także u *Microspora sp.* Po raz pierwszy aktynomycyny zostały wyizolowane z *Actinomycetes* i opisane przez W a k s m a n 'a i W o o d r u f f 'a (117) w 1940 r. Waksman rozróżniał 6 typów aktynomycyn: A, B, C, D, 3436 i 3491 (77, 118), z których typ A okazał się identyczny z typem 3436, a typ 3491 identyczny z typem X, wyróżnionym przez B r o c k m a n n 'a (9). W zależności od użytego szczepu można otrzymać różne rodzaje aktynomycyn. Każdy ze szczepów produkuje mieszaninę aktynomycyn z prze-

* Dr, adiunkt Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

Skróty: AMC — aktynomycyna; TPO — oksydaza tryptofanowa; KN — kwasy nukleinowe; pCpCpA — trójnukleotyd cytydilo-cytidynoadenylowy; DNA-wirus — wirus, którego materiałem genetycznym jest DNA; RNA-wirus — wirus, którego materiałem genetycznym jest RNA; dAT — polinukleotyd dezoksyadenylotymidylowy; dGdC — polinukleotyd dezoksyguanylo-dezoksytydylowy.

wagą jednego typu. Stąd też tak duża ilość tych związków i różnorodna ich klasyfikacja. Brockmann i Gröne (10) np. wyizolowali 15 różnych aktynomycyn. Roussos i Vinning (cyt. 128) rozpatrują kompleksy aktynomycyn A, B, X i D jako identyczne. Corbaz uważa aktynomycyny A i B jako identyczne z aktynomycyną X, a aktynomycynę D z aktynomycyną I, przy czym aktynomycyna C stanowi oddzielną grupę (cyt. wg 128). Kuryłowicz i wsp. (73) otrzymali aktynomycynę K (synonim onkostatyna K), którą na podstawie własności fizykochemicznych sklasyfikowano w grupie aktynomycyn D lub I. Później Waksman i wsp. zaproponowali podział aktynomycyn na 7 grup (119). Wg tej klasyfikacji aktynomycyny D_{IV} i I należą do grupy zwanej aktynomycyną IV; do niej zalicza się też aktynomycyny A_{IV} , B_{IV} , X_I i C_I .

Jako preparaty handlowe spotykamy: *Actinomycin A* (synonimy; *Actinomycin I*, *Actinomycin B₁*, *Actinomycin X_{OB}*) o ciężarze cząsteczkowym 1000 i wysokiej toksyczności (10 μ g zabija mysz po 24-48 godz.). *Actinomycin C* (synonimy: *HBF 386*, *Sanamycin — Actinomycin VII*) wytwarzana przez *Streptomyces chrysomalus*. *Actinomycin C₁* nazywana jest często *Actinomycin S* lub *D*. Dzięki badaniom Brockmann'a (11) i Johnson'a (61) poznana została szczegółowa chemia aktynomycyn co następnie pozwoliło na wykonanie kompletnej syntezy aktynomycyny C_3 i C_1 (D) (12, 15).

Aktynomycyny wykazują działanie bakteriostatyczne, głównie przeciwko drobnoustrojom gram-dodatnim. Działanie to jest bardzo silne, bowiem aktynomycyna D już w stężeniu 0,25-0,75 μ g/ml hamuje wzrost *Staphylococcus aureus* (70).

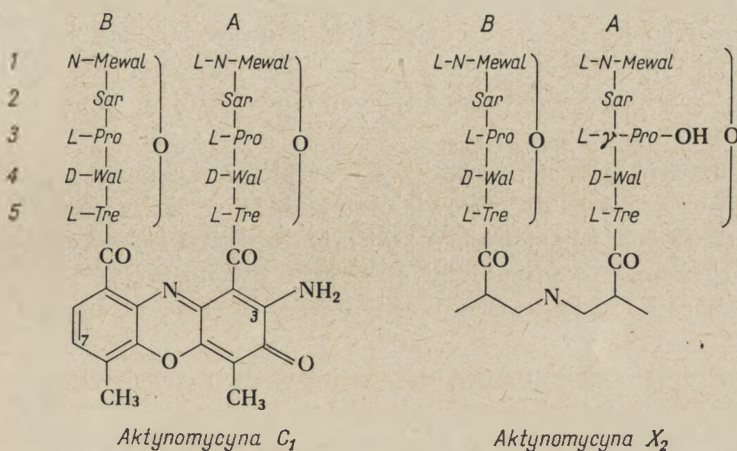
I. Wpływ struktury chemicznej aktynomycyn na ich aktywność biologiczną

Aktynomycyny pod względem budowy chemicznej są związkami peptydowymi zawierającymi grupę chromoforową i dlatego zostały nazwane przez Brockmann'a chromopeptydami. Grupa chromoforowa (której dawniej przypisywano budowę akrydynową) zawiera ugrupowanie fenoksazyny.

Różnice występujące wśród naturalnie produkowanych aktynomycyn dotyczą głównie łańcuchów peptydowych. Zmiany występują w strukturze, ale nigdy w konfiguracji atomów węgla α aminokwasów (12, 13). Różnice w składzie aminokwasowym poszczególnych aktynomycyn mogą występować w jednym albo w obu łańcuchach peptydowych, w każdej pozycji łańcucha (tablica 1).

Zmieniając skład aminokwasowy podłoża wzrostowego szczepu można uzyskać produkcję żądanych aktynomycyn (68, 100). Również liczne analogi naturalnie występujących aminokwasów mogą być wykorzystane do syntezy.

Badania krystalicznych i scharakteryzowanych aktynomycyn pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że skład aminokwasowy obu łańcuchów polipeptydowych może wpływać na biologiczną aktywność cząsteczki. Podstawienie L- γ -oksyproliny na miejsce L-proliny w łańcuchu A aktynomycyny C₁, daje aktynomycynę X₂ (schemat 1) o aktywności biologicz-



Schemat 1. Wzory aktynomycyn C₁(D) i X₂

Tablica 1

Aminokwasy w łańcuchach peptydowych aktynomycyn (95)

Pozycja łańcucha peptydowego	Aminokwasy			
	tylko w jednym z łańcuchów	w obu łańcuchach A i B	tylko w łańcuchu A	nie scharakteryzowane
1	L-N-metylo-Wal L-N-metylo-Ileu	L-N-metylo-Wal L-N-metylo-Ileu		
2		Sar*)		
3	L-Pro Sar*)	L-Pro Sar*)	L- γ -Pro-OH L-Pro-OH L-allo-Pro-OH	L-N-metylo-Ala kwas L-pipekolino- nowy kwas azetydino- karboksylowy
4	D-Wal D-allo-Ileu	D-Wal D-allo-Ileu		
5		L-Tre		

*) Sar — sarkozyna

nej od 50 do 100% wyższej we wszystkich testach (14, 94). Aktynomycyna X₂ ma dwukrotnie wyższą aktywność biologiczną niż aktynomycyna X_{1a}, w której na miejscu dwóch reszt proliny występujących w aktynomycynie C₁, są: 1 reszta sarkozyny i 1 reszta L- γ -oksyproliny (14). Zastąpienie allo-izoleucyną jednej lub obu reszt D-waliny w aktynomycy-

nie C_1 daje aktynomycynę C_2 i C_3 (11) z nieznacznymi tylko zmianami aktywności (17, 94). Dalsza zmiana w aktynomycynie C_3 przez zastąpienie jednej lub obu N-metylowalin przez N-metyloizoleucynę potęguje działanie hamujące, jak to wykazał test oparty o oznaczania polimerazy RNA bakteryjnej (52). Acylowanie grup hydroksylowych hydroksyproliny obniża aktywności aktynomycyn (14, 94).

Interesujące jest, że z 10-ciu aminokwasów występujących w aktynomycynie C_1 tylko 4 mogą tworzyć wiązania wodorowe. Ilość ta jest stała we wszystkich naturalnie występujących modyfikacjach łańcuchów peptydowych.

Można zatem przyjąć, że zmiany w strukturze chemicznej aktynomycyn mogą częściowo lub całkowicie zmieniać ich aktywność biologiczną. Reich (95) podaje następujące zestawienie zmian aktywności spowodowanych różnymi modyfikacjami struktury aktynomycyn.

a) Zmiany całkowicie znoszące aktywność wg wszystkich stosowanych testów:

1. hydroliza obu laktonów, dająca kwas dwukarboksylowy,
2. redukcja pierścienia aromatycznego,
3. redukcyjna acetylacja grup funkcjonalnych chromoforu,
4. zastąpienie grup aminowych chromoforu przez chlor lub grupą karboksylową,
5. zastąpienie jednego z wodorów grupy aminowej chromoforu przez β -aminoetyl lub *p*-aminofenyl,
6. zastąpienie obu wodorów grupy aminowej chromoforu przez reszty alkilowe,
7. połączenie chinoidowego tlenu i azotu grupy aminowej z atomem azotu wskutek czego powstaje pierścień pięcioczłonowy.

b) Zmiany aktynomycyn obniżające aktywność biologiczną:

1. alkilowanie grupy aminowej przez metyl, β -dwuetyloaminoetyl lub β -hydroksyetyl.
2. acylowanie grup hydroksylowych reszt hydroksyproliny w aktynomycynach typu X.
3. zastąpienie wodoru w pozycji 7 chromoforu grupami $-NH_2$, $-OH$, $-NO_2$.

II. Chemizm działania aktynomycyn

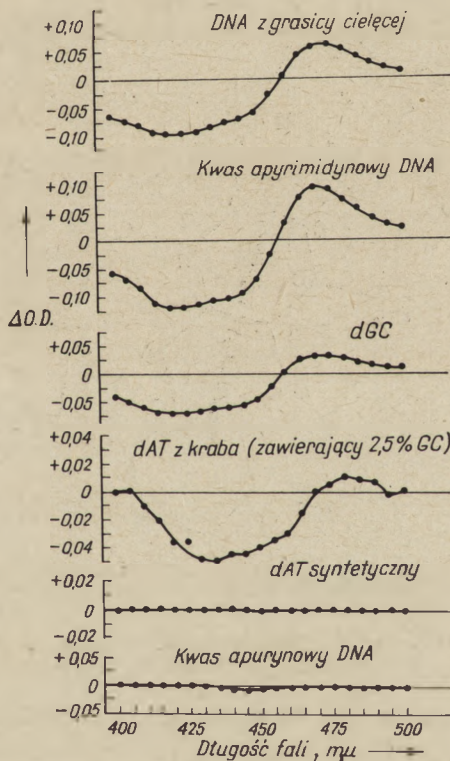
Aktynomycyna jako silny antybiotyk i środek przeciwrakowy stała się przedmiotem zainteresowań wielu badaczy z dziedziny biochemii i medycyny, co przyczyniło się do rozwoju badań nad mechanizmem jej działania.

Podstawą tych badań były prace Beers'a (6), który wykazał hamujący wpływ barwników akrydynowych na biosyntezę kwasu poliadeninowego w *Micrococcus lysodeicticus*. Mechanizm hamowania polegał

na tworzeniu się kompleksu barwnik-polimer. Steiner i Beers (104) stwierdzili, że barwniki akrydynowe tworzą kompleksy z polinukleotydami oraz drożdżowym RNA i DNA. Oddziaływanie wzajemne barwnika i DNA wykazał również L aw l e y (74).

Analogia w budowie aktynomycyny i barwników akrydynowych nasunęła przypuszczenie o podobieństwie ich działania. Wg Reicha (95) są liczne dane, że aktynomycyny mogą reagować z DNA tworząc kompleksy. W roztworze zawierającym 136 $\mu\text{g/ml}$ AMC-D i 600 $\mu\text{g/ml}$ DNA, przy pH 7, 84% AMC występuje w formie skompleksowanej (70). Maksimum absorpcji kompleksu AMC-DNA wynosi około 465m μ . Pewna frakcja kompleksów nie dysocjuje w czasie elektroforezy, dializy, ultrawierowania lub chromatografii na *Sephadexie*. Wiązanie AMC z DNA nie jest jonowe, ponieważ można usunąć AMC z kompleksu przy pomocy fenolu, mieszaniny etanol-eter, eteru lub wysokich stężeń mocznika.

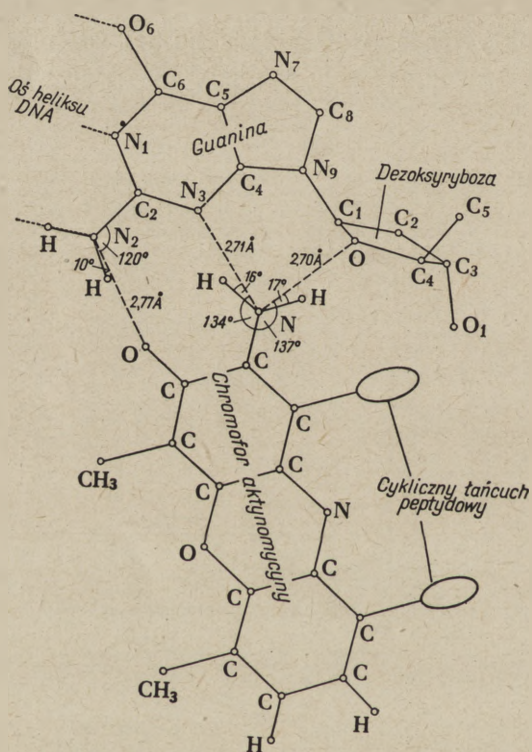
Biologiczna aktywność AMC polega na jej zdolności do łączenia się z DNA (70, 91). Prawdopodobnie dochodzi do połączenia poprzez guaninę



Rys. 1. Powstawanie kompleksu pomiędzy AMC i DNA z różnych źródeł (39)
 Wyniki przedstawiono jako różnice gęstości optycznej ($\Delta\text{O.D.}$); gęstość optyczną (OD) roztworów AMC oznaczano wobec roztworów zawierających odpowiednie preparaty DNA

(4, 38, 66, 124), ponieważ ilość związanej z DNA aktynomycyny wzrasta z zawartością guaniny w DNA. Jako dowód niezbędności guaniny w DNA dla utworzenia kompleksu z AMC może też służyć fakt, że kwas apurynowy DNA i syntetyczny dAT nie reaguje z antybiotykiem, podczas gdy kwas apirymidynowy DNA, syntetyczny dGdC i normalnie występujące DNA reagują z AMC. Rysunek 1 ilustruje te zależności.

W tworzeniu kompleksu AMC-DNA dużą rolę odgrywa drugorzędowa struktura DNA. O znaczeniu struktury spiralnej w reakcji AMC-DNA świadczy fakt, że łańcuch pojedynczo skręcony lub DNA poddany denaturacji cieplnej nieco słabiej wiąże AMC niż identyczny DNA nieogrzewany lub natywny DNA o podobnym składzie zasad (38, 63). P u l m a n (90) badając kompleksy aktynomycyny z purynami i DNA sugerował, że



Schemat 2. Model wiązania AMC-guanina (DNA) (49)

jednym z ważnych czynników w tworzeniu kompleksu jest przenoszenie ładunku elektrycznego. Badania nad sposobem wiązania się AMC z DNA wykazały, że antymetaboliczne działanie AMC jest bardziej wrażliwe na zmiany grupy $-NH_2$ w chromoforze niż w cyklicznych łańcuchach peptydowych (37, 60, 93). Te dane oraz obraz dyfrakcji rentgenowskiej i model

molekularny opisany przez Hamiltona i wsp. (49) pozwoliły wysunąć hipotezę co do sposobu wiązania AMC z DNA przedstawioną na schemacie 2.

Wg Hamiltona i wsp. (49) jedna związana molekula AMC przypada na każde 18 nukleotydów DNA. Między chromoforem AMC i guaniną DNA występują trzy wiązania wodorowe. Taki schemat trzech wiązań byłby niemożliwy gdyby np. jeden z wodorów aminowej grupy chromoforowej był zastąpiony przez grupę alkilową (37, 60, 93). Jak przedstawiono na schemacie 2 chromofor swoją długą osią skierowany jest prostopadle do osi spirali DNA i płaszczyzną swą nachylony do tej osi pod kątem około 70° . Gdy chromofor jest ustawiony w takiej pozycji, większa część cyklicznego łańcucha peptydowego może być umieszczona wewnątrz mniejszego rowka spirali natywnego DNA, z którym może tworzyć się w tych warunkach siedem wiązań wodorowych (cyt. wg 39). Tylko guanina w mniejszym rowku DNA może dostarczyć wodoru, dla którego tlen chinoidowy jest akceptorem. Niezdolność hipoksantyny w DNA do kompleksowania AMC wskazuje, że grupa aminowa guaniny jest ważnym czynnikiem specyficzności wiązania AMC. Za proponowanym miejscem wiązania aktynomycyny w mniejszym rowku spirali natywnego DNA przemawia też to, że wiązanie AMC nie ulega osłabieniu jeśli w większym rowku spirali DNA znajdzie się glukoza (cyt. wg 39).

Wiązanie AMC z DNA wymaga spełnienia następujących warunków:

a) obecność wolnej grupy $-NH_2$ w grupie chromoforowej; zastąpienie tylko jednego wodoru grupy aminowej przez grupę metylową powoduje spadek aktywności do 90% (81, 94), natomiast podstawienie innych grup (np. bromu) w pozycji 7 chromoforu w nieznacznym stopniu wpływa na własności biologiczne aktynomycyny (cyt. wg 95).

b) obecność niezredukowanego układu chinoidowego (cyt. wg 95) gdyż redukcja uniemożliwia udział tlenu w tworzeniu wiązania wodorowego.

c) obecność pierścieni laktonowych, które zabezpieczają określoną przestrzenną orientację składników łańcucha peptydowego; hydroliza laktonów do kwasów dwukarboksylowych uniemożliwia tworzenie kompleksów z DNA (81) i aktynomycyna traci aktywność biologiczną. Zmiany składu aminokwasowego w łańcuchach peptydowych modyfikując konfigurację AMC również wpływają na powstawanie kompleksów AMC-DNA.

W związku z mechanizmem działania AMC wyłoniło się pytanie — czy miejsce wiązania AMC do DNA może znajdować się na powierzchni matrycy, na której działa polimeraza RNA. Zagadnienie to zostało rozstrzygnięte poprzez zbadanie wpływu AMC na aktywność polimerazy RNA w reakcji prowadzonej równolegle przez dwie matryce. Jedna matryca była wrażliwa na AMC (np. DNA z grasicy cielecej lub *M. lyso-deicticus*), druga zaś oporna na AMC (np. dAT, lub kwas poliryboadeny-

lowy) (38). Przy pomocy odpowiedniego znakowanego nukleozydo- ^{32}P -trójfosforanu można oznaczyć aktywność matrycy dAT lub poliA nawet w obecności innej matrycy np. grasiczego DNA. Przy określonym stężeniu enzymu wprowadzenie DNA z grasicy cielőcej do reakcji, w której „primerem” (starterem) był dAT wyraźnie hamowało całą reakcję. Oznacza to, że dAT jest właściwym „primerem” DNA dla syntezy RNA, a dodany DNA grasiczy prawdopodobnie współzawodniczy z dAT o enzym. Natomiast dodanie AMC do mieszaniny zawierającej zarówno DNA grasiczy jak i dAT stymuluje reakcję (w porównaniu z szybkością reakcji bez antybiotyku). W tych warunkach wytworzony RNA jest całkowicie produktem aktywności matrycy dAT. Rezultaty te pokrywają się z hipotezą, że AMC usuwa część polimerazy RNA z DNA grasicy cielőcej i sugeruje, że pewna ilość miejsc w DNA wiążących AMC, byłaby normalnie zajęta przez polimerazę RNA.

Wykazano również, że AMC wyraźnie zmienia własności fizyczne DNA znajdującego się w kompleksie. Przede wszystkim bardzo silnie stabilizuje spiralę DNA (53, 96), na co wskazuje podwyższenie T_m (tzw. „Temperatura topnienia”) w teście denaturacji cieplnej. Wzrost T_m jest funkcją stosunku AMC:DNA-P. Zjawisko to występuje tylko przy wysokich stężeniach antybiotyku gdy stosunek molarny AMC:dG-nukleotyd DNA = = 0,025-0,5. Jest to stężenie, które odpowiada hamowaniu polimerazy DNA. Natomiast polimeraza RNA jest hamowana przy znacznie niższym poziomie AMC (stosunek AMC-dG-nukleotydy DNA = 0,0004-0,0075). Wydaje się więc, że wpływ AMC na polimerazę DNA jest raczej bezpośredni i polega na fizycznych zmianach zapobiegających rozwinięciu się skrętów „primera”. Na podstawie tych danych wnioskowano (53, 96), że:

- a) siły, które wiążą AMC z DNA są silniejsze niż te, które biorą udział w utrzymywaniu samej struktury DNA,
- b) w warunkach doświadczalnych AMC wiąże się z natywnym DNA, a nie wiąże się z pojedynczo skręconą cząsteczką,
- c) również hybrydy RNA-DNA, prawdopodobnie nie kompleksują AMC.

Dalsze badania sposobu wiązania się AMC z DNA doprowadziły do wniosku, że struktura spirali DNA jest istotnym czynnikiem w wiązaniu AMC a obecność jedynie samej dezoksyguanozyny w polinukleotydzie nie wystarcza. Postulowane wiązanie AMC w mniejszym rowku spirali natywnego DNA tłumaczy obserwacje dotyczące roli wszystkich elementów struktury tak DNA jak i AMC, które wpływają na utworzenie kompleksu. Dowodem na miejsce wiązania AMC w DNA jest też działanie proflawiny, która wchodzi pomiędzy przyległe pary zasad DNA, zmieniając strukturę obu rowków. Proflawina hamuje niespecyficznie, zarówno polimerazę DNA jak i polimerazę RNA, podczas gdy AMC, wiązana tylko w mniejszym rowku wykazuje uderzającą selektywność działania na polimerazę RNA. Jeżeli AMC leży w mniejszym rowku DNA,

to ten rowek byłby specyficznym miejscem matrycowym dla polimerazy RNA, a więc miejscem syntezy RNA i być może jej regulacji. Wobec czego możnaby przypuszczać, że polimeraza DNA funkcjonuje w rowku większym.

III. Wpływ aktynomycyny na układy biologiczne

Działanie AMC można rozpatrywać z punktu widzenia efektów ogólnych (np. hamowanie procesów morfologicznych i fizjologicznych) i efektów biochemicznych (99).

Skutki działania AMC pojawiają się najpierw w tkankach o szybkiej odnowie (*turnover*) (22): w nabłonku jelita, szpiku kostnym i tkankach limfoidalnych. U embrionów (71) i młodych, wzrastających zwierząt również inne tkanki wyraźnie zmieniają się pod wpływem AMC-D. Flickinger (29) wykazał, że działanie AMC na embriony żaby w różnych stadiach rozwoju, natychmiast zatrzymuje ten rozwój. AMC działa także na komórki roślinne (5). AMC-D w stężeniu 90 $\mu\text{g/ml}$ hamuje mitozy w korzeniu *Alium cepa* już po 36 godz.; zahamowanie występuje w interfazie. Komórki zróżnicowane i dojrzałe tracą wrażliwość na AMC. Selektywny wpływ AMC na szybko dzielące się tkanki sugeruje jej przeciwrakowe działanie.

Brachet i Denis (8) stwierdzili, że u *Acetabularia* pewne fragmenty pozajądrowe są znacznie mniej wrażliwe na AMC niż jądro, co sugeruje, że pierwotnym miejscem działania AMC jest jądro. AMC powoduje charakterystyczne uszkodzenie elementów strukturalnych tworzących pętle (*loops*) jąder spermatocytów (79a). Zmiany te występują w 6 godz. po zadziałaniu AMC i osiągają maksimum po 24-30 godzinach. Zmianie ulega również struktura jąderka; odrywa się ono od błony jądrowej, z którą normalnie jest stale związane. Wszystkie uszkodzenia jąder spowodowane przez AMC są odwracalne, np. regeneracja pętli rozpoczyna się około 40 godz. po iniekcji AMC a powrót do normy obserwuje się po 100-120 godz.

AMC wpływa na procesy reprodukcji, wzrostu i rozwoju wywołując zmiany morfologiczne, co można przypisać uszkodzeniu czynnika wspólnego tym procesom, mianowicie RNA. AMC powoduje też zaburzenia w szeregu czynności fizjologicznych a następnie zmiany morfologiczne, zwłaszcza w obrębie żołądka i jelit.

Wiele z tych efektów działania AMC przypomina wpływ promieniowania jonizującego. Wykazano także (26), że skutek dwóch następujących po sobie dawek promieniowania wzmagają się, jeśli hodowlę komórek potraktować AMC w okresie między pierwszym a drugim napromieniowaniem. W odstępie czasu między dawkami promieniowania występują pewne procesy regeneracji komórki. Regenerację tę hamują stosunkowo niskie stężenia AMC, co wskazywałoby, że głównym czynnikiem regene-

racji jest RNA. Wiadomo, że promienie jonizujące wywołują karcinogenezę i mutagenezę. U myszy opisano (20) również karcinogenezę wywołaną przez AMC. Jednak są też dane (18), że AMC-D zmniejszała ilość mutacji wywoływanych przez promieniowanie X u *Drosophila melanogaster*.

Bardzo interesujące okazały się efekty biochemiczne AMC, które dały podstawę do badań w wielu kierunkach, a przede wszystkim przyczyniły się do wyjaśnienia biosyntezy kwasów nukleinowych i białek oraz w pewnym stopniu działania wielu hormonów. Stwierdzono, że AMC szybko hamuje syntezę białek i RNA nie naruszając syntezy DNA u *Bacillus subtilis* (101, 102). Podobne efekty zaobserwowano u *Staphylococcus aureus* (69). Badania z L-komórkami (92, 93) wykazały, że początkowa szybkość syntezy białka i DNA nie ulega zmianie pod wpływem AMC, podczas gdy synteza RNA jest hamowana szybko i prawie ilościowo.

1. Wpływ AMC na biosyntezę kwasów nukleinowych

Synteza DNA. Guidice i Novelli (48) donieśli wprawdzie, że AMC-D hamuje syntezę polimerazy DNA u hepatektomizowanych szczurów, jednak skuteczne stężenia były wysokie. Umiarkowane ilości antybiotyku wywierały mały wpływ na aktywność polimerazy DNA (27). Przy wysokich stężeniach AMC, hamujących polimerazę DNA „primer” DNA pozostaje nietknięty (27). Całkowite zahamowanie występuje przy stosunku molarnym AMC:guanina-DNA 1:1.

Doniesienie (21) o rozpadzie DNA zachodzącym po zablokowaniu syntezy białka sugeruje, że AMC może wywierać pośredni wpływ na DNA. Popierałoby to hipotezę o istnieniu rdzenia białkowego utrzymującego matrycę DNA w pozycji funkcjonalnej i o niezbędności ciągłej syntezy białka dla normalnej funkcji komórki.

Badanie wpływu reakcji AMC-D z DNA na metabolizm (70) wykazuje, że:

- a) antybiotyk nie ma wyraźnego wpływu na fosforylazę polinukleotydową *Staphylococcus aureus* w systemie Grunberg-Manago (47);
- b) AMC-D hamuje inkorporację dATP znakowanego ^{32}P w czasie inkubacji z nieoczyszczonym preparatem polimerazy DNA izolowanej z *E. coli*;
- c) AMC-D hamuje transformację szczepu *Haemophilus influenzae graeciae* wrażliwego na streptomycynę w szczep niewrażliwy, ale tylko w przypadku dużych stężeń transformującego DNA szczepu opornego; brak hamowania przy niższych stężeniach DNA może być wynikiem dysocjacji kompleksu AMC-DNA w bardzo rozcieńczonych roztworach.

Synteza RNA. Hurwitz (60) doniósł, że synteza RNA jest 10-20 razy silniej hamowana przez AMC niż synteza DNA. AMC-D w stężeniu $0,2\mu\text{M}$ hamuje syntezę DNA w 25%, a syntezę RNA w 90-95% (60). Levinthal (74a) używając AMC-D w stężeniach 40 razy większych

niż Hurwitz stwierdził kompletne zahamowanie zarówno syntezy RNA jak i białek.

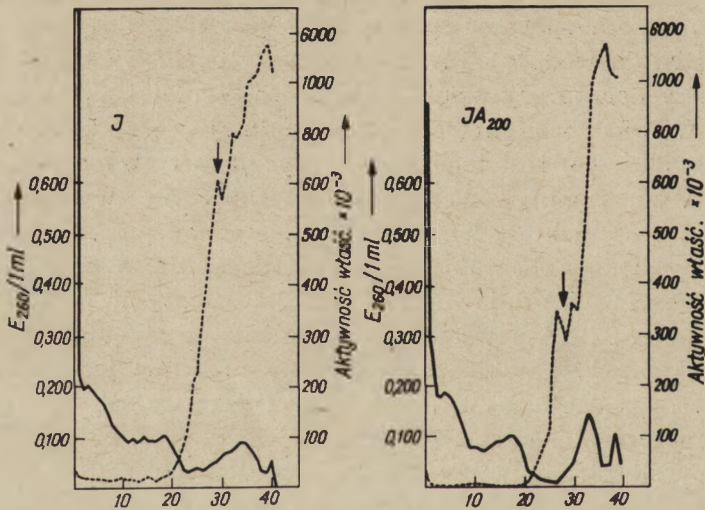
Badania wpływu AMC-D na przemiany mRNA z wątroby myszy (113) wykazały wyraźne zahamowanie inkorporacji ^{14}C -kwasu orotowego do wątrobowego kwasu rybonukleinowego, szczególnie do bardzo aktywnej frakcji RNA o stałych sedymentacji między 4,5S a 20S. Wyniki te pokrywają się z danymi uzyskanymi w pracy (33) dotyczącej wpływu AMC-D na inkorporację ^{32}P do RNA z wątroby szczura podczas indukowanej syntezy oksydazy tryptofanowej. Wszystkie dotychczasowe doniesienia wskazują na to, że AMC hamuje syntezę kwasu rybonukleinowego zależną od DNA (37, 60, 93). Synteza RNA inicjowana przez RNA nie jest bezpośrednio atakowana przez AMC (93).

Po działaniu AMC-D w stężeniu 1,0 $\mu\text{g/ml}$ przez 8 godz. i następnie inkubacji przez 16 godz. L-komórki włączają ^3H -cytydynę do frakcji nierozpuszczalnej w kwasie (92). RN-aza nie uwalnia trytu z tej frakcji, natomiast DN-aza uwalnia izotop całkowicie. Można wyciągnąć stąd wniosek, że AMC-D w tych warunkach hamuje całkowicie syntezę komórkowego RNA nie naruszając syntezy DNA. Goldberg i wsp. (37, 38a) wykazali, że hamowanie syntezy RNA jest kompetytywne i dodanie nadmiaru DNA powoduje odhamowanie, przy czym DNA z grasicy cieplej poddany denaturacji cieplnej okazał się bardziej aktywny, niż natywny DNA. Pojedynczo skręcony DNA trudniej tworzy kompleksy z antybiotykami (38a, 64) i dlatego może służyć jako matryca zastępcza naturalnego DNA, zinaktywowanego przez AMC. Wg Karstena (65) DNA i RNA oraz niektóre ich produkty degradacji, przypuszczalnie oligonukleotydy, znoszą hamujące działanie AMC na wzrost *Neurospora crassa*, przy czym RNA daje znacznie mniejsze efekty niż DNA. Produkty degradacji DNA i RNA powstające po alkalicznej i łagodnej kwaśnej hydrolizie (nukleotydy i nukleozydy) działały podobnie jak DNA i RNA, a produkty degradacji uzyskane po hydrolizie do zasad azotowych nie wykazywały tego działania. Stwierdzono jednak (65), że handlowe preparaty puryn i pirymidyn w wysokich stężeniach znoszą w pewnym stopniu cytostatyczne działanie AMC. Adenina, adenozyzna i adenozyzomono-, dwu- i trójfosforany w stężeniu 4-5 $\mu\text{M/ml}$ znosiły działanie AMC prawie w 100%. Pewne нефизjologiczne pochodne purynowe jak 8-azaksantyna i 8-chloroksantyna także znosiły działanie AMC. Pirymidyny nie wykazywały wyraźnego wpływu na AMC. Interesujący jest fakt, że pewne нефизjologiczne pochodne pirymidyn jak 5-bromouracyl i 2-amino-4-metylopirymidyna, same wykazujące własności cytostatyczne, w pewnym stopniu cofają zahamowanie aktynomycynowe. Wpływ puryn i pirymidyn można wytłumaczyć przypuszczalnym usuwaniem AMC z miejsca jej działania w żyjących komórkach, za czym przemawiają wymagane wysokie stężenia skuteczne tych substancji.

Chociaż hamowanie aktynowycynowe syntezy RNA zależnej od DNA może być zniesione po dodaniu nadmiaru DNA, to jednak *in vivo* te efekty nie są ściśle odwracalne. P i e r r o (88) wykazał, że równoczesne podanie DNA nie zmniejsza wywołanych przez AMC malformacji u kur. Wzrastające stężenia polimerazy-RNA nie zmieniają wpływu AMC na syntezę mRNA, podczas gdy wzrastające stężenia DNA obniżały ten efekt (52, 60, 94).

Obserwując skutki działania AMC F r a n k l i n (32) doszedł do wniosku, że w normalnych komórkach zwierzęcych synteza wszystkich RNA jest kierowana przez matryce DNA. Wyjątki mogą stanowić tylko układy DNA-RNA w jakiś sposób chronione w komórkach przed działaniem AMC i synteza RNA, polegająca na przyłączeniu końcowych grup do istniejących molekuł RNA bez udziału matrycy DNA.

AMC zapobiega znakowaniu wysokomolekularnych RNA, natomiast zahamowanie wbudowywania ^{32}P do frakcji 4S RNA (czyli przenoszącego RNA) jest nieznaczne lub wcale nie zachodzi (33, 79). Fakt, że nie-



Rys. 2. Wpływ AMC-D na inkorporację ^{32}P do różnych frakcji RNA z wątroby szczura podczas indukcji oksydazy tryptofanowej (33)

Wykresy przedstawiają wyniki analizy RNA w gradiencie sacharozy 1 — szczury indukowane — 100 mg DL-tryptofanu w 0,9% NaCl dootrzewnowo; IA₂₀₀ — szczury indukowane jak wyżej, którym podano dootrzewnowo 200 µg AMC-D w glikolu etylenowym. Linia ciągła — $\frac{1}{260}$; linia przerywana — radioaktywność właściwa na mg RNA

frakcjonowane preparaty RNA po działaniu AMC-D wykazywały bardzo wysoką zawartość piętna w CMP w porównaniu z innymi nukleotydami, sugeruje pewien specyficzny mechanizm znakowania przenoszącego RNA. Wiadomo, że znakowanie zachodzi w 97% we frakcji 4S (79), ponieważ

trzy końcowe nukleotydy pCpCpA wykazują przemiany niezależne od reszty łańcucha RNA. W tym przypadku po alkalicznej hydrolizie co najmniej 67% piętna występuje w CMP, a pozostały ^{32}P jest rozmieszczany pomiędzy nukleotydami w pobliżu końcowej sekwencji przenoszącego RNA (pCpCpA). Stąd wniosek, że AMC-D hamuje w wątrobie szczura syntezę wszystkich form RNA z wyjątkiem końcowych grup pCpCpA w przenoszącym RNA. Podobne rezultaty (33) przedstawione na rys. 2, wskazują, że istotnie wbudowywanie ^{32}P do frakcji 4S RNA nie jest hamowane przez AMC-D, podczas gdy pozostałe frakcje wykazują wyraźne obniżenie włączania ^{32}P .

Wydaje się, że AMC, która hamuje syntezę RNA powinna także hamować syntezę wirusów, szczególnie RNA-wirusów. Dane z literatury na ten temat są sprzeczne i wskazują, że działanie AMC i wirusów może być czasami uzupełniające, niekiedy zaś antagonistyczne (31).

W zakażonej komórce, której materiał genetyczny składa się z DNA, synteza RNA jest całkowicie zależna od DNA i wrażliwa na AMC. Synteza ta katalizowana przez polimerazę-RNA w obecności DNA (59) i dwuwartościowych kationów wymaga obecności wszystkich czterech rybonukleotydów trójfosforanowych (122). Powstały w ten sposób RNA ma skład bardzo zbliżony do „primera” DNA (122). Po zakażeniu wirusem, którego genomem jest RNA, komórka gospodarza syntetyzuje RNA zależny od RNA i synteza ta jest całkowicie niewrażliwa na AMC.

Wiele wirusów hamuje syntezę makrocząsteczek w organizmie gospodarza. RNA-wirusy i szczepionki wirusowe mogą hamować syntezę RNA i białek, a *Rheovirus* hamuje syntezę DNA (42). W takich przypadkach działanie wirusa i AMC jest podobne, chociaż mechanizmy hamowania mogą być różne.

Badania izotopowe (80) przy użyciu kwasu ^{14}C -orotowego wykazały, że AMC-D hamuje syntezę jąderkowego RNA znacznie silniej niż syntezę pozająderkowego RNA. Te dane oraz skład zasad jąderkowego RNA wskazują, że synteza jąderkowego RNA w zasadzie przebiega niezależnie od syntezy pozająderkowego RNA. W badaniach histochemicznych nad podziałem komórek HeLa wykazano (40, 107), że najpierw są atakowane przez AMC jąderka, które znikają kompletnie po 12-24 godz.

AMC wykorzystano również do badania migracji RNA z jądra do cytoplazmy (36). Levy (75) doniósł, że AMC może hamować tę migrację, natomiast Harris (51) nie podzielił tego poglądu dopatrując się błędów w technice laboratoryjnej. Perry jednak (86) wykazał, że jeśli czas impulsowego znakowania ^{32}P zawiera się w granicach 5-30 min., to obserwuje się obniżenie syntezy jąderkowego RNA pod wpływem AMC. Dłuższe działanie AMC (3,5-4,0 godz.) nie wpływa na RNA jąderkowy i chromatynowy, hamuje natomiast włączanie izotopu do cytoplazmatycznego RNA, przy czym hamowanie to jest znacznie słabsze niż hamowa-

nie obserwowane w jąderku w krótkim eksperymencie. Zatem znakowanie ^{32}P jąderkowego RNA wyprzedza znakowanie RNA cytoplazmatycznego, a więc RNA jąderkowy może być prekursorem większej części cytoplazmatycznego RNA, głównie zaś RNA rybosomalnego. Znaczna część rybosomalnego RNA miałaby zatem swój początek w jąderku lub związanej z nim chromatynie. Wynikałoby stąd, że jąderkowe rejony chromosomów tworzą jeden typ RNA, wchodzący następnie w skład rybosomów, podczas gdy inne części chromosomów wytwarzają inny typ RNA, stanowiący element kodu. Hamowanie przez AMC przenoszenia RNA z jądra do cytoplazmy wykazano również w embrionach kurzych (55).

A c s i wsp. (1) znaleźli bezpośrednią depolimeryzację RNA pod wpływem AMC-D u *B. subtilis*, jednak D a r n e l l (23) podobne wyniki otrzymane z komórkami HeLa przypisał szybkiej odnowie mRNA i wynikającemu stąd krótkiemu czasowi jego istnienia. Polisomy (ergosomy) wątroby szczura ulegają dezagregacji pod wpływem AMC (103). AMC działa pośrednio hamując syntezę mRNA, który rozpadając się powoduje z kolei rozpad rybosomów z nim związanych. W ciągu 4-8 godz. 50-80% rybosomów związanych z mRNA rozpada się po dawkach AMC, które hamują całkowicie syntezę mRNA (103).

2. Wpływ AMC na biosyntezę białka

Pierwsze doniesienia dotyczące wpływu AMC na biosyntezę białka pochodzą z roku 1956. Mianowicie F o l e y (30) podaje, że AMC-D, działa jako kompetytywny inhibitor pantotenu. Sugeruje on, że AMC wpływa na zależne od pantotenu reakcje związane z biosyntezą i wykorzystaniem aminokwasów. Wielu autorów stwierdziło następnie hamujące działanie AMC na indukcję enzymów adaptacyjnych (34, 44, 58, 87, 120, 121). Inne badania nad wpływem AMC na indukcję oksydazy tryptofanowej i na włączanie ^{32}P do różnych frakcji RNA w wątrobie szczurów (33, 87) wykazały, że równolegle z wyraźnym zahamowaniem indukcji zahamowane też zostaje włączanie ^{32}P do wszystkich frakcji RNA oprócz frakcji 4S (tj. przenoszącego RNA) (rys. 2). Między frakcją 4S i 18S stwierdzono występowanie małej frakcji RNA o bardzo wysokiej radioaktywności właściwej, która znacznie malała po działaniu AMC-D. Jeśli się przyjmie, że tą frakcją o wysokiej aktywności metabolicznej jest mRNA można przypuszczać, że proces indukcji oksydazy tryptofanu, hamowany przez AMC-D, jest syntezą enzymu *de novo*. Ostatnio stwierdzono (85), że AMC wywiera hamujący wpływ również na syntezę protrombiny indukowaną przez wit. K, a także hamuje wzrost zawartości DNA-polimerazy wątroby szczura po częściowej hepatektomii (79a). AMC-D nie wpływa wyraźnie na aktywność enzymów mitochondrial-

nych. Poziom dehydrogenazy kwasu bursztynowego w mitochondriach pozostaje bez zmiany po 24 godzinnym działaniu AMC (24).

Interesujące jest, że u młodych szczurów po takich dawkach AMC-D, które pozwalają na przeżycie 5 dni, występuje podwyższenie aktywności niektórych enzymów wątrobowych, indukowanych także przez 17-hydroksykortikosteron (98).

Tablica 2

Wpływ AMC-D na aktywność oksydazy tryptofanowej (TPO) w wątrobie szczura (87)

czas eksperyment	$\frac{1}{2}$ godz.			5 godz.		
	K	I	IA	K	I	IA
Aktywność TPO μg suchej masy	14,1	36,9	25,7	14,1	41,57	9,37

K — kontrola; I — indukcja DL-tryptofanem (100 mg w solifizjologicznej dootrzewnowo); IA — indukcja i traktowanie 200 μg AMC-D w glikolu etylenowym. Aktywność TPO wyrażona jest w ilości μg kinureny wyzwolonej przez 1 g suchej masy tkanki w ciągu 1 godz.

Ponadto stwierdzono, że AMC-D hamuje inkorporację znakowanej lizyny do jąderka oraz powoduje zmiany w jego granulacji (106), nie wykazując jednak takiego działania w chromosomach i cytoplazmie. Można więc przypuszczać, że przynajmniej pewna część jąderkowego białka jest syntetyzowana niezależnie od chromosomalnego RNA. Wydaje się, że przy pomocy AMC-D można przeprowadzić zróżnicowanie białek lub peptydów związanych z lizyną na dwa typy: jeden zlokalizowany tylko w jąderku i usuwany w czasie ekstrakcji razem z RNA, jest z nim związany chemicznie i metabolicznie, oraz drugi typ znaleziony w jądrze i cytoplazmie, który nie ekstrahuje się razem z RNA, a więc chemicznie i zapewne metabolicznie jest od niego niezależny. Są również dowody na to, że AMC hamuje syntezę histonów jądrowych (58, 105). Badania w mikroskopie elektronowym (62) wskazują, że zjawisko to może zależeć od fragmentacji jąderek, następującej pod wpływem AMC.

Badania na bakteriofagach wykazały, że powstawanie przeciwciał na bakteriofag T_2 *in vitro* było hamowane przez $5 \cdot 10^{-8} \text{M}$ AMC-D. Przemawia to za koncepcją, że tworzenie się przeciwciał podobnie jak innych białek zależy od syntezy mRNA.

Obserwacje, że AMC nie działa na biosyntezę białek nietkniętych komórek *E. coli* można wyjaśnić nieprzepuszczalnością ściany komórkowej bakterii dla tego związku. Gdy bowiem zniszczono błonę komórkową tych drobnoustrojów występował pod wpływem AMC szybki i wyraźny spadek włączania znakowanej leucyny (54, 76).

Obecnie uważa się, że wpływ AMC na biosyntezę białka jest pośredni, ponieważ hamowanie syntezy białek nie jest natychmiastowe, podczas gdy hamowanie syntezy RNA następuje bardzo szybko (3).

3. Wpływ AMC na wzrost drobnoustrojów i wirusów

Biologiczna aktywność AMC jest wybiórcza. AMC wywiera hamujący wpływ na bakterie gramdodatnie, podczas gdy drobnoustroje gramujemne są niewrażliwe na ten antybiotyk (117). Wpływ AMC na powstawanie DNA w bakteriach jest mniej wyraźny niż na syntezę białek (82, 101). Działanie AMC na drobnoustroje zasadniczo ma charakter bakteriostyczny, chociaż u pewnych szczepów *B. subtilis* wywołuje szybko lizę (cyt. wg 95). Przy progowych stężeniach antybiotyku może zachodzić powolny wzrost bez podziału komórek, przy czym stosunki różnych związków wielkocząsteczkowych są zmienione (60, 67). Przy stężeniach AMC powodujących zahamowanie wzrostu *B. subtilis* w 60-70%, synteza β -galaktozydazy i amylazy ulega zahamowaniu w tym samym stopniu, a indukcja α -glukozydazy przy pomocy maltozy w tych samych warunkach zostaje zahamowana w 90-95%.

AMC hamuje namnażanie wirusów zawierających DNA, ale nie działa na wirusy, których materiał genetyczny stanowi RNA. Wrażliwość procesu namnażania *Vaccinia-virusa* (DNA-wirus) jest jednak nieco mniejsza niż drażliwość podziału komórki gospodarza: 0,4 μg AMC/ml hamuje wzrost wirusa w 99%, podczas gdy podział komórek gospodarza zostaje zatrzymany całkowicie już przy stężeniu AMC 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Natomiast nawet bardzo duże stężenia AMC (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nie hamują wzrostu i nie wpływają na wydajność *Mengo* wirusa (RNA-wirus) (92).

Wśród wirusów zwierzęcych można wyróżnić, z uwagi na drażliwość na AMC przynajmniej dwie grupy: a) wirusy, których namnażanie nie zmienia się przy wprowadzeniu w czasie infekcji wysokiego stężenia antybiotyku (>2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), które hamuje całkowicie syntezę RNA komórki gospodarza, b) wirusy, których wzrost podlega wyraźnemu zahamowaniu przez niskie stężenie antybiotyku ($<0,1$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) (92, 93, 69, 109). Pewne wirusy nie dają się zakwalifikować do dwu wymienionych grup (7, 41).

Całkowite hamowanie syntezy komórkowego RNA przez AMC umożliwiło wyjaśnienie powstawania wirusowego RNA po infekcji zarówno wirusem polio (108) jak i innymi wirusami (57, 69, 79). Właściwości kwasu nukleinowego produkowanego w syntezie kierowanej przez wirusy sugerują, że w przypadkach infekcji wirusem opornym na AMC cały powstający RNA jest podobny do RNA wirusa (56).

Inne badania wykazały (35, 116), że AMC może wyraźnie podwyższać wzrost wirusa i hamować produkcję interferonu. Wirusowa infekcja komórek kręgowców często indukuje syntezę interferonu, białka, które z kolei hamuje namnażanie tegoż wirusa. Obserwacja ta ma duże znaczenie dla oceny możliwości istnienia wewnątrzkomórkowej obrony przed infekcją wirusową. Znane są trzy hipotezy syntezy interferonu:

1) synteza jest kierowana przez kwasy nukleinowe infekcyjnego wirusa,

2) wirus infekujący aktywuje prekursory interferonu normalnie występujące w niezakażonej komórce.

3) synteza interferonu jest ukrytą funkcją komórkową indukowaną przez infekcję wirusową (lub inny stymulator). AMC jest antagonistą procesu syntezy interferonu, ponieważ ma zdolności blokowania syntezy komórkowego RNA bez wpływu na syntezę wirusowego RNA. Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że synteza interferonu jest raczej pod kontrolą genetyczną komórkowego DNA, a nie wirusowego RNA.

4. Wpływ AMC na czynność hormonów

Mechanizm działania hormonów jest interpretowany jak dotąd raczej w sposób hipotetyczny. Ostatnie badania wykazały, że przeważająca grupa hormonów bierze udział w syntezie białka. Niektórzy badacze uważają nawet (19), że „hormony” są pierwotnymi induktorami enzymów”. Hipoteza, że hormony działają poprzez syntezę mRNA wydaje się prawdopodobna, ponieważ grupa hormonów hamowanych przez AMC obejmuje wiele hormonów ściśle związanych z wytwarzaniem mRNA. Według K a r l s o n a (64) hormony kontrolują aktywności genów przede wszystkim w procesach wzrostu i różnicowania.

Działanie aktynomycyny na czynność hormonów ilustrują poniższe przykłady.

Podanie hormonu wzrostu embrionom kurzym wywołuje wyraźne zwiększenie wagi embrionu oraz wzrost zawartości RNA i DNA (2); podanie AMC hamuje syntezę RNA indukowaną przez ten hormon (112). Indukcja oksydazy tryptofanu hydrokortizonem ulega kompletnemu zahamowaniu pod wpływem AMC (45). Obie obserwacje wskazywałyby, że hormon kontroluje syntezę enzymu *de novo* poprzez indukcję syntezy mRNA. AMC zdecydowanie hamuje działanie estrogenów zarówno na syntezę RNA jak i białka (53, 115). Ponieważ zdolność rybosomów do syntezy białka zależy od estrogenów (46), zatem wydaje się, że AMC pośrednio wpływa na mRNA hamując jego enzymatyczną resyntezę.

Androgeny między innymi katalizują włączanie znakowanej węglem ^{14}C waliny do białek. Po kastracji znakowanie wyraźnie maleje, ale po podaniu testosteronu wraca do normy (110). Testosteron indukuje syntezę dehydrogenazy kwasu mlekowego. To działanie androgenów jest hamowane przez AMC (43). Stymulacja wbudowywania aminokwasów w białka (78) jak też stymulacja znakowania RNA (25, 78, 125, 126) wywołana przez insulinę jest również hamowana przez AMC. Miejscem działania AMC jest zapewne również mRNA.

Wiadomo też (16, 97), że AMC-D hamuje działanie tyroksyny stymulującej syntezę enzymów adaptatywnych i prawdopodobnie regulującej syn-

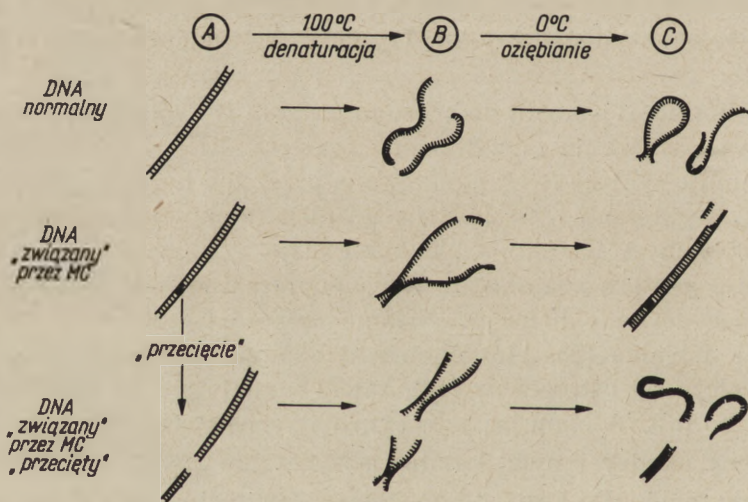
tezę pewnych mitochondrialnych białek biorących udział w oksydatywnej fosforylacji.

Antymetaboliczne działanie antybiotyków na czynność hormonów zostało opracowane bardzo szczegółowo przez Samuela (99).

IV. Aktynomycyna, a inne antybiotyki o antymetabolicznym działaniu

Phleomycyna jest antybiotykiem i jednocześnie czynnikiem przeciwrakowym. W przeciwieństwie do AMC hamuje ona syntezę DNA nie wpływając bezpośrednio na syntezę RNA lub białek w *E. coli* i komórkach HeLa. Hamuje ona *in vitro* polimerazę DNA, jak też nukleazę działającą na zakończenie łańcucha DNA, nie wpływa natomiast na endonukleazę (28).

Mitomycyna, która jest również silną substancją przeciwrakową wpływa zupełnie odmiennie na syntezę RNA niż AMC (111). Podczas gdy AMC hamuje syntezę mRNA przez blokowanie matrycy DNA wiążąc jego guaninę, ale pozostawia aparat genetyczny nieuszkodzony i zdolny do replikacji, to mitomycyna uszkadza geny, kontrolujące syntezę różnych typów komórkowego RNA. Działanie jej polega na wnikaniu pomiędzy

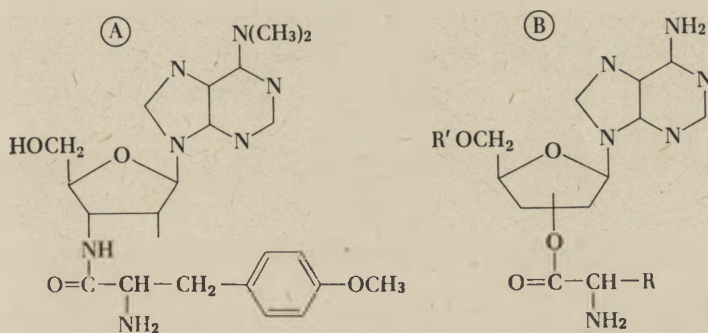


Rys. 3. Wpływ mitomycyny (MC) na przemianę cząsteczki DNA po denaturacji cieplnej i szybkim oziębieniu (111)

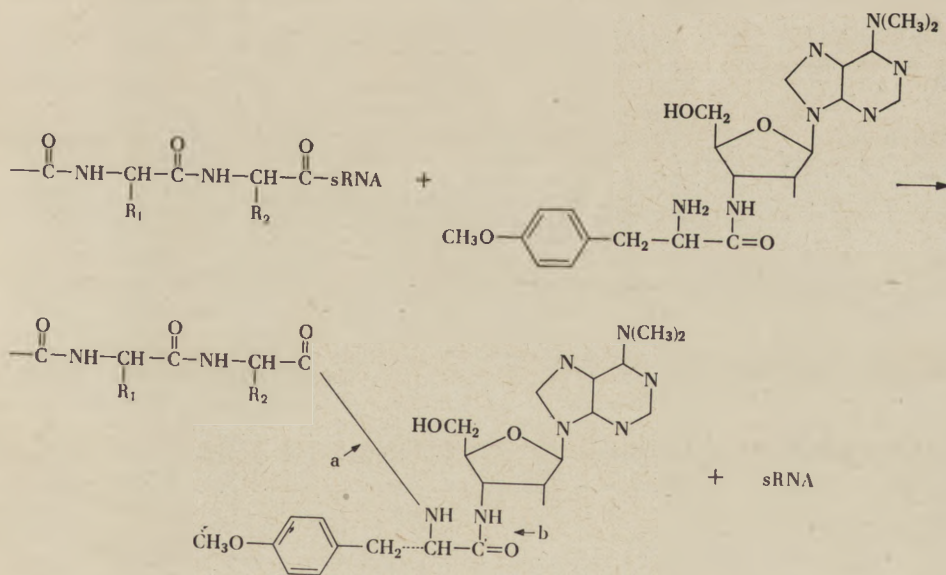
łańcuchy natywnego DNA, rozrywaniu wiązań wodorowych, a następnie tworzeniu innych, silniejszych, kowalentnych wiązań krzyżowych między tymi łańcuchami (prawdopodobnie między najbliższymi guaninami lub cytozynami dwóch sąsiednich łańcuchów), co prowadzi do śmierci komórki. Z drugiej strony, mitomycyna, w swoim normalnym utlenionym stanie nie reaguje *in vitro* z oczyszczonym DNA. Dopiero redukcja

enzymatyczna zależna od NADPH, albo redukcja chemiczna mitomycyny umożliwia jej działanie. Związana przez mitomycynę cząsteczka DNA zmienia właściwości fizyczne i przy denaturacji cieplnej nie ulega rozszczepieniu w miejscach związanych przez mitomycynę. Części łańcuchów rozszczepionych w miejscach nie związanych przez mitomycynę, po szybkim ochłodzeniu do 0° ulegają renaturacji, podczas gdy natywny DNA w tych warunkach nie renaturuje się. Mechanizm działania mitomycyny na cząsteczkę DNA przedstawiony jest na rysunku 3.

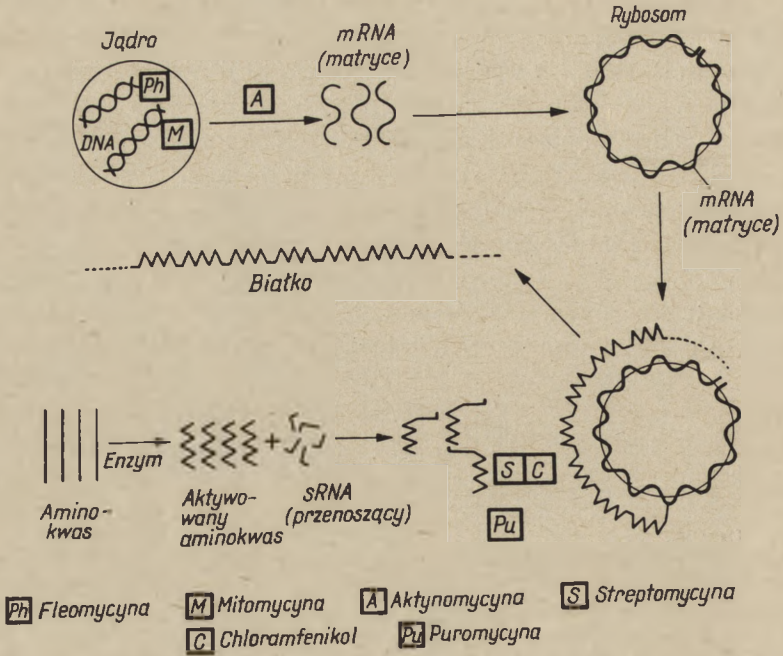
Chloramphenicol (chloromycetyna) jest antybiotykiem, który hamuje syntezę białka zarówno w komórkach zwierzęcych jak i bakteryjnych (123). Wydaje się, że może on hamować funkcjonowanie informacyjnego



Schemat 3. Analogia w budowie puromycyny i aminoacylo-sRNA (83, A — puromycyna B — aminoacylo-sRNA)



Schemat 4. Chemizm hamującego działania puromycyny na biosyntezę łańcucha polipeptydowego (83)



Rys. 4. Miejsca hamowania syntezy białka i kwasów nukleinowych przez antybiotyki o działaniu antymetabolicznym*

Antybiotyki hamujące syntezę białka i kwasów nukleinowych* Tablica 3

Nazwa	Źródło	Stężenia stosowane	Działanie
Phleomycyna	<i>Streptomyces verticillus</i>	100 µg/ml	hamowanie polimerazy DNA
Mitomycyna (A, B, C, porfiromycyna)	<i>Streptomyces caespitosus</i>	0,5-2,0 µg/ml (drobno- ustroje) 0,02 µg/ml (lu- dzka linia komórkowa Dg8 S)	krzyżowe wiązanie nici DNA
Aktynomycyna (C ₁ , X ₂ , X ₀₈ , X _{0β} , X _{1a})	<i>Streptomyces antibioticus</i>	2,0 µg/ml	tworzenie kompleksu z DNA kierującym syntezą mRNA, hamowanie polimerazy RNA
Streptomycyna	<i>Streptomyces griseus</i>	10 ⁻⁶ M	blokowanie przyłączenia mRNA do rybosomów?
Chloramfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	5 · 10 ⁻⁵ M	hamowanie przenoszenia aktyw. aminokwasów z sRNA do rybosomów
Puromycyna	<i>Streptomyces albo-niger</i>	10 ⁻³ M	„ „

* J. Hawiger — Dane z referatu wygłoszonego w Zakładzie Bakteriologii PZH.

RNA drogą kompetycji o miejsce wiązania z rybosomami. Przemawia za tym hamowanie przez chloramycetynę syntezy białka uprzednio indukowanej przez mRNA (123). Hamujący wpływ na biosyntezę białka w rozmnażających się komórkach może być przyczyną obserwowanej toksyczności hematologicznej chloramfenikolu.

Puromycyna, znany od 1952 r. antybiotyk hamujący wzrost komórek zwierzęcych, nie odegrała roli w leczeniu, ma jednak duże znaczenie w pracach badawczych, ponieważ specyficznie hamuje syntezę białka (83), przy czym synteza RNA i DNA przebiega normalnie. Proces hamowania jest odwracalny. Puromycyna działa na biosyntezę białek jako analog strukturalny zestryfikowanego sRNA (127).

Stosując peptydazę wykazano, że zostaje wytworzone wiązanie peptydowe pomiędzy grupą końcową wzrastającego łańcucha peptydowego i wolną grupą aminową puromycyny (schemat 4), analogicznie do tworzenia wiązania peptydowego w syntezie białka. W ten sposób puromycyna usuwa peptyd związany na mRNA i zatrzymuje rozbudowę łańcucha. Być może reakcję między łańcuchem peptydowym i puromycyną katalizuje ten sam enzym, który wytwarza wiązanie peptydowe w syntezie białkowej.

Rysunek 4 i tablica 3 ilustrują możliwe drogi działania omawianych antymetabolitów, spełniających istotną rolę w badaniu różnych szlaków metabolicznych.

Uwagi końcowe

Mimo bardzo licznych badań wielu aspektów działania AMC nie zdołano wyjaśnić do końca np. fizykochemicznych parametrów tworzenia kompleksu z DNA, działania czynników zewnętrznych na reakcję kompleksowania, rozmieszczenia AMC wewnątrz jądra, działania mutagennego AMC, odporności bakterii i zwierząt na AMC, immunologii. Jednak dzięki swemu specyficznemu oddziaływaniu na procesy metaboliczne AMC może mieć zastosowanie jako model badania szeregu tych procesów.

Resumując wszystkie dane dotyczące biochemii i działania aktynomycyny można przyjąć, że struktura chemiczna zarówno AMC jak i DNA gra pierwszorzędą rolę w oddziaływaniu wzajemnym między tymi związkami, a więc i w efektach metabolicznych wynikających z zablokowania syntezy mRNA na matrycy DNA.

AMC może być przy umiejętnym stosowaniu wykorzystana do zwalczania niektórych nowotworów. Z powodu jednak znacznej toksyczności wydaje się nieprawdopodobne wykorzystanie AMC do celów terapeutycznych w większym zakresie niż dotychczas. AMC w ziarnicy złośliwej (cyt. wg 72) dawała wyniki korzystne w 60%, ale tylko wtedy, gdy leczenie stosowano we wczesnych okresach schorzenia. W przypadkach pierwotnych raków płuc antybiotyk był nieskuteczny. W przypadkach

raka macicy i przerzutów w płucach AMC dawała efekty poprawy stanu ogólnego, szczególnie gdy inne sposoby leczenia zawodziły.

Po zastosowaniu aktynomycyny K (onkostatyny K) (77a) zaobserwowano wiele objawów ubocznych o charakterze toksycznym (spadek liczby krwinek białych i płytkowych, wypadanie włosów). Indywidualna tolerancja na lek jest niejednakowa. Część chorych, przy stopniowym stosowaniu tego leku, doszła do bardzo wysokiej dawki 12 000—16 000 μ g (dawka dzienna 200 μ g), u innych natomiast po osiągnięciu dawki 2000 μ g aktynomycyny K występowały objawy nudności, osłabienia, łaknienia itp.

LITERATURA

1. Acs G., Reich E., Valanji S., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 68 (1963).
2. D'Acunzo L., Guidice G., *Life Sc.* **2**, 624 (1963).
3. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 247 (1963).
4. Amos H., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 269 (1964).
5. Ball A. K., Gross P. R., *Science* **139**, 584 (1963).
6. Beers R. F., Fourth Int. Congr. Biochem., Vienna, Sect. 3—7, 1958.
7. Bossi R., Hütter R., Keller-Schierlein W., Neipp L., Zähler H., *Helv. Chim. Acta* **41**, 1645 (1958).
8. Brachet J., Denis H., *Nature* **198**, 205 (1963).
9. Brockmann H., Gröne H., *Naturwiss.* **41**, 65 (1954).
10. Brockmann H., Gröne H., *Chem. Ber.* **87**, 1036 (1954).
11. Brockmann H., *Fortschritte Chem. Org. Naturst.* **18**, 1 (1960).
12. Brockmann H., Lackner H., *Naturwiss.* **47**, 230 (1960).
13. Brockmann H., *Ann. NY Acad. Sci.* **89**, 323 (1960).
14. Brockmann H., *Chem. Ber.* **95**, 1081 (1962).
15. Brockmann H., Lackner H., *Naturwiss.* **51**, 435 (1964).
16. Bronk J. R., *Biochem. J.* **89**, 16P (1963).
17. Burchenal J. H., Oettgen H. F., Reppert J. A., Coley V., *Ann. NY Acad. Sci.* **89**, 399 (1960).
18. Burdette W. J., Gross P. R., *Science* **133**, 40 (1961).
19. Civin M., Knox W. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1787 (1959).
20. Cobb J. P., Walker D. G., *J. Natl. Cancer Inst.* **21**, 263 (1958).
21. Constantopoulos G., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 456 (1964).
22. Craveri R., Veronesi U., *Nature* **179**, 1306 (1957).
23. Darnell J. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 211 (1963).
24. Davidson E. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 53 (1963).
25. Eboüé-Bonis D., Chamban A. M., Volfin P., Clauser H., *Nature* **199**, 1183 (1963).
26. Elkind M. M., Whitmore G. F., Alescio T., *Science* **143**, 1454 (1964).
27. Elliott W. H., *Biochem. J.*, **86**, 562 (1963).
28. Falaschi A., Kornberg A., *Fed. Proc.* **23**, 940 (1964).
29. Flickinger R. A., *Science* **141**, 1063 (1963).
30. Foley G. E., *Antibiotics Annual*, str. 432, 1955—1956
31. Franklin R. M., Baltimore D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 175 (1962).

32. Franklin R. M., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 555 (1963).
33. Gałasiński W., Becarević A., Kanazir D., IV Symp. P. T. Bioch. Gdańsk, 1965.
34. Gelboin H. V., Blackburn N. R., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 657 (1963).
35. Gifford G. E., Heller E., *Nature* **200**, 50 (1963).
36. Girard M., Penman S., Darnell J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 205 (1964).
37. Goldberg I. H., Rabinovitz M., *Science* **136**, 315 (1962).
38. Goldberg I. H., Reich E., Rabinovitz M., *Nature* **199**, 44 (1963).
- 38a. Goldberg I. H., Rabinovitz M., Reich E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2094 (1962).
39. Goldberg I. H., Reich E., *Fed. Proc.* **23**, 958 (1964).
40. Goldstein M. N., Slotnick I. J., Journey L. J., *Ann N. Y. Acad. Sci.* **89**, 474 (1960).
41. Gomatos P. J., Tamm J., Dales S., Franklin R. M., *Virology* **17**, 441 (1962).
42. Gomatos P. J., Tamm J., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 651 (1963).
43. Goodfriend T. L., Kaplan N. O., *J. Biol. Chem.* **239**, 130 (1964).
44. Greengard O., Acs G., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 652 (1962).
45. Greengard O., Smith M. A., Acs G., *J. Biol. Chem.* **238**, 1548 (1963).
46. Greenman D. C., Kenney F. T., *Arch. Biochem.* **107**, 1 (1964).
47. Grunberg-Manago M., Ortiz P. J., Ochoa S., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 269 (1959).
48. Guidice G., Novelli G. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 383 (1963).
49. Hamilton L. D., Fuller W., Reich E., *Nature* **198**, 538 (1963).
50. Hamilton T. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 83 (1964).
51. Harris H., *Nature* **202**, 1301 (1964).
52. Hartmann G., Coy U., Kniese G., *Z. Physiol. Chem.* **330**, 227 (1962).
53. Haselkorn R., *Science* **143**, 682 (1964).
54. Haywood A. M., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **6**, 247 (1963).
55. Heilporn-Pohl V., *J. Embryol. Exptl. Morphol.* **12**, 439 (1964).
56. Holland J. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2044 (1962).
57. Homma M., Graham A. F., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 642 (1962).
58. Honig G. R., Rabinovitz M., *Fed. Proc.* **23**, 268 (1964).
59. Hurwitz J., Bresler A., Diringler R., *Biochim. Biophys. Res. Comm* **3**, 15 (1960).
60. Hurwitz J., Furth J. J., Malamy M., Alexander M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1222 (1962).
61. Johnson A. W., *Ann. NY Acad. Sci.* **89**, 336 (1960).
62. Journey L. J., Goldstein M. N., *Cancer Res.* **21**, 929 (1961).
63. Kahan E., Kahan F., Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **238**, 2491 (1963).
64. Karlson P., *Perspectives in Biol. Med.* **6**, 203 (1963).
65. Karsten W., Karsten H., Rauhen H. M., *Nature* **187**, 60 (1960).
66. Karsten W., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 610 (1961).
67. Karsten W., Karsten H., *Z. Physiol. Chem.* **327**, 234 (1962).
68. Katz E., *Ann. NY Acad. Sci.* **89**, 304 (1960).
69. Kingsbury D. W., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **9**, 156 (1962).
70. Kirk Julia M., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 167 (1960).
71. Klein N. W., Pierro L. J., *Science* **142**, 967 (1963).
72. Korzybski T., *Post. Biochem.* **3**, 121 (1957).
73. Kuryłowicz W., Ukleja-Bartkiewicz A., Roszkowski J., Kowszyk-Gindifer Z., *Arch. Immun. Ter. Dośw.* **9**, 443 (1961).

74. Lawley P. D., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 160 (1956).
- 74a. Levinthal C., Keynannaand A., Higa A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1631 (1962).
75. Levy H. B., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **113**, 886 (1963).
76. Mach B., Tatum E. L., *Science* **139**, 1051 (1963).
77. Manaker R., Gregory F. J., Vinning L. C., Waksman S. A., *Antibiotics Annual* str. 853, 1954—1955.
- 77a. Madejczyk A., Zborzil J., Żelechowska A., Żuławski M., *Nowotwory* **10**, 269 (1960).
78. Manchester K. L., Young F. G., *Vitamins, Hormones* **19**, 95 (1961).
79. Meritz J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 254 (1963).
- 79a. Meyer G. F., Hess O., *Chromosoma* (Berlin) **16**, 249 (1965).
80. Muramatsu M., Hodnett J. L., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 592 (1964).
81. Müller W., *Naturwiss.* **49**, 156 (1962).
82. Nakata A., Sekiguchi M., Kawamata J., *Nature* **189**, 246 (1961).
83. Nathans D., *Fed. Proc.* **23**, 984 (1964).
84. Nisman B., Pelmont J., De Mailly J., Yapo A., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **256**, 523 (1963).
q
85. Olson R. E., *Science* **145**, 926 (1964).
86. Perry R. P., *Exptl. Cell Res.* **29**, 400 (1963).
87. Petrović J., Gałasiński W., Becarević A., w przygot. do druku
88. Pierro L. J., *J. Exptl. Zool.* **147**, 203 (1961); **148**, 241 (1961).
89. Pollack M. R., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 80 (1963).
90. Pullman B., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 440 (1964).
91. Rauen H. M., Karsten H., Karsten W., *Z. Physiol. Chem.* **321**, 139 (1960).
92. Reich E., Franklin R. M., Shatkin A. J., Tatum E. L., *Science* **134**, 556 (1961).
93. Reich E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1238 (1962).
94. Reich E., Goldberg I. H., Rabinovitz M., *Nature* **196**, 743 (1962).
95. Reich E., *Cancer Research* **23**, 1428 (1963).
96. Reich E., *Science* **143**, 684 (1964).
97. Rosen F., *Cancer Research* **23**, 1447 (1963).
98. Rosen F., Prem Nath Raina Milholland R. J., Nichol Ch. A., *Science* **146**, 661 (1964).
99. Samuels L. D., *The New England J. of Medicine* **271**, 1252 (1964).
100. Schmidt-Kastner G., *Naturwiss.* **43**, 131 (1956).
101. Slotnick I. J., *Bact. Proc.* **59**, 130 (1959).
102. Slotnick I. J., *Ann. NY Acad. Sci.* **89**, 342 (1960).
103. Staechelin T., Wettstein F. O., Noll H., *Science* **140**, 180 (1963).
104. Steiner R. F., Beers R. F., Fourth Int. Congr. Biochem., Vienna, Sect. 3/38, 1958.
105. Suskind R. G., *Fed. Proc.* **23**, 442 (1964).
106. Suskind R. G., *J. Cell Biol.* **24**, 309 (1965).
107. Schatkin A. J., Reich E., Franklin R. M., Tatum E. L., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 277 (1962).
108. Schatkin A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 310 (1962).
109. Simon E. H., *Virology* **13**, 105 (1961).
110. Segaloff A., *Cancer Research* **23**, 1459 (1963).
111. Szybalski W., Iyer V. N., *Fed. Proc.* **23**, 946 (1964).

112. Talwar G. P., Panda N. C., Sarin G. S., Tolani A. J., *Biochem. J.* **82**, 173 (1962).
113. Trakatellis A. C., Axelrod A. E., Montjar M., *Nature* **203**, 1134 (1964).
114. Uhr J. W., *Science* **142**, 1476 (1963).
115. Ui H., Mueller G. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 256 (1963).
116. Wagner R. R., *Nature* **204**, 49 (1964).
117. Waksman S. A., Woodruff H. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **45**, 609 (1940).
118. Waksman S. A., Gregory F. J., *Antibiotics and Chemoter.* **4**, 1052 (1954).
119. Waksman S. A., Katz E., Vinning L. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 602 (1958).
120. Weber G., Singhal R. L., Stamm N. B., *Science* **142**, 391 (1963).
121. Weber G., Singhal R. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 521 (1964).
122. Weiss S. B., Nakamoto T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 140 (1961).
123. Weisberger A., Wolfe S., *Fed. Proc.* **23**, 976 (1964).
124. Wheeler G. P., Bennett L. L., jun., *Biochem. Pharmacol.* **11**, 353 (1962).
125. Wool J. C., *Am. J. Physiol.* **199**, 719 (1960).
126. Wool J. C., Munro A. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 918 (1963).
127. Yarmolinsky M. B., De La Haba G. L., *Proc. Natl. Acad. USA* **45**, 1729 (1959).
128. Zepf K., Berg H., *Die Pharmazie* **14**, 396 (1959).

K o m u n i k a t

W dniu 6.XII.1965 roku odbyło się w Warszawie ogólnopolskie spotkanie fotobiologów zorganizowane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne, na którym powołano do życia Komisję Fotobiologiczną. Celem Komisji będzie popieranie rozwoju i popularyzacja badań fotobiologicznych. W spotkaniu wzięło udział 28 osób, w tym 14 z Warszawy, 11 z Krakowa oraz po jednej osobie ze Szczecina, Torunia i Poznania. Zebrani reprezentowali zarówno ośrodki naukowe zajmujące się biologicznymi aspektami wpływu promieniowania elektromagnetycznego na żywy organizm jak i ośrodki zainteresowane problemami fotochemii w zastosowaniu do fotobiologii oraz podstawowymi badaniami fotochemicznymi. Przewodniczącym Komisji został Prof. dr D. Shugar (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), wiceprzewodniczącym — prof. dr J. Zubrzycki (Katedra Fizjologii Roślin UJ) a sekretarzem — doc. dr K. L. Wierzchowski (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN).

Postanowiono zorganizować pierwsze krajowe sympozjum fotobiologiczne w maju 1966 roku w Krakowie oraz zgłosić przystąpienie do Międzynarodowego Komitetu Fotobiologicznego zajmującego się współpracą fotobiologów i fotochemików w skali międzynarodowej.

Adres Komisji: *Doc. dr K. L. Wierzchowski*, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa 12, ul. Rakowiecka 36.

KAZIMIERZ OSTROWSKI*

Zastosowanie nieodwracalnych znakowanych inhibitorów w cytochemii

The Application of Labelled Irreversible Inhibitors in Cytochemistry

The new princip of detection and quantitative evaluation of some enzymes by use of labelled irreversible inhibitors is described. The application of ^3H -DFP for cytochemical detection of Acetylocholine esterase, Unspecific esterases and the Transport-ATPase is discussed.

W 1961 r. K. Ostrowski i E. A. Barnard (6) zaproponowali cytochemiczną metodę wykrywania enzymów przy użyciu nieodwracalnie wiążących się inhibitorów. Zastosowanie inhibitorów znakowanych izotopami promieniotwórczymi pozwala wykrywać ich połączenia z enzymem na drodze autoradiografii. W powstających połączeniach inhibitorów z cząsteczką enzymu jedna cząsteczka inhibitora wiąże się wiązaniami kowalencyjnymi z jednym ośrodkiem aktywności enzymatycznej cząsteczki enzymu.

Powszechnie stosowane metody histochemiczne (8) opierają się na wykrywaniu produktu reakcji enzymatycznej, który wypada w postaci barwnego nierozpuszczalnego związku w bezpośrednim sąsiedztwie czynnego enzymu. Reakcje te więc w najlepszym wypadku pokazują lokalizację aktywności enzymatycznej, natomiast interpretacja kinetyki tych reakcji jest albo niemożliwa, albo wymaga specjalnych dodatkowych technik, jak mikroskopia interferencyjna. Proponowana nowa zasada posiada szereg zalet ale także i wad w stosunku do powszechnie dotychczas używanych metod histochemicznych.

Teoretycznie można przewidywać następujące zalety proponowanej metody: 1) cytochemiczne określanie enzymów przy pomocy nieodwracal-

Skróty:

Achaza — esteraza acetylocholinowa; t-ATP-aza — transport-ATP-aza; DFP — dwuizopropylfluorofosforan; T-DFP — znakowany trytem DFP; 2-PAM — jodek pirydyno-2-aldoksymetylowy; PCMB — *p*-chloro-rtęcio-benzoesan; PCMS — *p*-chloro-rtęcio-sulfonian.

* Prof. dr, kierownik Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie.

nych inhibitorów stanowić powinno doskonałą kontrolę dla używanych dotychczas konwencjonalnie metod histochemicznych, ponieważ źródła błędów obu rodzajów reakcji są oczywiście zupełnie różne, 2) proponowana metoda daje szanse określania względnej i absolutnej ilości cząsteczek badanego enzymu w strukturze tkankowej ze względu na stałe stosunki ilościowe łączenia się jednej cząsteczki inhibitora z jednym ośrodkiem aktywności cząsteczki enzymu, 3) przy pomocy proponowanej reakcji można pokusić się o przebadanie pewnych danych kinetycznych enzymu *in situ* i porównać je z danymi biochemicznymi. Można w ten sposób przebadać np. kinetykę wiązania się inhibitora z enzymem albo tzw. zjawiska „starzenia się” enzymu związanego z inhibitorem, 4) można wyobrazić sobie opracowanie tego typu reakcji dla enzymów, dla których nie udało się znaleźć barwnych reakcji histochemicznych.

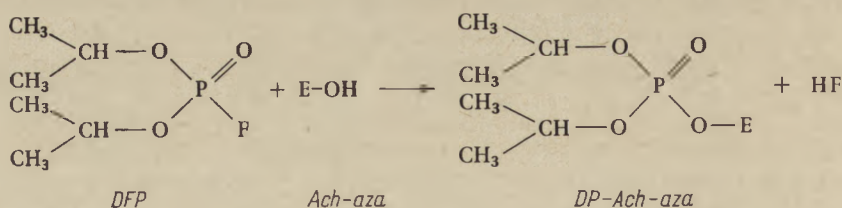
Oczywistą wadą proponowanej metody jest skomplikowanie jej zastosowaniem autoradiografii. Oprócz komplikacji technicznych autoradiografia obciążona jest niezbyt dobrą zdolnością rozdzielczą, która w mikroskopii świetlnej wynosi dla trytu 1-2 μ , zaś w mikroskopii elektronicznej wynosi w chwili obecnej od 500—800 Å.

Na poniższych przykładach przedyskutowane będą niektóre możliwości wykorzystania wyżej omówionej zasady. Przedstawione mianowicie będą wyniki zastosowania jednego z inhibitorów należących do grupy fosforanów organicznych — dwuizopropylodifluorofosforanu (DFP) w badaniach następujących enzymów: a) esterazy acetylocholinowej w płytkach ruchowych przepony, b) nieswoistych esteraz wątroby i nerek, c) transport — ATP-azy nerek.

Badania nad lokalizacją i ilościowym określaniem esterazy acetylocholinowej (Achaza) w płytkach ruchowych przepony myszy

DFP jest wysoce swoistym nieodwracalnym inhibitorem, który blokuje już w stężeniu 10^{-7} M Achazę, łącząc się z seryną ośrodka aktywności tego enzymu (schemat 1).

Ze względu na wysoką toksyczność DFP uzyskanie znakowanego związku okazało się niełatwym zadaniem. Znakowany trytem oraz fosforem 32 DFP można obecnie uzyskać z *Ammersham* lub *New England Nu-*



Schemat 1. Wiązanie się DFP z seryną ośrodka aktywności esterazy acetylocholinowej

clear Corp. Istotnym problemem w stosowaniu znakowanego inhibitora było stworzenie warunków swoistego wiązania się T-DFP wyłącznie z badanym enzymem.

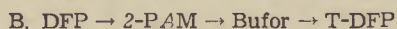
Sprawę swoistości reakcji rozwiązano w następujący sposób:

a) *Zasada protekcji substratem.* Jak wynika z badań biochemicznych Cohen i Warringa (3) obecność wysokich stężeń właściwego substratu chroni enzym przed zablokowaniem nawet przez nieodwracalnie wiążący się inhibitor. Wykorzystując to zjawisko zastosowano następującą kolejność postępowania. Przeponę myszy utrwaloną w formalinie przenoszono do środowiska zawierającego acetylocholinę w stężeniu 10^{-3}M , następnie utrzymując to stężenie substratu dodawano nieznakowany DFP w stężeniu 10^{-4}M . W tych warunkach nieznakowany DFP wiązał się ze wszystkimi enzymami innymi niż Achaza oraz z wszystkimi nieenzymatycznymi substancjami ewentualnie reagującymi z tym inhibitorem. Po elucji substratu stosowano znakowany trytem DFP w stężeniu 10^{-4}M , który blokował Achazę do tej pory chronioną przez duże stężenia substratu. Z tak przygotowanego materiału sporządzono autoradiogramy.

b) *Zasada swoistego reaktywowania.* W związku z możliwością stosowania DFP jako gazu bojowego a także przypadkowych zatruć tym związkiem, opracowano substancję nukleofilną (14, 15), która w sposób swoisty wypiera DFP z Achazy. Substancją tą jest jodek pirydyno-2-aldoksymetylowy (2-PAM). 2-PAM reaktywuje Achazę w sposób swoisty wypierając bardzo wolno DFP związany z innymi esterazami. Wykorzystując właściwości tej substancji zastosowano następującą procedurę: utrwaloną w formalinie przeponę myszy blokowano nieznakowanym DFP 10^{-4}M . Następnie odblokowywano Achazę przez stosowanie 2-PAM w stężeniu 10^{-3}M . Na odblokowany enzym działano znakowanym trytem DFP (T-DFP) uzyskując w ten sposób swoiste napiętnowanie radioizotopem badanego enzymu.

Zasada protekcji substratem jak i zasada swoistego reaktywowania dały wg przewidywań identyczne wyniki zarówno co do lokalizacji jak i ilości ziaren srebra w autoradiogramach płytek ruchowych przepony.

Wyżej opisane sposoby postępowania mogą być i były kontrolowane barwną reakcją histochemiczną wg Koelliego (7). Reakcja ta polega na inkubowaniu badanej tkanki w środowisku zawierającym acetylotiocholiny jako substrat. Po hydrolizie w miejscu aktywności enzymatycznej wypada osad soli miedziowej tiocholiny. Osad ten staje się widoczny po przekształceniu go w czarny siarczek miedzi. Przy pomocy reakcji



Schemat 2. Dwa warianty postępowania dla uzyskania swoistego wiązania T-DFP z esterazą acetylocholinową

Koellego kontrolowano poszczególne stadia (schemat 2) opisanych procedur.

Przy użyciu DFP znakowanego trytem można porównywać ilościowo stężenie znakowanego inhibitora stosując albo liczenie ziaren, albo szczególnie rodzaj fotometrii przy użyciu światła odbitego (10). Dane ilościowe uzyskane na tej drodze są wartościami względnymi. Przyczyna tego leży w istocie autoradiografii trytu. Trudna lub niemożliwa do ustalenia jest mianowicie wydajność tj. ilość ziaren srebra uzyskanych z określonej ilości dezintegracji w warstwie nieskończenie grubej. Nie mniej jednak pomiary względne oparte na liczeniu ziaren mogą być źródłem wielu interesujących informacji. Różne ilości ziaren srebra, przypadające na jednostkę powierzchni, są wykładnikiem różnych stężeń radioizotopu przypadającego na porównywane obszary. Przykładem takiego wykorzystania danych ilościowych uzyskanych tą metodą jest ocena wpływu utrwalaczy na ilość enzymu dostępnego dla inhibitora, lub wpływu innych inhibitorów, np. ezeryny na ilość związanego DFP przedstawiona w pracy Barnarda i Ostrowskiego (1).

Na drodze liczenia ziaren wykazano możliwość określania wspomnianych we wstępie niektórych parametrów kinetycznych enzymu. Tablica 1 pokazuje zależności czasowe pełnego wysycenia się inhibitorem enzymu zawartego w płytce ruchowej przepony.

Tablica 1

Szybkość wiązania się DFP z enzymem *in situ* (wg 10)

Czas	Ilość ziaren nad 9 μ^2 płytki ruchowej	\pm S.D.	v.c.	n	Ilość ziaren nad wł. mięśniowym w obszarze 900 μ^2 (tło)	\pm S.D.	c.v.	n
1 min.	obecności płytek ruchowych nie daje się wykazać				5,7	1,9	33,3	10
2 min.					6,4	2,1	32,8	10
5 min.	2,41	1,16	48,1	100	7,6	1,6	21,1	10
10 min.	7,69	1,55	20,2	100	10,6	1,7	16,0	10
20 min.	7,89	1,63	20,8	100	11,3	2,0	17,8	10

+ S.D. = odchylenie standartowe; v. c. = współczynnik zmienności; n = ilość liczonych pól

Najbardziej atrakcyjną wydaje się możliwość określania bezwzględnej ilości cząsteczek enzymu w płytce ruchowej. Schemat 3 pokazuje dwa możliwe sposoby podejścia do tego zagadnienia. Przyjrzyjmy się bliżej tym możliwościom. Pierwsza z nich polega na tym, że fragment przepony przygotowuje się tak, by wysycić w sposób swoisty cząsteczki enzymu T-DFP. Można tu stosować zarówno metodę protekcji substratem jak i swoistej reaktywacji. Z takiego fragmentu przepony ekstrahuje się związany inhibitor w sposób swoisty przy pomocy 2-PAM, a ilość inhibitora określa się w sposób bezwzględny w liczniku scyntylacyjnym.

Wyekstrahowane, a więc reaktywowane pod względem enzymatycznym płytki ruchowe wybarwia się histochemicznie reakcją Koellego i w sposób bezpośredni na preparacie gnecionym określa się ich ilość pod mikroskopem. Stąd można obliczyć ilość cząsteczek inhibitora przypadającego na jedną płytkę ruchową.

1. Podbarwienie reakcją histochemiczną
2. T-DFP lub ^{32}P -DFP („zimne” DFP dla kontroli)
3. Przemycie „zimnym” DFP
4. Utrwalenie formaliną
5. Przemycie buforem
6. Izolacja włókien mięśniowych zawierających płytki ruchowe oraz fragmentów włókien bez płytek



Schemat 3. Schemat postępowania w celu określenia bezwzględnej ilości cząsteczek Achazy w płytce ruchowej

Drugim podejściem jest użycie DFP znakowanego ^{32}P i określenie bezwzględnej ilości inhibitora przypadającego na płytkę ruchową przy pomocy autoradiografii śladowej. W wyżej opisanej metodzie ekstrakcyjnej nie używano ^{32}P -DFP, ponieważ aktywność właściwa tego związku jest stosunkowo niska. Nieprzydatność tego związku dla autoradiografii kontrastowej jest oczywista ze względu na właściwości fizyczne ^{32}P , a mianowicie wysoką energię promieniowania beta. Autoradiografia śladowa posiada szereg zalet w stosunku do autoradiografii kontrastowej. Pierwszą zaletą jest praktycznie biorąc brak tła. Jest wysoce nieprawdopodobne, by przypadkowe promieniowanie jonizujące ułożyło ziarna w kształcie śladu charakterystycznego dla promieniowania beta ^{32}P . Po drugie z geometrii autoradiogramów śladowych wynika, iż wydajność ich można określić na ok. 50%. Licząc więc ilość śladów wychodzących z pojedynczej płytki ruchowej i znając aktywność właściwą inhibitora oraz czas ekspozycji można obliczyć bezwzględną ilość cząsteczek inhibitora związanego z jedną płytką ruchową.

Rogers i wsp. (11) opracowali dla badań techniką autoradiografii śladowej metodę izolacji poszczególnych włókien. Metoda ta pozwala oddzielać włókna zawierające płytki ruchowe od włókien, które płytek nie zawierają. Izolowane włókna powlekano grubą warstwą emulsji dla uzyskania wyraźnych śladów (rysunek 1).

Obie metody, tak liczenia w liczniku scyntylicyjnym jak i autoradiografii śladowej dały zbieżne wyniki co do ilości cząsteczek Achazy przypadającej na jedną płytkę. Wyniki te nie są jeszcze opublikowane.

Badania nad lokalizacją i ilościowym określaniem tzw. nieswoistych esteraz

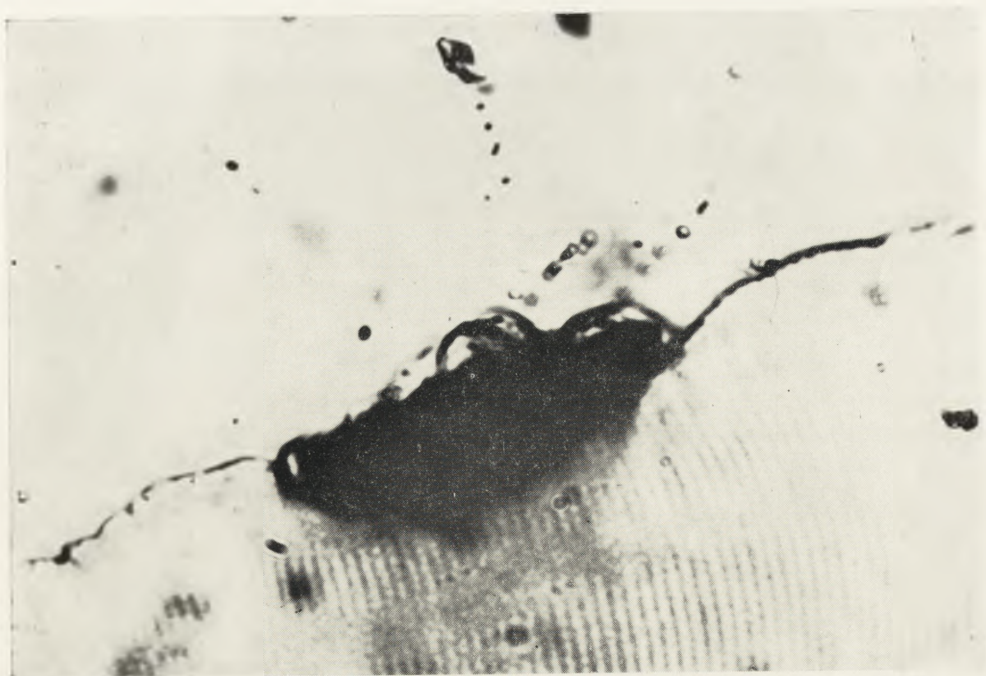
Nieswoiste esterazy są niejednorodną grupą enzymów hydrolitycznych występujących we wszystkich komórkach. Zakres działania poszczególnych enzymów należących do tej grupy jest różny, ale często zakresy działania zachodzą na siebie tak, że ten sam związek jest substratem dla kilku enzymów. Z punktu widzenia działania inhibitorów nieswoiste esterazy można podzielić na: wrażliwe i odporne na działanie DFP. Przy stosowaniu barwnych reakcji histochemicznych na esterazy — w szczególności nadaje się do tego reakcja indoksylowa Holta — uzyskuje się na ogół jednolite wybarwienie cytoplazmy np. komórek wątroby czy kanalików nefronu. Po uprzednim zadziałaniu DFP reakcję dają wyłącznie esterazy odporne na działanie tego inhibitora, a reakcja barwna wystąpi również w cytoplazmie, ale w postaci dobrze ograniczonych okrągłych wakuoli. Niektórzy autorzy np. Novikow sądzą, iż te odporne na działanie DFP esterazy są enzymami lizosomalnymi.

Jak z powyższego wynika, metodą znakowanego DFP można badać wyłącznie esterazy wrażliwe na ten inhibitor — są to te enzymy, które leżą poza układem lizosomalnym i dają dyfuzyjne zabarwienie cytoplazmy

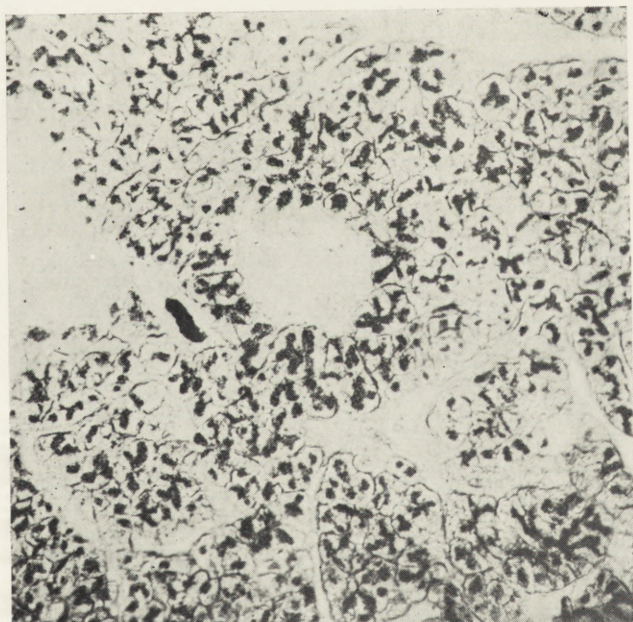
Tablica 2
Nieswoiste esterazy nerek (wg 9)

Substraty i inhibitory stosowane wraz z T-DFP		Ilość ziaren nad $9\mu^2$	\pm S.D.	v.c.
T-DFP	G1	0,84	0,83	98,8
	C _I	3,78	1,56	41,4
	C _{II}	0,82	0,87	106,1
β -metylo-acetylocholina	G1	0,63	0,81	128,5
	C _I	3,58	1,70	47,5
	C _{II}	0,80	0,96	107,5
Eseryna	G1	0,60	0,81	135,0
	C _I	2,86	1,68	58,7
	C _{II}	0,66	0,80	120,2
Octan fenylu + kwas acetylo-salicylowy	G1	0,63	0,80	126,9
	C _I	1,16	1,37	118,1
	C _{II}	0,58	0,76	131,0
Benzoilo-L-arginina	G1	0,74	0,98	132,4
	C _I	2,45	1,61	61,6
	C _{II}	0,53	0,81	152,8
Propionian α -akrylu	G1	0,67	0,88	131,3
	C _I	2,94	1,62	55,1
	C _{II}	0,76	0,88	115,7

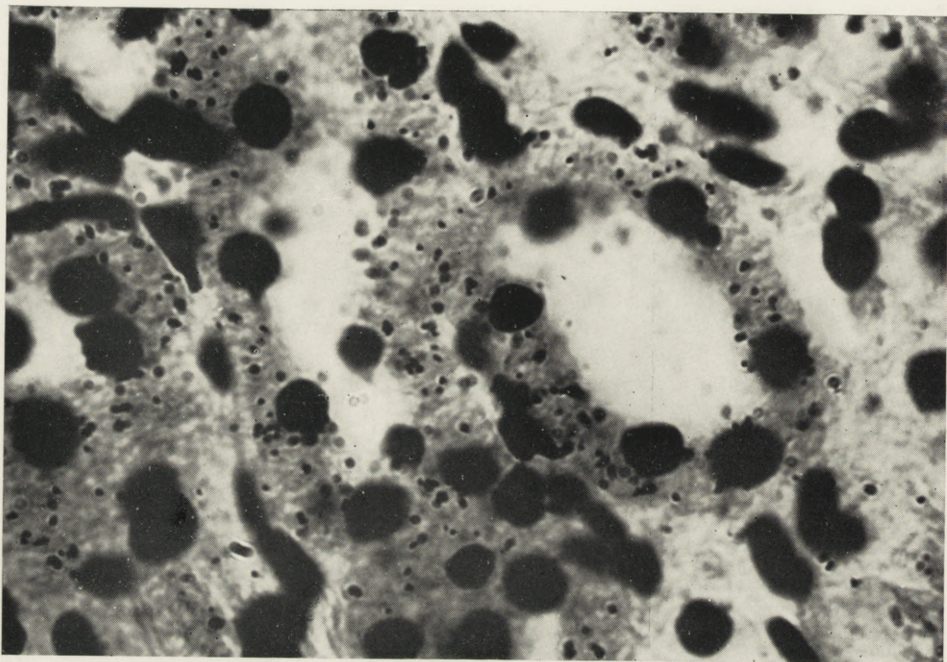
G1 = kłębek; C_I = kan. kręty części głównej nefronu; C_{II} = kanalik kręty dalszy — wstawka; n = 500



Rys. 1. Śladowy autoradiogram płytki ruchowej po zastosowaniu ^{32}P -DFP



Rys. 2. Autoradiogram trzustyki po inhibicji nieswoistych esteraz znakowanych DFP



Rys. 3. Nerka myszy; ziarna autoradiogramu wykazujące lokalizację T-ATPazy

przy użyciu barwnych reakcji histochemicznych. Dokładniejszej lokalizacji tych enzymów np. powiązania ich z siateczką endoplazmatyczną nie znamy.

Stosując DFP znakowany trytem (2) przebadano nieswoiste esterazy występujące w wątrobie i nerce myszy. Dla analizy zakresów działania tych enzymów, stosowano opisaną wyżej zasadę protekcji substratowej.

T a b l i c a 3

Ilości ziaren nad poszczególnymi odcinkami nefronu myszy odzwierciedlające różnice w ilości esteraz wrażliwych na DFP (wg 9)

	Kłębek	Kan. kręty I rzędu	Część gruba pętli Henle- go	Kan. kręty II rzędu	Tło
	Ilość ziaren nad powierzchnią 30,25µ ²				
Skrawek I	2,7±1,6 v.c. 59% n = 1000	7,4±2,3 v.c. 39% n = 1000	2,1±1,1 v.c. 52% n = 500	3,3±1,4 v.c. 42% n = 1000	0,2±0,5 n = 1000
Skrawek II	2,2±1,4 v.c. 63% n = 500	7,1±2,1 v.c. 29% n = 500	2,3±2,1 v.c. 91% n = 500	2,5±0,4 v.c. 16% n = 500	0,1±0,4 n = 1000

Dodając do środowiska inkubacyjnego zawierającego T-DFP różne substraty (tablica 2) wycinano poszczególne zakresy hydrolitycznego działania nieswoistych esteraz np. aktywność lipolityczną, chymotrypsynopodobną, acetylocholino-esterazową. Stosowano też substraty swoiste dla nieswoistych esteraz.

Badania przeprowadzone na nefronie (tablica 3) pozwoliły na określenie względnej ilości nieswoistych esteraz wrażliwych na DFP w poszczególnych częściach nefronu.

Wykonano również wstępne badania nad nieswoistymi esterazami w trzustce. Rysunek 2 pokazuje biegunową lokalizację ziaren srebra nad częścią szczytową komórek zewnątrzwydzielniczych. Widoczna jest niewielka ilość ziaren nad wyspami Langerhansa.

Badania nad „transport-ATP-azą”

„Transport ATP-aza” (t-ATP-aza) wykryta przez Skou (12), jest enzymem lub systemem enzymów, niedokładnie jeszcze określonych pod względem swojej budowy chemicznej. Enzym ten jest odpowiedzialny za pracę pompy sodowo-potasowej utrzymującej wysokie stężenie jonów

potasowych we wnętrzu komórek. Ten system enzymatyczny jest związany z błoną komórkową, o czym świadczy przebieg jego izolowania metodami biochemicznymi. Pogląd, iż istnieje biegunowa lokalizacja tego enzymu, np. lokalizacja przy błonie przypodstawnej komórek, jest uzasadniony teoretycznie, nie został jednak do tej pory udowodniony. Enzym ten występuje we wszystkich dotąd badanych komórkach. Niektórzy przypisują mu podstawowe znaczenie nie tylko dla regulacji gospodarki jonowej, ale także dla transportu aminokwasów poprzez błonę komórkową. t-ATP-aza ma do spełnienia szczególną rolę w nerce, biorąc czynny udział w resorpcji wtórnej. Dokładna lokalizacja tego enzymu w nerce nie jest znana. Można przypuszczać opierając się na tzw. teorii przeciwpądowej, iż dużą aktywność tego enzymu wykazywać powinna pętla Henlego. t-ATP-aza jest w sposób swoisty hamowana przez oubainę (strofantynę G).

Na oczyszczonych preparatach t-ATP-azy udało się określić właściwości biochemiczne tego enzymu (9, 13). Swoistym substratem jest ATP, od którego enzym ten odszczepia końcową grupę fosforanową. Produkt hydrolizy — ADP hamuje aktywność enzymu; natomiast inne związki jak AMP, UTP nie są substratami. Stwierdzono ścisłą zależność aktywności tego enzymu od obecności w środowisku jonów Mg^{++} , które mogą być zastąpione jonami Mn^{++} . t-ATP-aza należy do grupy ATP-az hamowanych przez jony Ca^{++} . PCMB lub PCMS niszczą aktywność enzymatyczną. Aktywność ta jest hamowana również przez małe stężenia oligomycyny i florydżyny. Stwierdzono też zależność aktywności t-ATP-azy od stężenia K^+ i Na^+ w środowisku.

Wyniki badań Hokina i Yody ogłoszone w 1964 r. (5) pozwoliły na opracowanie metody autoradiograficznego wykrywania t-ATP-azy. Pracując metodami biochemicznymi autorzy ci stwierdzili, iż DFP hamuje t-ATP-azę. DFP wiąże się z ośrodkiem aktywności enzymu poprzez serynę (a więc tak samo jak w esterazie acetylocholinowej). Najważniejsze z punktu widzenia opracowania histochemicznej metody autoradiograficznej było jednak ustalenie bezwzględnej zależności wiązania się enzymu z DFP od obecności jonów Mg^{++} . Stwierdzono na drodze biochemicznej zależność inaktywacji t-ATP-azy przez DFP od obecności jonów potasowych, natomiast nie znaleziono zależności od jonów sodowych. W obecności jonów K^+ można było stosować niższe stężenia molarne DFP. W badaniach biochemicznych Hokina i Yody oubaina zastępowała jony K^+ w środowisku. Jest to, jak się poniżej pokaże, jedyna różnica jaką stwierdzono pomiędzy układem biochemicznym a opracowanym układem histochemicznym. Odpowiednie stężenie ATP w środowisku inkubacyjnym chroni enzym przed działaniem inhibitorów. Inne nukleotydy tego efektu nie dają.

Opierając się na powyższych danych, opracowano następujący schemat postępowania dla uzyskania autoradiograficznej lokalizacji t-ATP-azy

(patrz schemat 4). Utrwalone w zimnej formalinie skrawki nerki umieszczano w środowisku pozbawionym jonów Mg^{++} a zawierającym niezna-

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. EDTA | inaktywacja t-ATPAzy przez usunięcie Mg^{++} |
| 2. DFP + EDTA | zablokowanie esteraz wrażliwych na DFP |
| 3. T-DFP + Mg^{++} + K^+ | swoiste znakowanie uczynionej t-ATPAzy |
| 4. DFP (w nadmiarze) | płukanie |
| 5. Autoradiografia | |

Kontrola: bez Mg^{++} , w obecności oubainy, oligomycyny etc.

Schemat 4. Postępowanie przy wykrywaniu „Transport-ATPAzy”

kowany DFP. W tych warunkach inaktywacji ulegną wszystkie esterazy wrażliwe na DFP, a t-ATP-aza wobec braku jonów Mg^{++} nie zwiąże się z DFP. W następnym stadium dodawano do środowiska jony Mg oraz T-DFP uzyskując jego związanie z enzymem zaktywowanym jonami Mg . Na autoradiogramach (rysunek 3) można było stwierdzić różne ilości ziaren srebra nad różnymi częściami nefronu. Stwierdzono zgodnie z przewidywaniami największe stężenie enzymu nad grubymi częściami pętli Henlego. W podobny sposób przebadano autoradiograficznie zmiany zachodzące wtedy, gdy w środowisku inkubacyjnym zawierającym T-DFP znajdowały się odpowiednie stężenia Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} oraz różne stężenia K, PCMB, AMP, ATP, i UTP.

Nie istnieją w tej chwili wiarygodne barwne reakcje histochemiczne pokazujące lokalizację t-ATP-azy. Zaproponowana przez Mc Clurkina (4) reakcja histochemiczna okazała się zarówno w naszych rękach jak i innych pracowniach niepowtarzalna.

Szczegółowe dane dotyczące t-ATP-azy są obecnie w opracowaniu i przygotowaniu do druku.

Autoradiografia w mikroskopie elektronowym

Proponowana metoda stosowania inhibitorów może być analizowana techniką autoradiografii w mikroskopie elektronowym. Zaletą tej metody jest polepszenie zdolności rozdzielczej autoradiografii o około jeden rząd wielkości. Najlepsze autoradiogramy uzyskiwane obecnie mają zdolność rozdzielczą równą około 500 Å. Rozważmy przykłady ilustrujące możliwość zastosowania tej metody: Istnieją sprzeczne poglądy co do lokalizacji esterazy acetylocholinowej w płytkach ruchowych. Wg większości autorów Achaza znajduje się wyłącznie na błonie postsynaptycznej. Wg Burnetta enzym ten występuje w pęcherzykach presynaptycznych. Nie wdając się w szczegółową dyskusję tej rozbieżności poglądów można stwierdzić, iż wykazanie lokalizacji Achazy przy pomocy znakowanego trytem DFP mogłoby przyczynić się do rozstrzygnięcia sporu. Zdolność rozdzielcza tej metody jest wystarczająco dobra dla rozstrzygnięcia pro-

blemu, zaś zupełnie inne źródła błędów tej metody pozwalają na dyskusję rozbieżności wyników uzyskanych metodami histochemicznymi opartymi na reakcjach enzymu z różnymi substratami. Innym zagadnieniem, które mogłoby być rozwiązane przy pomocy autoradiografii w mikroskopie elektronowym jest sprawa lokalizacji esteraz wrażliwych na DFP. Proponowana metoda mogłaby pomóc w ustaleniu z jakim narządem komórkowym te enzymy są związane.

Dyskutowane przykłady stosowania znakowanego inhibitora w badaniach cytochemicznych stanowią dowód realności tej metodyki i dla innych układów enzym-inhibitor, wymagających przebadania.

LITERATURA

1. Barnard E. A., Ostrowski K., *Exptl. Cell Res.* **36**, 28 (1964).
2. Barnard E. A., Ostrowski K., Darżynkiewicz Z., Rymaszewska D., *Exptl. Cell Res.* **36**, 43 (1964).
3. Cohen J. A., Warringa M. G. P., *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 52 (1953).
4. Mc Clurkin I. T., *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 654 (1964).
5. Hokin L. E., Yoda A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 454 (1964).
6. Ostrowski K., Barnard E. A., *Exptl. Cell Res.* **25**, 465 (1961).
7. Ostrowski K., Barnard E. A., Stocka Z., Darżynkiewicz Z., *Exptl. Cell Res.* **31**, 89 (1962).
8. Pearse A. G. E., *Histochemistry*, Churchill, London 1960.
9. Rendi R., Uhr M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 389 (1964).
10. Rogers A. W., *Exptl. Cell Res.* **24**, 228 (1961).
11. Rogers A. W., Barnard E. A., Ostrowski K., w druku.
12. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 6 (1960).
13. Wheeler K. P., Whittam R., *Biochem. J.* **93**, 349 (1964).
14. Wilson I. B., Ginsburg S., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 168 (1955).
15. Wilson I. B., Ginsburg S., Quan C., *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 286 (1958). (1958).



Prof. H. von Euler (z lewej) w rozmowie z Prof. Hevesy i Prof. Skarżyńskim.

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI*)

Hans von Euler
15.II.1873 — 8.XI.1964

Wiedz, że jedna na świecie oprze się jej potęga;
Światło wiedzy w tym życiu, brodzącym w ciągłych mrokach
Lukrecjusz, De Rerum Natur

W dniu 8 listopada 1964 r. zmarł w Sztokholmie w wieku lat 91 emerytowany profesor Hans von Euler (Chelpin), jedna z najbardziej popularnych postaci w biochemii. Euler, długoletni dyrektor Instytutu Biochemicznego Uniwersytetu w Sztokholmie, laureat Nagrody Nobla z 1929 r., był autorem ponad 2000 publikacji naukowych. Twórczej pracy naukowej poświęcił prawie trzy czwarte wieku, bowiem pierwsza praca Eulera: „Zależność pomiędzy temperaturą i stopniem dysocjacji niektórych kwasów” ukazała się w 1896 r., ostatnia natomiast: „Wyniki badań elektroforetycznych nad zawartością białek i enzymów w krwi i sieroicy zwierząt” — w 1964 r. Okres 68 lat wypełnił Euler nieustanną działalnością naukową, zachowując entuzjazm dla umiłowanej przez siebie dziedziny wiedzy. Do ostatnich dni działał w pełni sił fizycznych i umysłowych.

Profesor Euler urodził się 15 lutego 1873 r. w Augsburgu w Niemczech, w rodzinie wojskowej; ojciec jego był generałem niemieckim. Chemię i fizykę studiuje najpierw w Berlinie w latach 1893-1896 u Emila Fischera, H. Landolta i A. Kundta. Po otrzymaniu doktoratu za pracę na temat kompleksów molibdenowo-wanadowych (jednym z egzaminatorów Eulera przy promocji był Max Planck), udaje się do Getyngi i rozpoczyna naukę w zakresie chemii fizycznej w słynnym wówczas laboratorium Waltera Nernsta. W tym czasie Nernst pracował nad przewodnictwem elektrycznym żarzących się tlenków ziem rzadkich (lampa Nernsta) i przyjaźnił się z S. Arheniusem. Kiedy Arhenius zwrócił się do Nernsta o polecenie mu dobrego asystenta, ten wskazał na Eulera. W 1897 r. Euler jedzie do Sztokholmu i rozpoczyna pracę w drugiej ojczyźnie, zostając profesorem zwyczajnym chemii ogólnej i organicznej w 1906 r., a od 1929 r. kierownikiem Biokemiska Institutet przy Odengatan w Sztokholmie. W następnych latach ta placówka naukowa staje się sławna na cały świat, przyjeżdżają

*) Doc. dr, kierownik Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie.

do niej bowiem biochemicy z wielu krajów i zdobywa najwyższy autorytet w dziedzinie enzymologii.

Największym osiągnięciem Eulera są niewątpliwie badania nad fermentacją alkoholową, podczas których wykazał, że ten proces jest zależny nie tylko od białek-enzymów, ale również od rozpuszczalnych, niskocząsteczkowych substancji — kofaktorów. Wprawdzie już E. Buchner (1860-1917) przyjmował, że jego zymaza składa się z dwu składników, ale nie był w stanie tego udowodnić. Później tym problemem zajął się A. Harden (1865-1940) w Anglii wykazując, że fermentacja zależy od obecności fosforanu i innego składnika t.zw. kozymazy, odpornej na ogrzewanie w wyższej temperaturze. Mimo wysiłków Hardenowi i jego współpracownikowi Youngowi nie udało się kozymazy wydzielić i bliżej scharakteryzować. Właśnie w tym stadium badań nad rolą kofaktorów w fermentacji włączył się Euler ze swymi współpracownikami (F. Schlenk, R. Nilsson, K. Myrback, E. Adler) podejmując szczegółowe studia nad rolą kozymazy w poszczególnych reakcjach fermentacji. Wraz z Myrbackiem otrzymują kodehydrogenazę I w czystym stanie i ustalają strukturę tego związku. Za te badania i inne dotyczące procesów oksydacyjno-redukcyjnych w żywej komórce Euler otrzymuje w 1929 r. nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Z uwagi na również pionierskie osiągnięcia Hardena w dziedzinie fermentacji nagroda zostaje równo podzielona pomiędzy obu uczonych.

Innym poważnym osiągnięciem Eulera były badania nad przejściem beta-karotenu w witaminę A. Był pierwszym, który zaproponował uważać beta-karoten za prowitaminę A. Prowadząc badania nad analogami strukturalnymi kwasu nikotynowego wprowadza pojęcie antywitamina — termin przyjęty w nomenklaturze biochemicznej. Wiele lat pracy począwszy od II wojny światowej poświęcił badaniu zmian biochemicznych w tkankach nowotworowych. W nowotworach badał procesy oksydacyjno-redukcyjne, występowanie i aktywność różnych enzymów, zjawiska immunochemiczne i inne. Badania te są zawarte w dwóch znanych monografiach: „Biochemie der Tumoren” wydanej wraz ze Skarżynskim w 1942 r., oraz „Chemotherapie and Prophylaxe des Krebses” napisanej w 1962 r a więc zaledwie dwa lata przed śmiercią. Pierwsza monografia ma charakter oryginalnego i klasycznego dzieła w swoim zakresie, przetłumaczona na wiele języków, do dziś jest chętnie czytana przez tych, którzy zajmują się eksperymentalną onkologią.

Do Polaków profesor Euler odnosił się z sympatią i życzliwością a szczególne więzy łączyły go z naszym krajem poprzez osobę profesora B. Skarżynskiego. Profesor Skarżynski spędził bowiem w Instytucie Biochemii kierowanym przez Eulera całe 5 lat II wojny światowej. Obu uczonych łączyła szczerza przyjaźń i wzajemny szacunek, zarówno podczas pobytu profesora Skarżynskiego jak i później w latach powojennych.

Wiele anegdot i opowiadań, które miałem możność usłyszeć od profesora Skarżynskiego wskazywało, że profesor Euler był człowiekiem głęboko i wszechstronnie wykształconym, pełnym dynamizmu i nowych pomysłów naukowych, życzliwym dla swych licznych współpracowników. Na wieść o śmierci profesora Skarżynskiego w 1963 r. przysłał pełen żalu i współczucia list i był jednym z pierwszych, którzy nadesłali swoje prace do pamiątkowego zeszytu Acta Biochimica Polonica. Niestety nie było mu dane oglądać tej pracy wydrukowanej, zmarł bowiem w kilka dni po wyjściu zeszytu z drukarni. Pamiętam spotkanie z profesorem Eulerem na Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Moskwie w 1961 r. Kiedy chciałem mu pomóc w wejściu do windy, powiedział: „dziękuję, nie trzeba, muszę sam sobie dawać radę, za dwa miesiące jadę do Indii, czekam tylko żeby się zrobiło trochę chłodniej”. Był wówczas w wieku 88 lat i jak mi wiadomo pojechał do Indii, a w 1962 r. był również w Japonii i USA interesując się żywo najnowszymi problemami współczesnej biochemii i jej twórcami. Jeszcze w październiku 1964 r. przebywał w Niemczech, odwiedzał swoje rodzinne strony i wygłosił referat na posiedzeniu Towarzystwa Lekarskiego. Niespodziewana choroba i śmierć przerywa to pełne sukcesów, pracowite życie.

W dniu 17 listopada 1965 roku zmarła w Madison (USA)

Doc. Dr LUDMIŁA SZARKOWSKA

Kierownik Pracowni w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, członek Rady Naukowej tego Instytutu, członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Wiadomość ta dotarła do kraju w chwili drukowania tego zeszytu.

RECENZJE

Recenzja 15 tomu *Progress in Biophysics and Molecular Biology*

Progress in Biophysics and Molecular Biology, vol. 15, wyd. J. A. V. Butler i H. E. Huxley, Pergamon Press, 1965.

Kolejny tom *Progress...* przynosi sześć artykułów przeglądowych reprezentujących szeroki wachlarz zagadnień od zastosowań subkomórkowego frakcjonowania tkanki mózgowej do biosyntezy białka włącznie. Gwarantuje to szeroki krąg czytelników i stwarza oczywiste kłopoty potencjalnym recenzentom. Większość artykułów obraca się jednak wokół problematyki kwasów nukleinowych w biosyntezie białka i morfogenezie, wokół struktury wirusów, chromatyny i polipeptydów.

Nie jest łatwo pisać dziś artykuł przeglądowy o biosyntezie białka. Dynamika rozwoju tej dziedziny jest zupełnie niebywała i sypiący się z dnia na dzień istny nadmiar nowych faktów zmusza do nieustannej rewizji poglądów. P. N. Campbell, autor artykułu o biosyntezie białka, postąpił najsluszniej ograniczając się do głównych aspektów oraz do omówienia podstaw teoretycznych bez wnikania w szczegółowe zagadnienia kodu genetycznego. Literatura źródłowa omówiona jest do 1964 r. nie obejmuje jednak wielu prac, m.in. o zastosowaniu trójnukleotydów w badaniach *in vitro* i o wpływie struktury drugorzędowej. Dokładniej omówiony jest przebieg biosyntezy białka w układzie mikrosomów wątroby, zgodnie z zainteresowaniami badawczymi autora. Na podkreślenie zasługują podrozdziały o polisomach i ruchu mRNA z jądra do cytoplazmy. Artykuł obfituje w doskonałe schematy, które poglądowo ilustrują przebieg, często zresztą hipotetyczny, szeregu reakcji i przemian prowadzących do wytworzenia pierwszorzędowej struktury cząsteczki białka.

D. R. Davies w zwięzły sposób przedstawia wyniki ostatnich 4—5 lat badań rentgenograficznych nad konformacją polipeptydów, celowo omijając wyniki badań optycznych i hydrodynamicznych. W związku z tym praca przeznaczona jest raczej dla węższego grona bezpośrednio zainteresowanych.

Artykuł Jean Brachet o roli kwasów nukleinowych w morfogenezie jest chyba jedną z pierwszych prób stworzenia podstaw molekularnej embriologii. Szczegółowa rola DNA i poszczególnych rodzajów RNA w procesie różnicowania komórkowego jest jeszcze bardzo mało znana i niewątpliwie stanie się obiektem intensywnych badań na poziomie molekularnym w najbliższych latach. Powstrzymując się od daleko idących spekulatywnych rozważań autor dochodzi do wniosku, że w obecnej chwili najrozsądniejszym dla eksperymentatora założeniem jest uznanie wiodącej roli mRNA w procesie różnicowania; natomiast teoria regulacji Jacob i Monod wynikała z prac na układach bakteryjnych i upatrująca mechanizm regulacji na poziomie DNA znajduje tu raczej ograniczone zastosowanie. Autor zwraca uwagę na ewentualną rolę rybosomów w rozwoju i różnicowaniu polegającą na sukcesywnym ich uaktywnianiu w sensie zdolności do akceptacji mRNA. Jest to co prawda pogląd dyskusyjny w świetle doświadczeń, ale zapewne bardzo płodny.

Powszechnie toruje sobie drogę myśl, skądinąd poparta niecytowanymi przez autora pracami fizykochemicznymi A. Richa i genetycznymi B. A m e s a, że pozornie niespecyficzny charakter rybosomów w doświadczeniach *in vitro* nie stanowi istotnego odzwierciedlenia ich roli w komórce. Sądzić można, że praca J e a n B r a c h e t zainteresuje szerszy krąg czytelników.

Artykuł B. H. H y d a przedstawia na wstępie granice użyteczności nowoczesnych metod mikroskopii elektronowej i rentgenografii w badaniach ultrastruktury chromatyny, przy czym czyni to w sposób dostępny dla niespecjalistów. Z kolei autor omawia systematycznie prace ostatnich lat i hipotezy na temat struktury chromosomów jąder komórek wyższych roślin i zwierząt.

D. S t e v e B o c c i a r e l l i przedstawia strukturę i procesy rozwojowe wirusów zwierzęcych. W części pierwszej omówione są przejrzyście podstawy klasyfikacji, w części drugiej autor prezentuje poszczególne grupy, wreszcie część trzecia stanowi krótką analizę procesów rozwoju i replikacji wirusów zwierzęcych. Praca jest bardzo na czasie — wirusy zwierzęce mają znacznie uboższą literaturę przeglądową od swych odpowiedników roślinnych i fagów. Artykuł jest jednak nie dość konsekwentnie adresowany, szczególnie odnosi się to do części drugiej i trzeciej. Zawiera on bowiem szereg elementów opisowych świadczących o przeznaczeniu dla szerszego ogółu biochemików, z kolei kompletny prawie brak upraszczających schematów utrudnia lekturę.

Obszerna praca V. P. W h i t t a k e r a na temat zastosowań frakcjonowania subkomórkowego tkanki mózgowej koncentruje się głównie na pracach autora i jego zespołu w ciągu ostatnich 6-7 lat. Szczególnie dokładnie jest omówione powstawanie i właściwości synaptosomów. Zainteresowany czytelnik znajdzie tu również szczegółowe omówienie zawartości amin biogenetycznych i związanych z nimi enzymów w poszczególnych fragmentach subkomórkowych. Wyniki zespołu V. P. W h i t t a k e r a są wymownym dowodem pożytku, jaki daje skoncentrowanie w ramach jednej grupy badaczy dwu podstawowych narzędzi współczesnej biochemii: ultrawiorowania i mikroskopii elektronowej.

Opracowanie graficzne tomu jest na bardzo wysokim poziomie, natomiast indeks przedmiotowy jest niewyczerpujący. W sumie tom należy uznać za udany i celowy.

W. Szer

AUTOREFERATY PRAC DOKTORSKICH

Wpływ związków z grupy dwukumarolu na układ fibrynolityczny osocza

MARTA NIEWIAROWSKA

Pracę wykonano w Instytucie Hematologii i II Klinice Położnictwa i Chorób Kobietych Akademii Medycznej w Warszawie
Promotor: Prof. dr IRENA CHMIELEWSKA

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Warszawskiego nadająca stopień naukowy *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 7 czerwca 1965 r.

Praca poświęcona jest badaniu wpływu trzech związków z grupy dwukumarolu: sintromu, markumaru i pelentanu na układ fibrynolityczny królika i człowieka.

Związki te podawane były królikom doustnie w jednorazowych dawkach: sintrom — 8 mg/kg, markumar — 9 mg/kg, pelentan — 300 mg/kg. Zgodnie z powszechnie przyjętymi poglądami po podaniu związków z grupy dwukumarolu stwierdzono przedłużenie czasu protrombinowego. Indywidualny rozrzut był bardzo duży. Największe rozrzuty obserwowano w grupie zwierząt otrzymujących pelentan, najmniejsze — w grupie zwierząt otrzymujących sintrom. Maximum aktywności dla wszystkich trzech antykoagulantów obserwowano po 24 godzinach od momentu ich podania. Normalizacja czasu protrombinowego trwała najdłużej po zastosowaniu pelentanu. Wszystkie trzy antykoagulanty powodowały wydłużenie czasu fibrynolizy we frakcji euglobulinowej osocza, które utrzymywało się dłużej niż przedłużenie czasu protrombinowego. Największe zahamowanie fibrynolizy we frakcji euglobulinowej osocza zaobserwowano po podaniu markumaru (średnio z 385 min. do 1440 min.). Wyżej wymienione związki z grupy dwukumarolu wywoływały również wzrost aktywności antyplazminowej. Wskaźnik antyplazminy wzrastał od 1 do 3 w przypadku sintromu lub markumaru, od 1 do 7 w przypadku pelentanu. Nie zaobserwowano natomiast statystycznie istotnych zmian w poziomie fibrynogenu i plazminogenu.

U ludzi przebadano wpływ przewlekłego podawania sintromu, markumaru i pelentanu na zachowanie się aktywności fibrynolitycznej osocza: fibrynolizy we frakcji euglobulinowej, poziomu antyplazminy, plazminogenu oraz czynników XI (PTA) i XII (czynnika Hagemana). Te ostatnie czynniki badano z uwagi na ich rolę zarówno w aktywacji krzepnięcia krwi jak i w procesie fibrynolizy. Chorych podzielono na 3 grupy, zależnie od czasu protrombinowego (grupa 1 — czas protrombinowy do 20 sek, grupa 2 — czas protrombinowy od 20 do 30 sek, grupa 3 — czas protrombinowy powyżej 30 sek). Stwierdzono zależność między czasem fibrynolizy w euglobulinach a czasem protrombinowym badanych osobników. W grupach z wydłużonym czasem protrombinowym, czas fibrynolizy w euglobulinach wydłużał się, osiągając maksymalne wartości w trzeciej grupie. Różnice te są statystycznie znamienne. Współczynnik korelacji między czasem fibrynolizy w euglobulinach a czasem protrombinowym, równy jest 0,53. Nie zaobserwowano natomiast korelacji między poziomem plazminogenu, fibrynogenu, czynników XI i XII a cza-

sem protrombinowym osocza. Poziom antyplazminy wzrastał w grupach, w których czas protrombinowy był przedłużony. Statystycznie istotne były różnice między grupą pierwszą a drugą, pierwszą a trzecią. Natomiast współczynnik korelacji między czasem protrombinowym a poziomem antyplazminy, wynosił 0,155.

Z powyższych danych można wysnuć wniosek, że związki grupy dwukumarolu powodują nie tylko upośledzenie krzepnięcia krwi, polegające na obniżeniu poziomu czynników II, VII, IX i X, lecz także powodują zahamowanie fibrynolizy. Mechanizm tego zahamowania polega na wzroście inhibitorów enzymów fibrynolitycznych. Otrzymane wyniki służyły do sprawdzenia słuszności tezy istnienia stanu dynamicznej równowagi między stanem krzepnięcia krwi i fibrynolizy.

Wpływ związków tiolowych na wytwarzanie fosfolipazy C w hodowlach *Clostridium perfringens*

ANTONI JACEK ZBROŻYNA

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego
Promotor: Prof. dr IRENA CHMIELEWSKA

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi U. W. nadająca stopień naukowy
doktora nauk przyrodniczych z dnia 10.V.1965 r.

Fosfolipaza C występuje m.in. w przesączach po hodowli beztlenowo rosnących drobnoustrojów *Cl. perfringens*. Jest ona identyczna z toksyną α tego drobnoustroju. Ilość jej w podłożu w hodowlach *Cl. perfringens* jest zależna od składu podłoża. Obecność enzymatycznych hydrolizatów białek w podłożu znacznie zwiększa ilość enzymu. Pierwotnym celem pracy było ustalenie jaka minimalna ilość enzymatycznego hydrolizatu kazeiny dodana do podłoża, nie mająca wpływu na wzrost *Cl. perfringens*, stymuluje maksymalnie wytwarzanie fosfolipazy. Do hodowli użyto podłoża zawierające kwasowy hydrolizat kazeiny lub różne ilości enzymatycznego hydrolizatu uzupełniane hydrolizatem kwasowym do stałej zawartości hydrolizatu w podłożu. Czynnikiem obniżającym potencjał red.-ox. tych podłoży był tioglikolan sodowy. Jako standard do oznaczeń fosfolipazy służył przygotowany własną metodą preparat enzymu. Stosowano różny czas hodowania *Cl. perfringens* na badanych podłożach. Stwierdzono, że zawartość do 30% enzymatycznego hydrolizatu kazeiny nie wpływa na wzrost drobnoustrojów, natomiast wyższa jego zawartość przedłuża fazę logarytmicznego wzrostu. Ilość fosfolipazy osiąga maksimum po 7 godz. i jest najwyższa przy ok. 30% zawartości hydrolizatu enzymatycznego w podłożu. Ilość enzymu w późniejszym okresie hodowli zawsze spada. W hodowlach 24-godz. przy zawartości do 10% enzymatycznego hydrolizatu nie stwierdza się obecności enzymu. Wobec inaktywacji fosfolipazy w czasie hodowli zwrócono uwagę na dodawany do podłoża tioglikolan sodowy. Podłoża po 24-godz. hodowli inkubowano ze standardem fosfolipazy z dodatkiem i bez dodatku tioglikolanu. Przeprowadzono także hodowlę 24-godz. dodając po 7 godz. glutation. Stwierdzono, że dodawane do podłoża związki zawierające grupę tiolową wpływają na inaktywację wytwarzanej fosfolipazy. Do inaktywacji tej potrzebna jest jednakże obecność czynników znajdujących się w podłożu po 24-godz. hodowli. Wysłunęto hipotezę, że czynnikami tymi są enzymy proteolityczne, produkowane przez drobnoustrój i aktywowane związkami tiolowymi.

Fragmenty pracy są wydrukowane w *Acta Mikrobiol. Polon.* 14, zes. 4 (1965).

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

II Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych

Wiedeń 21—24 IV, 1965

Austriackie Towarzystwo Biochemiczne w dniach od 21 do 24 kwietnia 1965 r. zorganizowało w Wiedniu II Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Gospodarzem Zjazdu był prof. O. Hoffmann-Ostenhof a obrady odbywały się w salach Uniwersytetu Wiedeńskiego. W Zjeździe wzięło udział ponad 2000 osób, głównie z kontynentu europejskiego, ale również dość liczna grupa przybyła z USA oraz innych krajów pozaeuropejskich. Plenarny referat na otwarcie Zjazdu został wygłoszony przez H. A. Krebsa (Oxford) na temat „Mechanizmów kontrolujących metabolizm węglowodanów”. Następnie obrady toczyły się w jednym sympozjum i w trzech kolokwiach poświęconych następującym problemom:

Struktura i funkcja RNA,

Przeciwciała biologicznie czynnych cząsteczek,

Cyklitole i fosfoinozytydy,

Biosynteza związków aromatycznych.

Krebs w swoim referacie omawiał różne przykłady mechanizmów regulujących przemianę cukrową w komórce, zachodzące pod wpływem tych samych enzymów jako przeciwstawne sobie reakcje syntezy i rozpadu. Przewaga procesów glikolizy lub glikoneogenezy uzależniona jest od szeregu czynników włączających lub wyłączających odpowiednie enzymy. Dawno znanym fizjologicznym czynnikiem regulującym syntezę lub rozpad cukrów w wątrobie była odpowiednia dieta: ubogolub wysokowęglowodanowa, jednakże mechanizm wpływu diety nie był wyjaśniony. Glikoneogeneza nie we wszystkich swych etapach jest odwróceniem procesu rozpadu glukozy. Tam gdzie konieczne jest pokonanie barier energetycznych pojawiają się dodatkowe reakcje, specjalnie wrażliwe na działanie substancji modyfikujących i w określonych warunkach wykazujące sprzężenie zwrotne. Jeden z mechanizmów regulujących działa np. na etapie syntezy i rozpadu glikogenu, drugi natomiast — na etapie przemian estrów fosforowych cukru.

Jednak centralną rolę w metabolizmie węglowodanów odgrywa 2-fosfoenolopirogronian, od którego odgałęziają się liczne reakcje metaboliczne. Dalsze ogniwo, które podlega działaniu mechanizmów sterujących stanowi pirogronian wytworzony z 2-fosfoenolopirogronianu. Dekarboksylacja oksydacyjna pirogronianu przyczynia się do zwiększenia spalań końcowych produktów degradacji glukozy lub ich zamiany w tłuszczowce. Natomiast karboksylacja pirogronianu stanowi drogę przeciwną uzupełniającą bezpośrednio rezerwy szczawiooctanu, a pośrednio resyntezę cukru. Działanie karboksylazy pirogronianowej podlega mechanizmowi sprzężenia zwrotnego. Enzym ten bowiem aktywowany jest w obecności acetylo-Co-A, zabezpieczającego ciągłość produkcji energii w przebiegu cyklu kwasów trójkarboksylowych i odwrotnie — jest hamowany przy braku acetylo-Co-A. Analogicznie Krebs podawał przykłady dalszych mechanizmów regulacyjnych przemiany

cukrowej, np. na etapie szczawiooctanu i innych związków. Referat nie wprowadzał nowych danych ani nie nakreślał nowych dróg metabolicznych glukozy, poruszał jednak bardzo trudny i istotny problem regulacji natężenia i kierunku przebiegu różnych reakcji odwracalnych w przemianie glukozy. Przedstawiony przez Krebsa mechanizm regulacyjny pozwala w pewnym sensie zrozumieć wiele efektów towarzyszących różnym stanom patologicznym i choć w części wyjaśnia problem sterowania anabolizmu i katabolizmu węglowodanów.

Zagadnienie mechanizmu regulacji procesów metabolicznych znalazło również wyraz w kilku krótkich komunikatach (G. Jacobsach i I. Syllm-Rapport, Berlin; W. Seubert i W. Huth, Frankfurt n M; M. Ruiz-Amil, i wsp., Madryt; M. Gumińska, Kraków). Również dość liczna grupa referatów z tzw. doniesień „różnych” dotyczyła zagadnień związanych z produkcją energii i utlenianiem tkankowym, działaniem rozmaitych inhibitorów i aktywatorów na procesy metaboliczne, jak również zagadnień metodycznych z tej dziedziny.

W grupie referatów sympozjalnych dotyczących struktury i własności RNA można wyróżnić cztery grupy doniesień i wykładów omawiających własności sRNA, mRNA oraz RNA rybosomalnego i RNA wirusowego. Na temat DNA było zaledwie kilka komunikatów. I- i II-rzędowa struktura sRNA była przedmiotem kilku prac (H. G. Zachau i wsp., Kolonia; H. Seidel, Getynga), przy czym przy ustalaniu sekwencji nukleotydów autorzy posługiwali się głównie metodami enzymatycznymi stosując RN-azę trzustkową, RN-azę T_1 oraz inne fosfodwuesterazy. W innych badaniach nad sRNA, cząsteczkę metylowano metodami chemicznymi (G. Boman, Uppsala; L. Rychlik, Praha) lub enzymatycznymi (A. M. Kaye i B. Fridlander, Rehovoth) względnie modyfikowano działaniem HNO_2 lub przez bromowanie (J. P. Ebel, Strasbourg) uzyskując różnego stopnia zmiany zdolności przenoszenia poszczególnych aminokwasów. Badania te mają szerokie praktyczne znaczenie zarówno przy ustalaniu struktury jak i mechanizmu działania rybopolinukleotydów. Otrzymanie czystych preparatów sRNA o określonej specyficzności jest obecnie możliwe dzięki m.in. filtracji na syntetycznym żelu dekstranowym (M. Staehelin, Bazylea), rozdziałowi na bentonicie w obecności jonów Mg (D. B. Dunn, Cambridge) lub na hydroksypatycie (U. Harding, Würzburg).

Informacyjny RNA izolowano z różnych źródeł i częściowo charakteryzowano. M.in.: mRNA otrzymano z drożdży (W. Duntze i wsp., Freiburg), z retikulocytów królika (G. Marbaix, Bruksela). Jest interesujące, że ciężar cząsteczkowy mRNA z retikulocytów ustalono na ok. 140 000. Taka cząsteczką polinukleotydu przy założeniu, że posiada strukturę jednoniciową, może zawierać informacje dla ok. 140 aminokwasów jeśli się przyjmie, że jeden kodon złożony jest z trzech nukleotydów. Wiadomo też, że łańcuch alfa i beta hemoglobiny ludzkiej zawiera odpowiednio 141 i 146 aminokwasów, co by wskazywało, że wyizolowany mRNA może mieć zakodowany jeden z tych łańcuchów polipeptydowych. Również Shapira i wsp. (Paryż) z jąder komórek wątroby królika wyosobnili RNA, który wzmagal syntezę hemoglobiny *in vitro*. Także z innych materiałów, jak komórki HeLa (D. Kanazir, Bruksela), komórki *E. coli* (J. Forchhammer, Kopenhaga), kiełki grochu (U. E. Loening, Edinburg) oraz różne tkanki roślinne (I. Böttger i I. Lidemann, Halle) izolowano mRNA i określano jego aktywność. S. Ochoa (Nowy York) i H. Kuntzel i wsp. (Getynga) posługując się syntetycznym poliUG jako nośnikiem informacji o znanej sekwencji nukleotydów terminalnych wykazali w systemie bezkomórkowym z *E. coli*, że polinukleotyd jest „czytany” przez ten system od 3'-końca łańcucha; ta obserwacja ma istotne znaczenie przy ustalaniu sekwencji kodonów, zwłaszcza w policystronowych cząsteczkach mRNA.

Struktura I- i II-rzędowa oraz własności biologiczne rybosomalnego i wirusowego RNA były omawiane m.in. w referatach R. A. Coxa (Londyn), J. P. Ebel

(Strasbourg), D. Drünbergera (Praga), G. Kocha (Hamburg), F. Sokola (Bratysława), R. Langridge (Boston), R. L. Eriksona i wsp. (Denver) i innych. Należy również wspomnieć o kilku doskonałych doniesieniach metodycznych z zakresu badania struktury polinukleotydów, wskazujących nowe możliwości ustalania sekwencji nukleotydów i porównywania struktury różnych kwasów nukleinowych (G. L. Brown, i wsp., Londyn; F. Sanger i wsp., Cambridge).

Na kolokwium poświęconym przeciwciałom biologicznie aktywnych cząsteczek wygłoszono łącznie 37 referatów i komunikatów. M.in. B. Cinader (Toronto) przedstawił wyniki swoich badań nad przeciwciałami dla normalnej i chemicznie zmodyfikowanej cząsteczki rybonukleazy. Autorowi udało się otrzymać przeciwciała hamujące i aktywujące rybonukleazę, przy tym referat zawierał ciekawe rozważania poświęcone zmianie konformacji centrum aktywnego enzymu podczas reakcji z przeciwciałem. M. Pollock (Londyn) badając penicilinazy różnych mutantów *Bacillus licheniformis* wykazał, że stopień zahamowania enzymu przez antysurowicę zależy od szczepu bakteryjnego i struktury substratu, co pozwoliło na wysunięcie przypuszczeń odnośnie centrum aktywnego i konformacji cząsteczki enzymu. J. Uriel (Villejuif) przedstawił postępy w zakresie immunoelektroforetycznego badania enzymów, głównie na przykładzie hydrolaz trzustkowych. Technika zastosowana przez Uriela pozwala na identyfikację i badanie jednorodności oraz biologicznych własności enzymów występujących w złożonych mieszaninach bez potrzeby stosowania czystych antygenów i monowalentnych surowic. Pewne zależności między strukturą a własnościami antygenowymi i biologicznymi ACTH przedstawili J. Felber i S. Ashcroft (Lozanna). Syntetyczne polipeptydy ACTH złożone z 39 aminokwasów wykazywały pełne własności antygenowe, natomiast zbudowane tylko z 24 aminokwasów były nieaktywne. Porównanie struktury insuliny różnych gatunków zwierząt z własnościami antygenowymi wobec rozmaitych przeciwsurowic było przedmiotem badań S. Wilsona (Toronto). Stosując hybrydy łańcuchów A i B insuliny z dorsza i wołu w reakcjach precipitacyjnych z antysurowicą uzyskaną od świnki morskiej autor próbował ustalić jaka sekwencja aminokwasów w określonych odcinkach łańcucha peptydowego odpowiedzialna jest za własności immunologiczne. Zainteresowanie wzbudził również komunikat Ruth Arnon (Rehovoth) poświęcony immunologicznym badaniom trypsynogenu, trypsyny i papainy. Autorka wykazała, że podczas reakcji z przeciwciałem papaina może jednocześnie rozkładać to przeciwciało na dwa mniejsze fragmenty o nieco innych własnościach precipitacyjnych i fizykochemicznych. Obrady tego kolokwium wykazały istotne znaczenie metod immunochemicznych w badaniu struktury i funkcji białek.

Kolokwium poświęcone cyklitolom i fosfoinozytydom zgromadziło kilkanaście doniesień. Przewodniczący zjazdu, prof. Hoffmann-Ostenhof przedstawił drogi syntezy niektórych cyklitolu w organizmach roślinnych, a T. Posternak (Genewa) omówił związki wykazujące własności biologicznych antagonistów inozytolu. Inne referaty dotyczyły syntezy i katabolizmu inozytolu i jego pochodnych u bakterii, roślin i zwierząt oraz przemian fosfoinozytydów w tkance mózgowej.

Tematem trzeciego kolokwium (18 komunikatów) była biosynteza związków aromatycznych. M.in. G. Billek (Wiedeń) zaprezentował współczesne poglądy na biosyntezę roślinnych stilbenów. Poza sterydami na kolokwium omawiano syntezę kumaryny, flawonoidów, witaminy K₂, niektórych alkaloidów i różnych związków aromatycznych.

Polska biochemia była reprezentowana na zjeździe przez 29 referatów zgłoszonych i przyjętych, a tylko 15 wygłoszonych (mniej więcej połowa referatów nie otrzymała pokrycia finansowego na wyjazd do Wiednia). Referaty z Polski dotyczyły dość szerokiego wachlarza zagadnień — od struktury wewnętrznej syntetycz-

nych polinukleotydów (W. Szer) i białka (K. Zakrzewski) poczynając, poprzez problem kierowanej syntezy enzymów w komórkach mikroorganizmów (M. Bagdasarian), biosyntezy specyficznych białek *in vitro* (W. Ostrowski), izolowanie krystalicznych białek (T. Baranowski) a skończywszy na przedstawieniu różnych tematów z zakresu metabolizmu (M. Gumińska, A. Koj, Z. Kaniuga) i badań fizykochemicznych (A. Morawiecki, C. Janion, W. Dobryszczycka, J. Lisowski). Polska delegacja stanowiła dość liczną grupę na zjeździe przedstawiając szeroki i aktualny zakres współczesnych badań biochemicznych w naszym kraju.

W. Ostrowski
M. Gumińska
A. Koj

IV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Gdańsk, 11-12 VI.1965 r.

W dniach 11 i 12 czerwca 1965 r. odbyło się w Gdańsku IV doroczne Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Gospodarzem Sympozjum był Gdański Oddział PTBioch a obrady toczyły się w Akademii Medycznej w Gdańsku.

Głównym tematem Sympozjum była Biochemia lipidów i temu zagadnieniu poświęcone były referaty sesji plenarnej oraz doniesienia w sekcjach: „Metabolizm lipidów” oraz „Metodyka badania lipidów”. Oprócz tego jednak dopuszczono do wygłoszenia doniesienia z innych dziedzin biochemii grupując je w sekcjach: „Biochemia żywienia”, „Utlenianie biologiczne”, „Metabolizm”, „Enzymy”, „Biochemia kliniczna” oraz „Komunikaty różne”. Ta forma stanowi od wielu lat tradycyjną formę organizacji posiedzeń angielskiego Biochemical Society. Celowość przyjęcia jej przez PTBioch była przedmiotem dość ożywionej dyskusji w czasie Sympozjum Gdańskiego. Opinia na ten temat wydaje się podzielona. Z jednej strony uważa się, że biochemia polska nie jest jeszcze na tyle rozwinięta aby sympozjum o wąskiej tematyce zgromadziło dostateczną ilość uczestników, z drugiej jednak strony dopuszczenie do wygłoszenia komunikatów z różnych dziedzin biochemii przekształca sympozjum w ogólnopolski zjazd, czego potwierdzeniem wydaje się Sympozjum Gdańskie, w którym brało udział około 200 uczestników i na którym wygłoszono około 120 komunikatów.

Sesja Plenarna Sympozjum obejmowała 3 referaty. P. Włodawer mówiła o roli fosfolipidów w strukturze i funkcji mitochondriów. Poruszyła ona w swym wykładzie zagadnienie ultrastruktury błon mitochondrialnych i roli fosfolipidów jako składników tych błon w podstawowych czynnościach mitochondriów jak fosforylacja oksydacyjna lub aktywny transport substancji przez błony mitochondrialne. Szereg innych zjawisk zachodzących w mitochondriach jak np. ich skurecz lub pęcznienie wiąże się również z przemianą lipidów. Wydaje się, że pewna integralność lipidowo-białkowych struktur w mitochondriach jest niezbędnym warunkiem ich prawidłowej funkcji. Drugi referat tej sesji wygłoszony przez J. Patelskiego dotyczył przemiany chylomikronów. Omówiono w nim powstawanie i przechodzenie chylomikronów do krwiobiegu a także usuwanie ich z krwi obwodowej i rolę lipazy lipoproteidowej w tym procesie. Kwasy tłuszczowe uwalniane przez ten enzym są transportowane przez niektóre białka osocza do tkanek, gdzie ulegają dalszym przemianom. W ostatnim referacie R. Niemirowicz mówił o rozpadzie fosfolipidów u zwierząt. Niemal wszystkie tkanki posiadają własną przemianę

fosfolipidów. Kataboliczna strona tej przemiany nie jest jeszcze dobrze poznana. Autor omówił poglądy na rolę fosfolipaz a także diesterazy glicerofosforanowej w procesach tkankowej degradacji fosfolipidów oraz nową koncepcję, według której pierwszy etap rozpadu fosfolipidów polega na transestryfikacji, akceptorem zaś kwasu tłuszczowego jest cholesterol, mono- lub dwugliceryd albo lizolecytyna.

W sekcji poświęconej metabolizmowi lipidów wygłoszono 22 komunikaty obejmujące szeroki wachlarz tematów. Znalazły się tam doniesienia o składzie różnych frakcji lipidowych, o enzymach katabolizmu lipidów w surowicy, o włączaniu znakowanych prekursorów do lipidów i wiele innych doniesień.

Druga grupa komunikatów, zebranych w osobnej sesji dotyczyła metodyki badań lipidów. Sporo uwagi poświęcono tu różnym odmianom techniki chromatograficznej. Problematyce tłuszczowców była poświęcona również sesja „Biochemii żywienia”. Przedstawiono na niej 7 doniesień. Trzecią sesją o stosunkowo wąskim temacie była sesja poświęcona utlenianiu biologicznemu. Przedstawiono na niej 10 komunikatów w większości dotyczących różnych pośrednich etapów utleniania w mitochondriach.

Oprócz tych sekcji obradowały w czasie Sympozjum jeszcze cztery inne, wymienione na początku sesje, o tematyce znacznie bardziej różnorodnej. Wygłoszono na nich łącznie około 65 doniesień.

Spotkania naukowe w rodzaju Sympozjum Gdańskiego posiadają oprócz oficjalnej części odbywającej się na sali konferencyjnej jeszcze inną stronę, do której przywiązuje się w ostatnich czasach nie mniejszą wagę. Są to spotkania poza posiedzeniami, wizyty w zakładach naukowych, dyskusje w małych grupkach, w których można porozmawiać o szczegółach i nie trzeba ograniczać się czasem. Wydaje się, że i pod tym względem Sympozjum Gdańskie należy uważać za udane.

M. Bagdasarian.

IV Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

W dniu 11 czerwca 1965 r. odbyło się w Gdańsku, w sali im. Rydygiera IV Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Rozpoczęło się ono w drugim terminie w obecności 144 członków. Zebranie otworzył Prezes Towarzystwa — prof. Kazimierz Zakrzewski. Na Przewodniczącego Zebrania wybrano prof. Grzegorza Bagdasariana, zaś Sekretarza — dr Danutę Hulanicką. Obejmując przewodnictwo obrad prof. G. Bagdasarian stwierdził, że wymogi formalne zostały dopełnione i IV Walne Zebranie jest prawomocne.

W pierwszych trzech punktach porządku dziennego został przyjęty protokół z III Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz dokonano wyboru Komisji Matki w składzie: dr Helena Filipek-Wender, dr Konstancja Raczyńska-Bojanowska i dr Roman Lorenc oraz Komisji Skrutacyjnej w składzie: doc. Witold Drabikowski (Przewodniczący), mgr Jolanta Barańska, dr Wanda Dobryszcka, mgr Monika Fonberg, dr Monika Jeżewska, mgr Anna Konecka, dr Andrzej Leonowicz, dr Wiesław Makarewicz i dr Jerzy Rogulski.

W imieniu ustępującego Zarządu Głównego sprawozdanie złożył Prezes — prof. K. Zakrzewski. Omówił on rozwój Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz działalność Zarządu Głównego i Oddziałów. Towarzystwo skupia 672 członków w 11 Oddziałach, to jest we wszystkich miastach uniwersyteckich z wyjątkiem Torunia. Miarą stałej tendencji wzrostowej Towarzystwa jest fakt, że w roku bieżącym przyjęto ponad 40 nowych członków.

Działalność Towarzystwa była prowadzona w czterech zasadniczych kierunkach: 1) organizacja zebrań naukowych, 2) inicjowanie i współorganizacja kursów szkoleniowych i krótkoterminowych stażów, 3) organizacja zjazdów biochemicznych oraz 4) prowadzenie wydawnictw naukowych (*Postępy Biochemii* oraz *Monografie Biochemiczne*).

Najwyższą działalność, w czasie ubiegłego roku, wykazał Oddział w Szczecinie, pod przewodnictwem dr Zygmunta Machoya. Zorganizowano tam 26 zebrań naukowych. Część ich była poświęcona kursowi statystyki. Sukces Oddziału w Szczecinie jest szczególnie godny pochwały i naśladowania, gdy uwzględni się małą liczebność ośrodków biochemicznych w tym mieście. Znaczna poprawa pod względem ilości i jakości zebrań naukowych nastąpiła w Oddziale Warszawskim po wyobrach nowych władz z doc. Zofią Zielińską, jako Przewodniczącym.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne organizuje od roku 1963 Kursy Podstaw Biochemii. Podobnie jak poprzednie, II Kurs w roku 1964 i następny planowany na 1965 rok są organizowane wraz z Katedrą Diagnostyki Laboratoryjnej Studium Doskonalenia Lekarzy. II Kurs był subwencionowany przez Wydział VI Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk, co umożliwiło wprowadzenie ćwiczeń praktycznych. W ubiegłej kadencji Zarząd Główny zabiegał usilnie o upowszechnienie krótkoterminowych stażów w zakładach krajowych. Wszystkie wnioski w tej sprawie były załatwione pozytywnie.

Po I Krajowym Kongresie Biochemii (wrzesień 1963 roku) Polskie Towarzystwo Biochemiczne zorganizowało dwa następne zjazdy naukowe: III Sympozjum — Budowa i Własności Enzymów (Kazimierz, wrzesień 1964) oraz IV Sympozjum — Biochemia Lipidów (Gdańsk, czerwiec 1965). Godny podkreślenia jest sukces organizacyjny i naukowy Sympozjum w Kazimierzu, osiągnięty dzięki pracy Oddziału w Lublinie, pod kierunkiem doc. Jerzego Trojanowskiego. Częstość tych zjazdów wykazuje, że coroczne zjazdy biochemiczne w Polsce są nie tylko pożądane lecz i możliwe.

Organizując zbiorowe wyjazdy na międzynarodowe kongresy i sympozja, Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyjął nowe kryteria: ilość wyjeżdżających uczestników zależy nie od ilości delegacji przyznanych przez resorty, lecz od sumy na ten cel przeznaczonej i najekonomiczniej wykorzystanej; pierwszeństwo uczestnictwa w wyjeździe mają autorzy najlepszych spośród zgłoszonych prac wg oceny niezależnej i obiektywnej komisji. W oparciu o te kryteria Towarzystwo zorganizowało trzy wyjazdy: na I Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (Londyn, marzec 1964) — 4 osoby, na VI Międzynarodowy Kongres Biochemii (Nowy Jork, lipiec 1964) — 15 osób oraz na II Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (Wiedeń, kwiecień 1965) — 15 osób, na zjazd Arbeitsgemeinschaft Biochemie (Magdeburg, czerwiec 1965) — 3 osoby. Kryteria przyjęte przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne zostały pozytywnie ocenione przez II Wydział Polskiej Akademii Nauk, któremu też Towarzystwo zawdzięcza wyniki osiągnięte w tej dziedzinie. Kryteria te znajdują coraz szersze uznanie i zastosowanie.

Działalność wydawnicza Polskiego Towarzystwa Biochemicznego polega na wydawaniu kwartalnika *Postępy Biochemii* i *Monografii Biochemicznych*. *Postępy Biochemii* są redagowane przez prof. Irenę Chmielewską, której kompetencji i trudom zawdzięczają swój ciągły rozwój i rosnące znaczenie dla kształcenia biochemików oraz popularyzacji biochemii w Polsce. Wobec zapowiedzianej rezygnacji prof. Ireny Chmielewskiej z obowiązków Redaktora, Zarząd Główny rozpiisał konkurs na obsadę tego stanowiska. W wyniku konkursu na stanowisko Redaktora *Postępów Biochemii* została powołana dr Zofia Lassota. Wybrany przez nią zespół redakcyjny

będzie realizował propozycje przedłożone w ramach konkursu i zaaprobowane przez Zarząd Główny.

Monografie Biochemiczne stały się wydawnictwem o dużej dynamice Wydrukowano dotąd sześć zeszytów. Zarówno pozycje wydrukowane, jak i oczekujące na realizację stanowią rozprawy habilitacyjne, w przyszłości jednak zeszyty *Monografii* będą obejmować również opracowania niezwiązane z przewodami habilitacyjnymi.

Gospodarka finansowa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest całkowicie zrównoważona dzięki dotacji Polskiej Akademii Nauk (w rocznej wysokości 250 000 zł) oraz skuteczności zbierania składek członkowskich. Roczne wpływy wynoszą ok. 500 000 zł. Zwiększenie dochodów ze sprzedaży *Monografii Biochemicznych* pozwoliłoby na dalszy rozwój akcji stypendiów na staże, wyjazdy na sympozja i konferencje oraz na popularyzację biochemii.

Kończąc swe przemówienie, prof. Kazimierz Zakrzewski podziękował wszystkim członkom za ich udział w pracach zarówno Zarządu Głównego, władzach Oddziałów jak i poszczególnych akcjach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Po przemówieniu Prezesa, Przewodniczący Komisji Rewizyjnej, prof. Bronisław Filipowicz odczytał Protokół tej Komisji. Oceniała ona pozytywnie działalność Zarządu Głównego III Kadencji i zaproponowała Walnemu Zebraniu udzielenie Zarządowi absolutorium.

Z kolei, doc. Witold Brzeski, sekretarz Redakcji *Postępów Biochemii* złożył sprawozdanie z działalności Redakcji w latach 1964 i 1965. W tomach X i XI zamieszczono 56 artykułów. Autorami 19 byli profesorowie i docenci, zaś 37 — młodszy pracownicy nauki. Najwięcej artykułów dostarczył ośrodek warszawski — 34; inne zaś: Lublin — 6, Kraków — 4, Gdańsk i Poznań — po 3, Górny Śląsk — 2, a Białystok, Łódź, Szczecin i Wrocław — po jednym. Nakład *Postępów Biochemii* wynosi obecnie 1260 egzemplarzy. Prenumerata zagraniczna stanowi ok. jednej szóstej nakładu. *Postępy Biochemii* są jednym z dziesięciu polskich czasopism biologicznych (na 1057 na całym świecie) zaliczonych do tzw. *Automatic Subject Citation Alert*. W zakończeniu sprawozdania ustępujący wkrótce Komitet Redakcyjny pod przewodnictwem prof. Ireny Chmielewskiej zapewnił o swej współpracy przy przejmowaniu teki redakcyjnej przez nowy Komitet oraz życzył mu powodzenia w pracy nad dalszym podnoszeniem poziomu *Postępów Biochemii* i umacnianiu jego pozycji w światowej literaturze biochemicznej.

Po sprawozdaniach Prezesa, Komisji Rewizyjnej i Redakcji *Postępów Biochemii* odbyła się dyskusja.

Doc. Paulina Włodawer postawiła wniosek, by na przyszłość zawęzić tematykę sympozjów i ograniczyć liczbę komunikatów.

Prof. Janina Opieńska-Blauth wyraziła uznanie dla ustępującego Redaktora *Postępów Biochemii* prof. Ireny Chmielewskiej. *Postępy Biochemii* reprezentują wysoki poziom naukowy i stanowią dobrą szkołę dla młodej kadry biochemików. Jednocześnie zaapelowała o ściślejszą współpracę Zarządu z ośrodkami prowincjonalnymi.

Prof. Józef Heller wyraził uznanie dla ogólnej linii pracy Zarządu Głównego.

Mgr Jerzy Maruchin podziękował w imieniu członków za pomoc w wyjazdach na sympozja i uzyskiwaniu stypendiów zagranicznych.

Dr Maria Dydyńska wskazała na konieczność właściwej reklamy *Monografii Biochemicznych*.

Doc. Witold Drabikowski zaapelował o lepszą wymianę pracowników między ośrodkami.

W odpowiedzi na głosy w dyskusji prof. Kazimierz Zakrzewski — nie zgodził się z doc. P. Włodawer, aby zawęzić tematykę sympozjów i ograniczyć liczbę ko-

munikatów. Doroczne sympozja powinny obejmować różną tematykę i zapewniać jak największej ilości członków Towarzystwa możliwość poddania pod dyskusję wyników swej pracy.

Członkowie PTBioch. są zawiadamiani o pojawianiu się nowych tomów *Monografii Biochemicznej* drogą rozsyłanych komunikatów.

Prof. Zakrzewski podziękował prof. I. Chmielewskiej za tak owocną i ofiarną pracę i poinformował, że PTBioch. zorganizuje zebranie poświęcone pracy popularzacyjnej prof. I. Chmielewskiej.

Po zamknięciu dyskusji Przewodniczący Walnego Zebrania poddał pod głosowanie wniosek Komisji Rewizyjnej o udzielenie absolutorium ustępującemu Zarządowi. Wniosek został przyjęty w głosowaniu jawnym, bez głosów przeciw, przy 4 wstrzymujących się.

W następnym punkcie porządku dziennego prof. Kazimierz Zakrzewski odczytał tekst wniosku Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego o nadanie godności członka honorowego prof. Włodzimierzowi Mozołowskiemu, wybitnemu uczonemu, nauczycielowi kadr biochemicznych, twórcy gdańskiej szkoły biochemicznej. Uzasadniając wniosek, prof. Kazimierz Zakrzewski omówił zasługi prof. Włodzimierza Mozołowskiego dla polskiej biochemii.

W tajnym głosowaniu, pod nieobecność prof. Włodzimierza Mozołowskiego 140 głosami na 140 ważnych wniosek został przyjęty. Przewodniczący Walnego Zebrania, prof. Grzegorz Bagdasarian, przyjaciele oraz uczniowie prof. Włodzimierza Mozołowskiego złożyli mu swe gratulacje.

Przystępując do wyboru nowego Zarządu Komisja Matka przedstawiła listę zgłoszonych kandydatur.

Prezes — prof. Kazimierz Zakrzewski, Vice-Prezes — doc. Zofia Zielińska. Członkowie Zarządu: doc. Zofia Kasprzyk, dr Tadeusz Kłopotowski, dr Krzysztof Murawski, doc. Włodzimierz Bicz, doc. Józef Lisowski, doc. Juliusz Popowicz, doc. Jerzy Patelski, doc. Jerzy Trojanowski, dr Aleksander Koj, doc. Tomasz Borkowski. Zastępcy członków: doc. Marek Kamiński, dr Stanisław Lewak, doc. Stefan Angielski, doc. Ryszard Niemirowicz, dr Antoni Dancewicz, doc. Waclaw Minakowski, dr Jan Stanisławski.

W wyniku tajnego głosowania do władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zostali wybrani:

Prezes — Prof. K. Zakrzewski — 123

Vice-prezes — Doc. Z. Zielińska — 125

Członkowie Zarządu:	Doc. Z. Kasprzyk	— 127 głosów
	Dr T. Kłopotowski	— 113 „
	Dr. K. Murawski	— 121 „
	Doc. W. Bicz	— 116 „
	Doc. J. Lisowski	— 122 „
	Doc. J. Popowicz	— 113 „
	Doc. J. Trojanowski	— 120 „
	Dr. A. Koj	— 101 „
	Dr. J. Patelski	— 104 „
Zastępcy członków:	Doc. M. Kański	— 111 „
	Doc. S. Angielski	— 113 „
	Doc. R. Niemirowicz	— 110 „
	Dr A. Dancewicz	— 58 „
	Dr S. Lewak	— 96 „
Komisja Rewizyjna:	Doc. Józef Chmiel	— 130 „
	Doc. Mariusz Żydowo	— 130 „
	Doc. Ryszard Schramm	— 130 „

W czasie obliczania głosów, prof. Kazimierz Zakrzewski zreferował założenia i sprawy organizacyjne III Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, który odbędzie się w Warszawie w dniach 4-7 kwietnia 1966. Na tym Zebranie zakończono.

Sekretarz Zarządu Głównego
Dr T. Kłopotowski

KOMUNIKATY ZARZĄDU GŁÓWNEGO P. T. BIOCH

I

W dniu 5 lipca 1965 roku, w siedzibie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbyło się I Zebranie (Konstytuujące) Zarządu Głównego Towarzystwa, wybranego na IV Walnym Zebraniu, w Gdańsku.

Podział funkcji został dokonany w oparciu o nowoprzyjęty Statut. Podział ten przedstawiony jest poniżej w postaci listy adresowej.

Sekretarz Zarządu Głównego
Dr T. Kłopotowski

ADRESY WŁADZ POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Prezes	— <i>Prof. dr Kazimierz Zakrzewski</i>
V-Prezes	— <i>Doc. dr Zofia Zielińska</i>
Sekretarz	— <i>Dr Tadeusz Kłopotowski</i>
Skarbnik	— <i>Doc. dr Zofia Kasprzyk</i>
Z-ca Sekretarza	— <i>Dr Krzysztof Murawski</i>
Z-ca Skarbnika	— <i>Doc. dr Włodzimierz Bicz</i>

— Warszawa 40, ul. Freta 16

CZŁONKOWIE ZARZĄDU, PEŁNOMOCNICZY:

d/s Współpracy z Innymi Towarzystwami
Doc. dr Józef Lisowski
Wrocław, ul. Chałubińskiego 4
Instytut Immunologii i Medycyny Doświadczalnej im. L. Hirszfelda

d/s Zebrań i Zjazdów
Dr Aleksander Koj
Kraków, ul. Kopernika 7
Katedra Chemii Fizjologicznej A. M.

d/s Szkolenia i Popularyzacji Biochemii
Doc. dr Juliusz Popowicz
Białystok 8, Skr. pocztowa 9

d/s Wydawniczych
Doc. dr Jerzy Trojanowski
Lublin, ul. Akademicka 12
Katedra Biochemii UMCS

d/s Współpracy z Towarzystwami Lekarskimi
Doc. dr Jerzy Patelski
Poznań, ul. Rektora Świącickiego 6
Katedra Chemii Fizjologicznej A. M.

WŁADZE ODDZIAŁÓW:

Białystok	— <i>Doc. dr Juliusz Popowicz</i> Białystok 8, Skr. pocztowa 9
Gdańsk	— <i>Doc. dr Ryszard Niemirol</i> Gdańsk 6, Al. Zwycięstwa 42 Katedra Chemii Fizjologicznej A. M.
Górny Śląsk	— <i>Prof. dr Stanisław Józkiwicz</i> Zabrze 8 — Rokitnica, ul. K. Marksa 19 Katedra Chemii Fizjologicznej A. M.
Kraków	— <i>Prof. dr Franciszek Nowotny</i> Sekretarz — <i>Dr Aleksander Koj</i> Kraków, ul. Kopernika 7 Katedra Chemii Fizjologicznej A. M.
Lublin	— <i>Doc. dr Jerzy Trojanowski</i> Lublin, ul. Akademicka 12 Katedra Biochemii UMCS
Łódź	— <i>Dr Henryk Panusz</i> Łódź 32, ul. Narutowicza 68 Katedra Chemii Fizjologicznej A. M.
Olsztyn	— <i>Doc. dr Wacław Minakowski</i> Olsztyn 5, Kortowo, Nowa Zootechnika Katedra Biochemii WSR
Poznań	— <i>Doc. dr Józef Chmiel</i> Poznań, ul. Rektora Święckiego 6 Zakład Patologii Ogólnej A. M.
Szczecin	— <i>dr Bogusław Rózycki</i> Szczecin, ul. Słowackiego 17 Katedra Biochemii WSR
Warszawa	— <i>Doc. dr Zofia Zielińska</i> Warszawa 22, ul. Pasteura 3 Instytut Biochemii Doświadczalnej im. M. Nenckiego — Zakład Biochemii
Wrocław	— <i>doc. dr Andrzej Morawiecki</i> Wrocław, ul. Chałubińskiego 4 Zakład Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

II

Zarząd Główny postanowił rozszerzyć zakres wydawnictwa seryjnego „Monografie Biochemiczne” poza druk prac habilitacyjnych. Obecnie na łamach tego wydawnictwa będą publikowane także opracowania monograficzne większe niż w *Postępkach Biochemii* oraz prace doświadczalne o objętości większej niż w *Acta Biochimica* (np. podsumowanie badań kilkuletnich) z zakresu biochemii. Na życzenie autorów będą przyjmowane do druku prace również w języku angielskim. Prace będą honorowane zgodnie z maksymalnymi obowiązującymi stawkami.

Wstępne zgłoszenia z podaniem tytułu, krótkiego streszczenia oraz przybliżonego terminu złożenia gotowego maszynopisu prosimy nadsyłać na adres:

Doc. dr J. Trojanowski

Pełnomocnik Zarządu Gł. do spraw wyd.
Lublin, ul. Akademicka 12, Katedra Biochemii

Komunikat Nr 2 Komitetu Organizacyjnego IV Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych

Komitet powiadamia, że w dn. 16-18.IX.1966 r. odbędzie się w Białymstoku IV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Problematyka naukowa Zjazdu:

- 1) Wirusowe zapalenie wątroby
- 2) Wolna tematyka

Powiadamy, że tytuły prac do przedstawienia na Zjeździe wraz ze streszczeniami, należy zgłaszać do dn. 28.II.1966 r., zaś prace do ogłoszenia in extenso do dn. 31.III.1966 r., na adres: Komitet Organizacyjny IV Zj. Pol. Tow. Epid. i Lek. Ch. Zak., Białystok, ul. Sosnowa 5, Kl. Chor. Zakaźnych AMB.

Przewodniczący Zarządu Głównego Pol. Tow. Epid. i Lek. Ch. Zak.
prof. dr med. Karol Szymański

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
Doc. dr med. Piotr Boroń

Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
Dr med. Danuta Prokopowicz

POSTĘPY BIOCHEMII

January 1966

ARTICLES IN POLISH

Volume 12

Number 1

I. Buchowicz — Immune-globulins—Properties and Structure (Serum and Vaccine Inst., Warszawa)	5
J. Rogulski — The Specificity of the Amino Acids Nitrogen Metabolism in Mammalian Tissues) Lab. Clin. Biochem., School Med., Gdańsk)	35
J. Z. Beer, O. Rosiek, J. M. Sabliński — Some Aliphatic Polyamines and Their Biological Role (Inst. Nuclear Res., Warszawa)	63
H. Augustyniak — The Structure and Properties of 2,5-Diketopiperazine (Inst. Biochem. Biophys., Warszawa)	95
M. M. Jeżewska, T. Sawicka — Free Nucleotides of Some Animals (Inst. Biochem. Biophys., Warszawa)	113
W. Gałasiński — Actinomycines and Their Antimetabolic Activity (Dep. Physiol. Chem., School Med., Białystok)	127
K. Ostrowski — The Application of Labelled Irreversible Inhibitors in Cytochemistry (Dep. Histol. Embryol., School Med., Warszawa)	153
Chronicle	163

SPIS TREŚCI

I. Buchowicz — Immunoglobuliny — własności i struktura	5
J. Rogulski — Swoistość przemian azotu aminokwasów w tkankach ssaków	35
J. Z. Beer, O. Rosiek, J. M. Sablinski — Niektóre poliaminy alifatyczne i ich znaczenie biologiczne	63
H. Augustyniak — Budowa i własności 2,5-dwuketopiperazyny	95
M. M. Jeżewska, T. Sawicka — Wolne nukleotydy u zwierząt	113
W. Gałasinski — Aktynomycyny i ich antymetaboliczne działanie	127
K. Ostrowski — Zastosowanie nieodwracalnych znakowanych inhibitorów -w cytochemii	153
Hans von Euler (W. Ostrowski)	163
Recenzja 15 tomu Progress in Biophysics and Molecular Biology (W. Szer)	167
Wpływ związków z grupy dwukumarolu na układ fibrynolityczny osocza (M. Niewiarowska)	169
Wpływ związków tiolowych na wytwarzanie fosfolipazy C w hodowlach <i>Clostridium perfringens</i> (A. J. Zbrożyna)	171
II Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (W. Ostrowski, M. Guminska, A. Koj)	172
IV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (M. Bagdasarian)	176
IV Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	177
Komunikaty Zarządu Głównego P. T. Bioch. I	181
II	182
Komunikat Komit. Org. IV Zjazdu Naukowego Polskiego Tow. Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych	183

W 2 zeszytach tego tomu ukażą się:

1. Transformacje bakteryjne, E. Bańkowska, W. T. Dobrzański, T. Osowiecki
2. Zawartość kwasu adenozynotrójforowego w erytrocytach w przypadkach patologicznych, W. Leyko
3. Hydroksylacja proliny a biosynteza kollagenu, E. Wojtecka-Łukasik
4. Metabolizm albuminy osocza w świetle badań izotopowych, A. Koj
5. Nomenklatura kinin roślinnych, J. H. Rogozińska

Kwartalnik

Cena w prenumeracie zł 80.— rocznie
zł 40.— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

CENTRALA KOLPORTAŻU PRASY I WYDAWNICTW „RUCH”
WARSZAWA, UL. WRONIA 23, KONTO PKO NR 1-6-100.020
ODDZIAŁY I DELEGATURY „RUCH”
URZĘDY POCZTOWE I LISTONOSZE
KSIĘGARNIE DOMU KSIĄŻKI

Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, Wronia 23 (tel. 20-46-83), konto PKO nr 1-6-100.024. Koszt prenumeraty ze zleceniem wysyłki za granicę jest o 40% wyższy.

Czasopismo nabywać można we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN—Ossolineum PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter) oraz w następujących Księgarniach Technicznych P.P. „Domu Książki”:

Wrocław, ul. Świdnicka 8	Warszawa, ul. Świętokrzyska 14
Łódź, ul. Piotrkowska 45	Bydgoszcz, Stary Rynek 15
Poznań, ul. Paderewskiego 6	Białystok, ul. Lipowa 43
Kraków, Rynek Główny 36	Szczecin, Al. Wojska Polskiego 29
Katowice, ul. Młyńska 2	Opole, ul. Ozimska 8
Lublin, Krakowskie Przedm. 39	

Archiwalne egzemplarze można nabywać także w Punkcie wysyłkowym Prasy Archiwalnej „Ruch”, Warszawa, ul. Srebrna 12, konto PKO nr 114-6-700041 VII O/M.

TYLKO PRENUMERATA ZAPEWNI

REGULARNE OTRZYMYWANIE CZASOPISM

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.*, 7, 601 (1961) Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora (ów), tytuł, miejsce i rok wydania; np.: Przyłęcki S. J., *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, Łódź, 1947. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York, 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

I. Buchowicz — Immunoglobuliny — własności i struktura	5
J. Rogulski — Swoistość przemian azotu aminokwasów w tkankach ssaków	35
J. Z. Beer, O. Rosiek, J. M. Sabliński — Niektóre poliaminy alifatyczne i ich znaczenie biologiczne	63
H. Augustyniak — Budowa i własności 2,5-dwuketopiperazyny	95
M. M. Jeżewska, T. Sawicka — Wolne nukleotydy u zwierząt	113
W. Gałasiński — Aktynomycyny i ich antymetaboliczne działanie	127
K. Ostrowski — Zastosowanie nieodwracalnych znakowanych inhibitorów w cytochemii	153
Hans von Euler (<i>W. Ostrowski</i>)	163
Recenzja 15 tomu <i>Progress in Biophysics and Molecular Biology</i> (<i>W. Szer</i>)	167
Wpływ związków z grupy dwukumarolu na układ fibrynolityczny osocza (<i>M. Niewiarowska</i>)	169
Wpływ związków tiolowych na wytwarzanie fosfolipazy C w hodowlach <i>Clostridium perfringens</i> (<i>A. J. Zbrożyna</i>)	171
II Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (<i>W. Ostrowski, M. Gumińska, A. Koj</i>)	172
IV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (<i>M. Bagdasarian</i>)	176
IV Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	177
Komunikaty Zarządu Głównego P. T. Bioch. I	181
II	182
Komunikat Komit. Org. IV Zjazdu Naukowego Polskiego Tow. Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych	183