

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK



TOM XI

1965

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

WYDAWANY Z ZASIŁKU
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

TOM XI

1965

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor — Irena Chmielewska

Sekretarz — Witold Brzeski

ADRES REDAKCJI

KATEDRA BIOCHEMII UW

Warszawa 22, Al. Żwirki i Wigury 6

tel. 22-30-51, wewn. 46

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1965

Nakład 1330 (1204+126)	Oddano do składania 20.VII.1965 r.
Ark. wyd. 13. Ark. druk. 15,5 + wkł.	Podpisano do druku we wrześniu 1965 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono we wrześniu 1965 r.
Cena zł 20,—	Zam. nr 1031/65. E-47

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA.

JADWIGA BRYŁA* I ANDRZEJ GARDAS*

Czynniki sprzęgające i wysokoenergetyczne pośredniki oksydacyjnej fosforylacji

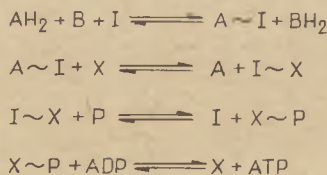
Coupling Factors and High-Energy Intermediates of Oxidative Phosphorylation

The protein factors coupling terminal electron transport and oxidative phosphorylation as well as high energy intermediates participating in oxidative phosphorylation are reviewed.

Zjawisko oksydacyjnej fosforylacji znane jest już od 25 lat (5, 33). Prowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że proces ten zachodzi w mitochondriach i jest ściśle sprzężony z transportem elektronów w łańcuchu oddechowym. Ustalono, że istnieją trzy miejsca oksydacyjnej fosforylacji zlokalizowane w trzech różnych etapach przeniesienia elektronów: 1) między NADH a cytochromem b, 2) między cytochromem b a cytochromem c, 3) między cytochromem c a tlenem cząsteczkowym.

Każdy z tych odcinków zawiera kilka przENOŚNIKÓW elektronów i dotychczas nie jest jeszcze dokładnie ustalone, który z przENOŚNIKÓW jest miejscem zamiany energii utleniania w energię chemiczną wysokoenergetycznego wiązania ATP.

Prowadzone w licznych laboratoriach badania doprowadziły do sformułowania przedstawionego na schemacie 1 hipotetycznego mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji (62, 63).



Schemat 1. Hipotetyczny mechanizm sprzężenia syntezy ATP z reakcjami oksydoredukcji

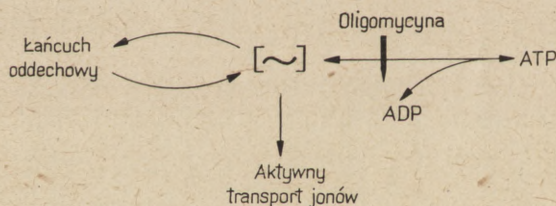
Schemat ten zakłada, że pierwszy wysokoenergetyczny związek A~I powstaje podczas utlenienia zredukowanego przENOŚNIKA elektronów AH₂ przez utleniony przENOŚNIK B. Teoretycznie możliwe jest łączenie się

* Mgr, asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

I albo z utlenioną formą nośnika elektronów (63), albo ze zredukowaną (18). Większość autorów przyjmuje jednak połączenie z formą utlenioną.

Z licznych doświadczeń wiadomo, że w ściśle sprzężonych mitochondriach przy braku ADP i ortofosforanu następuje zahamowanie oddychania, co jest tłumaczone związaniem przENOŚNIKA elektronów A przez I. Badania nad czynnikami rozprzegającymi i hamującymi oksydacyjną fosforylację oraz reakcjami wymiany ATP-P i ATP-ADP wskazywały jednak, że A~I nie bierze bezpośrednio udziału w syntezie ATP. Konieczne zatem było wprowadzenie hipotetycznego związku X, który wiążąc się z I uwalnia A, a następnie łącząc się z fosforanem uwalnia I. Ufosforylowany związek X reagując z ADP daje ATP. Obszerne omówienie schematu oksydacyjnej fosforylacji znaleźć można w jednym z wcześniejszych numerów *Postępów Biochemii* (81).

Istnienie wysokoenergetycznych pośredników zostało już wykazane doświadczalnie, tak np. zaobserwowano w mitochondriach pewne zjawiska wymagające dostarczenia energii, której źródłem niekoniecznie musi być ATP (schemat 2). Takim procesem jest aktywny transport jonów przez błony mitochondrialne (14, 35) lub odwrócenie łańcucha oddechowego (22, 64). Procesy te przebiegają nie tylko w obecności ATP, ale również wtedy, gdy synteza ATP jest zahamowana np. przez działanie oligomycyny, a także przy braku ortofosforanu w mieszaninie reakcyjnej. Wskazuje to na istnienie nieufosforylowanych wysokoenergetycznych pośredników i możliwość wykorzystania ich energii bez przekształcenia w energię ATP.



Schemat 2. Możliwość wykorzystania wysokoenergetycznych pośredników oksydacyjnej fosforylacji

W ostatnich latach zagadnienie izolowania i identyfikacji czynników sprzęgających i wysokoenergetycznych pośredników zajmuje główne miejsce w badaniach nad oksydacyjną fosforylacją. Postęp tych badań jest utrudniony na skutek złożoności samego procesu, katalizowanego przez kompleksy enzymatyczne ściśle związane ze strukturą mitochondriów. Rozbicie tej struktury mające na celu wyizolowanie pośredników może powodować powstawanie artefaktów. Ponadto wysokoenergetyczne pośredniki są związkami bardzo labilnymi o dużej aktywności cząsteczkowej, co znacznie utrudnia ich izolowanie.

I. Czynniki białkowe

W 1960 roku w pracowni Rackera (41, 52) przez mechaniczne rozbicie mitochondriów otrzymano fragmenty utleniające substraty oddechowe, ale nie przeprowadzające oksydacyjnej fosforylacji. Z ekstraktu rozbitych mitochondriów wyizolowano białko przywracające tym fragmentom zdolność do przeprowadzania syntezy ATP. Na podstawie tych doświadczeń wysunięto przypuszczenie, że białko to jest co najmniej składnikiem kompleksu sprzęgającego oksydacyjną fosforylację z transportem elektronów. Ponieważ niewiele wiadomo o mechanizmie tego sprzęgania, tymczasowo nazwano je czynnikiem sprzęgającym i oznaczono symbolem F_1 . Dodanie czynnika F_1 do fragmentów mitochondrialnych, w których stosunek zestryfikowanego fosforanu do pobranego tlenu (P:O), jest bliski zeru, wywołuje zwiększenie P:O do około jedności. Stosunek P:O jest miarą oksydacyjnej fosforylacji i jego pomiar przed i po dodaniu czynników sprzęgających do fragmentów mitochondrialnych jest jedynym sposobem określania aktywności tych czynników.

Powstało pytanie, czy czynnik F_1 sprzęga oksydacyjną fosforylację we wszystkich trzech odcinkach łańcucha oddechowego, czy też jest specyficzny tylko dla jednego. Odpowiedź na nie można było uzyskać mierząc stosunek P:O przy zastosowaniu różnych substratów oddechowych. Jak wiadomo najczęściej stosowanymi substratami są: NADH, którego utlenienie jest związane z fosforylacją na wszystkich trzech etapach, bursztynian — z dwiema na etapach 2) i 3) między cytochromem *b* — cytochromem *c* — tlenem oraz askorbinian, dający tylko jedną fosforylację między cytochromem *c* a tlenem.

Badania wykazały, że stosunek P:O wzrastał po dodaniu czynnika F_1 do niefosforylujących fragmentów w taki sam sposób dla NADH i bursztynianu użytych jako substraty oddechowe, natomiast nie zwiększał się, jeżeli substratem był askorbinian (50). Wskazywało to na specyficzność czynnika F_1 , przywracającego fosforylację tylko między cytochromem *b* a cytochromem *c*.

Czynnik F_1 poza sprzęganiem oksydacyjnej fosforylacji jest konieczny do odwrócenia transportu elektronów we fragmentach mitochondrialnych i wykazuje aktywność ATP-azy. ATP-aza ta hydrolizuje również GTP, UTP, ITP, lecz nie hydrolizuje CTP.

Stosując inną technikę rozbijania mitochondriów otrzymano inne czynniki sprzęgające. Przez rozbicie mitochondriów ultradźwiękami lub w wyniku alkalicznej ekstrakcji w 0,02 M roztworze amoniaku otrzymano dwie frakcje: nierozpuszczalną — zawierającą fragmenty mitochondrialne zdolne do utleniania substratów oddechowych, lecz nie katalizujące oksydacyjnej fosforylacji, oraz rozpuszczalną, z której wyizolowano połączenia białkowe. Dodanie ich do niefosforylujących fragmentów przywracało tym fragmentom zdolność katalizowania syntezy ATP. Białka

te nazwano czynnikami sprzęgającymi F_3 i F_4 (20, 54). Z niefosforylujących fragmentów mitochondrialnych w wyniku działania ultradźwiękami, trawienia trypsyną lub działania mocznika izolowano czynniki sprzęgające oznaczone symbolami F_0 i F_2 (52, 55). Metody otrzymywania różnych czynników zestawiono w tabelicy 1, metody otrzymywania fragmentów niefosforylujących, którym wyizolowane czynniki przywracają zdolność do fosforylacji — w tabelicy 2.

Tabela 1

Metody otrzymywania i własności czynników sprzęgających oksydacyjną fosforylację

Nazwa	Metoda	Własności
Czynnik F_1	Rozbicie mitochondriów w homogenizatorze Nossala (41, 52)	Aktywność ATP-azy, konieczny dla oksydacyjnej fosforylacji, reakcji wymiany ATP-P i odwrócenia łańcucha oddechowego w P-fragmentach
Czynnik F_2	Rozbicie ultradźwiękami N-fragmentów (52)	Konieczny dla oksydacyjnej fosforylacji i reakcji wymiany ATP-P w N-S fragmentach
Czynnik F_3	Rozbicie ultradźwiękami mitochondriów (54)	Stymuluje reakcję wymiany ATP-P w P- i T-fragmentach
Czynnik F_4	Alkaliczna ekstrakcja mitochondriów (20)	Konieczny dla oksydacyjnej fosforylacji, reakcji wymiany ATP-P i odwrócenia łańcucha oddechowego w P-fragmentach
Czynnik F_0	Rozbicie ultradźwiękami T-U-fragmentów (55)	Przywraca ATP-azie, wyizolowanej z mitochondriów wrażliwość na oligomycynę
Inhibitor ATP-azy	Alkaliczna ekstrakcja mitochondriów (52)	Hamuje aktywność ATP-azy, nie wpływając jednak na oksydacyjną fosforylację.

Bardzo interesującym czynnikiem, wyizolowanym z mitochondriów w pracowni Rackera jest czynnik F_0 (56). Przywraca on ATP-azie wrażliwość na oligomycynę, utlenia NADH i bursztynian, a po dodaniu czynników F_1 i F_2 przywraca oksydacyjną fosforylację, co prawda z niewielką wydajnością (stosunek P:O wynosi około 0,08). Byłby to zatem po raz pierwszy otrzymany rozpuszczalny układ, katalizujący utlenianie substratów oddechowych sprzężone z syntezą ATP.

Racker (57) wysuwa przypuszczenie, że tylko część wyizolowanych w jego pracowni czynników bierze bezpośredni udział w oksydacyjnej fosforylacji, a część jest elementami strukturalnymi mitochondriów. Takim białkiem strukturalnym mogłyby być czynnik F_4 , który ma wiele

Tablica 2

Metody otrzymywania i własności niefosforylujących fragmentów mitochondrialnych

Nazwa	Metoda	Własności
N-fragmenty	Rozbicie mitochondriów w homogenizatorze Nossala (41, 52)	Katalizują reakcję wymiany ATP-P i oksydacyjną fosforylację na etapie cyt. b-cyt. c po dodaniu czynnika F_1
N-S-fragmenty	Rozbicie ultradźwiękami N-fragmentów (41, 52)	Katalizują reakcję wymiany ATP-P i oksydacyjną fosforylację na etapie cyt. b-cyt. c po dodaniu czynnika F_1 i F_2
T-fragmenty	Trawienie S-fragmentów* trypsyną (54)	Katalizują reakcję wymiany ATP-P po dodaniu czynnika F_3
U-fragmenty	Ekstrakcja S-fragmentów* 2M roztworem mocznika (54)	Katalizują reakcję wymiany ATP-P i oksydacyjną fosforylację na etapie cyt. b-cyt. c po dodaniu czynnika F_1
T-U-fragmenty	Ekstrakcja T-fragmentów 2M roztworem mocznika (55)	Przywracają ATP-azie wrażliwość na oligomycynę
P-fragmenty	Rozbicie ultradźwiękami mitochondriów w 2% roztworze fosfolipidów (20)	Katalizują reakcję wymiany ATP-P i oksydacyjną fosforylację na etapie NADH-cyt. c po dodaniu czynników F_1 i F_4

* S-fragmenty otrzymywane przez rozbicie mitochondriów ultradźwiękami (54) katalizują oksydacyjną fosforylację bez dodania czynników sprzęgających.

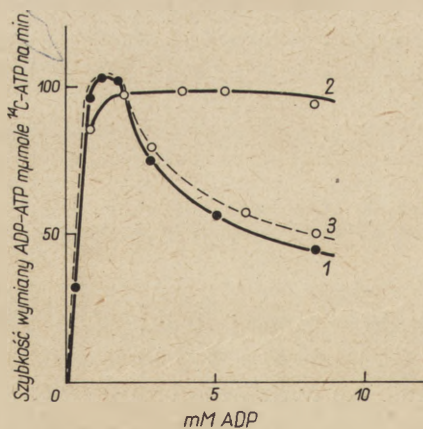
własności podobnych do własności strukturalnego białka mitochondriów otrzymanego przez Criddla i współpracowników (cyt. wg 57).

Na podstawie różnic we wrażliwości na trawienie trypsyną czynników sprzęgających oksydacyjną fosforylację, wyizolowanych oraz związanych z błoną mitochondrialną, Racker (58) proponuje następujące ich ułożenie w błonie mitochondrialnej. Najbliżej powierzchni znajdowałyby

się inhibitor ATP-azy i czynnik F_3 , czynnik F_4 byłby zlokalizowany dalej, ponieważ po wyizolowaniu jest łatwo inaktywowany działaniem trypsyny a w stanie związanym bardzo trudno, a czynnik wrażliwy na oligomycynę F_0 byłby ułożony najgłębiej, ponieważ dopiero w bardzo drastycznych warunkach jest inaktywowany przez trypsynę i mocznik.

Prace prowadzone w pracowni Lehningera wykazały, że reakcja wymiany ATP-ADP zachodząca w mitochondriach (70, 74) i fragmentach mitochondrialnych (21, 72, 73) jest hamowana przez 2,4-dwunifrofenol, arsenian, oligomycynę, azydek oraz wówczas, gdy nośniki elektronów są zredukowane, tj. w obecności substratu oddechowego i cyjanku. Około 50% aktywności enzymu katalizującego tę wymianę daje się wyekstrahować 0,3 M roztworem siarczanu amonowego z mitochondriów wątroby szczura (75). Stwierdzono, że po wyekstrahowaniu enzymu z fosforylujących fragmentów mitochondrialnych wydajność oksydacyjnej fosforylacji malała — stosunek P:O mierzony z β -hydroksymaślanem jako substratem spadał z 3 do około 2, zaś z askorbinianem i egzogennym cytochromem c z 1 do 0. Enzym ten oczyszczono około 140 razy za pomocą frakcjonowania ekstraktu siarczanem amonowym i chromatografii na DEAE-celulozie i CM-celulozie (75). Jego dodanie do fragmentów niefosforylujących przywracało oksydacyjną fosforylację — z askorbinianem jako substratem stosunek P:O wzrastał do jedności. Ponieważ ekstrakcja enzymu katalizującego wymianę ATP-ADP znosi fosforylację między cytochromem c a tlenem, a jego dodanie ją przywraca, uważa się, że jest on czynnikiem sprzęgającym syntezę ATP z transportem elektronów w ostatnim etapie przemian łańcucha oddechowego.

Kinetyczne badania reakcji wymiany ATP-ADP prowadzone na wyizolowanym enzymie wykazały, że jego aktywność zależy od stężenia ADP (rysunek 1).

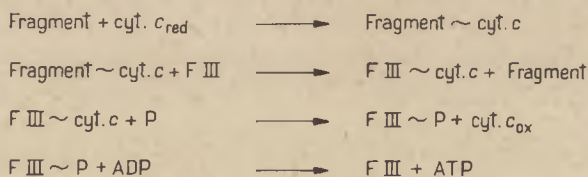


Rys. 1. Zależności szybkości wymiany ATP-ADP od stężenia ADP (wg 26)

1. — bez dodatków, 2. — z cyt. c_{red} , 3. — z cyt. c_{red} i oligomycyną

Początkowo ze wzrostem stężenia ADP szybkość reakcji znacznie rośnie, osiąga maksimum przy stężeniu około 1 mM ADP a następnie spada. Taka zależność szybkości reakcji od stężenia substratu jest charakterystyczna dla inhibicji substratowej i była interpretowana w przypadku esterazy acetylocholinowej (80) i dehydrogenazy fosfortriozy (82) jako dowód istnienia dwóch miejsc przyłączenia substratu, różniących się wartościami stałych dysocjacji. Hamowanie reakcji wymiany ATP-ADP przez duże stężenia ADP można cofnąć przez dodanie zredukowanego cytochromu c. Działa on w tym przypadku specyficznym i nie może być zastąpiony utlenionym cytochromem c, albuminą surowicy, czy hemoglobina. Efekt cytochromu c jest znoszony przez oligomycynę. Otrzymane wyniki nasuwają przypuszczenie, że zredukowany cytochrom c łączy się z enzymem wypierając ADP z drugiego miejsca przyczepu, a oligomycyna hamuje powstawanie kompleksu cyt. c_{red} -enzym (26, 71).

W 1958 roku Linnane (36) zaobserwował, że rozbicie mitochondriów ultradźwiękami w obecności EDTA daje fosforylujące fragmenty. Jednak do maksymalnej fosforylacji konieczne było dodanie rozpuszczalnego białka wyizolowanego z supernatantu. Dalsze badania doprowadziły do izolowania trzech czynników, oznaczonych numerami I, II i III (F I, F II i F III) biorących udział w trzech kolejnych fosforylacjach (27). Czynniki I, II i III katalizują reakcję wymiany ATP-ADP i jest konieczny do przeprowadzenia fosforylacji na etapie cyt. c-tlen (79). Jest to białko o masie cząsteczkowej około 35 000 (37, 76). Według Webstera (77, 78, 79) tworzy ono wysokoenergetyczny kompleks z cytochromem c, a następnie z fosforanem. Z kompleksu tego fosforan przenoszony jest na ADP (schemat 3).



Schemat 3. Proponowany przez Webstera (72) mechanizm oksydacyjnej fosforylacji związanej z utlenieniem zredukowanego cytochromu c

Fragment — fragment mitochondrialny, F III — czynnik sprzęgający III

Czynnik F III wykazuje bardzo podobne właściwości do związku wyizolowanego w pracowni Lehnigera (75). Nie stwierdzono jednak, czy białko otrzymane przez Lehnigera i współpracowników może tworzyć wysokoenergetyczny kompleks z cytochromem c.

Czynnik II, wyizolowany przez Beyera (6) jest białkiem o masie cząsteczkowej 124 000. Według tego autora bierze on udział w procesie fosforylacji oksydacyjnej na etapie cytochrom b-cytochrom c (7).

Czynnik I odgrywałby analogiczną rolę w procesie syntezy ATP na

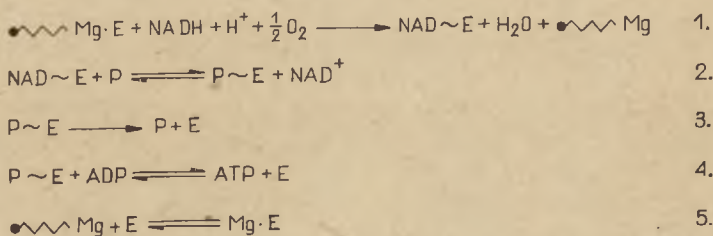
etapie NADH, cytochrom b, tworząc wysokoenergetyczne połączenie z NAD (27, 65).

Udział NAD w oksydacyjnej fosforylacji wykazał Pinchot (44, 45, 46, 47, 48, 49, 59).

II. Czynniki niebiałkowe

W 1953 roku Pinchot (44) badając układ enzymatyczny katalizujący proces syntezy ATP związany z utlenianiem NADH u bakterii *Alcaligenes faecalis* stwierdził, że: dla powiązania fosforylacji z utlenianiem NADH konieczna jest obecność dwóch rozpuszczalnych czynników: termolabilnego i termostabilnego. Czynniki niewrażliwy na ciepło oczyszczono i zidentyfikowano jako oligonukleotyd typu RNA, zawierający adeninę, guaninę i uracyl w stosunku molarnym 2:1:1 (45). Związek ten jest niewrażliwy na RN-azę, co sugeruje, że nukleotyd urydylowy znajduje się na końcu łańcucha (46, 59). Oligonukleotyd ten oraz jony Mg^{2+} służą do połączenia składnika termolabilnego z fragmentem zdolnym do utleniania NADH tworząc w ten sposób układ fosforylujący. Gdy aktywne fragmenty utleniają NADH w nieobecności P i ADP, oddysocjowuje z nich do frakcji rozpuszczalnej wysokoenergetyczny pośrednik. Dlatego odwirowane z takiego układu fragmenty mogą utleniać NADH, ale nie fosforylują. Zdolność do fosforylacji zostaje im przywrócona dopiero po dodaniu supernatantu (47).

Pinchot (48,49) sugeruje, że pośrednik jest związkiem bogatym w energię i zawiera białko (enzym sprzęgający) połączone z NAD. Na poparcie swojej hipotezy przytacza następujące dane: 1) podczas izolowania kompleksu wysokoenergetycznego białko jest trwale związane z NAD, 2) w czasie inkubacji tego kompleksu z ortofosforanem i ADP wytwarzane są równoważne ilości NAD^+ i ATP, 3) przyłączenie NAD^+ do białka jest uwarunkowane obecnością ATP. Autor ten proponuje następującą kolejność reakcji w procesie oksydacyjnej fosforylacji katalizowanej przez preparaty z *Alcaligenes faecalis* (schemat 4) (wg. 48, 49).



Schemat 4. Proponowany mechanizm oksydacyjnej fosforylacji katalizowanej przez preparaty z *A. faecalis* (wg 49)

● — oksydaza NADH,

— oligonukleotyd typu RNA

Reakcja 1 przedstawia utlenienie NADH przez fosforylujący układ zawierający oksydazę NADH dołączoną do enzymu sprzęgającego (E) za pomocą specyficznego oligonukleotydu i magnezu. Utlenienie NADH sprzężone jest z utworzeniem wysokoenergetycznego pośrednika $\text{NAD}\sim\text{E}$ i oddysocjowaniem niefosforylującego fragmentu. W reakcji 2 zachodzi utworzenie ufosforylowanego związku białkowego $\text{E}\sim\text{P}$. Reakcja 3 wskazuje na nietrwałość ufosforylowanego pośrednika. W reakcji 4 następuje połączenie $\text{E}\sim\text{P}$ z ADP z utworzeniem ATP i uwolnieniem enzymu sprzęgającego. Wreszcie w reakcji 5 następuje regeneracja fosforylującego kompleksu z fragmentu nieaktywnego i enzymu sprzęgającego.

Synteza ATP przy udziale wysokoenergetycznego pośrednika, ani też reakcja odwrotna, czyli dołączenie NAD^+ do enzymu sprzęgającego w obecności ATP nie były hamowane przez 2,4-dwunitrofenol (49). Natomiast związek ten uniemożliwiał utworzenie się kompleksu $\text{NAD}\sim\text{E}$. Sugeruje to, że 2,4-dwunitrofenol nie rozszczepia wysokoenergetycznego pośrednika, lecz uniemożliwia ponowne dołączenie niefosforylującego fragmentu do enzymu sprzęgającego — reakcja 5 przebiegająca ze strony prawej do lewej.

Schemat ten tłumaczy również wiele obserwacji poczynionych nad procesem syntezy ATP w mitochondriach zwierzęcych. Stosunek P:O obserwowany w preparatach z *Alcaligenes faecalis* jest niższy od jedności. W celu wytłumaczenia oksydacyjnej fosforylacji w łańcuchu oddechowym mitochondriów zwierzęcych należałoby wprowadzić dwa nowe pośredniki. Mogłyby one zawierać Co Q i cytochrom c połączone ze specyficznymi białkami. Wymianę ATP-ADP w mitochondriach zwierzęcych można tłumaczyć reakcją 4, a działanie mitochondrialnej ATP-azy wydaje się być uwarunkowane równaniami 3 i 4.

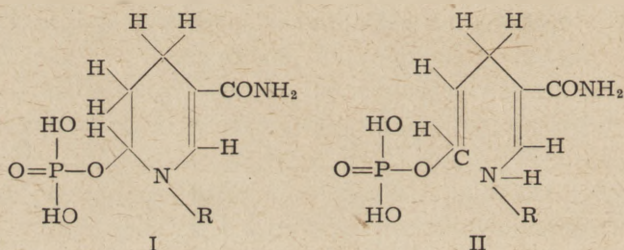
Niefosforylowany wysokoenergetyczny kompleks sugerowany przez P i n c h o t nie jest jedyną pochodną NAD proponowaną jako pośrednik oksydacyjnej fosforylacji. Purvis (53) przyjmuje istnienie oprócz NAD i NADH trzeciej formy nazwanej przez niego „extra NAD”. Według tego autora podczas inkubacji mitochondriów z fosforanem i ADP lub 2,4-dwunitrofenolem ilość NAD reagująca z dehydrogenazą alkoholową jest większa od sumy wartości $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$, oznaczonej w czasie zerowym. Purvis przyjmuje, że ta dodatkowa ilość NAD została uwolniona z jakiegoś prekursora, który nie reaguje z dehydrogenazą alkoholową i którego struktura i funkcja nie zostały jeszcze ustalone. Związek ten mógłby odpowiadać kompleksowi $\text{NAD}\sim\text{I}$ — postulowanemu przez S l a t e r a wysokoenergetycznemu pośrednikowi oksydacyjnej fosforylacji (63).

G r i f f i t h s (28, 30, 31) donosi o innym pośredniku będącym ufosforylowaną formą NAD, różną od NADP. Pośrednik ten powstaje w katalizowanej przez mitochondria lub fragmenty submitochondrialne reakcji redukcji NAD^+ przez bursztynian zachodzącej w obecności fosforanu. Nie

powstaje on, jeżeli mieszanina inkubacyjna zawiera jako substraty: pirogronian, jabłczan i glutaminian, powstaje w małych ilościach w przypadku użycia α -ketoglutaranu i β -hydroksymasłanu. Według Griffithsa (30, 31) powstały pośrednik, izolowany z supernatantu za pomocą chromatografii i elektroforezy po cieplnej denaturacji mitochondrialnego białka, jest pochodną NAD, absorbującą przy około 320 m μ i zawierającą równoważne ilości fosforanu i NAD. Tworzenie się tego związku jest hamowane przez amytał, malonian i antymycynę, co wskazuje, że do jego powstawania niezbędny jest transport elektronów.

Po inkubacji wydzielonego pośrednika z mitochondriami lub fragmentami mitochondriów w obecności ADP stwierdzono tworzenie się ATP i NADH, przy czym z dwóch moli pośrednika powstawał jeden mol NADH oraz mieszanina kilku pochodnych NAD (29). Jednym z nich może być opisany po raz pierwszy przez Krebsa (19) kompleks NADH-X, drugi związek absorbujący w 295 m μ może mieć budowę podobną do budowy produktu kwasowej modyfikacji NADH (15).

W oparciu o te dane Griffiths (28) proponuje dla wydzielonej przez siebie, a postulowanej uprzednio przez Burtona i Kaplana (15) oraz Barltropa (4) ufosforylowanej pochodnej NADH budowę I lub II, przy czym II jest formą otwartą związku I.



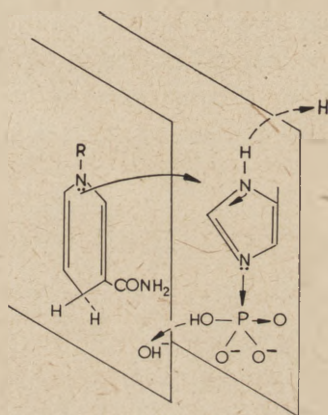
Przyłączenie fosforanu do NADH w pozycji 6 pierścienia nikotynamidoadeninowego przyjmuje Griffiths w oparciu o spostrzeżenia Coopera, Neuberta i Chaplaina (cyt. wg 28), którzy wykazali, że pochodna NAD z zablokowaną pozycją 6 przez grupę aminową, jest silnym inhibitorem syntezy ufosforylowanego NADH.

W celu potwierdzenia hipotezy, że ufosforylowana pochodna NADH wykryta przez Griffithsa bierze udział w oksydacyjnej fosforylacji, było konieczne zbadanie wpływu czynników rozprzegających na jej wytwarzanie się i przemiany. Doświadczenia wykazały, że 2-4-dwunitrofenol hamuje tworzenie się tej pochodnej, ale nie uniemożliwia jej przekształcenie do NADH i fosforanu, czy ATP. Oligomycyna nie hamuje tworzenia się ufosforylowanej pochodnej NADH, ani jej rozszczepienia do NADH i fosforanu, lecz uniemożliwia reakcję przeniesienia reszty fosforanowej z tego związku na ADP (28).

Tworzenie przez mitochondria wysokoenergetycznej ufosforylowanej pochodnej NADH po inkubacji z bursztynianem oraz powstawanie ATP

z tego związku w reakcji wrażliwej na oligomycynę sugerują, że może on być pośrednikiem w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Fakt, że podczas inkubacji mitochondriów z substratami związanymi z NAD nie obserwowano powstawania tego pośrednika, nie jest dowodem sprzecznym z tym przypuszczeniem. Można założyć, że wynik ten jest skutkiem ustawnego „obrotu” ufosforylowanej pochodnej NADH, zachodzącego w obecności substratów związanych z NAD.

Udział dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego w procesie oksydacyjnej fosforylacji przyjmuje również *Estabrook* (24) na podstawie badań fluorymetrycznych. W 1958 roku *Chance* i *Baltscheffsky* (16) zaobserwowali, że fluorescencja zredukowanego dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego w mitochondriach jest o wiele intensywniejsza niż

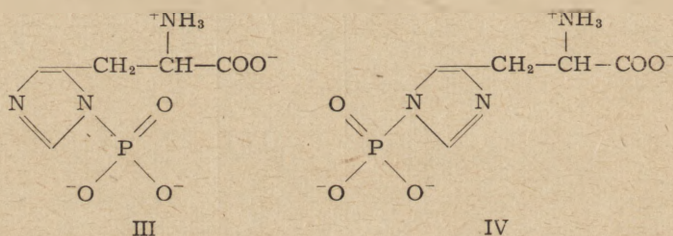


Rys. 2. Możliwy mechanizm aktywacji imidazolu przez pierścień pirydynowy NADH celem utworzenia fosfoimidazolu (wg 24)

w roztworach wodnych. W kilka lat później *Estabrook* (23) i *Avidor* (3) stwierdzili, że zredukowany dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy fluoryzuje znacznie intensywniej w mitochondriach niż w połączeniu z rozpuszczalnymi białkami enzymatycznymi (11, 61). W 1963 roku *Estabrook* i współpracownicy (24) wykazali, że stopień podwyższenia fluorescencji zależy od stanu mitochondriów (17). Przejście ze stanu 2 (w którym czynnikiem ograniczającym oddychanie jest brak substratu) do stanu 4 (w którym brak akceptora uniemożliwia oddychanie) jest związane ze wzrostem fluorescencji, sześć razy większym od wzrostu jakiego należałoby oczekiwać ze względu na zmianę stężenia NADH. W warunkach intensywnego oddychania zachodzącego w stanie 3, albo w wyniku działania czynników rozprzegających oksydacyjną fosforylację fluorescencja zmniejsza się do połowy w porównaniu z obserwowaną w stanie 4. Fakty te wskazują, że podwyższenie fluorescencji może być wywołane przez niskoenergetyczny związek zawierający NADH. Nawiązując do obserwowanego przez *Theorella* i *McKinley-McKee* (68, 69) wzrostu intensywności fluorescencji emitowanej przez kompleks NADH

z dehydrogenazą alkoholową po dodaniu imidazolu Estabrook (24) przyjmuje, że intensywna fluorescencja zredukowanego dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego obserwowana w mitochondriach jest wywołana przez trójskładnikowy kompleks: enzym·NADH·białko zawierające histydynę. Oddziaływanie między NADH a pierścieniem imidazolowym histydyny — może zdaniem Estabrooka powodować jego zaktywowanie, umożliwiające reakcję z fosforanem z wytworzeniem ugrupowania fosfoimidazolowego przy jednoczesnym uwolnieniu NADH (rysunek 2).

Rolę pośrednika w oksydacyjnej fosforylacji przypisuje ufosforylowanej formie histydyny również Boyer i współpracownicy (10, 12, 13, 42, 43, 67). Badacze ci zaobserwowali w 1961 roku włączanie znakowanego fosforanu do frakcji białkowej mitochondriów (67). Po proteolitycznej i alkalicznej degradacji znakowanego materiału izolowano związek, który wykazywał wszystkie właściwości syntetycznej fosfohistydyny (12). Nie ustalono jednak czy fosforan w biologicznie czynnym związku jest przyłączony do N-1 (wzór III) czy do N-3 (wzór IV) pierścienia imidazolowego histydyny.



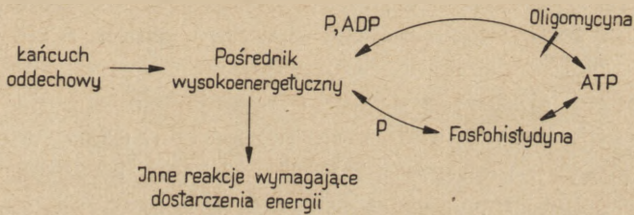
Dalsze obserwacje pozwoliły na wysunięcie przypuszczenia, że wbudowana w białko fosfohistydyna jest wysokoenergetycznym pośrednikiem w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Podczas inkubacji mitochondriów w obecności tlenu i radioaktywnego fosforanu, ale bez ADP, następowało bardziej gwałtowne znakowanie fosforanem histydyny niż wewnątrzmitochondrialnego ATP (12). Fosforylację histydyny obserwowano również w czasie inkubacji mitochondriów z ATP. Dodany 2,4-dwunitrofenol do mieszaniny reakcyjnej uniemożliwiał tworzenie się fosfohistydyny przy udziale ³²P, ale nie hamował jej powstawania, gdy donatorem znakowanego fosforanu było AT³²P. Ponadto obserwowano wymianę między fosfohistydyną związaną z białkiem a P lub ATP (12, 42).

Boyer (43) sugeruje, że tworzenie się ufosforylowanego pośrednika imidazolowego nie wiąże się bezpośrednio z reakcjami utleniania i redukcji. Reakcje oksydoredukcyjne mogłyby być sprzężone z tworzeniem zaktywowanego związku zdolnego do łączenia się z P dając w ten sposób ufosforylowany imidazol, który można również otrzymać w wyniku działania ATP.

Badania Slatera i współpracowników z 1964 roku (64) rzuciły nowe światło na rolę fosfohistydyny w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Zauważono mianowicie, że w doświadczeniach przeprowadzanych w 20°

oligomycyna hamowała tylko w 50% włączenie fosforanu do mitochondrialnego ATP. Obliczenie stopnia inhibicji było utrudnione z dwóch względów, a mianowicie: 1) w obecności oligomycyny zachodzi początkowo bardzo gwałtowne znakowanie, a dopiero później następuje znaczne zwolnienie tej reakcji, 2) w nieobecności oligomycyny znakowanie jest tak gwałtowne przez pierwsze 10 sekund, że nie można obliczyć szybkości początkowej tej reakcji.

Celem zmniejszenia szybkości włączania fosforanu do frakcji białkowej przeprowadzono oznaczenia w 0°. W tych warunkach oligomycyna hamowała w 96—99% włączenie ^{32}P do mitochondrialnego ATP, ale nie miała wpływu na znakowanie materiału białkowego. Wykazano również, że w nieobecności oligomycyny szybkość znakowania fosfohistydyny wynosiła tylko około 1,5% szybkości znakowania ATP. W oparciu o ten fakt Slater wykluczył udział fosfohistydyny jako pośrednika występującego na głównej drodze oksydacyjnej fosforylacji i umieścił ją na drodze bocznej, niewrażliwej na oligomycynę (schemat 5).



Schemat 5. Miejsce fosfohistydyny w procesie oksydacyjnej fosforylacji wg Slatera (64)

Takie umieszczenie fosfohistydyny jest zgodne z propozycją A h m e d a i J u d a h a (1, 2) z 1961 roku odnośnie roli ufosforylowanych białek mitochondrialnych i zawartej w nich energii w transporcie wody (2) i jonów (32, 40, 51), przez błony mitochondrialne.

Stwierdzono również, że powstawanie fosfohistydyny zachodzi zarówno podczas inkubacji z fosforanem, jak i z ATP wyciągów otrzymanych w wyniku zamrożenia i odtajenia mitochondriów, przy czym proces ten nie zależy od transportu elektronów. Spostrzeżenia te wskazują na możliwość katalizowania syntezy tego związku przez rozpuszczalny układ enzymatyczny (43). Ostatnie badania grupy B o y e r a nad rolą fosfohistydyny (9) wskazują na obecność dwu różnych form tego związku, przy czym fosfohistydyna otrzymywana z rozpuszczalnych wyciągów mitochondrialnych (43) wydaje się być ściśle związana z syntetazą bursztynylo~CoA (39).

Rozważano również udział fosfolipidów w procesie oksydacyjnej fosforylacji. G a r b u s, D e L u c a, L o o m a n s, S t r o n g (25) zauważyli gwałtowne włączenie fosforanu do frakcji lipidowej z wytworzeniem połączenia o właściwościach ufosforylowanego analogu fosfoinozytydu. Re-

akcja ta nie było zależna od rodzaju dodanego substratu i nie była wrażliwa na oligomycynę, ale była hamowana w warunkach anaerobowych oraz w obecności cyjanku, azydku, antymycyny i 2,4-dwunitrofenolu. Jednak ze względu na 15—20-krotnie szybsze znakowanie ATP niż lipidów wyklucza się udział tych związków jako pośredników w syntezie ATP.

III. Uwagi końcowe

Dotychczasowe wyniki badań nad izolowaniem i udziałem wysokoenergetycznych pośredników i czynników sprzęgających syntezę ATP z transportem elektronów pozwalają na wyjaśnienie w pewnym stopniu mechanizmu tego procesu. Można już określić warunki, jakie powinien spełniać związek biorący bezpośredni udział w oksydacyjnej fosforylacji. Powinien on być zdolny do tworzenia wysokoenergetycznego połączenia z ortofosforanem w czasie funkcjonowania łańcucha oddechowego lub w reakcji z ATP przy zablokowaniu transportu elektronów. Powinien przenosić grupę fosforanową na ADP z wytworzeniem ATP, z szybkością równą szybkości oksydacyjnej fosforylacji.

Nie wszystkie opisane pośredniki wydają się spełniać te warunki i prawdopodobnie nie wszystkie biorą bezpośredni udział w oksydacyjnej fosforylacji. Część z nich może być składnikami strukturalnymi mitochondriów (57). Inne mogą uniemożliwiać wykorzystanie wysokoenergetycznych połączeń na innych drogach niż synteza ATP (34). Jeszcze inne są być może artefaktami lub wysokoenergetycznymi połączeniami dostarczającymi energii do innych procesów metabolicznych. Nie można zapominać o tym, że rozbitcie mitochondriów powoduje zmianę wrażliwości na inhibitory oksydacyjnej fosforylacji. I tak zmienia się wrażliwość na atraktylozyd (83), hamuje on oksydacyjną fosforylację wyłącznie w ściśle sprzężonych mitochondriach, nie działa natomiast na fosforylujące fragmenty mitochondrialne i rozprężone mitochondria. Mitochondrialne fragmenty fosforylujące nie wykazują zjawiska ścisłego sprzężenia i oprócz ADP fosforylują również GDP, UDP i IDP (38).

Wydaje się, że nagromadzona ilość faktów doświadczalnych wskazuje na to, że tymczasowa nazwa czynniki sprzęgające oksydacyjną fosforylację z transportem elektronów nie jest odpowiednia. Nazwa ta mylnie sugeruje udział wyizolowanych związków w powstawaniu pierwszego wysokoenergetycznego wiązania, podczas gdy rzeczywiście biorą one udział w reakcjach przeniesienia energii z pierwszego wysokoenergetycznego pośrednika do ATP. Ponieważ niektóre wyizolowane połączenia katalizują reakcje charakterystyczne dla syntetaz, Beyer (8) proponuje zmianę nazwy *czynnik sprzęgający* na *syntetazę ATP*.

Pani Profesor dr Irenie Chmielewskiej składamy serdeczne podziękowanie za pomoc i cenne uwagi w trakcie przygotowywania artykułu.

LITERATURA

1. Ahmed K., Judah J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 295 (1963).
2. Ahmed K., Judah J. D., Gallagher C. H., *Nature* **191**, 1309 (1961).
3. Avi-Dor Y., Olson J. M., Doherty M. D., Kaplan N. O., *J. Biol. Chem.* **237**, 2377 (1962).
4. Barltrop J. A., Grubb P. W., Hesp B., *Nature* **199**, 759 (1963).
5. Belicer W. A., Cibakowa E. T., *Biochimija* **4**, 516 (1939).
6. Beyer R. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 460 (1964).
7. Beyer R. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 184 (1964).
8. Beyer R. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 764 (1964).
9. Bieber L. L., Lindberg O., Duffy J. J., Boyer P. D., *Nature* **202**, 1316 (1964).
10. Boyer P. D., *Science* **141**, 1147 (1963).
11. Boyer P. D., Theorell H., *Acta Chem. Scand.* **10**, 447 (1956).
12. Boyer P. D., DeLuca M., Ebner K. E., Hultquist D. E., Peter J. B., *J. Biol. Chem.* **237**, PC 3306 (1962).
13. Boyer P. D., Hultquist D. E., Peter J. B., Kreil G., Mitchell R. A., DeLuca M., Hinkson J. W., Butler L. G., Moyer R. W., *Fed. Proc.* **22**, 1080 (1963).
14. Brierly G. P., Bachmann E., Green D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1928 (1963).
15. Burton R. M., Kaplan N. O., *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 150 (1963).
16. Chance B., Baltscheffsky H., *J. Biol. Chem.* **233**, 736 (1958).
17. Chance B., Williams G. R., *Nature* **176**, 250 (1955).
18. Chance B., Williams G. R., *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
19. Chaykin S., Meinhart J. O., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **220**, 811 (1956).
20. Conover T. E., Prairie R. L., Racker E., *J. Biol. Chem.* **238**, 2831 (1963).
21. Cooper C., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 561 (1957).
22. Ernster L., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow 1961), tom V, red. E. C. Slater, Pergamon Press, London 1963, str. 115.
23. Estabrook R. W., *Anal. Biochem.* **4**, 231 (1962).
24. Estabrook R. W., Gonze J., Nissley S. P., *Fed. Proc.* **22**, 1071 (1963)..
25. Garbus J., DeLuca H. F., Loomans M. E., Strong F. M., *J. Biol. Chem.* **238**, 59 (1963).
26. Glaze R. P., Wadkins C. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 194 (1964).
27. Green D. E., Beyer R. E., Hansen M., Smith A. L., Webster G., *Fed. Proc.* **22**, 1460 (1963).
28. Griffiths D. E., *Fed. Proc.* **22**, 1064 (1963).
29. Griffiths D. E., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria, red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 116 (dyskusja).
30. Griffiths D. E., Chaplain R. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**, 497 (1962).
31. Griffiths D. E., Chaplain R. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**, 501 (1962).
32. Judah J. D., Ahmed K., McLean A. E. M., *Nature* **196**, 484 (1962).
33. Kalckar H., *Biochem. J.* **33**, 631 (1939).
34. Lee C. P., Ernster L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 523 (1965).

35. Lehninger A. L., Rossi C. S., Greenawalt J. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 444 (1963).
36. Linnane A. W., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 221 (1958).
37. Linnane A. W., Titchener E. B., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 469 (1960).
38. Löw H., Vallin J., Alm B., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria, red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 5.
39. Mitchell R. A., Butler L. G., Boyer P. D., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **16**, 545 (1964).
40. Norman A. W., Bieber L. L., Lindberg O., Boyer P. D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 108 (1964).
41. Panefsky H. S., Pullman M. E., Datta A., Racker E., *J. Biol. Chem.* **235**, 3330 (1960).
42. Peter J. B., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 1180 (1963).
43. Peter J. B., Hultquist D. E., DeLuca M., Kreil G., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 1182 (1963).
44. Pinchot G. B., *J. Biol. Chem.* **205**, 65 (1953).
45. Pinchot G. B., *J. Biol. Chem.* **229**, 1 (1957).
46. Pinchot G. B., *J. Biol. Chem.* **229**, 25 (1957).
47. Pinchot G. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **46**, 929 (1960).
48. Pinchot G. B., *Fed. Proc.* **22**, 1076 (1963).
49. Pinchot G. B., Hormanski M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1970 (1962).
50. Prairie R. L., Conover T. E., Racker E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 422 (1963).
51. Pressman B. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 556 (1964).
52. Pullman M. E., Garber E. R., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow 1961), tom V, red. E. C. Slater, Pergamon Press, London 1963, str. 470.
53. Purvis J. L., *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 435 (1960).
54. Racker E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1659 (1962).
55. Racker E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 435 (1963).
56. Racker E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 75 (1963).
57. Racker E., *Fed. Proc.* **22**, 1088 (1963).
58. Racker E., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria, red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 75
59. Shibko S., Pinchot G. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 257 (1961).
60. Shibko S., Pinchot G. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 140 (1961).
61. Shifrin S., Kaplan N. O., *Adv. Enzymol.* **22**, 337 (1960).
62. Slater E. C., *Nature* **172**, 975 (1953).
63. Slater E. C., *Rev. Pure Appl. Chem.* **8**, 221 (1958).
64. Slater E. C., Kemp A., Tager J. M., *Nature* **201**, 781 (1964).
65. Smith A. L., Hansen M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**, 136 (1962).
66. Snoswell A. M., *Biochem. Biophys. Acta* **60**, 143 (1962).
67. Suelter C. H., DeLuca M., Peter J. B., Boyer P. D., *Nature* **192**, 43 (1961).
68. Theorell H., McKinley-McKee A. A., *Acta Chem. Scand.* **15**, 1811 (1961).
69. Theorell H., McKinley-McKee A. A., *Acta Chem. Scand.* **15**, 1834 (1961).
70. Wadkins C. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 221 (1961).

71. Wadkins C. L., Vith International Congress of Biochemistry, (New York 1964), Abstracts X, Bioenergetics, New York 1964, str. 762.
72. Wadkins C. L., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **233**, 1581 (1958).
73. Wadkins C. L., Lehninger A. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1576 (1960).
74. Wadkins C. L., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 2555 (1963).
75. Wadkins C. L., Lehninger A. L., *Fed. Proc.* **22**, 1092 (1963).
76. Webster G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 245 (1962).
77. Webster G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**, 399 (1963).
78. Webster G., XIth International Congress of Biochemistry, (New York 1964) Abstracts X, Bioenergetics, New York 1964, str. 764.
79. Webster G., Smiths A. L., Hansen M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **49**, 259 (1963).
80. Wilson I. B., Bergman F., *J. Biol. Chem.* **186**, 683 (1950).
81. Wojtczak L., *Post. Biochem.* **8**, 73 (1962).
82. Velick S. F., Furfine C., w *The Enzymes*, tom VII, red. P. D. Boyer, H. Lardy i K. Myrback, Academic Press, New York 1960, str. 243.
83. Vignais P. V., Vignais P. M., Stanislas E., *Biochem. Biophys. Acta* **60**, 284 (1962).

WOJCIECH ARDELT*

Biochemia lathyryzmu

Biochemistry of Lathyrism

Some disturbances of chemistry of connective tissue in lathyrism are reviewed. The possible mechanism of action of the lathyrogens is discussed.

Podawanie w diecie dużych ilości niektórych roślin rodzaju *Lathyrus* wywołuje u kręgowców rozległe zmiany w obrębie układu nerwowego i tkanki łącznej. Dla uszkodzeń układu nerwowego, objawiających się spastycznymi porażeniami, wywoływanych między innymi przez *L. sativus* i *L. cicera* przyjęła się nazwa neurolathyryzm. Inna grupa roślin strączkowych, mianowicie pospolity groszek pachnący — *L. odoratus*, *L. tingitanus*, *L. hirsutus* i *L. pusillus* wywołuje schorzenie tkanki łącznej opisywane w literaturze pod równorzędnymi nazwami: lathyryzm i osteolathyryzm. Pierwsza z tych nazw jest częściej używana.

W lathyryzmie zachodzą uszkodzenia w obrębie tkanek mezenchymalnych, przy czym szczególnie dotknięte są tkanki bogate w kolagen. Występują zaburzenia wzrostu chrząstek i kości (24, 45), nienormalna łamliwość kości (21, 45), deformacje szkieletowe (1, 3, 21, 24, 45, 57, 70, 71, 72, 76, 81) oraz ogólne osłabienie wiązań i ścięgien z następowym wywichnięciem i przemieszczeniem się stawów (71). Ponadto opisano jako objaw lathyryzmu zwyrodnieniowe zmiany stawów (71), przepukliny (3, 24, 45, 54, 71, 81) oraz tętniaki aorty (3, 21, 45, 54, 70, 71, 81). Objawy te są makroskopowym wyrazem uszkodzenia wszystkich składników tkanki łącznej.

Lathyryzm wzbudził duże zainteresowanie, bowiem stanowić może eksperymentalny model dla badań metabolizmu składników tkanki łącznej, jak również patogenezy niektórych chorób tej tkanki u ludzi.

I. Związki lathyrogenne

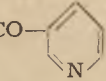

O działaniu *Lathyrus odoratus* na tkankę łączną doniesiono po raz pierwszy w 1933 roku (24). W 1954 roku wyizolowano z *L. pusillus* kry-

* Mgr, asystent Zakładu Biochemii Instytutu Reumatologicznego w Warszawie.

staliczną substancję zdolną do wywoływania charakterystycznych zmian u szczurów (19). W tym samym czasie wyizolowano krystaliczny lathyrogen z *L. odoratus* i zidentyfikowano go jako β -(N- γ -L)-glutamyloaminopropionitryl (56, 81, 82). Następnie okazało się, że reszta γ -glutamylowa nie ma zasadniczego znaczenia, a aktywnym związkiem jest β -aminopropionitryl (3, 98). Występuje on we wszystkich roślinach wywołujących uszkodzenia tkanki łącznej, nie zawierają go natomiast rośliny strączkowe wywołujące neurolatyryzm (91). Wykazano następnie, że występujący w przyrodzie aminoacetonitryl, jest potężniejszym lathyrogiem niż β -aminopropionitryl (7, 89). Znalezione również związki należące do innych niż nityryle grup chemicznych a wykazujące działanie lathyrogenne. Levene (50) sklasyfikował związki lathyrogenne w czterech grupach: nityryle, urei-

Tablica 1

Lathyrogeny

Grupa	Związek	Wzór
Nityryle	β -aminopropionitryl	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
	Aminoacetonitryl	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
	Metylenoaminoacetonitryl	$\text{CH}_2=\text{NCH}_2\text{CN}$
Ureidy	Semikarbazyd	$\text{NH}_2\text{NHCONH}_2$
	Hydrazydy	Hydrazyd kwasu izonikotynowego
Hydrazyd kwasu nikotynowego		NH_2NHCO - 
Hydrazyd kwasu cyjanooctowego		$\text{NH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CN}$
Benzohydrazyd		NH_2NHCO - 
Hydrazyny		Wodzian hydrazyny

dy, hydrazydy i hydrazyny. Najczęściej stosowane lathyrogeny zestawiono w tablicy 1 zachowując podział Levene'a. Poza tymi związkami wymienia się również merkaptoetyloaminę i cystaminę, jednakże ich własności lathyrogenne nie są pewne (17).

Jak widać z tablicy lathyrogenne nityryle z wyjątkiem metylenoaminoacetonitrylu mają wolną grupę aminową. Aktywność uwarunkowana jest obecnością tej grupy, np. β -hydroksyaminopropionitryl i kwas cyjanooctowy są całkowicie pozbawione działania lathyrogennego (46, 50). Zamiana grupy cyjanowej nityryli na grupę karboksylową lub estrową pro-

wadzi również do utraty zdolności wywoływania latyryzmu (50). Właściwości tej pozbawione są np. ester metylowy glicyny, czy β -alanina. Ustalono także, że dla aktywności semikarbazydu istotne jest ugrupowanie ureidowe ($\text{NH}_2\text{NH-CO-N}$), dla hydrazydów — hydrazydowe ($\text{NH}_2\text{NH-CO-C}$), zaś w przypadku wodzianu hydrazyny podstawienie któregośkolwiek z atomów wodoru powoduje stratę właściwości latyrogennych (50).

II. Zmiany w obrębie tkanki łącznej

Zmianie w latyryzmie ulegają wszystkie składniki tkanki łącznej: zarówno kolagen — główne białko strukturalne, jak i składniki niekolagenowe czyli pozostałe białka włókienkowe i tzw. substancja podstawowa.

1. Zmiany składników niekolagenowych

Najbardziej dramatyczne zmiany mają miejsce w aorcie i nasadowych chrząstkach długich kości. Głównymi składnikami substancji podstawowej tych tkanek są sulfonowane mukopolisacharydy, reprezentowane przede wszystkim przez izomery siarczanu chondroityny. W ścianie aorty, przed wytworzeniem się śródściennych krwawień i tętniaków następuje nagromadzenie się materiału, wykazującego histochemiczne właściwości mukopolisacharydów (8, 27, 42, 57, 76, 83, 100). Wyniki te są zgodne z wynikami badań Granta i współpracowników (27), którzy stwierdzili w aorcie latyrycznych szczurów zwiększoną zawartość heksozamin i kwasów uronowych. Odczyn metachromazji z błękitem toluidynowym i jednoczesna oporność na działanie jądrowej hialuronidazy wskazują, że co najmniej część gromadzącego się materiału jest siarczanem chondroityny B (8).

Akumulacji mukopolisacharydów towarzyszy obserwowana metodami histologicznymi liza struktur elastycznych (blaszki i włókna elastyny), połączona z przerostem i proliferacją fibroblastów (15, 57, 100). Opisane zjawiska zachodzą nie tylko w ścianie aorty, lecz także w ścianach tętnic płucnych i wieńcowych (96), oraz w zastawkach sercowych (8). Mukopolisacharydy gromadzące się w zastawkach sercowych w odróżnieniu od odkładających się w aorcie są wrażliwe na działanie hialuronidazy (8). Pochodzenie nadwyżki mukopolisacharydów w aortach zwierząt latyrycznych nie jest jasne. Niektórzy autorzy łączą odkładanie się tych substancji z depolimeryzacją substancji podstawowej (57), destrukcją elastycznych elementów ściany aorty (8) lub z ewentualnym zmniejszeniem się syntezy elastyny — głównego białka podporowego układu naczyniowego (26). Zmiany te powinny być związane z obniżeniem się zawartości elastyny w aortach latyrycznych zwierząt, jednakże Grant i współpracownicy (27) wykazali, że w aortach szczurów dotkniętych latyryz-

mem elastyna, jak i kolagen występują w ilościach prawidłowych. Bardziej prawdopodobna wydaje się ogólna nadprodukcja mukopolisacharydów, zwłaszcza że zmianom w obszarze tkanki łącznej towarzyszy znaczny wzrost poziomu mukoproteidów w surowicy krwi (27, 83).

Podczas gdy w aorcie rośnie ogólna ilość mukopolisacharydów, w chrząstkach nasadowych długich kości zachodzi zjawisko odwrotne — zawartość heksozamin jest niższa niż w tkance prawidłowej (5, 6). Spada również zawartość mukopolisacharydów dających się strącić jako sole wapnia z protoelizatów tkanki otrzymanych działaniem pepsyny, trypsyny i amylazy (75). Zdolność syntezy heksozamin w homogenatach chrząstek nasadowych latyrycznych szczurów ulega znacznemu obniżeniu w porównaniu z homogenatami chrząstek prawidłowych. W doświadczeniu Pedrini i Pedrini-Mille (66), jeden gram tkanki latyrycznych zwierząt, w środowisku glutaminy i glukozy-6-fosforanu syntetyzował w ciągu trzech godzin 296 μg heksozamin, podczas gdy jeden gram tkanki prawidłowej w tych warunkach wytwarzał 1229 μg tych związków. Tak więc zdolność syntezy heksozamin uległa obniżeniu o 76%.

Największe zmiany w chrząstce nasadowej latyrycznych szczurów zachodzą w obrębie strefy dojrzewania chondrocytów — substancja podstawowa tej strefy wykazuje zmniejszone powinowactwo do barwników charakterystycznych dla mukopolisacharydów (34). Badania autoradiograficzne wykazały, że przy niezmienionej ogólnej zdolności tkanki do wykorzystania ^{35}S -siarczanu nie zachodzi w strefie dojrzewania chondrocytów wbudowywanie radioaktywnej siarki (43). Ponieważ jednocześnie ma miejsce w tym obszarze gwałtowne wbudowywanie się znakowanych aminokwasów wysunięto hipotezę, że w latyryzmie zablokowane jest tworzenie się kompleksów mukopolisacharydów z białkami typu niekolagenowego, co może nawet prowadzić do uszkodzenia fibrogenozy (kompleksom takim przypisuje się rolę w procesie tworzenia się włókien) (43). Badanie *in vitro* uwapnienia chrząstek nasadowych rachitycznych szczurów wykazało, że dodanie aminoacetonitrylu do środowiska reakcji nie hamuje tego procesu, natomiast ulega on zahamowaniu w chrząstkach nasadowych szczurów, którym podawano aminoacetonitryl (34). Chrząstka latyrycznych zwierząt nie ulega kalcyfikacji *in vitro* zarówno w środowisku syntetycznym, jak i w surowicy krwi zdrowych zwierząt.

Substancja podstawowa skóry ulega w latyryzmie mniejszym uszkodzeniom niż substancja podstawowa aorty i chrząstek nasadowych. Obserwuje się tu jedynie niewielkie zwiększenie się frakcji siarczanów chondroityny oraz obniżenie się poziomu lipidów i rozpuszczalnych (niekolagenowych) białek (60).

Zmiany zachodzące w obrębie niekolagenowych składników tkanki łącznej w latyryzmie są więc wielokierunkowe i przebiegają z różnym natężeniem w zależności od rodzaju tkanki.

2. Zmiany kolagenu

Tkanki zwierząt, u których wywołano latoryzm, wykazują charakterystyczne zmiany własności mechanicznych. Zwiększa się ich rozciągliwość, natomiast wytrzymałość na rozrywanie ulega znacznemu obniżeniu (4, 21, 41, 47, 98). Zwróciło to uwagę badaczy na możliwość uszkodzenia kolagenu — składnika decydującego o własnościach mechanicznych tkanki łącznej. Zawartość kolagenu w tkankach zwierząt latorycznych nie odbiega jednak od normy (12, 14, 20, 21, 47, 48). Wydaje się, że prawidłowa jest również synteza tropokolagenu (16, 18, 20, 47). Wskazują na to wyniki doświadczeń Daslera i współpracowników (18), którzy stwierdzili w poliwinylowej gąbce implantowanej pod skórę latorycznym szczurom powstawanie bezpostaciowego materiału z typową dla kolagenu zawartością hydroksyproliny, barwiącego się hematoksyliną i eozyną. Stwierdzono również, że przekształcanie się znacznej proliny w hydroksyprolinę zachodzi z prawidłową szybkością (86).

Kolagen latorycznych zwierząt wykazuje ponadto szereg prawidłowych własności. Nie stwierdzono zmian w wymiarach cząsteczkowych (31, 45, 61), konformacji (31), widmie w podczerwieni i nadfiolecie (61), masie cząsteczkowej monomeru (45, 47, 61), skręcalności optycznej (31, 47), zawartości α -spirali (10), granicznej liczbie lepkości (31, 47, 61) oraz w temperaturze skurczu cieplnego (31, 41). Badania składu chemicznego również nie wykazały zmian: stwierdzono prawidłowy skład aminokwasowy (31, 54), zawartość grup ϵ -aminowych i wiązań estrowych (61). Nie stwierdzono również zwiększonej zawartości wolnych grup aminowych i karboksylowych lub też ketoimidowych, która mogłaby tłumaczyć zwiększoną w porównaniu z normą absorpcję chromu przez kolagen zwierząt latorycznych (60).

Mimo że wyniki badań, przeprowadzonych omówionymi metodami chemicznymi i fizykochemicznymi nie wskazywały na zmiany kolagenu w latoryzmie, w 1958 roku niemal jednocześnie Clemmons (9) oraz Levene i Gross (29, 47) wykazali znacznie zwiększoną rozpuszczalność kolagenu zwierząt latorycznych. Obserwacja ta została później potwierdzona w szeregu pracowni (9, 18, 30, 45, 59, 61, 86). Kolagen daje się ekstrahować z tkanek prawidłowych wodnymi roztworami soli, kwasów i zasad. Oziębiony roztwór chlorku sodu ekstrahuje z tkanek prawidłowych większość nowo wytworzonego kolagenu, kwaśne roztwory, jak np. rozcieńczony kwas octowy i bufony cytrynianowe usuwają dodatkowo starsze białko. Jednakże ilość składników dających się w ten sposób ekstrahować wynosi około 2% masy kolagenu, olbrzymia jego większość (około 98%) pozostaje w tych roztworach nierozpuszczalna (37, 68). Stwierdzono, że 1 M roztwór chlorku sodu rozpuszczający na zimno około 1% kolagenu prawidłowych tkanek płodów kurzych, z tkanek latorycznych zwierząt ekstrahuje około 40% kolagenu kości, 60% kola-

geny skóry i 40% kolagenu aorty (47). Nadwyżka rozpuszczalnego kolagenu w tkankach latyrycznych zwierząt mogła być bądź to wynikiem uszkodzenia dojrzałego kolagenu wytworzonego przed podaniem latyrogenu, bądź też wytwarzania się — po podaniu latyrogenu — różnego od normalnego, rozpuszczalnego kolagenu.

Uzyskano szereg danych doświadczalnych, zgodnych zarówno z pierwszym (29, 47, 94), jak i drugim (20,86, 87, 93) przypuszczeniem. Stwierdzono, że przy jednoczesnym podaniu β -aminopropionitrylu i znacznej ^{14}C glicyny specyficzna aktywność rozpuszczalnej frakcji kolagenu płodów kurzych była znacznie zwiększona w porównaniu z kontrolą i wyraźnie przewyższała specyficzną aktywność frakcji nierozpuszczalnej. Jeżeli natomiast znaczony aminokwas podano o 24 godziny wcześniej niż latyrogen, specyficzna aktywność frakcji rozpuszczalnej była niższa niż aktywność frakcji nierozpuszczalnej (86). Podobne wyniki, sugerujące, że nadwyżka rozpuszczalnego kolagenu pochodzi z nowo wytworzonych jego cząsteczek otrzymano również w innej pracowni (87). Doświadczenia te wraz z wynikami badań uszkodzonych tkanek w mikroskopie elektronowym nasunęły przypuszczenie, że w latyryzmie zostaje zablokowane tworzenie się włókien z prawidłowo wytworzonego tropokolagenu (20, 51, 86, 87). Wniosek ten nie był jednak zgodny z wynikami innych autorów. Już w 1959 roku Levene i Gross (47) wykazali spadek zawartości frakcji nierozpuszczalnego kolagenu w skórze, aortach i kościach płodów kurzych traktowanych β -aminopropionitrylem, podczas gdy u zwierząt kontrolnych następował stały wzrost tej frakcji białkowej.

Dalsze badania tej samej grupy autorów wskazywały, że fibrogenesa u latyrycznych zwierząt przebiega prawidłowo (93, 94), natomiast istnieją liczne dowody wskazujące na uszkodzenie wiązań międzycząsteczkowych we włóknach kolagenu. Włókna te są u latyrycznych zwierząt cieńsze i słabsze od prawidłowych (21). Rozpuszczalny kolagen, zarówno prawidłowy (28, 35) jak i pochodzący od zwierząt latyrycznych (31, 36, 47, 62) ma zdolność tworzenia *in vitro* form włóknistych podczas dializy ekstraktów, ogrzewania w temperaturze około 38° oraz pod wpływem ATP. Jednak w odróżnieniu od prawidłowych, typowe prążkowane włókna kolagenu latyrycznych świnek morskich wytworzone podczas ogrzewania w temperaturze 38° nie stają się nierozpuszczalne nawet po tygodniowej inkubacji (31). Tworzenie się włókien kolagenu latyrycznych zwierząt podczas dializy (agregacja typu „koniec do końca”) zachodzi z opóźnieniem i w mniejszym stopniu niż w przypadku kolagenu normalnego (62), natomiast precypitacja pod wpływem ATP (agregacja typu „bok do boku”) wydaje się być bardziej kompletna, choć powstałe w ten sposób agregaty są cieńsze od prawidłowych (62).

Podczas denaturacji prawidłowego kolagenu w roztworze (np. przez ogrzewanie w *pH* poniżej 5,0 lub przez działanie mocznika) tworzą się co najmniej dwa składniki niejednakowej wielkości, zwane α - i β -fragmen-

tami, przy czym drugi z nich szybciej sedymentuje w ultrawirówce (68). We frakcji kolagenu rozpuszczalnej w buforze cytrynianowym fragmenty te występują w stosunku cząsteczkowym 2:1 (63), natomiast frakcja rozpuszczalna w obojętnych solach zawiera głównie α -fragmenty (64).

Porównawcza chromatografia produktów denaturacji rozpuszczalnego kolagenu z tkanek prawidłowych i pochodzących od zwierząt latyrycznych wykazała, że składają się one głównie z α -fragmentów ze śladami tylko β -fragmentów (53, 61). Wysunięto więc hipotezę, że w latyryzmie ma miejsce uszkodzenie procesu wewnątrzcząsteczkowego wiązania krzyżowego (53).

Chromatografia na karboksymetylocelulozie pozwoliła na rozdzielenie α - i β -fragmentów z kwaśnego ekstraktu prawidłowego kolagenu na dwa różniące się składem aminokwasowym fragmenty α , które oznaczono symbolami α_1 i α_2 oraz dwa różne fragmenty β oznaczone odpowiednio β_1 i β_2 (67, 68, 69). Analiza aminokwasów tych fragmentów wykazała, że β_1 jest agregatem jednego fragmentu α_1 i jednego fragmentu α_2 , zaś β_2 — dwóch fragmentów α_1 (54, 68). Wyniki tych doświadczeń razem z faktem szybszego wbudowywania się *in vivo* znaczonej ^{14}C glicyny do α - niż do β -fragmentów (54) stały się punktem wyjścia hipotezy, że nowo wytworzony kolagen składa się z dwóch fragmentów o niewielkiej masie cząsteczkowej (α_1 i α_2), które w procesie dojrzewania agregują do większych fragmentów (β_1 i β_2) drogą tworzenia się wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych (1, 2). Wykazano później, że w produktach denaturacji kwaśnych ekstraktów kolagenu znajdują się niewielkie ilości wyżej zagregowanej formy — γ -tropokolagenu — będącej trimerem w stosunku do α -tropokolagenu (2). Ostatnio zaproponowano także zmianę oznaczenia β_1 na β_{12} (agregat α_1 i α_2) oraz β_2 na β_{11} (agregat dwóch α_1) (44).

III. Sposób działania latyrogenów

Mechanizm działania latyrogenów nie jest dotychczas wyjaśniony. Nie wiadomo, które z wywołanych przez nie uszkodzeń tkanki łącznej należy uważać za pierwotne, a które za wtórne. Jedni autorzy uważają, że zasadniczymi uszkodzeniami są zmiany w obrębie elastyny (8, 70, 97, 100), inni — kolagenu (20, 38, 58, 85, 90), jeszcze inni — w obrębie substancji podstawowej (8, 34, 42, 57, 71, 73, 76). Nie wiadomo w jakim stosunku pozostają do siebie zmiany obserwowane w obrębie substancji podstawowej i kolagenu i czy fibrogenesa zachodzi w tkance łącznej z udziałem, czy bez udziału substancji niekolagenowych (43, 77).

Według ostatnich poglądów kolagen jest wytwarzany wewnątrz fibroblastu (chondroblastu lub osteoblastu) jako trójłańcuchowa cząsteczka o masie około 360 000 (tropokolagen). Cząsteczka taka jest wydzielana do przestrzeni międzykomórkowej i tam agreguje do form włóknistych, prawdopodobnie drogą nieenzymatyczną (77). Według innej hipotezy do

przeźreni międzykomórkowej wydzielane są α -fragmety, które następnie zespalają się w trójłańcuchową cząsteczkę (23). Fragmenty te reprezentują poszczególne łańcuchy polipeptydowe tropokolagenu; masa cząsteczkowa każdego z nich wynosi około 120 000. Jedna cząsteczka tropokolagenu składa się z dwóch łańcuchów α_1 i jednego łańcucha α_2 (68, 69). Każdy łańcuch rozpada się pod wpływem hydrazyny lub hydroksylaminy na cztery podjednostki o masie cząsteczkowej około 30 000, bez uwalniania grup aminowych (22). Wyniki następnych badań prowadzonych przez Gallopa (23), pozwalają sądzić, że podjednostki te są związane ze sobą w łańcuch przez trzy pary wiązań estrowych. Na rys. 1 podany jest schemat budowy tropokolagenu wg Gallopa (23). Tworzą ją trzy łańcuchy polipeptydowe o masie cząsteczkowej około 120 000 (dwa łańcuchy α_1 i jeden łańcuch α_2). Każdy z nich składa się z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 30 000.

Udział w tych wiązaniach biorą z jednej strony grupa α -karboksylowa kwasu asparaginowego, stanowiącego C-końcowy aminokwas podjednost-

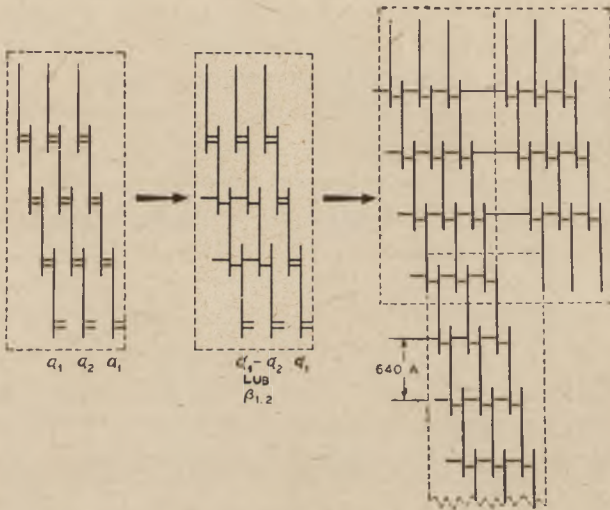


Rys. 1. Schemat budowy cząsteczki tropokolagenu (wg 23). Objaśnienia w tekście. Strzałki oznaczają wiązania estrowe. Różna grubość strzałek obrazuje dwa rodzaje wiązań — z α - albo β -karboksylową grupą kwasu asparaginowego

ki oraz grupa β -karboksylowa sąsiadującej z nim reszty kwasu asparaginowego, z drugiej strony prawdopodobnie hydroksylowe grupy składnika cukrowcowego, drugiej podjednostki, dołączonego do białkowego fragmentu podjednostki O-glikozydowym wiązaniem przez resztę tyrozyny. Część cukrowcową stanowi heksoza połączona z nie zidentyfikowanym dodatkowym cukrowcem, który prawdopodobnie jest źródłem grupy aldehydowej odgrywającej rolę w tworzeniu wiązań międzyłańcuchowych (23). Jedno z wiązań estrowych łączących dwie podjednostki jest bardziej reaktywne niż drugie i zdolne do transestryfikacji wewnątrzcząsteczkowej z wytwo-

rzeniem wiązania z sąsiednim łańcuchem tropokolagenu, lub międzycząsteczkowej — z łańcuchem sąsiedniej cząsteczki. Rysunek 2 przedstawia hipotetyczny schemat dojrzewania i starzenia się kolagenu w wyniku tworzenia się wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań krzyżowych, zgodny z proponowanymi przez Gallopa (23) reakcjami transestryfikacji. Proces ma charakter transestryfikacji i zachodzi bez zwiększenia się liczby wiązań estrowych.

Wydaje się, że opisane uprzednio dwa możliwe defekty kolagenu w latorozymie (wewnątrzcząsteczkowy i międzycząsteczkowy) mogą wynikać



Rys. 2. Schemat dojrzewania i starzenia się kolagenu (wg 23)

Z lewej strony — cząsteczka tropokolagenu z wiązaniami wyłącznie wewnątrzłańcuchowymi, w środku — cząsteczka tropokolagenu z dwoma wiązaniami międzylańcuchowymi (tworzy się forma dwulańcuchowa β), z prawej — „stary” kolagen z maksymalną ilością wewnątrz- i międzylańcuchowych wiązań krzyżowych

z tego samego źródła — uszkodzenia procesu wiązania krzyżowego. W świetle przytoczonej hipotezy dojrzewania kolagenu byłoby to uszkodzenie w zakresie reakcji transestryfikacji. Hipoteza ta tłumaczy prawidłową zawartość estrowych wiązań w kolagenie latorozymych zwierząt, bowiem wytwarzanie wiązań krzyżowych nie pociąga za sobą zwiększenia się ilości wiązań estrowych. Transestryfikację w obrębie włókna kolagenu uważa Gallop (23) za proces nieenzymatyczny. Przy założeniu, że w latorozymie powstaje prawidłowy tropokolagen, uszkodzenie procesu wiązania krzyżowego mogłoby więc polegać na bezpośrednim działaniu latorozenów na ugrupowania biorące udział w tworzeniu wiązań estrowych w cząsteczce kolagenu.

Hipoteza prostej kombinacji chemicznej latorozenów z grupami aldehydowymi kolagenu powstała wcześniej niż sugestia transestryfikacji jako

procesu odpowiedzialnego za wiązanie łańcuchów (51). Wykazano mianowicie, że zwiększenie rozpuszczalności kolagenu wywoływane przez hydrazyd kwasu izonikotynowego może być *in vivo* (49) i *in vitro* (51) odwracane przez działanie pewnych aldehydów. Najpotężniejsze działanie wykazuje tu aldehyd glicerolowy, który odwraca również działanie β -aminopropionitrylu, wodzianu hydrazyny i semikarbazydu. Działanie aldehydów ma charakter reakcji chemicznej, gdyż przebieg interakcji jest zależny od czasu i temperatury inkubacji oraz od stężenia aldehydu, a niezależny od *pH* środowiska, optycznej formy aldehydu i stanu metabolicznego komórek tkanki łącznej (jak np. zablokowania ciągu glikolitycznego jodoctanem lub cyklu kwasów trójkarboksylowych cyjankiem potasu). Wykazano również obecność w kolagenie nienasyconych ketonów lub aldehydów na podstawie reakcji z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną (23, 51) i apresoliną (23). Powstała więc hipoteza, że latyrogeny blokują ugrupowania karbonylowe kolagenu zapobiegając w ten sposób tworzeniu się wiązań krzyżowych, a aldehydy odwracają działanie latyrogenów w sposób kompetycyjny (51). Takie działanie wymagałoby wbudowywania co najmniej jednej cząsteczki latyrogeny na dwie cząsteczki kolagenu, jednakże badania rozmieszczenia radioaktywnego β -aminopropionitrylu i produktów jego przemiany w tkankach płodów kurzych prowadzone przez Orlofa i Grossa (65) wykazały wbudowywanie się co najwyżej jednej cząsteczki tego nitrylu na sto cząsteczek kolagenu.

Tak więc wydaje się, że bezpośrednie połączenie latyrogenów z kolagenem nie może być uważane za przyczynę zwiększonej rozpuszczalności tego białka w latyryzmie.

Gallop (23) sugeruje, że latyrogeny mogą uszkadzać syntezę lub wbudowywanie się do tropokolagenu związków karbonylowych niezbędnych dla procesów wiązania krzyżowego. Działanie takie miałyby miejsce wewnątrz fibroblastu i prowadziłyby do syntezy nieprawidłowego tropokolagenu. Obserwowane wcześniej obniżone wiązanie 2,4-dwunitrofenylohydrazyny przez kolagen zwierząt latyrycznych w porównaniu z normalnym może być odbiciem zmniejszonej zawartości cukrowców w tym białku (51, 60).

Dowody prawidłowej syntezy tropokolagenu w latyryzmie są jedynie dowodami prawidłowej szybkości tego procesu. Chociaż skład aminokwasowy tropokolagenu latyrycznych zwierząt jest prawidłowy, to jednak subtelne substytucje reszt lub zmiany sekwencji mogą nie być uchwytnie dostępnymi dziś metodami (93). Subtelne zmiany, wystarczające do uszkodzenia procesu wiązania krzyżowego mogłyby być odbiciem defektu metabolizmu związków azotowych (45). Istnieje cały szereg faktów wskazujących na możliwość takiego uszkodzenia. Jak już wspomniano, zasadnicze znaczenie dla aktywności latyrogenów ma obecność wolnej grupy aminowej. Po podaniu latyrogenów zahamowana jest synteza heksozamin, oraz obniżone wydalanie w moczu kwasu asparaginowego, kwasu gluta-

minowego, seryny i metioniny, a zwiększone — metylohistydyny i histydyny (101). Obniżona jest również pula wolnych iminokwasów (proliny i hydroksyproliny) w tkankach latyrycznych płodów kurzych (40). Sprzeczne są dane na temat wbudowywania się w latyryzmie znakowanego ^{15}N chlorku amonu do tkanki łącznej (45, 80). Wreszcie omówione uprzednio nieprawidłowości w metabolizmie sulfonowanych mukopolisacharydów, jak również fakt, że objawy latyryzmu rozwijają się wolniej u zwierząt pozostających na diecie wysokobiałkowej (kazeina i żelatyna) (11, 13) lub wzbogaconej metionią, cysteiną albo glutaminą (13), mogą być wyrazem ogólnego uszkodzenia metabolizmu związków azotowych w tym schorzeniu. Z drugiej strony wydaje się, że metabolizm glutaminy, która jest donorem grupy aminowej w syntezie heksozamin, jak również transaminacja nie są uszkodzone. Mózgowa synteza glutaminy i sercowa transaminaza nie są hamowane *in vitro* przez nitryle (45).

Stwierdzono, że niektóre pospolite enzymy proteolityczne jak pepsyna (79), trypsyna (33) i chymotrypsyna (55) mogą niszczyć wewnątrzcząsteczkowe wiązania krzyżowe β -fragmentów rozpuszczalnego kolagenu. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie (32, 93), że obserwowane w latyryzmie uszkodzenia kolagenu mogą być wywołane działaniem tkankowych proteaz uwolnionych z komórek przez działanie latyrogenów. Hipoteza ta stanowiłaby zatem pewne uzupełnienie wspomnianej już hipotezy o pochodzeniu rozpuszczalnego kolagenu tkanek latyrycznych zwierząt i uszkodzonego kolagenu normalnego.

Niewiele dla ustalenia mechanizmu działania latyrogenów wnoszą badania przemiany tych związków w organizmie. Większość podanego znakowanego ^{14}C w grupie cyjanowej β -aminopropionitrylu jest wydalana z ustroju w postaci niezmienionej (101) lub jako nielatyrogenowy kwas cyjanooctowy (52, 65, 74, 75, 92). Drobne ilości wprowadzonej w tym związku radioaktywności znaleziono w kolagenie (65, 88), sulfonowanych polisacharydach chrząstek nasadowych, białkach wątroby, glikogenie, kreatyninie, allantoinie i kwasie hipurowym (74). Wbudowywanie się izotopowego atomu węgla z grupy cyjanowej β -aminopropionitrylu do trzech ostatnich związków oraz do seryny i glicyny białek wątroby, sugeruje przekształcanie się grupy cyjanowej w karboksylową. Z drugiej strony radioaktywność kwasu cyjanooctowego wskazuje na detoksykację związaną z oksydacyjną deaminacją (45).

Interesujący jest wpływ na rozwój latyryzmu niektórych substancji chemicznych o charakterze hormonów. Wiadomo, że hormon wzrostowy i luteotropowy potęgują objawy tego schorzenia, zaś ACTH, kortykosteroidy, tyroksyna i L-trójjodotyronina hamują rozwijanie się latyrycznych zmian (25, 75, 84, 85, 95, 99). Substancje te jednak działają w różnym stopniu na rozwój choroby wywołanej różnymi latyrogenami. Może to wskazywać na niejednorodność działania różnych latyrogenów (75, 95).

Latyryzm jest interesującym modelem do badań biosyntezy i biodegradacji składników tkanki łącznej. Wraz z eksperymentalnym skorbucem może służyć w pracach nad wyjaśnieniem mechanizmów syntezy, depozycji, dojrzewania i starzenia się kolagenu — głównego białka podporowego ustroju. Uzyskane obserwacje mogą być również pomocne w badaniach niektórych chorób kośćca i układu naczyniowego. Ponieważ zmiany zachodzące w latyryzmie w obrębie kolagenu są przynajmniej w pewnym wycinku przeciwstawne do zmian obserwowanych w procesie starzenia się tego białka (w czasie starzenia się kolagenu narasta ilość wiązań krzyżowych) wyniki badań tego schorzenia mogą być również użyteczne w pracach gerontologicznych.

LITERATURA

1. Akamatsu Y., Takahashi M., *Arch. Pathol.* **78**, 61 (1964).
2. Altgelt K., Hodge A. J., Schmit O., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **47**, 1914 (1961).
3. Bachhuber T. E., Lalich J. J., Angevine D. M., Schilling E. D., Strong F. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 294 (1955).
4. Bell G. H., Sharma D. N., *J. Physiol.* **154**, 46 P (1960).
5. Castellani A. A., Castellani-Bisi C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **98**, 318 (1958).
6. Castellani A. A., Castellani-Bisi C., Frigerio E. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 57 (1959).
7. Chang S. Y., Witschi E., Ponseti I. V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **90**, 45 (1955).
8. Churchill D. W., Gelfant S., Lalich J. J., Angevine D. M., *Lab. Invest.* **4**, 1 (1955).
9. Clemmons J. J., *Fed. Proc.* **17**, 432 (1958).
10. Cohen C., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 203 (1955).
11. Dasler W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **85**, 485 (1954).
12. Dasler W., *Fed. Proc.* **13**, 519 (1954).
13. Dasler W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **91**, 554 (1956).
14. Dasler W., *Chicago Med. School Quart.* **48**, 1 (1957).
15. Dasler W., Milliser R. V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **96**, 171 (1957).
16. Dasler W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **97**, 112 (1958).
17. Dasler W., Milliser R. V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **98**, 759 (1958).
18. Dasler W., Stoner R. E., Milliser R. V., *Metabolism* **10**, 883 (1961).
19. Dupuy H. P., Lee J. G., *J. Am. Pharm. Assn.* **43**, 61 (1954).
20. Follis R. H., Tuosimis A. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **98**, 843 (1958).
21. Fry P., Harkness M. L. R., Harkness R. D., Nightingale M., *J. Physiol.* **164**, 77 (1962).
22. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *Nature* **183**, 1659 (1959).
23. Gallop P. M., *Biophys. J.* **4**, suppl. 1 79 (1964).
24. Geiger B. J., Steenbock H., Parsons H. T., *J. Nutr.* **6**, 427 (1933).
25. German W. J., *J. Neurosurg.* **17**, 657 (1960).
26. Gilman T., Harton M., *J. Embryol. Exptl. Morphol.* **6**, 270 (1958).
27. Grant R. A., Hathorn M., Gilman T., *Nature* **186**, 164 (1960).
28. Gross J., Kirk D., *J. Biol. Chem.* **233**, 355 (1958).
29. Gross J., Levene C. I., *Am. J. Pathol.* **35**, 687 (1959).

30. Gross J., Levene C. I., Orlof S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **105**, 148 (1960).
31. Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 250 (1963).
32. Gross J., *Biophys. J.* **4**, suppl. 1, 63 (1964).
33. Gross J., dane niepublikowane, wg 32 i 93.
34. Ham K. M., *J. Pathol. Bact.* **79**, 175 (1960).
35. Harrington W. F., von Hippel P. H., *Adv. Protein Chem.* **16**, 1 (1961).
36. Hausmann E., *Fed. Proc.* **22**, 191 (1963).
37. Higgs D. G., Reed R., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 265 (1963).
38. Hurley J. V., Ham K. N., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **40**, 216 (1959).
39. Jackson D. S., Bentley J. P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 737 (1960).
40. Juva K., Kulonen E., *Biochem. Pharm.* **13**, 85 (1964).
41. Kalliomaki L., Yli-Pohja M., Kulonen E., *Experientia* **13**, 495 (1957).
42. Karnovsky M. J., *Fed. Proc.* **18**, 484 (1959).
43. Kennedy J. S., Kennedy G. D. C., *J. Pathol. Bact.* **84**, 123 (1962).
44. Kohn R., Bensusan H. B., Klein L., *Science* **145**, 186 (1964).
45. Kulonen E., Juva K., Mikkonen L., Nikkari T., Salmi A., Tuominen T., *Biochem. Pharm.* **6**, 56 (1961).
46. Lalich J. J., *Science* **128**, 206 (1958).
47. Levene C. I., Gross J., *J. Exptl. Med.* **110**, 771 (1959).
48. Levene C. I., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **42**, 89 (1961).
49. Levene C. I., *J. Exptl. Med.* **113**, 795 (1961).
50. Levene C. I., *J. Exptl. Med.* **114**, 295 (1961).
51. Levene C. I., *J. Exptl. Med.* **116**, 119 (1962).
52. Lipton S. H., Lalich J. J., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2022 (1958).
53. Martin G. R., Gross J., Piez K. A., Lewis M. S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 599 (1961).
54. Martin G. R., Piez K. A., Lewis M. S., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 472 (1963).
55. Martin G. R., dane niepublikowane, wg 32 i 93.
56. McKay G. F., Lalich J. J., Schilling E. D., Strong F. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **52**, 313 (1954).
57. Menzies D. W., Mills K. W., *J. Pathol. Bact.* **73**, 223 (1957).
58. Mielke J. E., Lalich J. J., Angevine D. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **94**, 673 (1957).
59. Mikkonen L., Tuominen T., Kulonen E., *Acta Chem. Scand.* **13**, 2125 (1959).
60. Nikkari T., Kulonen E., *Biochem. Pharm.* **11**, 923 (1962).
61. Nikkari T., Kulonen E., *Biochem. Pharm.* **11**, 931 (1962).
62. Nikkari T., Kulonen E., *Biochem. Pharm.* **13**, 89 (1964).
63. Orekhovitch V. N., Shpikiter V. O., Kazakova O. V., Mazurov V. I., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 554 (1959).
64. Orekhovitch V. N., Shpikiter V. O., Mazurov V. I., Kounina O. V., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 505 (1960).
65. Orloff S. D., Gross J., *J. Exptl. Med.* **117**, 1009 (1963).
66. Pedrini V., Pedrini-Mille A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **101**, 358 (1959).
67. Piez K. A., Weiss E., Lewis M. S., *J. Biol. Chem.* **235**, 1987 (1960).
68. Piez K. A., Lewis M. S., Martin G. R., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 596 (1961).

69. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S., *Biochemistry* 2, 58 (1963).
70. Ponseti I. V., Baird W. A., *Am. J. Pathol.* 28, 1059 (1952).
71. Ponseti I. V., Shepard R. S., *J. Bone Joint Surg.* 36A, 1031 (1954).
72. Ponseti I. V., Shepard R. S., *Fed. Proc.* 13, 473 (1954).
73. Ponseti I. V., Wawzonek S., Shepard R. S., Evans T. C., Stearns G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 92, 366 (1956).
74. Ponseti I. V., Wawzonek S., Franklin W. E., Winnick R. E., Winnick T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 93, 515 (1956).
75. Ponseti I. V., *Bull. Hosp. Joint Dis.* 20, 1 (1959).
76. Ramamurti P., Taylor H. E., *Lab. Invest.* 7, 115 (1958).
77. Robertson W. B., *Biophys. J.* 4, suppl. 1, 93 (1964).
78. Ross W. C. J., *Ann. NY. Acad. Sci.* 68, 669 (1958).
79. Rubin A. L., Pfahl D., Speakman P. T., Davison P. F., Schmitt F. O., *Science* 139, 37 (1963).
80. Salmi A., Kulonen E., *Nature* 196, 895 (1962).
81. Schilling E. D., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 2848 (1954).
82. Schilling E. D., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2843 (1955).
83. Schwartz C. J., *Brit. J. Exptl. Pathol.* 40, 44 (1959).
84. Selye H., Bois P., *Rev. Canad. Biol.* 15, 281 (1956).
85. Selye H., *Rev. Canad. Biol.* 16, 1 (1957).
86. Smiley J. D., Yeager H., Ziff M., *J. Exptl. Med.* 116, 45 (1962).
87. Smith D. J., Shuster R. C., *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 498 (1962).
88. Stalder K., Stegman H., *Naturwiss.* 17, 398 (1962).
89. Stamler F. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 90, 294 (1955).
90. Storey E., Varasdi G., *Brit. J. Exptl. Pathol.* 39, 376 (1958).
91. Strong F. M., *Nutr. Rev.* 14, 65 (1956).
92. Strong F. M., Lalich J. J., Lipton S. H., Siewert W. H., Garbutt J. T., *Proc. Fourth Internatl. Congr. Biochem. Vienna*, 1958, str. 100.
93. Tanzer M. L., Gross J., *J. Exptl. Med.* 119, 275 (1964).
94. Van der Hooff A., Levene C. I., Gross J., *J. Exptl. Med.* 110, 1017 (1959).
95. Vivanco F., Gabay S., Ramos F., Martin J. A. S., Diaz C. J., *Proc. Fourth Internatl. Congr. Biochem. Vienna*, 1958, str. 100.
96. Walker D. G., Wirtschafter Z. T., *Arch. Pathol.* 61, 125 (1956).
97. Walker D. G., *Arch. Pathol.* 64, 434 (1957).
98. Wawzonek S., Ponseti I. V., Shepard R. S., Wiedenmann I. G., *Science* 121, 63 (1955).
99. Weaver A. L., Spittell J. A., *Mayo Clin. Proc.* 39, 485 (1964).
100. Wirtschafter Z. T., *Arch. Pathol.* 64, 577 (1957).
101. Yli-Pohja M., Tuominen T., Kulonen E., *Clin. Chim. Acta* 3, 397 (1958).

JAROSŁAW BILLEWICZ-STANKIEWICZ*

Enzymy metabolizmu amin katecholowych

Enzymes of Catecholamine Metabolism

Enzymes participating in the anabolism, storage and catabolism of catecholamines are reviewed.

W ostatnich latach jesteśmy świadkami bardzo żywego rozwoju badań nad przemianami w ustroju żywym amin katecholowych, znaczeniem w fizjologii i patologii oraz wpływem czynników farmakologicznych na ich metabolizm. Podobnie jak w większości procesów biochemicznych, w przemianach amin katecholowych biorą udział specyficzne enzymy. W referacie podano krótki przegląd wyników badań nad tymi enzymami.

I. Enzymy anabolizmu

Opisana przez B l a s c h k o (28) przypuszczalna kolejność reakcji syntezy noradrenaliny i adrenaliny została w zupełności potwierdzona przez późniejsze badania. Nie ulega dziś wątpliwości, że główna droga syntezy zaczyna się od fenyloalaniny i przez tyrozynę, dwuhydroksyfenyloalaninę (DOPA), dopaminę oraz noradrenalinę doprowadza do adrenaliny. Bezpośrednich dowodów dostarczyły zwłaszcza badania wykonane za pomocą związków znakowanych izotopowym węglem (^{14}C) i trytem (^3H). Wprowadzenie do ustroju lub do izolowanych tkanek znakowanych fenyloalaniny, tyrozyny, DOPA lub dopaminy prowadzi do powstawania znakowanej noradrenaliny i adrenaliny (70, 107, 127, 143). Synteza noradrenaliny w ustroju zwierząt wyższych i człowieka odbywa się wyłącznie w tkance nerwowej i chromochłonnej, zaś adrenaliny wyłącznie w tkance chromochłonnej (80), której komórki embriogenezycy są odpowiednikami komórek zwojowych. Pięciciozłonowy łańcuch

* Prof. dr med., kierownik Katedry i Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Lublinie.
liny, COMT — O-metylotransferaza katecholaminowa.

syntezy wymaga szeregu aktywatorów. Wysłunięte zostały także hipotezy trzech alternatywnych dróg syntezy, z których pierwsza miałaby prowadzić przez dekarboksylację tyrozyny do tyraminy (131) i utlenienie tejże na dopaminę, druga — przez przekształcenie tyraminy w norsynerfrynę (oktopaminę) (87) i trzecia — przez hydroksylację DOPA z wytworzeniem dwuhydroksyfenyloseryny i następczą jej dekarboksylację do noradrenaliny (69).

Utlenianie fenyloalaniny do tyrozyny przez skrawki rdzenia nadnerczy wykazali Fellman i Devlin (97). Wewnątrzkomórkowe umiejscowienie w nadnerczach hydroksylazy (oksydazy) fenyloalaniny nie jest dokładnie poznane (97). Natomiast w wątrobie szczura układ utleniający znajduje się we frakcji rozpuszczalnej homogenatu, przygotowanego za pomocą izotonicznego roztworu chlorku potasu. Układ ten złożony jest z dwóch różnych frakcji białkowych (94, 117), zredukowanego fosforanu dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH₂) (93) oraz nie zidentyfikowanego kofaktora (95). Jak wiadomo, brak tej aktywności enzymatycznej w wątrobie u człowieka pociąga za sobą gromadzenie się we krwi fenyloalaniny i wydalanie jej w postaci dużych ilości kwasu fenylopirogronowego, co występuje w klinicznym zespole fenyloketonurii.

W drugim etapie syntezy amin katecholowych tyrozyna jest utleniana przez oksydazę tyrozyny (tyrozynazę) z wytworzeniem DOPA (80). Związek ten nie jest normalnym składnikiem białka i nie zostaje dowożony z pokarmem, dlatego też musi zachodzić nieustanna jego synteza w ustroju (80). Tyrozynaza jest oksydazą fenolową (80). Chemicznie jest to białko miedziowe wrażliwe na tlenek węgla i cyjanowodór. Ponieważ połączenia miedziowokarbonylowe nie reagują na światło, hamowanie tyrozynazy przez CO nie ulega zmianom pod wpływem promieni świetlnych. Monofenole są atakowane przez enzym po okresie indukcji, gdy enzym i substrat przez pewien czas stykały się ze sobą i prawdopodobnie pewne ilości monofenolu zostały utlenione do odpowiedniego orto-dwufenolu, który następnie katalitycznie przyspiesza utlenienie monofenolu. Działanie oksydazy fenolowej na monofenole określane jest jako aktywność „krezolazowa”, a na dwufenole jako aktywność „katecholazowa” (109).

Bierze się także pod uwagę możliwość nieenzymatycznego utleniania tyrozyny do DOPA przy aktywowaniu tej reakcji przez kwas askorbinowy (1). Duża zawartość kwasu askorbinowego w korze nadnerczy może nasuwać przypuszczenie słuszności tej hipotezy.

W 1956 roku Kirschner i Goodall (98) po raz pierwszy bezspornie wykazali, że tyrozyna zostaje przekształcana w rdzeniu nadnerczy w adrenalinę i noradrenalinę. Homogenaty rdzenia nadnerczy w małym stopniu zużytkowują dodaną tyrozinę na wytwarzanie noradrenaliny i to tylko we frakcji „cząstek”, podczas gdy supernatant jest pod tym względem nieaktywny. W porównaniu z homogenatami skrawki rdzenia nadnerczy przetwarzają tyrozinę w aminy katecholowe w ilości dziesięcio-

krotnie większej, co przemawia za tym, że aktywność enzymu związana jest ze strukturami komórkowymi, które w procesie homogenizacji ulegają uszkodzeniu (97, 127). Tyrozynazę wyosobniono z robaka mącznego (*Tenebrio molitor*) (126), z mięsaka czerniaczkowego Hardinga-Passeya myszy (78) i z różnych tkanek zwierząt ssących (108).

Zwraca się uwagę na to, że utlenienie tyrozyny jest reakcją przebiegającą bardzo powoli w porównaniu z innymi etapami syntezy amin katecholowych. Podawanie znakowanej tyrozyny do płynu przetaczonego przez wyosobnione nadnercza nie przyspiesza produkcji noradrenaliny, podczas gdy dopamina bardzo znacznie wzmaga jej syntezę (74). Dlatego proces hydroksylacji tyrozyny uważany jest za czynnik ograniczający szybkość całego procesu syntezy noradrenaliny i adrenaliny, pochynając od fenyloalaniny (80).

Następny etap syntezy noradrenaliny i adrenaliny — dekarboksylacja DOPA na dopaminę, katalizowana przez dekarboksylazę dwuhydroksyfenyloalaniny, która została wykryta przez Holtza w nerce morskiej świnki, a później w wątrobie, jelitach i w rdzeniu nadnerczy (80, 104, 151) oraz w układzie nerwowym środkowym i obwodowym różnych zwierząt (80). Ten sam enzym zdaje się dekarboksylować także 5-hydroksytryptofan do serotoniny (105) w homogenatach tkanek nie zawierających w warunkach ustrojowych serotoniny, jak nerwy współczulne, rdzeń nadnerczy i inne. Także tkanki nie zawierające amin katecholowych, jak komórki tuczne oraz rakowiaki są zdolne do dekarboksylacji nie tylko 5-hydroksytryptofanu, lecz także DOPA (32). Ostateczna odpowiedź, czy mamy do czynienia z jednym, czy też z dwoma różnymi enzymami, będzie możliwa po uzyskaniu ich w postaci krystalicznej. Przekształcenie DOPA w dopaminę zostało wykazane przez Holtza m.in. u ludzi (80). Po dożylnym wprowadzeniu około 40% DOPA ukazało się w moczu w postaci dopaminy. Dekarboksylaza DOPA działa wyłącznie na lewoskrętny izomer (80). Szybkość dekarboksylacji jest tak znaczna, że na ogół, poza nielicznymi wyjątkami, nie udaje się wykryć DOPA w tkankach, a można jej obecność wykazać po podaniu inhibitora hamującego dekarboksylazę DOPA (74, 80). Frakcjonowane wirowanie homogenatów tkankowych wykazało, że enzym ten znajduje się w supernatancie (60, 97). Produkt dekarboksylacji dopamina jest następnie magazynowany w ziarnistościach komórkowych (97). Stwierdzono *in vitro*, że dekarboksylaza DOPA jest także w stanie dekarboksylować dwuhydroksyfenyloserynę (152). Koenzymem dekarboksylazy DOPA jest fosforan-5-pirydoksalu (80). Kofaktorem zdaje się być Zn^{++} (140).

Między zawartością w tkance nerwowej noradrenaliny a aktywnością dekarboksylazy DOPA istnieje znaczny stopień korelacji. Największą zawartość noradrenaliny i największą aktywność dekarboksylazy DOPA stwierdzono we współczulnych zwojach i włóknach pozazwojowych, zaś w układzie środkowym w podwzgórze (80).

Można dodać, że dopamina powstaje także nieenzymatycznie, przynajmniej *in vitro*, z tyraminy pod wpływem promieni pozafioletkowych, które aktywizują wytwarzanie nadtlenu wodoru. Tlen odszczepiany z H_2O_2 w obecności kwasu askorbinowego przekształca tyraminę w dopaminę (80).

Inhibitory dekarboksylazy DOPA są liczne (48). Nadmiar substratu (DOPA) lub jego analogi jak α -metylo-DOPA, a także α -metylo-tyrozyna hamują intensywnie enzym przez wiązanie koenzymu. α -Metylo-DOPA stosowano próbnie w leczeniu nadciśnienia i zespołu rakowiaka (49). Nieznaczny dodatek izoniazydu do substratu chroni dekarboksylazę DOPA przed inaktywacją, prawdopodobnie w wyniku powstawania hydrazonu, który uodparnia koenzym (65, 120). Kwas fenylpirogroonowy także ma hamować aktywność dekarboksylazy DOPA, w związku z czym być może pogłębione zostają zaburzenia metaboliczne w fenylketonurii (40).

Z innych inhibitorów dekarboksylazy DOPA można wymienić hydrazydy (np. iproniazyd), hydrazyny, semikarbazydy, hydrazynoftalazyne, pochodne sulfonilomocznika, a także cynamonylosalicylany, szczególnie 5-(3-hydroksycynamonylo) salicylan oraz kwas 3,4-dwuhydroksycynamonowy (kwas kawowy). Ostatnie inhibitory działają stosunkowo krótko, gdyż po 30-40 min. ulegają w tkankach rozkładowi. Podanie zwierzętom *in vitro* inhibitora dekarboksylazy DOPA powoduje brak wzrostu ciśnienia krwi po wprowadzeniu DOPA przy zachowaniu reakcji na dopaminę, noradrenalinę i adrenalinę (48, 49).

Clark wykazał, że na koncentrację dekarboksylazy DOPA w tkankach ma wpływ szereg hormonów (48, 49). Tyroksyna i trójiodotyronina zmniejszają aktywność tego enzymu w wątrobie. Tak samo wpływa głodowanie (81, 150). Zwierzęta pozbawione nadnerczy i utrzymywane w dobrym stanie ogólnym przez podawanie dużych ilości chlorku sodowego nie reagują na wprowadzanie DOPA zwyżką ciśnienia krwi, przy czym zachowane są normalne reakcje na adrenalinę, noradrenalinę i dopaminę. Podawanie hydrokortyzonu z dezoksykortykosteronem zdaje się normalizować reakcję na DOPA. Aktywność dekarboksylazy DOPA u szczurów płci męskiej wydaje się być wyższa niż u osobników żeńskich (48, 137).

Następny etap syntezy, powstawanie noradrenaliny z dopaminy jest katalizowany przez β -oksydazę dopaminy. Wprowadzenie grupy hydroksylowej do łańcucha bocznego dopaminy wykazano zarówno w tkankach chromochłonnej i nerwowej, jak i w ustroju zwierzęcym jako całości (54, 72). Reakcja ta jest dość skomplikowana i na jej przebieg nie ma jednolitego poglądu. Według Blaschko początkowo następuje odwodowanie z powstaniem układu chinonowego, a następnie przyłączenie wody (31). Massart i Vercauteren (114) sugerują, że początkowo zachodzi przyłączenie tlenu i powstaje *orto*-chinon, następnie przejście w *para*-chinon z wytworzeniem grupy metinowej w łańcuchu bocznym i dalej przyłączenie wody z końcową hydroksylacją. W ten

sposób w procesie hydroksylacji dopaminy zachodziłoby pośrednie powstawanie związku chinono-metinowego, przy czym wodór byłby pobierany nie ze środowiska, lecz z łańcucha bocznego, po czym następowałoby przyłączenie wody.

Niedawno Kirschner (96), a także Levin, Levenberg i Kaufman (111) otrzymali z nadnerczy wołu częściowo oczyszczoną β -oksydazę dopaminy. Po wyekstrahowaniu wodą proszku acetonowego z nadnerczy wysolono enzym siarczanem amonu przy 35% nasycenia. Oksydaza ta hydroksyluje dopaminę w obecności kwasu askorbinowego i fumarowego, przy czym powstaje noradrenalina, kwas dehydroaskorbinowy i woda (111). Stwierdzono także konieczność ATP i dehydrogenazy glukozy. ATP może być zastąpiony przez inne trójfosforany purynowe lub pirymidynowe, ale połączenia dwu- i jednofosforanowe nie mogą zastąpić trójfosforanów. Dehydrogenaza glukozy może być zastąpiona w tym układzie przez katalazę. β -Oksydaza dopaminy nie zdaje się być enzymem swoistym, gdyż hydroksyluje także inne związki w pozycji *beta*, np. β -fenyloetyloaminę przeprowadza w β -fenyloetanolaminę (110). Proces hydroksylacji w nadnerczach jest szybki, gdyż nadnercza szeregu zwierząt nie zawierają dopaminy lub mało (około 2% ogółu amin katecholowych) (32). Natomiast w tkance nerwowej hydroksylacja przebiega wolniej i można w niej znaleźć do 50% dopaminy (56, 132, 147). Oksydaza dopaminy znajduje się wewnątrz ziarnistości komórkowych (60, 71). Niektóre guzy chromochłonne nadnerczy nie posiadają zdolności hydroksylowania dopaminy, w klinice nazywają je guzami „nieczynnymi” (134).

Współzawodniczącym inhibitorem β -oksydazy dopaminy jest bromek eteru cholino-2,6-ksylilowego (TM 10) (60), a także epinina (64). Do niewspółzawodniczących można zaliczyć adrenalon i *p*-hydroksyamfetaminę (63).

Metylowanie noradrenaliny i przekształcenie jej w adrenalinę zachodzi przy udziale S-adenozylometioniny jako donora grup metylowych (44). W stanach wzmożonej produkcji adrenaliny jak np. po dodaniu acetylocholin, insuliny (43, 83) lub też w guzach chromochłonnych nadnerczy stwierdza się w nadnerczach wolną homocystynę względnie homocysteinę jako wyraz wyczerpywania się donora metylowego w wyniku bardzo szybkiego metylowania noradrenaliny (27). Ponieważ S-adenozylometionina powstaje z metioniny i ATP, przy podawaniu czystej metioniny do homogenatów niezbędna jest obecność ATP i Mg^{++} (116). S-adenozylometionina przyspiesza metylowanie noradrenaliny w stopniu znacznie większym niż ATP i metionina (97). Reakcja metylowania noradrenaliny ma przebiegać zgodnie z działaniem układów transmetylujących opisanych przez Cantoniego (45, 46). Interesujące jest spostrzeżenie Verlyego z pracowni Bacqa, który podając szczerom L-metioninę podwójnie znakowaną w grupie metylowej atomami ^{14}C i 3H stwierdził, że grupa ta przechodzi jako całość do choliny, natomiast grupa metylowa

kreatyny i adrenaliny ma większą zawartość ^{14}C niż ^3H . Wyniki te sugerują, że grupa metylowa przenoszona jest z metioniny do adrenaliny i kreatyny na drodze różnej od drogi zwykłej metylacji (17).

Obecność układu metylującego noradrenalinę wykazano we frakcji płynnej homogenatów. Izolowane nadnercza cielęce perfundowane znakowaną tyrozyną zawierały znaczne ilości znakowanej noradrenaliny, a mało znakowanej adrenaliny, co zdaje się świadczyć, że proces metylowania zachodzący w płynie protoplazmatycznym jest niezbyt szybki. Może to być spowodowane także stosunkowo wolnym przenikaniem noradrenaliny z ziarnistości do płynu. Wytworzona adrenalina również zostaje w ziarnistościach. Wydaje się, że proces metylowania noradrenaliny zachodzi w czasie jej przechodzenia z jednych organelli komórkowych do drugich (127). Metylacja noradrenaliny ma miejsce jedynie w rdzeniu nadnerczy i w tkankach podobnych, natomiast nie występuje w tkance nerwowej (115).

Podawanie dożylnie znakowanej adrenaliny lub perfuzja adrenaliną nadnerczy izolowanych nigdy nie powoduje powstawania znakowanej noradrenaliny. Stanowi to dowód, że odwrotna reakcja tzn. odmetylowanie w ustroju nie zachodzi (124).

W związku z wysuniętymi hipotezami alternatywnych dróg syntezy amin katecholowych należy podkreślić, że nie ma dowodów, aby tyraminę, czy też fenyletyloaminę można było uznać za prekursorzy noradrenaliny. W badaniach McGoodalla i Kirschnera (67, 98) po dodaniu znakowanej tyrozyny nie udało się wykazać tyraminy w homogenatach nadnerczy. Wykazano również, że szczury nie mogą zużytkować wprowadzonej fenyletyloaminy i tyraminy do syntezy amin katecholowych (106). Nie ma także dowodów przemawiających za istnieniem drugiej drogi alternatywnej, gdyż w żadnych warunkach nie stwierdzono w tkankach ssaków obecności oktopaminy (97).

Trzeci wariant syntezy poprzez dwuhydroksyfenyloserynę teoretycznie jest możliwy, gdyż podana zwierzętom dwuhydroksyfenyloseryna ulega dekarboksylacji do noradrenaliny. Werle i Jüngten-Sell (140) sądzą, że w ustrojach ssaków znajduje się swoista dekarboksylaza dwuhydroksyfenyloseryny. Jednak po wprowadzeniu inhibitora dekarboksylazy DOPA można stwierdzić w tkankach obecność DOPA, natomiast nie udało się wykazać obecności dwuhydroksyfenyloseryny. Wydaje się więc, że dwuhydroksyfenyloseryna nie powstaje ani w nadnerczach, ani w tkance nerwowej (97).

Z przedstawionych faktów wynika, że realną i pewną jest jedynie przedstawiona przez Blaschko droga syntezy: tyrozyna \rightarrow DOPA \rightarrow dopamina \rightarrow noradrenalina \rightarrow adrenalina.

Magazynowanie amin katecholowych w komórkach zachodzi w ziarnistościach o gęstości różniącej się od gęstości mitochondriów, przy czym

aminy te są składowane w postaci osmotycznie i elektrochemicznie obojętnej. Magazynowaniu amin i związanym z tym enzymom szczególnie dużo uwagi poświęcili Hillarp i współpracownicy (75).

Jak zostało wykazane przez tych badaczy (58, 76), a następnie potwierdzone przez innych (33, 34), noradrenalina i adrenalina są magazynowane w postaci zespolonej z ATP, przy czym na jedną cząsteczkę ATP przypada od 3 do 5, najczęściej 4 cząsteczki aminy. Dodatkowo ładunki amin są zobojętniane przez ujemne ładunki reszt fosforanowych ATP. W ziarnistościach magazynujących aminy katecholowe znajduje się mikrosomalny cytochrom *m* (139). ATP nie jest wytwarzany w ziarnistościach ze względu na brak enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych, lecz pochodzi z mitochondriów (136). W procesie uwalniania amin katecholowych z ziarnistości następuje jednoczesne oswabianie ATP przy zachowanym stosunku cząsteczkowym aminy: ATP = 4:1 (133). W czasie rozpadu ziarnistości w środowisku hipotonicznym uwalniany ATP zostaje szybko rozkładany przez ATP-azę oraz kinazę adenylanową. Prawdopodobnie oba te enzymy są umiejscowione w błonie tych organelli (75). Aktywatorem zarówno ATP-azy, jak i kinazy adenylanowej jest Mg^{++} (75). ATP-aza jest hamowana przez salirgan i *p*-chlorortęciobenzoesan, a kinaza adenylanowa przez NaF (75). Jak wykazano, w tych samych ziarnistościach komórek nadnerczy magazynowane są noradrenalina, adrenalina i dopamina. Wobec tego proces magazynowania nie zdaje się być swoisty (18, 20). Jak wiadomo, czynnikiem farmakologicznym przeciwdziałającym magazynowaniu amin katecholowych jest rezerpina, przy czym ta właściwość jest uważana za najistotniejsze działanie tego alkaloidu (19).

II. Enzymy katabolizmu i inaktywacji

Istnieje kilka dróg rozpadu i inaktywacji amin katecholowych: 1) utlenienie do adrenochromu i melanin, 2) odwodorowanie do adrenalonu i następne utlenienie do kwasu protokatechusowego, 3) dezaminacja przez oksydazę monoaminową (MAO) i następnie O-metylacja przez oksymetylotransferazę katecholoaminową (COMT), 4) metylacja przez COMT i następnie dezaminacja przez MAO, 5) sprzęganie amin katecholowych i ich produktów rozpadu z kwasem glukoronowym lub siarkowym (100).

Należy podkreślić, że układy enzymatyczne inaktywujące aminy katecholowe działają znacznie wolniej i słabiej niż układ inaktywujący acetylocholinę, tj. esteraza cholinowa. Dlatego też następstwa pobudzenia włókien cholinergiczných są ściśle zlokalizowane, podczas gdy pobudzenia adrenergiczne wykazują tendencję do rozprzestrzeniania się na większych obszarach.

W łańcuchu przemian adrenaliny do adrenochromu zachodzi utlenienie do adrenochinonu i cyklizacja łańcucha bocznego z wytworzeniem ukła-

du indofenolowego. Przemiany te mogą być aktywowane przez układ oksydazy cytochromowej. W mięśniach gładkich (z wyjątkiem mięśni jelit) wykryto oksydazę katecholową utleniającą adrenalinę (lecz nie noradrenalinę) *in vitro* do adrenochromu (16), a w sercu szczura — układ enzymatyczny, aktywny również *in vitro*, aktywowany przez metale ciężkie, a hamowany przez cyjanek potasu (82).

Według Hoffer'a (77) w jednym litrze osocza ludzkiego ma znajdować się do 50 μg adrenochromu, co jednak nie zostało potwierdzone przez innych autorów (84, 141).

Szereg autorów uważa, że fenolazowy typ utleniania adrenaliny nie ma praktycznie większego znaczenia dla ogólnej przemiany amin katecholowych, gdyż w tkankach znajdują się czynniki redukujące, np. grupy sulfhydrylowe i kwas askorbinowy, chroniące aminy katecholowe przed tego typu utlenieniem, a także przed autooksydacją (36). Jednak w niektórych narządach, gdzie czynniki redukujące są prawdopodobnie mało operatywne względem adrenochinonu, np. w sercu, ten rodzaj utleniania amin katecholowych może mieć duże miejscowe znaczenie (91). Obecność enzymów katalizujących fenolazowy typ utleniania adrenaliny stwierdzono również w nerce i w słabszym stopniu w mózgu królika (92). Adrenalina w osoczu może być także utleniana przez białko miedziowe — ceruloplazminę, uważaną za główną oksydazę osocza, chociaż jej rola w katabolizmie amin katecholowych do dziś dnia nie została wyjaśniona (144, 145). Również ferrytyna *in vitro* może wykazywać względem adrenaliny aktywność fenolazową (36).

W łańcuchu przemian adrenaliny przez adrenalon, dwuhydroksyfenyloglikol, aldehyd protokatechusowy do kwasu protokatechusowego miałyby działać w pierwszym ogniwie hipotetyczna dehydrogenaza adrenaliny (57), a w dalszych oksydaza monoaminowa (MAO) i inne enzymy. Aldehyd będący produktem utleniania adrenaliny został znaleziony w moczu królików (148), kwas protokatechusowy w moczu morskich świnek (88). Dehydrogenazę adrenaliny znaleźli Imaizumi i Kawamoto (85) w osoczu królików, jednakże innym autorom nie udało się stwierdzić obecności tego enzymu ani w osoczu człowieka i królika, ani też w wyciągach z wątroby, serca, śledziony i mózgu (84, 146), chociaż u człowieka wykrywa się pewne ilości kwasu protokatechusowego w moczu po dodaniu kwasu 3,4-dwuhydroksymigdałowego (66). Adrenalon wyosobniono z moczu morskich świnek (69, 85, 99) i z krwi królików (77), natomiast po podaniu znaczonej adrenaliny człowiekowi nie znaleziono oznaczonego adrenalonu (7). Tak więc zarówno istnienie dehydrogenazy adrenaliny, jak i znaczenie przemian amin katecholowych poprzez adrenalon w ogólnoustrojowym metabolizmie pozostaje zagadnieniem otwartym.

Zwrócenie uwagi na proces dezaminacji amin katecholowych łączy się z odkryciem przez Hare'a (73) oksydazy tyraminy, która jak stwierdzili Blaschko i współpracownicy (37) utlenia również adrenalinę i nora-

drenalinę do odpowiednich aldehydów. Dlatego nazwano ją później oksydazą monoaminową (MAO). Jest to enzym o względnie małej swoistości, wrażliwy na ciepło, lecz dość stały w niskiej temperaturze (53). Optimum *pH* dla enzymu waha się w dość szerokich granicach zależnie od rodzaju preparatu i substratu. Najczęściej leży w granicach środowiska słabo alkalicznego 7,1—7,5 (113). MAO zawiera jedną grupę sulfhydrylową niezbędną dla jej aktywności, a w centrum aktywnym ma tylko jeden rodzaj receptorów (84, 153).

Największe powinowactwo wykazuje MAO względem serotoniny (135), następnie względem dopaminy i tyraminy, nieco słabsze w stosunku do noradrenaliny i adrenaliny (125). Bierze także udział w katabolizmie histaminy (112).

Obecność MAO wykazano zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców (30, 35). W ustroju ludzkim najwięcej zawiera jej wątroba, a następnie w porządku malejącym serce, nerka, mózg i płuca. W mózgu najwięcej MAO znajduje się w podwzgórzu. Występuje ona w ziarnistościach komórkowych, przede wszystkim w mitochondriach (55, 84).

Inhibitory MAO są liczne i można je uszeregować w pięciu następujących grupach (38, 119): 1) alkaloidy ruty stepowej, a więc harman i jego pochodne — są to inhibitory odwracalne, o szybko mijającym działaniu; znacznym *in vitro*, słabszym *in vivo*; 2) podstawione hydrazyny, hydrazony i hydrazydy: *p*-metylofenylohydrazyna, fenyloizopropylhydrAZYNA, iproniazyd, nialamid, catron itp. — wykazują one znaczną aktywność i długotrwałe, nieodwracalne działanie; 3) pochodne indolowe jak 2-hydroksytryptamina, izoptryptamina i inne; 4) pochodne fenyloetyloaminy jak tranylecypromina, amfetamina, dezoksyamfetamina i inne; 5) substancje różne, np. amid prokainy, imipramina i szereg innych środków psychotropowych, dezoksyfedryna, adrenalon.

Badania nad wpływem inhibitorów MAO na przemianę amin biogennych są bardzo liczne, a szczególnie dużo uwagi zwrócono na hamowanie MAO przez iproniazyd. Okazało się, że jest on istotnie silnym inhibitorem także *in vitro* i to w obecności tlenu. Przypuszcza się, że nieodwracalne zahamowanie enzymu zachodzi na skutek odwodorowania iproniazynu w centrum aktywnym enzymu (52). Nadmiar substratu w pomiarach *in vitro* stwarza możliwości rozpadu kompleksu enzym-inhibitor, przy czym hamowanie staje się odwracalne (62).

Biorąc pod uwagę dużą rolę, którą zaczęto przypisywać MAO w katabolizowaniu amin katecholowych, należało się spodziewać, że po zahamowaniu tego enzymu powinno następować zarówno gromadzenie się w tkankach amin endo- i egzogennych, jak również wzmaganie ich fizjologicznego działania. Stwierdzono, że inhibitory MAO (catron i inne) hamują także znikanie znakowanej noradrenaliny z serca (10). Iproniazyd podany *in vivo* zmniejsza zdolność niektórych tkanek, np. wątroby, nerek, mózgu i serca do inaktywacji noradrenaliny i adrenaliny. Po podaniu

iproniazydu łącznie z aminami katecholowymi wzrasta dwukrotnie ich wydalanie z moczem w postaci wolnej (84). Podanie samego iproniazydu nie prowadzi u człowieka, u kota i szczura do wzrostu wydalania endogennej noradrenaliny i adrenaliny (47, 50); odmiennie zachowuje się ustrój morskiej świnki (123). Tylko duże dawki iproniazydu, wystarczające do zahamowania enzymu w 85—100%—ach wywołują wzrost zawartości noradrenaliny w mózgu (61). Widocznie istnieje tam nadmiar MAO, gdyż obecność jeszcze około 20% normalnej aktywności zapewnia dostateczny rozpad noradrenaliny, tak że nie gromadzi się ona w tkance.

Iproniazyd nie ma jednak wpływu na niektóre tkanki, np. nie zwiększa działania adrenaliny i noradrenaliny na trzecią powiekę kota (42, 68) i nie wpływa na zawartość noradrenaliny w krwi odpływającej ze śledziony w czasie drażnienia nerwów śledzionowych (41).

Wobec rozbieżności wyników badań wielu autorów było zdania, że znaczenia MAO w katabolizmie amin katecholowych nie można traktować jako pewnik (15, 39, 86). Obecnie jednak przyjmuje się, że aminy katecholowe i inne biogenne aminy są inaktywowane w znacznym stopniu przez MAO w tkankach, w których po podaniu inhibitora enzymu dochodzi do wzmożenia fizjologicznego działania amin (159). Brak tego zjawiska przemawia za tym, że w procesie inaktywacji zachodzą inne przekształcenia amin, a przede wszystkim metylacja. Wyrażono przypuszczenie (138), że główną czynnością MAO w warunkach fizjologicznych, przynajmniej w mózgu, jest regulowanie wewnątrzkomórkowej zawartości noradrenaliny i serotoniny, dzięki czemu odływ amin z komórki w kierunku receptora może być przerwany. MAO może wpływać na zawartość noradrenaliny w mózgu poprzez działanie na dopaminę, która jest dla niej szczególnie dobrym substratem (138).

Po obciążeniu ustroju noradrenaliną i adrenaliną wzrasta wydalanie w moczu metoksy pochodnych amin katecholowych (3, 4). Axelrod (6) wychodząc z założenia, że S-adenozylometionina może być donorem nie tylko grup N-metylowych, lecz także O-metylowych amin katecholowych, inkubował adrenalinę z frakcją płynną szczurzej wątroby w obecności S-adenozylometioniny i w mieszaninie reakcyjnej zidentyfikował metoksyadrenalinę (metadrenalinę) (9, 11). To stwierdzenie wskazywało na istnienie enzymu O-metylotransferazy katecholaminowej (COMT), katalizującej przenoszenie grupy metylowej aktywnej metioniny na grupę 3-hydroksylową amin katecholowych.

Axelrod i współpracownicy (5, 6, 12) uzyskali preparaty COMT oczyszczone około trzydziestokrotnie i wykazali, że w braku S-adenozylometioniny i Mg^{++} zachodzą tylko ślady O-metylowania. Mg^{++} może być zastąpiony szeregiem kationów dwuwartościowych, włącznie z Co^{++} , Mn^{++} , Cd^{++} , Fe^{++} i Ni^{++} . Substratami COMT są: adrenalina, noradrenalina, dopamina, dopa, kwas 3,4-dwuhydroksymigdałowy, jak również kilka katecholi syntetycznych. Enzym nie wykazuje swoistości stereo-

chemicznej i metyluje zarówno lewo- jak i prawoskrętne izomery. W obecności czynników blokujących grupy sulfhydrylowe, takich jak kwas jednonoowy lub *p*-chlorortęciobenzoesan, O-metylacja zostaje zahamowana.

Axelrod (6), biorąc pod uwagę swoistość COMT względem katecholi i niezbędną jonów dwuwartościowych, wyraża przypuszczenie, że jony te są czynnikiem wiążącym substrat poprzez dwie sąsiadujące grupy hydroksylowe z enzymem. W enzymie w miejscu wiązania znajduje się prawdopodobnie grupa sulfhydrylowa, gdyż czynniki blokujące tę grupę hamują reakcję.

Z wyjątkiem mięśni szkieletowych nie mających zdolności O-metylacji amin katecholowych i mięśnia sercowego posiadającego tę zdolność w stopniu minimalnym, właściwość tę posiadają wszystkie tkanki. Obecność COMT wykazano u wszystkich badanych dotychczas gatunków ssaków (człowiek, mała, krowa, świnia, kot, i królik) (12). Wydaje się, że noradrenalina może ulegać wprawdzie O-metylowaniu i następnie dezaminacji przez MAO, dając po utlenieniu kwas 3-metoksy-4-hydroksymigdałowy (5).

Inhibitorami COMT są pirogalol, kwercetyna, glukocyjamina, trójhydroksyfenyloalanina oraz związki amidu kwasu tropolonooctowego (8, 84). Bacq (14) już w 1936 roku zauważył, że drażnienie włókien współczulnych u kota po podaniu pirogalolu lub podanie adrenaliny łącznie z pirogalolem powoduje wzmożone efekty ze strony trzeciej powieki i ciśnienia krwi. Pod wpływem inhibitorów COMT powstawanie metoksyadrenaliny zostaje prawie całkowicie zahamowane, przy czym półokres biologicznego rozpadu noradrenaliny *in vivo* jest tylko nieznacznie przedłużony, co świadczy o uruchamianiu alternatywnych mechanizmów jej rozpadu (142). Równoczesne blokowanie obu znanych dróg rozpadu za pomocą iproniazydu i pirogalolu powoduje powstawanie niezidentyfikowanych dotychczas produktów metabolizmu amin katecholowych (128, 129).

Doświadczenia ze znakowanymi trytem adrenaliną i noradrenaliną przeprowadzone na człowieku, kocie i myszy wykazały (13, 102), że około 70% wprowadzonych ³H-adrenaliny i ³H-noradrenaliny zostaje przekształcone w metoksy pochodne, z czego około 25% ulega oksydacyjnej dezaminacji i utlenieniu do kwasu 3-metoksy-4-hydroksymigdałowego albo zredukowaniu do 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikolu. Pozostałe ilości metoksy pochodnych zostają wydalone w postaci niezmienionej lub sprzężonej. Około 20% wstrzykniętej adrenaliny jest dezaminowane pierwotnie, a dopiero wtórnie O-metylowane do kwasu 3-metoksy-4-hydroksymigdałowego.

Sprzęganie amin katecholowych, jak i bezpośrednich produktów ich przemian z kwasami glukoronowym i siarkowym zachodzi prawie wyłącznie w wątrobie. U człowieka przeważa łącznie się z kwasem siarkowym (103), u szczura — z glukoronowym (102, 130). Inkubacja metoksyadrena-

liny lub metoksynoradrenaliny z mikrosomami wątroby szczura i kwasem urydynodwufosfoglukoronowym powoduje enzymatyczne powstawanie związków sprzężonych dzięki odpowiedniej transferazie obecnej w mikrosomach (6).

Billewicz-Stankiewicz i współpracownicy (23) zauważyli, że w osoczu i surowicy krwi występuje enzym katalizujący utlenienie adrenaliny do adrenochromu w obecności nadtlenu wodoru. Nazwano go prowizorycznie „oksydazą adrenaliny” i opracowano metodę jego oznaczenia (89). Badany enzym różni się od czynników utleniających adrenalinę w osoczu opisanym przez innych autorów (118, 121, 122). Znajduje się on w β -globulinach i nie jest identyczny z ceruloplazminą, ferrytyną, katalazą i peroksydazą (23). Wykazano, że między aktywnościami ceruloplazminy i ADO mierzonymi w tych samych surowicach nie ma korelacji, bowiem w czasie przechowywania surowicy krwi świńskiej w temp. 2-4° w ciągu 4 dni aktywność ceruloplazminy (mierzona metodą Ravina) nie ulegała zmianie, natomiast aktywność ADO ulega zanikowi. Po wykonanym na bibule rozdziale elektroforetycznym świeżej surowicy świńskiej i kolejnym natryskaniu stężonymi roztworami adrenaliny i nadtlenu wodoru, widzi się wyraźne powstawanie adrenochromu w pasmach α - i β -globulin. Po upływie około 80 godzin przechowywania w temp. 2-4° surowica tworzy pasmo adrenochromu o niezmięnionej intensywności w α -globulinach (zawierających ceruloplazminę), natomiast w β -globulinach adrenochrom powstaje zaledwie w śladowej ilości. Roztwory ceruloplazminy i ferrytyny o stężeniu przekraczającym poziomy tych białek w osoczu nie wykazują aktywności oksydazy adrenaliny.

Katalaza surowicy w warunkach metody pomiaru ADO zostaje inaktywowana, a więc nie interferuje w oznaczaniu tego enzymu. Aktywnej peroksydazy brak w osoczu i surowicy krwi (79), nie występuje tam również cytochrom i oksydaza cytochromowa. Ponadto w przeciwieństwie do ADO enzymy te są inaktywowane przez cyjanek.

Oksydaza adrenaliny jest nieuczynniana przez tlenek węgla, przy czym promienie świetlne nie mają żadnego wpływu na przebieg inaktywacji. To stwierdzenie wskazywałoby na to, że nie należy ona do grupy hemo-proteidów. Zależność aktywności enzymu od zmiennych stężeń substratu (adrenaliny) wskazuje, że nasycenie enzymu substratem następuje stopniowo, uzyskując maksimum przy stężeniu około 0,1 μ M adrenaliny/ml. Stała Michaelisa (K_M) ADO osocza krwi ludzkiej dla adrenaliny, oznaczana metodą Lineveawera-Burka, wynosi $13,7 \cdot 10^{-6}$ M/l i jest wielokrotnie mniejsza od stałej MAO ($9,4 \cdot 10^{-4}$ M/l). To upoważnia do wnioskowania, że ADO posiada znaczne powinowactwo do adrenaliny i może być operatywna w ustroju w katabolizmie amin katecholowych. Przy użyciu stałych ilości substratu i zmiennego stężenia enzymu otrzymuje się krzywą aktywności w kształcie wyciągniętej litery S. Optimum temperatury dla ADO (przy półgodzinnej inkubacji) znajduje się w granicach 36—51°, przy

czym przy 80° zachodzi inaktywacja (23). Całość wyników przemawia za tym, że ADO jest raczej jednym enzymem, a nie zespołem enzymów.

U przedstawicieli ssaków i płazów (szczur, żaba) stwierdzono (22), że aktywność ADO u osobników młodych jest niska i wzrasta z wiekiem, natomiast u przedstawicieli ptaków (kura) enzym ten w pierwszym dniu życia ma pełną aktywność właściwą osobnikom dojrzałym.

Niektóre czynniki farmakologiczne i monoaminy biogenne powodują charakterystyczne zmiany średniej aktywności ADO u szczura. Adrenalina, noradrenalina, histamina, rezerpina, w działaniu doraźnym (1—2 godz.), jak również iproniazyd podany jednorazowo zwiększają aktywność, efedryna i rezerpina w działaniu przewlekłym — obniżają, zaś atropina, dwuhydroergotoksyna i efedryna w działaniu doraźnym nie wywierają wpływu na tę aktywność enzymatyczną (25).

Przewlekłe podawanie niektórych hormonów zwłaszcza sterydowych: hydrokortyzonu, etstradiolu (u samic) i testosteronu a także kortykotropiny, wywołuje obniżenie aktywności ADO u szczurów. Natomiast karmienie suszoną tarczycą wzmagą tę aktywność. Podobny efekt u samców powoduje kastracja (21).

Czynniki powodujące *stress*, jak np. ostre obciążenie zwierząt wysiłkiem fizycznym, umieszczenie w niskiej lub wysokiej ciepłocie otoczenia, oddychanie w przestrzeni zamkniętej (hiperkapnia z hipoksją) powodują znamienny wzrost średniej aktywności ADO (24, 26). Podskórne jednorazowe wstrzyknięcie terpentyny prowadzi do kilkudniowego obniżenia aktywności tego enzymu, natomiast nie ma wpływu hipoksja bez hiperkapnii ani podskórne wprowadzenie zawiesiny hodowli paciorkowca hemolizującego. Po przebyciu ostrego pobudzenia emocjonalnego u człowieka (studenci po egzaminie) stwierdzano wyraźny, bardzo znamienny spadek aktywności ADO (24).

Wyjaśnienie mechanizmu zmian aktywności enzymatycznej ADO nie jest łatwe. Wzrost aktywności w niektórych przypadkach może być wyrazem indukowania enzymu przez zwiększenie się ilości w tkankach lub mobilizowanie amin katecholowych. W ten sposób mogłyby działać pewne środki farmakologiczne, jak rezerpina, iproniazyd, efedryna, hormony: adrenalina, noradrenalina i histamina. Możliwe są również i inne mechanizmy: hydrokortyzon jako czynnik wzmagający katabolizm białka obniżałby koncentrację enzymu, tyroksyna jako hormon wzmagający przemianę, mogłaby aktywować enzym. Oksydaza adrenaliny jest najprawdopodobniej wytwarzana w wątrobie, bowiem zatrucie zwierząt atofanem zdaje się obniżać jej aktywność w osoczu. Z drugiej strony, nie udało się wykazać zwiększonej koncentracji enzymu w osoczu krwi odpływającej z wątroby.

Mechanizmy inaktywacji amin katecholowych są swoiste nie tylko dla różnych gatunków zwierząt, ale także dla poszczególnych narządów.

Wydaje się, że w ogólnej gospodarce amin katecholowych ustroju największe znaczenie odgrywa O-metylacja. Natomiast w tkance mózgowej dużą rolę odgrywa dezaminacja oksydacyjna, a w mięśniu sercowym — utlenianie chinonowe amin katecholowych. W związku z tym hierarchia poszczególnych enzymów w różnych narządach wydaje się być różna.

LITERATURA

1. Abderhalden E., *Fermentforsch.* **15**, 24 (1936).
2. Alles G. A., Heegard E. V., *J. Biol. Chem.* **147**, 487 (1943).
3. Armstrong M. D., Mc Millan A., *Fed. Proc.* **16**, 146 (1957).
4. Armstrong M. D., Mc Millan A., Shaw K. N. F., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 422 (1957).
5. Axelrod J., *Science* **127**, 754 (1958).
6. Axelrod J., *Pharmacol. Rev.* **11**, 402 (1959).
7. Axelrod J., *Physiol. Rev.* **39**, 751 (1959).
8. Axelrod J., Ciba Foundation Symposium on Adrenergic Mechanisms, red. Vane J. R., Wolstenholme G. E. W., O'Connor M., London 1960 str. 36.
9. Axelrod J., Inscoe J. K., Senoh S., Witkop B., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 210 (1958).
10. Axelrod J., Hertting G., Patrick R. W., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **134**, 325 (1961).
11. Axelrod J., Senoh S., Witkop B., *J. Biol. Chem.* **233**, 697 (1957).
12. Axelrod J., Tomchik R., *J. Biol. Chem.* **233**, 702 (1958).
13. Axelrod J., Withby L. G., Hertting G., Kopin I. J., *Circulation Res.* **9**, 715 (1961).
14. Bacq Z. M., *Arch. Internatl. Physiol.* **42**, 340 (1936).
15. Bacq Z. M., *Pharmacol. Rev.* **1**, 1 (1949).
16. Bacq Z. M., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **95**, 1 (1949).
17. Bacq Z. M., Ciba Foundation Symposium on Adrenergic Mechanisms, red. Vane J. R., Wolstenholme G. E. W., O'Connor M., London 1960 str. 25.
18. Bertler A., Hillarp N., Rosengren E., *Experientia* **16**, 419 (1960).
19. Bertler A., Hillarp N. A., Rosengren E., *Acta Physiol. Scand.* **52**, 44 (1961).
20. Bertler A., Rosengren A. M., Rosengren E., *Experientia* **16**, 418 (1960).
21. Billewicz-Stankiewicz J., Ambroziak T., Pam. IX Zjazdu Pol. Tow. Fizjol., Toruń 1963, str. 33; *Acta Physiol. Polon.* **16**, 689 (1965).
22. Billewicz-Stankiewicz J., Gołabek W., Planda A., *Annales UMCS sect. D* **19**, 45 (1964).
23. Billewicz-Stankiewicz J., Kossowski A., Szczekala Z., Pam. IX Zjazdu Pol. Tow. Fizjol., Toruń 1963, str. 34; *Acta Physiol. Polon.* **16**, 681 (1965).
24. Billewicz-Stankiewicz J., Szczekala Z., *Acta Physiol. Polon.* **16**, 695 (1965).
25. Billewicz-Stankiewicz J., Szczekala Z., Tyburczyk W., *Experientia* **20**, 85 (1964).
26. Billewicz-Stankiewicz J., Tyburczyk W., *Internatl. Zeitschr. Angew. Physiol. Arbeitphysiol.* **20**, 62 (1963).
27. Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **39**, 549 (1957).
28. Blaschko H., *J. Physiol.* **96**, 50P-51P (1939).

29. Blaschko H., *Pharmacol. Rev.* **4**, 415 (1952).
30. Blaschko H., *Brit. Med. Bull.* **9**, 146 (1953).
31. Blaschko H., *Brit. Med. Bull.* **13**, 162 (1957).
32. Blaschko H., *Pharmacol. Rev.* **11**, 307 (1959).
33. Blaschko H., Born G. V. R., D'Iorio A., Eade N. R., *J. Physiol.* **133**, 548 (1956).
34. Blaschko H., Hagen P., Welch A. D., *J. Physiol.* **129**, 27 (1955).
35. Blaschko H., Hope D. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 10 (1957).
36. Blaschko H., Levine W. G., *Neuropsychopharmacology*, red. E. Rothlin, Amsterdam-London-New York-Princeton 1961, tom II, str. 435.
37. Blaschko H., Richter D., Schlossman H., *Biochem. J.* **31**, 2187 (1937).
38. Bojarska-Dahlig H., Kurzepa S., *Wiad. Chem.* **16**, 659, 741 (1962).
39. Bovet D., Carpi A., *Ann. Rev. Physiol.* **20**, 306 (1958).
40. Boylen J. B., Quastel J. H., *Biochem. J.* **80**, 644 (1961).
41. Brown G. L., Gillespie J. S., *J. Physiol.* **138**, 81 (1957).
42. Burn J. H., Philpot F. J., Trendelenburg U., *Brit. J. Pharmacol.* **9**, 423 (1954).
43. Butterworth K. P., Mann M., *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 415 (1957).
44. Bulbring E., *Brit. J. Pharmacol.* **4**, 234 (1949).
45. Cantoni G. L., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2942 (1952).
46. Cantoni G. L., *J. Biol. Chem.* **204**, 403 (1953).
47. Carlson A. E., Boje-Rasmussen E., Kristjansen P., *J. Neurochem.* **4**, 321 (1959).
48. Clark W. G., *Pharmacol. Rev.* **11**, 330 (1959).
49. Clark W. G., Pogrund R. S., *Circulation Res.* **9**, 721 (1961).
50. Crawford T. B. B., Law W., *Brit. J. Pharmacol.* **13**, 35 (1958).
51. Crout J. R., *Biochem. Pharmacol.* **6**, 47 (1961).
52. Davison A. N., *Biochem. J.* **67**, 316 (1957).
53. Davison A. N., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 1737 (1958).
54. Demis D. S., Blaschko H., Welch A. D., *J. Pharmacol.* **117**, 208 (1956).
55. Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, London 1960, str. 284, 285, 421.
56. Euler von U. S., *Acta Physiol. Scand.* **43**, 155 (1958).
57. Euler von U. S., *Hormones in Blood*, red. Gray C. H., Bacharach A. L., London-New York 1961, str. 515.
58. Falck B., Hillarp N. A., Hogberg B., *Acta Physiol. Scand.* **36**, 360 (1956).
59. Fellman J. H., Devlin M. K., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 328 (1958).
60. Gaddum J. H., Ciba Foundation Symposium on Adrenergic Mechanisms, red. Vane J. R., Wolstenholme G. E. W., O'Connor M., London 1960, str. 588.
61. Gey K. F., Pletscher A., *J. Neurochem.* **6**, 239 (1961).
62. Gluckmann M. I., Marazzi A. S., *Fed. Proc.* **17**, 371 (1958).
63. Goldstein M., Contrera J. F., *Biochem. Pharmacol.* **7**, 77 (1961).
64. Goldstein M., Contrera J. F., *Nature* **192**, 1081 (1961).
65. Gonnard P., Chi J. N., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 485 (1958).
66. Goodall Mc C., *Pharmacol. Rev.* **11**, 416 (1959).
67. Goodall Mc C., Kirschner N., *J. Biol. Chem.* **226**, 231 (1957).
68. Griesemer E. C., Barsky J., Dragstedt C. A., Wells J. A., Zeller E. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. (N. Y.)* **84**, 699 (1959).
69. Gryglewski R., *Post Hig. Med. Dośw.* **14**, 337 (1960).
70. Gurin S., Delluva A. M., *J. Biol. Chem.* **170**, 545 (1947).
71. Hagen P., *Pharmacol. Rev.* **11**, 361 (1959).

72. Hagen P., Welch A. D., *Rec. Progr. Hormone Res.* **12**, 27 (1956).
73. Hare M. L. C., *Biochem. J.* **22**, 968 (1928).
74. Hess S. M., Connamacher R. H., Ozaki M., Udenfriend S., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **134**, 129 (1961).
75. Hillarp N. A., *Acta Physiol. Scand.* **42**, 144 (1958).
76. Hillarp N. A., Nilson B., *Acta Physiol. Scand.* **32**, 11 (1954).
77. Hoffer A., *Am. J. Psychiat.* **114**, 752 (1958).
78. Hogeboom G., Adams M. H., *J. Biol. Chem.*, **226**, 511 (1957).
79. Holmberg C. G., Laurell C. B., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **3**, 103 (1951).
80. Holtz P., *Pharmacol. Rev.* **11**, 317 (1959).
81. Holtz P., Stock K., Westermann E., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **228**, 322 (1956).
82. Hornykiewicz O., *Biochem. Z.* **326**, 270 (1955).
83. Hökfelt B., *Acta Physiol. Scand.* **25**, suppl. 92 (1951).
84. Iisalo E., *Acta Pharmacol. Toxicol.* **19**, suppl. 1 (1962).
85. Imaizumi R., Kawamoto K., *Med. J. Osaka Univ.* **3**, 269 (1952).
86. Imaizumi R., Omori K., Unoki A., Sano K., Watari Y., Namba J., Inui K., *Jap. J. Pharmacol.* **8**, 87 (1958).
87. Imaizumi R., Yoshida H., Hirmatsu H., Omori K., *Jap. J. Pharmacol.* **8**, 2 (1958).
88. Imaizumi R., Yoshida H., Kita T., *Jap. J. Pharmacol.* **8**, 9 (1958).
89. Jasiński A., Tyburczyk W., *Acta Physiol. Polon.* **12**, 887 (1961).
90. Józkiwicz S., Krause M., *Post. Biochem.* **7**, 207 (1961).
91. Kaliman P. A., *Biochimija* **26**, 284 (1961).
92. Kaliman P. A., Koschliak T. V., *Biochimija* **26**, 729 (1961).
93. Kaufman S., *Fed. Proc.* **16**, 203 (1957).
94. Kaufman S., *J. Biol. Chem.* **226**, 511 (1957).
95. Kaufman S., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 428 (1958).
96. Kirschner N., *Fed. Proc.* **18**, 261 (1959).
97. Kirschner N., *Pharmacol. Rev.* **11**, 350 (1959).
98. Kirschner N., Goodall Mc C., *Fed. Proc.* **15**, 110 (1956).
99. Kita T., *Nippon Yakurigaku Zasshi* **53**, 523 (1957).
100. Koelle G. B., *Pharmacol. Rev.* **11**, 381 (1959).
101. Kohn H. J., *Biochem. J.* **31**, 1693 (1937).
102. Kopin I. J., Axelrod J., Gordon E., *J. Biol. Chem.* **236**, 2109 (1961).
103. La Brosse E. H., Axelrod J., Kopin I. J., Ketty S. S., *J. Clin. Invest.* **40**, 253 (1961).
104. Langemann H., *Brit. J. Pharmacol.* **6**, 318 (1951).
105. Langemann H., 5-Hydroxytryptamine, red. G. P. Lewis, London-York-Paris-Los Angeles 1958, str. 153.
106. Leeper L. C., *Pharmacol. Rev.* **11**, 358 (1959).
107. Leeper L. C., Udenfriend S., *Fed. Proc.* **15**, 298 (1956).
108. Lerner A. B., Fitzpatrick T. B., Calkins E., Summerson W. H., *J. Biol. Chem.* **178**, 185 (1949).
109. Leuthardt V. F., *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 14 Aufl., Berlin 1959, str. 254—256.
110. Levin E. Y., Kaufman S., *J. Biol. Chem.* **236**, 2043 (1961).
111. Levin E. Y., Levenberg B., Kaufman S., *J. Biol. Chem.* **235**, 2080 (1960).
112. Lindell S. E., Westling H., *Acta Physiol. Scand.* **39**, 370 (1967).

113. Malafaya-Baptista A., Garret J., Oswald W., Malafaya-Baptista M. F., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **230**, 10 (1957).
114. Massart L., Vercauteren R., *Ann. Rev. Biochem.* **28**, 527 (1959).
115. Masuoka D. T., Clark W. G., Schott H. F., *Rev. Canad. Biol.* **20**, 1 (1961).
116. Masuoka D. T., Schott H. F., Akawie R. I., Clark W. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.* **93**, 5 (1956).
117. Mitoma S., *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 474 (1956).
118. Nakajima H., Thuillier J., *Neuropsychopharmacology*, ed. E. Rothlin, Amsterdam-London-New York-Princeton 1961, tom II, str. 500.
119. Ozaki M., Weissbach H., Ozaki A., Witkop B., Udenfriend S., *J. Med. Pharm. Chem.* **2**, 591 (1960).
120. Palm D., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **234**, 206 (1958).
121. Payza A. N., Hoffer A., *Istanbul Univers. Tip. Fakult. Mecmuesi* **22**, 1096 (1959).
122. Payza A. N., Zaleschuk J., *Istanbul Univers. Tip. Fakult. Mecmuesi* **22**, 1523 (1959).
123. Pekkarinen A., Niemela N., Sotaniemi E., *Acta Physiol. Scand.* **50**, suppl. 175, 116 (1960).
124. Peyrin L., Cier J. F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 239 (1961).
125. Pletscher A., Gey K. F., Zeller P., *Fortschr. Arzneimittelforsch.* **2**, 417 (1960).
126. Raper H. S., *Biochem. J.* **20**, 735 (1926).
127. Rosenfeld G., Leeper L. C., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 252 (1958).
128. Schaepdryver de A. F., Kirschner N., *Science* **133**, 586 (1961).
129. Schaepdryver de A. F., Kirschner N., *Arch. Internatl. Pharmacodyn.* **130**, 477 (1961).
130. Schayer R. W., *J. Biol. Chem.* **189**, 301 (1961).
131. Schüller W., Wiedemann A., *Zeitschr. Physiol. Chem.* **233**, 235 (1935).
132. Schumann H. J., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **234**, 282 (1958).
133. Schumann H. J., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **241**, 200 (1961).
134. Sjoerdsma A., *Pharmacol. Rev.* **11**, 374 (1959).
135. Sjoerdsma A., Smith T. E., Stevenson T. D., Udenfriend S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.* **89**, 36 (1955).
136. Slater E. C., Holton F. A., *Biochem. J.* **55**, 30 (1953).
137. Sloane-Stanley G. M., *Biochem. J.* **45**, 556 (1949).
138. Spector A., Kuntzman R., Shore P. A., Brodie B. B., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **130**, 256 (1960).
139. Spiro M. J., Ball E. G., *Fed. Proc.* **17**, 314 (1958).
140. Steensholt G., Flikke M., Joner P. E., Rés. III Congr. Internatl. Biochim. Bruxelles, Liège 1955, str. 38.
141. Szara S., Axelrod J., Perlin S., *Am. J. Psychiatr.* **115**, 162 (1958).
142. Udenfriend S., Creveling C. R., Ozaki M., Daly J. W., Witkop B., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 249 (1959).
143. Udenfriend S., Wyngarden J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 48 (1956).
144. Walaas E., Walaas O., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 151 (1961).

145. Wald I., Murawski K., Szajbel W., *Post. Hig. Med. Dośw.* **13**, 697 (1959).
146. Weil-Malherbe H., Bone A. D., *Biochem. J.* **67**, 65 (1957).
147. Weil-Malherbe H., Bone A. D., *Nature* **180**, 1050 (1957).
148. Weinstein S. S., Manning R., *Science* **86**, 19 (1937).
149. Werle E., Jüngten-Sell J., *Biochem. Z.* **327**, 259 (1955).
150. Westermann E., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **228**, 159 (1956).
151. Westermann E., *Biochem. Z.* **328**, 405 (1956).
152. Yuwiler A., Geller E., Eiduson S. *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 162 (1959).
153. Zeller E. A., *Pharmacol. Rev.* **11**, 387 (1959).
154. Zeller E. A., Barsky J., Berman R. B., *J. Biol. Chem.* **214**, 267 (1955).

degradacji. W warunkach normalnych zniszczenie erythrocytu następuje po jego zestarzeniu się, co u człowieka ma miejsce w około 120 dni od czasu pojawienia się dojrzałego erythrocytu w krwi krążącej. O eliminacji staroego erythrocytu decyduje niewątpliwie pewien stan krytyczny jego struktury i funkcji, do którego zbliża się on stopniowo w miarę starzenia. W niektórych warunkach chorobowych stan ten może nastąpić o wiele wcześniej lub może być zdefiniowany nietypowymi zmianami erythrocytu. Zespół cech starych erythrocytów oraz z grubsza charakter zmian odpowiedzialnych za ich starzenie się można badać po ich uprzednim oddzieleniu, dzięki różnicy gęstości, od młodych erythrocytów.

Z dotychczasowych badań wynika, iż w starzejącym się erythrocycie ma miejsce zmniejszenie się czynności enzymatycznych, między innymi czynności aldolazy i izomerazy fosfoheksos. W wyniku tych zmian następuje zmniejszenie się intensywności glikolitycznej starych erythrocytów, a tym samym wyraźne zmniejszenie się w nich intensywności przemian energetycznych. Pociąga to za sobą zmniejszenie się produkcji ATP, a w dalszej konsekwencji zaburzenie transportu kationów i ogólne osłabienie funkcji aktywnego transportu związków organicznych przez błony strukturalne erythrocytu (3). Inną charakterystyczną zmianą, odróżniającą stare erythrocyty od młodych jest zmniejszanie się zawartości lipidów w miarę starzenia oraz zmniejszanie się objętości erythrocytów — co jest równoznaczne ze zwiększeniem się ich gęstości (7).

Hemoglobina starych erythrocytów również różni się od hemoglobiny młodych. W hemolizatach pochodzących ze starych erythrocytów po przeprowadzeniu typowego rozdziału chromatograficznego obserwuje się zwiększenie procentowe hemoglobiny A_1 kosztem hemoglobiny A_2 , stanowiącej normalnie główną frakcję hemoglobiny (7, 39). Rezultat ten sprzeczny jest z przypuszczeniem *Lingrel i Borsooka*, że mniejsza frakcja hemoglobiny — hemoglobina A_1 może być postacią prekursorową hemoglobiny (28).

Denaturacja alkaliczna i krystalizacja przebiega w identyczny sposób dla hemoglobin starych i młodych erythrocytów, chociaż *Rosa i Labie* (40) zaobserwowali w toku starzenia się erythrocytu istotne zmiany w łańcuchach β -hemoglobiny. Potwierdza to *Walter* (49), według którego w hemoglobinie pochodzącej ze starych erythrocytów osłabiona jest zdolność wiązania jonów chromu, do których największe powinowactwo wykazują łańcuchy β -hemoglobiny (29).

Hemoglobina ze starych erythrocytów ma zmniejszoną zdolność do dysocjacji tlenu, a zwiększoną elektroujemność i zawartość oksyhemoglobiny. Nie stwierdza się natomiast produktów dalszego utlenienia hemoglobiny, których należałoby oczekiwać, gdyby ulegała ona nieodwracalnym procesom degradacji w starzejących się erythrocytach. Produkty takie obserwuje się natomiast wewnątrz erythrocytu w niektórych stanach chorobowych. Zwiększenie się zawartości methemoglobiny i pojawianie

się tzw. ciałek Heinza w niektórych anemiach świadczy zdaniem J a n d l a, E n g l e ' a i A l l e n a (21) o nieodwracalnym utlenianiu hemoglobiny i ewentualnie innych składników erytrocytu, inicjowanym rodnikiem wodorotlenowym. Podobne produkty pojawiają się w erytrocytach poddanych *in vitro* działaniu fenylohydrazyny lub innych środków hemolitycznych. Przypuszczenie, że obecność zredukowanego glutationu jest niezbędna dla utrzymania wewnątrz erytrocytu hemoglobiny w stanie zredukowanym, nie zostało potwierdzone w całej rozciągłości. Stwierdzono bowiem, w doświadczeniach *in vitro*, że GSH może chronić hemoglobinę przed utlenieniem jedynie wówczas, kiedy dodatkowo w układzie obecne jest białko o własnościach peroksydazowych, znajdujące się normalnie w erytrocytach (14). Jest to przypuszczalnie peroksydaza glutationowa. Przyczyną pojawiania się produktów utlenienia hemoglobiny w erytrocytach może być zatem zahamowanie czynności tego enzymu, a nie zmniejszenie się zawartości GSH.

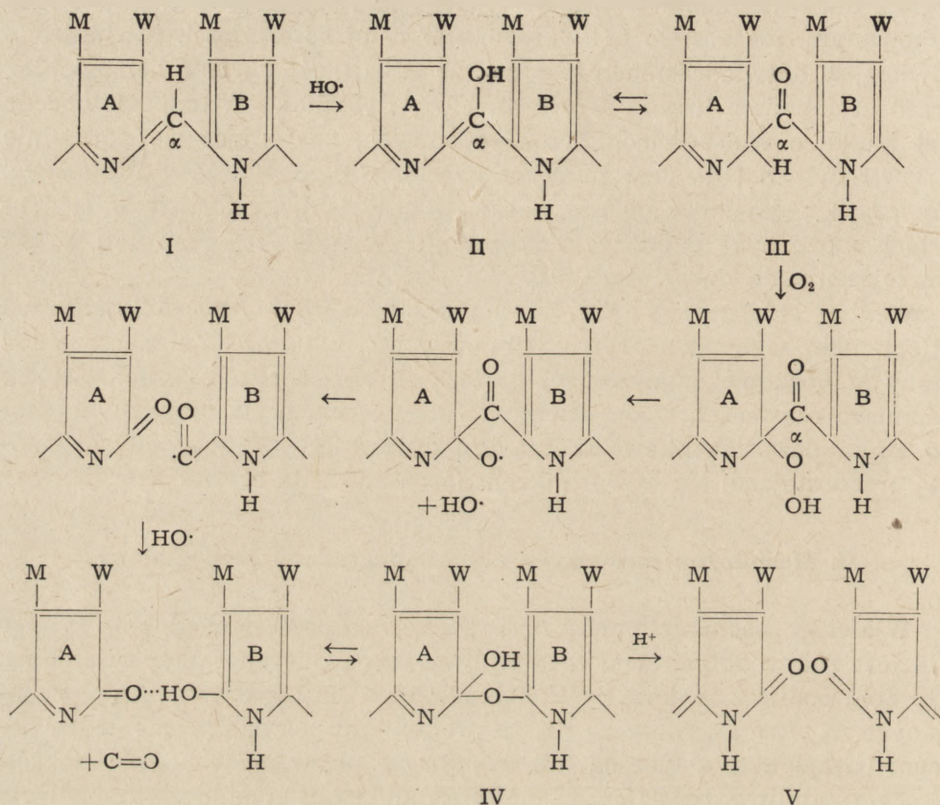
Według N i c h o l l s a (34) istotną rolę w ochronie hemoglobiny przed utlenieniem wewnątrz erytrocytu odgrywa katalaza i nienaruszoność błony komórkowej, stanowiącej barierę chroniącą przed przeniknięciem nadmiaru cząsteczek wody utlenionej do wnętrza erytrocytu. Stwierdzono, że katalaza krwinkowa zdolna jest usunąć 99 — 99,9% wody utlenionej przedostającej się w warunkach normalnych do erytrocytu.

II. Mechanizm pierwszych etapów degradacji hemoglobiny

Właściwy mechanizm pierwszych reakcji rozpadu hemoglobiny *in vivo* nie jest znany dotychczas. Niewątpliwie mają one charakter utleniania, któremu podlega hemowa część hemoglobiny. Na podstawie badań wykonanych *in vitro* przypuszcza się, że produktami pośrednimi pomiędzy hemem (związanym z globiną lub wolnym) a pierwszym barwnikiem żółciowym — biliwerdyną (V) są kolejne produkty utlenienia protoporfiryny w grupie metinowej α (I) łączącej A i B pierścienie pirolowe. Wyróżnia się tu α -hydroksyhem (II), α -ketochem (III), który odszczepiając cząsteczkę CO przekształca się w hipotetyczny werdochem (IV), z którego po oderwaniu się żelaza powstaje biliwerdyna. Denaturacja i odłączanie się globiny może nastąpić przed utlenianiem porfiryny lub na jednym z dalszych etapów. W drugim przypadku związkami pochodnymi hemoglobiny są choleglobiny (globina związana z hydroksy- lub ketochemem) i werdoglobina (globina związana z werdochemem). Na schemacie 1 przedstawiono fragmenty kolejnych produktów pośrednich rozerwania mostku α układu porfirynowego według mechanizmu proponowanego przez A n n a n a i M a s o n a (1). Opierając się na wynikach swoich doświadczeń w modelowym układzie z zastosowaniem izotopu ^{18}O autorzy ci sądzą, że utlenienie hemu hemoglobiny przebiega analogicznie do autooksydacji związków enolowych. Wydaje się, że i w organizmach zwierzęcych rozpad he-

moglobiny przebiega przez podobne jeśli nie identyczne związki pośrednie (24, 25).

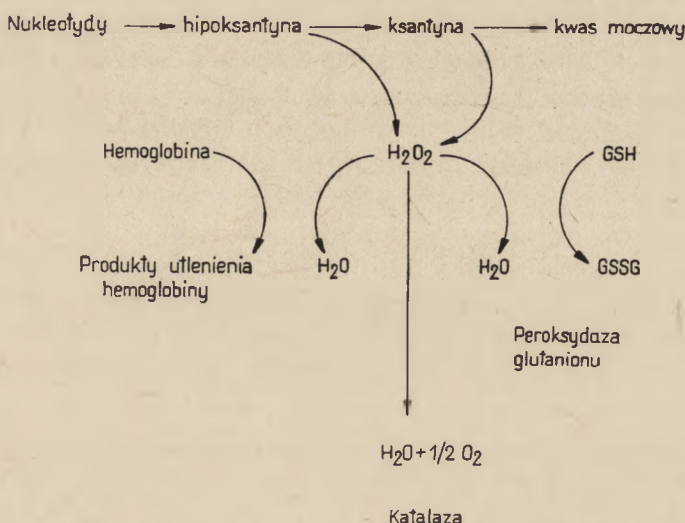
W warunkach *in vitro* degradacja hemoglobiny jest procesem utlenienia, do którego przebiegu niezbędny jest czynnik redukujący i woda utleniona, dodawana lub tworzona *in situ*, enzymatycznie. Używanym najczęściej czynnikiem redukującym jest kwas askorbinowy. W przypad-



ku użycia jako czynnika redukującego związków sulfhydrylowych lub siarkowodoru powstają sulfahemoglobiny, w których atom siarki wiąże się z atomem węgla mostka metinowego osłaniając go przed dalszym utlenieniem. W obecności katalazy zielono zabarwione produkty degradacji hemoglobiny (choleglobiny, werdoglobina, sulfahemoglobina) nie powstają, co sugeruje, że rozpad hemoglobiny związany jest z procesami peroksydacji (6).

W obecności preparatów wątroby jedynie 20—25% hemoglobiny ulega degradacji z wytworzeniem barwników żółciowych. W związku z tym

wysunięto przypuszczenie, że w wątrobie istnieje stan równowagi pomiędzy kilku układami wykorzystującymi lub rozkładającymi wodę utlenioną, z których jednym jest utlenianie hemoglobiny (schemat 2). Nieobec-



Schemat 2. Współzależność oksydacyjnego rozpadu hemoglobiny i innych procesów zużywających wodę utlenioną

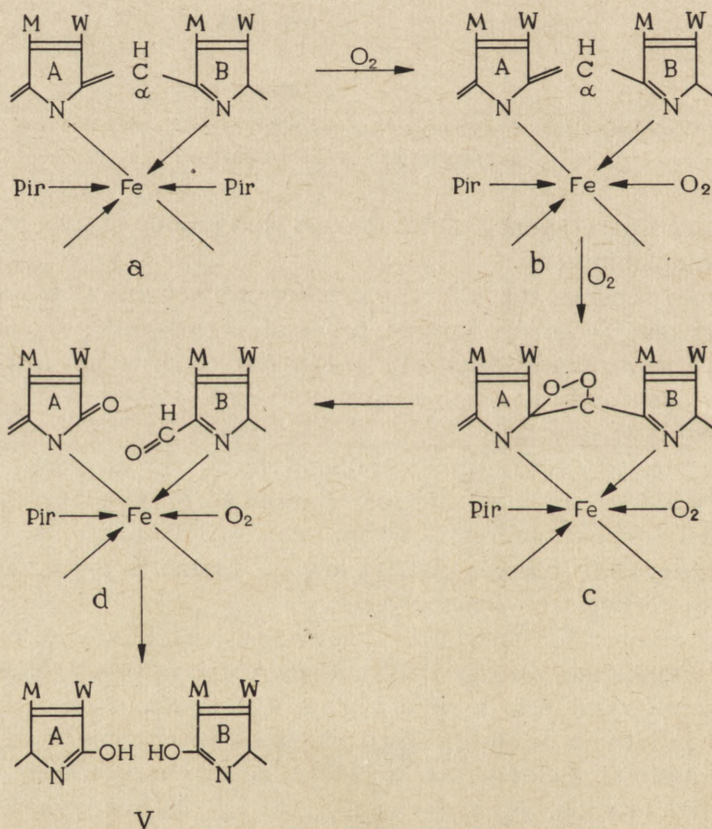
ność katalazy i peroksydazy glutationowej sprzyjałaby oksydacyjnej przemianie hemoglobiny (30).

Pomimo iż schemat ten jest dość przekonujący, brak bezpośredniego dowodu wykazującego powiązanie procesu peroksydacji z oksydacyjną przemianą hemoglobiny. Wcześniejsze próby wykazania udziału H₂O₂ w procesie oksydacji hemoglobiny podjęte przez Keilina (23) nie dały wyniku pozytywnego.

Wydaje się, że oksydacyjny autokatalityczny rozpad hemu hemoglobiny w warunkach *in vitro* nie ma charakteru enzymatycznego, nawet w obecności preparatów tkankowych, aczkolwiek sądząc np. ze specyficzności rozerwania układu porfirynowego można przypuszczać, że *in vivo* jest to reakcja enzymatyczna.

Jak już zaznaczono barwniki żółciowe spotywane w przyrodzie mają strukturę wynikającą z rozerwania układu porfirynowego między pierścieniami pirolowymi A i B. Pullman i Perault (38) sugerowali, iż większa podatność α -mostka metinowego na rozerwanie może wynikać z różnicy gęstości elektronowej w stosunku do pozostałych mostków. Jednakże Petryka, Nicholson i Gray (36) nie wykazali uprzywilejowania α -mostka podczas utleniania heminy *in vitro* do barwników werdohemowych. Izolowane barwniki okazały się mieszaniną izomerycznych związków powstałych z rozerwania układu porfirynowego zarówno w pozycji α -mostka, jak i β , γ i δ -mostków.

Enzymatyczny charakter pierwszych reakcji rozpadu hemoglobiny *in vivo* wykazany został po raz pierwszy przez Nakajimę i współpracowników (31) w 1963 roku. Autorzy ci stwierdzili, że pierwszy etap utlenienia hemu hemoglobiny katalizowany jest przez enzym typu oksigenaz, nazwany przez nich oksigenazą hemową mostka α -metinowego (*heme α -methenyl oxygenase*). Enzym ten znaleziono w wątrobie i nerce, lecz nie stwierdzono jego obecności w śledzionie i szpiku kostnym. Dla swej pełnej czynności wymaga on obecności NADPH, Fe^{2+} , oraz aktywatora zawartego w jądrach komórkowych. Sam enzym zlokalizowany jest we frakcji rozpuszczalnych białek cytoplazmy. Białko tego enzymu jest bardzo wrażliwe na działanie powietrza, związki blokujące grupy $-\text{SH}$ i związki chelatujące metale. Substratami odkrytego enzymu *in vitro* są kompleksy hemu lub hemoglobiny: hemochromogen pirydynowy lub kompleks hemoglobiny z haptoglobina. Natomiast wolna hemoglobina lub hemina atakowane są przez tę oksigenazę bardzo nieznacznie. Autorzy



Schemat 3. Poszczególne etapy rozpadu hemu katalizowane przez oksigenazę hemową mostka α -metinowego proponowane przez Nakajimę (32);

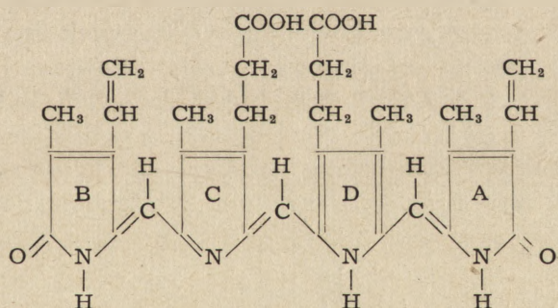
Pir — pirydyna, M — metyl, W — winyl, A i B dwa pierścienie porfiryne układu porfiryнового hemu, V — fragment biliwerdyny

sugerują (33), że kompleks hemoglobiny z haptoglobina jest naturalnym substratem oksygenazy hemowej mostka α -metinowego również w warunkach *in vivo*. Proponowany przez Nakajimę (32) mechanizm oksydacyjnego rozszczepienia układu porfiryнового hemoglobiny do biliwerdyny przedstawiony jest na schemacie 3.

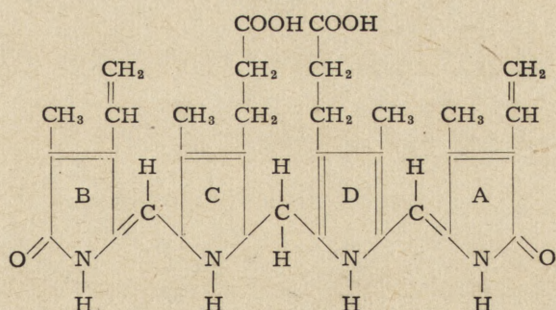
Przekształcenie c \rightarrow d w tym schemacie jest wzorowane na mechanizmie utlenienia i rozerwania wiązania C-C w pierścieniu indolowym pod wpływem oksygenazy tryptofanowej. Wyodrębniony przez autorów związek d jest prekursorem biliwerdyny. Autor przypuszcza, że następny etap reakcji polegający na oderwaniu tlenu węgla i powstaniu biliwerdyny jest również procesem enzymatycznym.

III. Przemiany barwników żółciowych

Pierwszym barwnikiem żółciowym powstającym w toku degradacji składnika porfiryнового hemoglobiny jest biliwerdyna (VI). Barwnik ten powstaje w komórkach fagocytarnych układu siateczkowo-śródbłonkowego, w których odbywają się pierwsze reakcje degradacji hemoglobiny. Najprawdopodobniej też w tychże komórkach biliwerdyna ulega redukcji do bilirubiny (VII) w reakcji katalizowanej przez bliżej niesprecyzowaną dehydrogenazę. Wzory obydwóch barwników podane są w postaci bislaktamowej jako bardziej zgodnej z rzeczywistą strukturą związków hydroksypirolowych (37).



VI

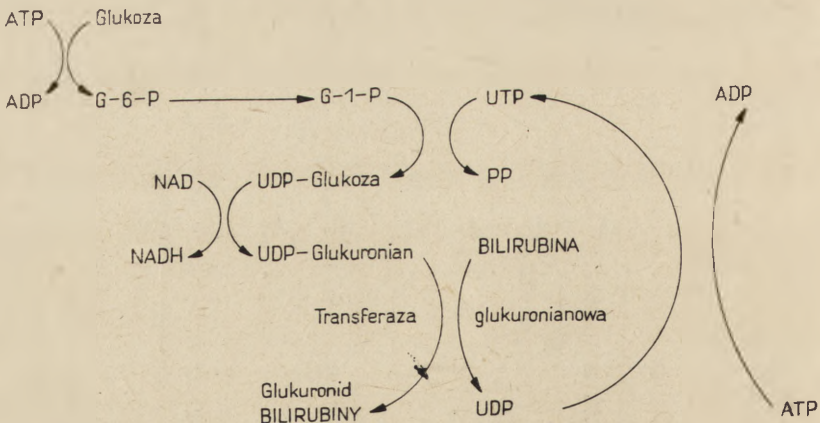


VII

Z układu siateczkowo-śródbłonkowego bilirubina przedostaje się do krwi, gdzie tworzy kompleksy z białkami osocza: albuminą i α_1 -globuliną. Obecność bilirubiny w osoczu krwi można wykryć za pomocą tzw. reakcji Van den Bergha, w której odczynnikiem jest dwuazowany kwas sulfanilowy w środowisku etanolu. W niektórych stanach chorobowych można wykazać obecność bilirubiny w osoczu reakcją Van den Bergha w środowisku wodnym, co nazwano reakcją bezpośrednią. Istota różnicy pomiędzy barwnikiem reagującym bezpośrednio a barwnikiem reagującym pośrednio z odczynnikiem dwuazowym długi czas pozostawała niewyjaśniona. Dopiero w 1951 roku wykazano, że barwnikiem rozpuszczalnym w wodzie i dającym reakcję bezpośrednią jest pochodna bilirubiny, w której grupy karboksylowe reszt kwasu propionowego są zestryfikowane (52). W 1957 roku równocześnie i niezależnie od siebie wykazano, że rzekomy ester bilirubiny jest w istocie dwuglukuronidem. W niektórych przypadkach obok dwuglukuronidu izolowano z osocza monoglukuronid bilirubiny (43). Niektórzy autorzy sądzą, że związek ten jest kompleksem dwuglukuronidu bilirubiny i wolnej bilirubiny (51). Sprawa ta nie jest rozstrzygnięta. Oznaczenia rozróżniające ilość dwu- i monoglukuronidów bilirubiny nie mają większego znaczenia w praktyce diagnostycznej (11).

Łagodna hydroliza pochodnych bilirubiny izolowanych z żółci szczura wykazała, że są one mieszaniną, w skład której wchodzi 60—90% glukuronidów i 10—40% estrów kwasu siarkowego (44). Estry te nie poddają się działaniu β -glukuronidazy i są trudno hydrolizowane środkami chemicznymi (20). Wydaje się jednak, że sprzęganie bilirubiny z kwasem siarkowym jest specyficzne gatunkowo, gdyż jakkolwiek estry te znaleziono u szczura, nie wykazano ich obecności w żółci człowieka i psa (12).

Głównym i prawie wyłącznym miejscem sprzęgania bilirubiny z kwasem glukuronowym są komórki wątroby (43), a siedliskiem enzymu katalizującego tę reakcję — mikrosomy (19, 42), gdzie jak wiadomo odbywają się również inne procesy detoksykacyjne. Właściwym donatorem reszty



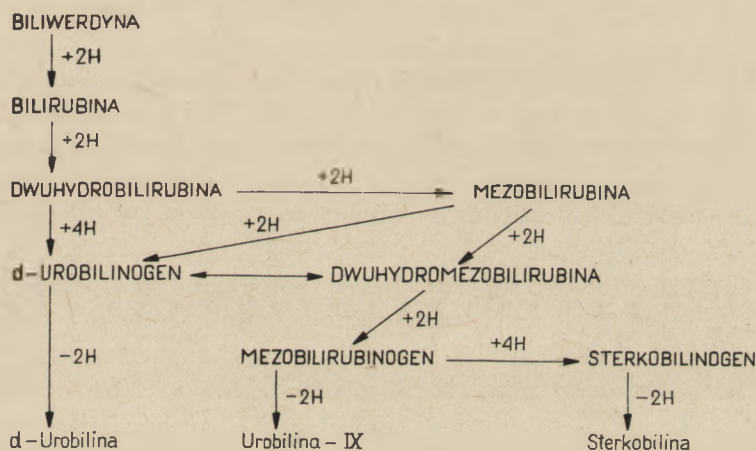
Schemat 4. Schemat syntezy glukuronidu bilirubiny (wg 5)

glukuronianowej okazał się UDP-glukuronian. Schemat 4 podaje zaproponowany przez Billing i Lathé (5) przebieg syntezy glukuronidu bilirubiny.

Specyficzność transferazy glukuronianowej i jej niezależność od innych procesów detoksykacyjnych wykazali Arias i Johnson (2) w doświadczeniu *in vivo*, w którym mimo podania zwierzęciu nadmiaru N-acetylo-*p*-nitrofenolu wydalanego w postaci glukuronidu synteza glukuronidów bilirubiny nie ulegała zakłóceniu.

Glukuronidy bilirubiny wydalone zostają do kanalików żółciowych i wraz z żółcią do przewodu pokarmowego. W przypadku uszkodzenia aparatu wydalniczego komórek wątrobowych lub mechanicznego zablokowania odpływu żółci glukuronidy bilirubiny przedostają się z powrotem do krwioobiegu, gdzie dają się stwierdzić jako barwniki reagujące bezpośrednio z odczynnikiem Van den Bergha.

W przewodzie pokarmowym, w jego dalszych odcinkach, pod wpływem układów dehydrogenazowych pałeczki okrężnicy bilirubina ulega stopniowej redukcji do związków grupy urobilinogenów, które w dalszym



Schemat 5. Uproszczony schemat przemian ważniejszych, czteropirolowych barwników żółciowych

etapie ulegają utlenieniu do związków grupy urobiliny. Wzajemne zależności pomiędzy ważniejszymi czteropirołowymi barwnikami żółciowymi przedstawiono na schemacie 5.

Ilościowy udział poszczególnych barwników w całej puli urobilinoidów wydalanych z kałem jest zmienny i zależny od wielu czynników. Według Watsona (50) dokładna analiza składu urobilinoidów wydalanych z kałem nie przedstawia większej wartości diagnostycznej. Tym niemniej badania tej grupy związków nie zostały jeszcze zakończone. Dopiero niedawno np. udało się po raz pierwszy zredukować *in vitro* bilirubinę do sterkobilinogenu, łatwo utlenianego następnie do (\pm) sterkobiliny. Pro-

dukt ten w odróżnieniu od występującej w naturze odmiany lewoskrętnej jest mieszaniną racemiczną (22). Drugi związek tej grupy d-urobilina występuje w przyrodzie jedynie w postaci prawoskrętnej, zaś trzeci — urobilina IXa jest związkiem nieaktywnym optycznie.

IV. Bilans procesu rozpadu hemoglobiny

Ilość barwników żółciowych wydalanych z kałem w ciągu doby przez osobnika zdrowego wynosi od 40 do 280 mg, średnio 140 mg, co odpowiada około 4 g hemoglobiny przy założeniu, iż rozpad tego proteidu jest jedynym źródłem barwników żółciowych. Ta ilość stanowi tylko około 75% hemoglobiny, która ulega degradacji w ciągu doby przy uwzględnieniu 120 dniowego okresu życia erythrocytu. Niezgodność tę trudno jest wytłumaczyć inaczej aniżeli przypuszczając, że istnieje oprócz omówionej inna droga rozpadu hemoglobiny, dotychczas niezbadana.

Hemoglobina wprowadzana ludziom do krwioobiegu w ilości 8—12 g/dzień była prawie w 95% przekształcana w barwniki żółciowe (46). Również kontrola stopnia konwersji hemoglobiny znakowanej ^{14}C i ^{59}Fe do bilirubiny wykazała, że jeśli ilość wprowadzanej do krwioobiegu hemoglobiny nie przekraczała zdolności wiązania jej w kompleks z haptoglobina, to konwersja wynosiła prawie 100% (35). Gdy jednak ilość wprowadzanej hemoglobiny przekraczała zdolność jej wiązania z haptoglobina lub gdy wprowadzano erythrocyty znakowane ^{51}Cr zamiast hemoglobiny, wówczas konwersja w bilirubinę oznaczaną w przetoce żółciowej wynosiła 63–80% (35).

Alternatywna droga rozpadu hemu hemoglobiny występuje przede wszystkim w przypadkach hemolitycznej anemii, kiedy przetaczanie dużych ilości krwi nie prowadzi do równoważnego zwiększenia wydalania barwników żółciowych, mimo iż przetoczona krew szybko znika z obiegu.

Inna niedokładność obliczeń bilansowych katabolizmu hemoglobiny ujawniła się po zastosowaniu znakowanej ^{15}N glicyny do badania biosyntezy hemoglobiny i długości życia erythrocytów. Równoczesne oznaczanie radioaktywności krwi krążącej i wydalanych barwników żółciowych wykazało, że już w pierwszych dniach po podaniu glicyny część jej zostaje wbudowana do barwników żółciowych. Wczesne pojawianie się znakowanych barwników żółciowych sugerowało istnienie innej, nie katabolicznej drogi ich powstawania. Ta część barwników żółciowych stanowiła 10–15% ilości barwników wydalanych przez zdrowego osobnika, jednak w pewnych stanach chorobowych obserwowano znaczne zwiększenie się procentowego udziału barwników żółciowych wcześniej znakowanych. Schorzeniami tymi były: anemia złośliwa, porfiria wrodzona oraz bilirubinemia wrodzona, określana w literaturze anglosaskiej jako *shunt hyperbilirubinemia*, która opisana po raz pierwszy w 1952 roku została dokładniej

zbadana w 1959 roku (16). Duży wzrost wcześniej znakowanego sterkobilinogenu stwierdzono również w talasemii (13).

Badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu powstawania barwników żółciowych inną drogą aniżeli przez rozpad hemoglobiny ze starych erytrocytów zapoczątkowali Israels i współautorzy (15, 17, 18). Badając wbudowywanie prekursorów pirolu do bilirubiny stwierdzili oni, że na krzywej radioaktywności barwników żółciowych można wyróżnić dwa wczesne maksima i trzecie pojawiające się dopiero w okresie rozpadu hemoglobiny ze starych erytrocytów (po około 120 dniach od wprowadzenia prekursora). Najwcześniejsze maksimum pojawia się w kilka godzin po wprowadzeniu prekursora i nie zależy od intensywności procesów krwiotwórczych. Drugie natomiast pojawia się w kilka dni po podaniu glicyny względnie kwasu δ -aminolewulinowego i jest zależne od intensywności procesów erytropoezy. W 1965 roku wyniki te potwierdzone zostały w badaniach na psach i ludziach, którym podano znakowane prekursory hemu: glicynę, kwas δ -aminolewulinowy i protoporfirynę, a następnie śledzono narastanie aktywności w produktach (hemoglobinie, hemach niehemoglobinowych i barwnikach żółciowych) (45). Stwierdzono, że bezpośrednia inkorporacja prekursorów do barwników żółciowych, nie związana z procesami erytropoezy odbywa się w komórkach wątroby, a związkami pośrednimi barwników są hemy niehemoglobinowe. Nie należy jednak zapominać o sugestii Israelsa i współautorów (15), według której istnieje kilka innych możliwości wczesnego pojawiania się znakowanych barwników żółciowych po podaniu znakowanych prekursorów hemu. Są to mianowicie: a) nadmierne tworzenie się hemu w stosunku do produkcji globiny i natychmiastowe katabolizowanie jego nadmiaru, b) bezpośrednia synteza bilirubiny z prekursorów hemu, c) wewnątrzszpikowa degradacja niedojrzałych lub wadliwych form erytrocytów, d) rozpad białek hemowych innych niż hemoglobina. Tak więc ustalenie mechanizmu tego bocznego toru powstawania bilirubiny i dalszych barwników żółciowych pozostaje sprawą do rozwiązania.

W celu wyjaśnienia niezgodności bilansu rozpadu hemoglobiny wysuwano również przypuszczenie, że część wydalanych urobilinoidów może ulegać w końcowych odcinkach przewodu pokarmowego dalszej degradacji do dwu- i monopirolu. Wiadomo, że głównymi produktami wśród dwupirolowych barwników żółciowych są związki typu mezobilifuscyny. Szczegółowa analiza ilościowa zawartości urobilinogenów oraz mezobilifuscyn w kale osób zdrowych wykazała jednak, że barwniki dwupirolowe stanowią zaledwie około 9% wydalanych urobilirubinoidów (8). W wielu stanach chorobowych stwierdza się znaczne nieraz zmniejszenie ilości mezobilifuscyn, a tylko w niektórych nieznaczny wzrost w stosunku do normy. Te wyniki analiz uzupełnione zostały badaniami z zastosowaniem znakowanych prekursorów hemu. Oznaczenia radioaktywności urobilinogenów, mezobilifuscyn i hemoglobiny krwi krążącej wykazały, że spora

część wskaźnika izotopowego pojawia się bardzo wczesnie nie tylko w czteropirolowych barwnikach żółciowych, lecz również w mezobilifuscynach (9). Najwcześniej wskaźnik izotopowy pojawia się właśnie w mezobilifuscynach, co oprócz anabolicznej drogi powstawania tych barwników sugeruje, że mogą one stanowić prekursorową formę barwników czteropirolowych powstających nie z rozpadu hemoglobiny.

Niejednokrotnie sugerowano, że niedokładne bilansowanie się rozpadu hemoglobiny i wydalania barwników żółciowych może również wynikać z ich przenikania przez ścianki jelit i wydalania z moczem. Istotnie, w niektórych schorzeniach stwierdza się zwiększenie zawartości urobilinogenu w moczu, lecz u osobników zdrowych występuje on w moczu w ilościach śladowych. Wyjaśnieniu absorpcji barwników żółciowych z jelit i ich dalszych losów poświęcono szereg prac, lecz dopiero użycie barwników żółciowych znakowanych izotopami pozwoliło na dokładniejsze badania w tym zakresie. Okazało się, że znaczna część barwników jest absorbowana przez ścianki jelit, lecz następnie wydalana zostaje z powrotem poprzez wątrobę do przewodu pokarmowego. Wolna bilirubina podawana do dwunastnicy bardzo szybko odnajdywana była w osoczu i żółci, natomiast jej glukuronid przechodził przez ścianki jelit do krwioobiegu dopiero po hydrolizie i odszczepieniu kwasu glukuronowego (26). Podając znakowany ^{14}C urobilinogen stwierdzono, że obiegowi jelitowo-wątrobowemu ulega około 50% tego barwnika podanego do dwunastnicy i około 20% wprowadzonego do jelita grubego u szczurów. Podobne wyniki uzyskano w kilku przypadkach u ludzi (27). Wykazano, że większa część urobilinogenu zaabsorbowanego przez jelita wydalana jest z powrotem z żółcią do przewodu pokarmowego, a jedynie w przypadkach zablokowania aparatu wydalniczego wątroby zostaje on wydalany z moczem. Zaobserwowano również wyraźną różnicę w intensywności przemiany wolnej bilirubiny i jej glukuronidu w jelitach. Pierwszy z tych związków ulegał redukcji do urobilinogenu i przekształceniu w mezobilifuscynę tylko w nieznacznym stopniu, natomiast glukuronid okazał się właściwym substratem dehydrogenaz bakteryjnych w jelitach (10). Krążenie jelitowo-wątrobowe barwników żółciowych nie wydaje się zatem wpływać decydująco na bilans rozpadu hemoglobiny.

Ustalenie alternatywnej drogi rozpadu hemoglobiny w przypadkach istnienia dużych różnic pomiędzy ilością znikającej z krążenia hemoglobiny lub erytrocytów a ilością tworzących się barwników żółciowych jest sprawą oczekującą rozwiązania.

LITERATURA

1. Anan F. K., Mason H. S., *J. Biochem.* **49**, 765 (1961).
2. Arias I. M., Johnson L., *Clin. Res.* **7**, 291 (1959).
3. Bernstein R. E., *J. Clin. Invest.* **38**, 1572 (1959).

4. Billing B. H., Cole P. G., Lathe G. H., *Biochem. J.* **65**, 774 (1957).
5. Billing B. H., Lathe G. H., *Am. J. Med.* **24**, 111 (1958).
6. Deul D. H., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 242 (1961).
7. Edwards M. J., Koler R. D., Rigas D. A., Pitcarim D. M., *J. Clin. Invest.* **40**, 636 (1961).
8. Gilbertsen A. S., Hawkinson V., Watson C. J., *J. Clin. Invest.* **38**, 1175 (1959).
9. Gilbertsen A. S., Lowry P. T., Hawkinson V., Watson C. J., *J. Clin. Invest.* **38**, 1160 (1959).
10. Gilbertsen A. S., Watson C. J., *J. Clin. Invest.* **41**, 1041 (1962).
11. Gregory C. H., Watson C. J., *J. Lab. Clin. Med.* **60**, 1 (1962).
12. Gregory C. H., Watson C. J., *J. Lab. Clin. Med.* **60**, 17 (1962).
13. Grinstein M., Bannerham R. M., Vavra J. D., Moore C. V., *Am. J. Med.* **29**, 18 (1960).
14. Hill A. S., Haut A., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *J. Clin. Invest.* **43**, 17 (1964).
15. Israels L. G., Skandenberg J., Guyda H., Zings W., Zipursky A., *Brit. J. Haematol.* **9**, 50 (1963).
16. Israels L. G., Suderman H. J., Ritzman S. E., *Am. J. Med.* **27**, 693 (1959).
17. Israels L. G., Yamamoto T., Skandenberg J., Zipursky A., *Science* **139**, 1054 (1963).
18. Israels L. G., Zipursky A., *Nature* **193**, 73 (1962).
19. Isselbacher K. J., *Biochem. Biophys. Res. Com.* **5**, 243 (1961).
20. Isselbacher K. J., McCarthy E. A., *J. Clin. Invest.* **38**, 645 (1959).
21. Jandl J. H., Engle L. K., Allen D. W., *J. Clin. Invest.* **39**, 1818 (1960).
22. Kay I. T., Weimer M., Watson C. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 1122 (1963).
23. Keilin D., *Nature* **191**, 769 (1961).
24. Kikuchi G., *Proc. Intern. Congr. Haematol.*, 8th, Tokyo 1960, **2**, 1092 (1962), cyt. wg C.A. **59**, 9166 (1963).
25. Kosaka K., *Proc. Intern. Congr. Haematol.*, 8th, Tokyo 1960, **2**, 1087 (1962), cyt. wg C.A. **59**, 9166 (1963).
26. Lester R., Schmid R., *J. Clin. Invest.* **42**, 736 (1963).
27. Lester R., Schumer W., Schmid R., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 878 (1964).
28. Lingrel J. B., Borsook H., *Nature* **195**, 355 (1962).
29. Malcolm D., Raney H. M., Jacobs A. S., *Blood* **21**, 8 (1963).
30. Mills G. C., *J. Biochem.* **51**, 41 (1962).
31. Nakajima H., Takemura T., Nakajima O., Yamaoka K., *J. Biol. Chem.* **238**, 3784 (1963).
32. Nakajima H., *J. Biol. Chem.* **238**, 3797 (1963).
33. Nakajima H., Takemura T., Nakajima O., Naito S., Shirasawa K., Yamaoka K., *Intern. Congr. Haematol.*, Xth, Stockholm 1964, Abstrakt B-17.
34. Nicholls P., *Biochem. Biophys. Acta*, **99**, 286 (1965).
35. Ostrow J. D., Jandl J. H., Schmid R., *J. Clin. Invest.* **41**, 1628 (1962).
36. Petryka Z., Nicholson D. C., Gray C. H., *Nature* **194**, 1047 (1962).
37. Plieninger H., Decker M., *Ann.* **598**, 198 (1956).
38. Pullman B., Perault A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**, 1476 (1959).
39. Rosa J., Dreyfus J. C., Schapira G., *Nature* **188**, 753 (1960).
40. Rosa J., Labie D., *Nature* **196**, 901 (1962).
41. Schmid R., *J. Biol. Chem.* **229**, 871 (1957).

42. Schmid R., Axelrod J., Hammaker L., Swarm R. L., *J. Clin. Invest.* **37**, 1123 (1958).
43. Schoenfield L. J., Bollman J. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 929 (1963).
44. Schoenfield L. J., Bollman J. L., Hoffman H. N., *J. Clin. Invest.* **41**, 133 (1962).
45. Schwartz S., Ibrahim G., Watson C. J., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 1003 (1964).
46. Shen S. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **105**, 264 (1960).
47. Talafant E., *Nature* **178**, 312 (1956).
48. Talafant E., *Nature* **180**, 1051 (1957).
49. Walter H., *Nature* **198**, 189 (1963).
50. Watson C. J., *J. Lab. Clin. Med.* **54**, 1 (1959).
51. Weber A. P., Schalm L., Witmans J., *Acta Med. Scand.* **173**, 19 (1963).
52. Yamaoka K., Kosaka K., *Proc. Japan. Acad.* **27**, 715 (1951).

PRZEMYSŁAW SZAFRAŃSKI* i STEFAN KLITA**

Kwasy nukleinowe i biosynteza białka

Nucleic Acids and Protein Biosynthesis

The role of rybosomes, transfer-RNA and messenger-RNA in the process of protein biosynthesis is reviewed.

Olbrzymi rozwój biochemii w ciągu ostatniego dziesięciolecia sprawił, że wiele procesów zachodzących w komórce można przedstawić w postaci reakcji chemicznych. Klasyczne prace Bracheta (14) oraz Fraenkel-Conrata i współpracowników (40) wykazały bezspornie, że kwas rybonukleinowy (RNA) bierze udział w przekazywaniu informacji genetycznej. Badania nad rekombinacją, mutacją i transformacją drobnoustrojów (62) dostarczyły dowodów, że materiałem genetycznym jest kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Materiał ten decyduje o specyfice każdego żywego organizmu, określa jakościowy charakter procesów zachodzących w komórce oraz ogranicza ich zmienność. Opierając się na pracach Chargaffa (23), Wilkinsa (144) oraz Paulinga i Coreya (103), Watson i Crick (141) zaproponowali dwuniciową strukturę DNA posiadającą atrybuty materiału genetycznego. Dzięki odpowiedniej sekwencji zasad, DNA zachowuje właściwą specyficzność, ulega replikacji poprzez enzymatyczną syntezę komplementarnej nici i podlega mutacjom na zasadzie addycji, delecji czy też punktowej wymiany zasad. Warunki zewnętrzne mogą być powodem tych zmian, a powstające mutacje stają się źródłem selekcji i ewolucji organizmów. Wrazem tych zmian są różnice w powstającym w ustroju białku, którego struktura kontrolowana jest przez aparat genetyczny.

Badania nad mechanizmem replikacji DNA zapoczątkowane przez Kornberga i innych (67) doprowadziły do wyjaśnienia autokatalitycznej roli DNA w tym procesie. Dalszym ogniwem w zrozumieniu przekazywania informacji zawartej w DNA było wyizolowanie przez Weissa i Nakamoto polimerazy RNA zależnej od DNA (143). Polime-

* Doc. dr, pracownik Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i Instytutu Gruźlicy, Warszawa.

** Mgr, asystent Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

raza ta kopiuje RNA na cząsteczce DNA jako matrycy. Następnie B e e r m a n n i C l e v e r (5) zaobserwowali, że podczas podziału jąder komórek muszki owocowej powstają w chromosomach pierścienie — protuberancje — które mogą być uważane za jednostkę genetyczną będącą w akcji. Stwierdzono, że pierścienie te zbudowane są z nici DNA, na których syntetyzowany jest RNA. Tak więc DNA kieruje syntezą RNA, a ten z kolei syntezą białek, a więc i enzymów, które katalizują reakcje chemiczne w komórce.

Nagromadziło się wiele danych świadczących o tym, że rybosomy są miejscem syntezy białka (10, 16). Zawierają one znaczne ilości RNA, który jak przypuszczano mógł spełniać rolę informatora w transkrypcji genetycznej. Do 1961 roku przyjmowano, że rybosomy są strukturami zawierającymi informację o budowie białka, zatem musi być bardzo wiele rybosomów i tyle rodzajów RNA, ile rodzajów białek. Ten klasyczny model stał się bardzo wątpliwy z chwilą gdy stwierdzono, że RNA rybosomów jest mało zróżnicowany. W rybosomach z *Escherichia coli* stwierdzono zaledwie dwa rodzaje RNA — jeden o masie cząsteczkowej 560 000, drugi 1 000 000. Tymczasem większość białek komórkowych składa się z 100 do 1000 aminokwasów, co odpowiada masie cząsteczkowej 10 000 do 100 000. Biosynteza tak różnych białek na jednostajnej matrycy RNA rybosomów nie jest możliwa. Co więcej skład nukleotydowy DNA różnych organizmów znacznie odbiega od jednostajnego składu RNA rybosomów (6). Po zakażeniu komórek bakteryjnych fagiem T₂ nie stwierdzono powstawania nowych rybosomów, podczas gdy synteza białka fagowego przebiegała w pełni (16). Fakty te wymagają zmiany poglądu na mechanizm kontroli syntezy różnorodnych białek.

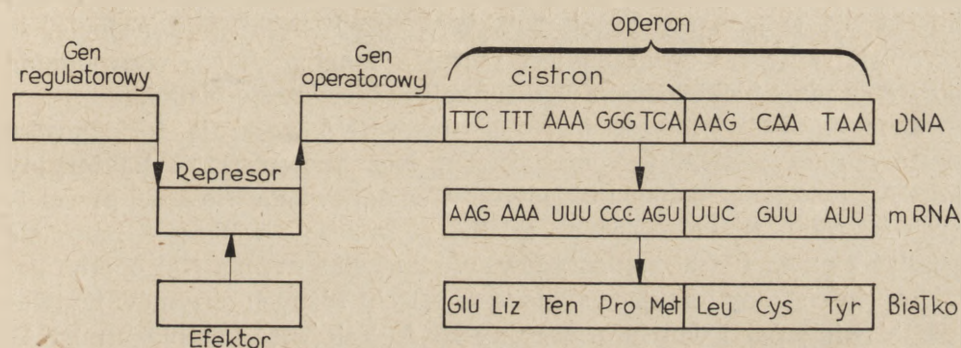
I. Kontrola przekazywania informacji genetycznej

Jest rzeczą dobrze znaną, że synteza szeregu białek u bakterii jest ściśle kontrolowana i może zmieniać się w bardzo szerokich granicach. Dla większości indukowanych enzymów, z których jednym z najlepiej zbadanych przypadków jest β -galaktozydaza (102), synteza ta sięga 70% ogólnej ilości białek wytwarzanych w komórkach. Po dodaniu laktozy do hodowli *E. coli* synteza β -galaktozydazy osiąga maksimum już po 2-3 min., co stanowi 40%-60% okresu generacji bakterii. Z kolei usunięcie induktora powoduje gwałtowne zahamowanie syntezy. Kapitalne znaczenie miały wyniki doświadczeń G r o s a (49). Wykazał on, że hodowane z dodatkiem fluorouracylu bakterie włączają go do RNA i produkują zmienione białka, co uwidoczniło się w utracie aktywności β -galaktozydazy.

W 1961 roku J a c o b i M o n o d (61) z Instytutu Pasteura w Paryżu przedstawili hipotezę, według której każdy gen lub inaczej DNA cistronowy (65), odpowiedzialny za syntezę jednego określonego rodzaju białka, działa jako matryca w syntezie informacyjnego RNA (mRNA) prze-

kazując mu w ten sposób zakodowaną w DNA informację. Utworzony mRNA łączy się następnie z rybosomami, które uzyskują w ten sposób dane o sekwencji aminokwasów w polipeptydzie. Dzięki pracom Cricka i współpracowników (31), Nirenberga i Matthaei (91) oraz Ochoa (96) wiemy dziś, że miejsce każdego aminokwasu w białku jest określone przez trójkę nukleotydów zwaną trypletem lub kodonem. Tryplety te są uszeregowane w odpowiedniej sekwencji na mRNA. Rysunek 1 przedstawia schemat regulacyjnej funkcji DNA

Odcinki DNA odpowiedzialne za syntezę określonego białka, zwane cistronami, ułożone obok siebie tworzą operon. Czynność operonu jest regulowana przez gen operatorowy, znajdujący się na jednym z krańców



Rys. 1. Schemat kontroli przekazywania informacji genetycznej

operonu i ściśle z nim związany. Może on występować w dwóch stanach: „otwartym” i „zamkniętym”. Jeżeli operator jest „otwarty”, każdy cistron operonu syntetyzuje mRNA, który przekazuje uzyskaną informację dalej. Operator „zamyka się” gdy działa na niego specyficzny represor, który ma być produktem genu regulatorowego. Aktywność represorów zależałaby od obecności w środowisku metabolitów zwanych efektorami. W przypadku syntezy enzymów indukowanych represor byłby unieczynniony przez efektor, co powodowałoby otwarcie operatora i stymulację syntezy polipeptydów odpowiadających cistronom danego operonu. W przypadku represji enzymów odpowiedni efektor aktywowałby działalność represora, powodując zamknięcie operatora i zahamowanie funkcji operonu.

Próby wyizolowania czy identyfikacji postulowanego represora lub nawet zrozumienie mechanizmu jego działania nie dały oczekiwanych rezultatów. Początkowo przypuszczano, że ma on strukturę polinukleotydową, trudno byłoby jednak wówczas zrozumieć w jaki sposób polinukleotyd mógłby rozpoznać właściwy efektor. Spostrzeżenie, że represor jest ciepłochwijny i że mutanty mogą zawierać represory nieczułe na efektor, doprowadziło do założenia jego struktury białkowej. Opierając się na tym przypuszczeniu Jacob i Monod (61) założyli, że działanie represora, podobnie jak enzymu w zwrotnym hamowaniu, jest zależne

od metabolitów powstających w łańcuchu reakcji, w których bierze on udział. Represor występowałby w dwóch allosterycznych odmianach. Jedna z nich posiadałaby powinowactwo strukturalne do określonej części lub pełnej sekwencji nukleotydowej genu operatorowego; druga — do odpowiedniego metabolitu — efektora. Kompleks efektor-represor zmniejszałby powinowactwo tego ostatniego do operatora.

Z chwilą, kiedy stwierdzono, że informacyjny RNA tworzy z homologicznym DNA hybrydy, które dają się izolować, otworzyły się możliwości zbadania działania efektoru. Technika hybrydyzacji pozwala na wydzielenie RNA, komplementarnego do odpowiedniej frakcji DNA zawierającej właściwy operon (13, 52). Stosując tę technikę wykazano, że w obecności odpowiedniego efektoru bakterie syntetyzowały więcej mRNA niż w jego nieobecności. Wyniki te potwierdzają koncepcję, że czynność represora związana jest raczej z zahamowaniem wytwarzania mRNA, a nie z blokowaniem jego funkcji w biosyntezie białka.

Dane odnośnie wielkości informacyjnego RNA wskazują, że jednostką syntetyzującą mRNA jest nie cistron, lecz operon (125). Bakteryjny mRNA zawiera około 1000 nukleotydów, co odpowiada wielkości przeciętnego cistronu. Niektóre jednak mRNA są znacznie większe — mogą się składać z około 10 000 nukleotydów. Według *Martina* (79) operon zawierający cistrony kodujące syntezę dziesięciu różnych enzymów wytwarza tej wielkości jeden informacyjny RNA. Tak więc kompleks mRNA-operon jest zdolny do syntezy tych polipeptydów, których informacja jest zakodowana w danym operonie.

Bardzo ciekawe są obserwacje dotyczące tzw. polarności operonu. Objawia się ona podczas mutacji, w wyniku której następuje utrata aktywności jednego enzymu i równoczesny spadek aktywności innych, należących do tego samego operonu. Zjawisko to sugeruje zdefiniowaną kolejność ujawniania się funkcji cistronów. Cistron, którego aktywność enzymatyczna została utracona, jest zawsze bliżej genu operatorowego niż inne, których aktywność enzymatyczna została tylko częściowo obniżona. Wymaga to niewątpliwie odpowiedniej kontroli replikacji materiału genetycznego i współdziałania między tym materiałem a czynnikami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi, które wpływałyby na sekwencję aktywności genetycznej.

II. Replikacja materiału genetycznego

Wraz z wyjaśnieniem struktury DNA (141) pojawiło się wiele sugestii co do mechanizmu jego replikacji. *Meselson* i *Stahl* (85) jedni z pierwszych wykazali, że duplikacja materiału genetycznego zachodzi poprzez resyntezę pojedynczych nici DNA z utworzeniem dwóch nowych identycznych cząsteczek. Stosując komórki *Escherichia coli* znaczone ^{15}N badacze ci stwierdzili, że po okresie jednej generacji w środowisku zawie-

rającym ^{14}N pojawiał się w komórkach DNA, którego jedna nić znaczone była ^{15}N , druga ^{14}N . Po dwóch generacjach dwie cząsteczki DNA spośród czterech zawierały po jednej nici znaczonej ^{15}N , zaś pozostałe dwie zbudowane były z ^{14}N . Odkrycie przez Kornberga polimerazy DNA i badania nad mechanizmem jej działania (67) potwierdziły wyniki Meselsona i Stahla. Wykazano, że polimeraza DNA z *E. coli* może resyntetyzować podwójną nić DNA w obecności czterech dezoksynukleozydotrójfosforanów oraz częściowo nadtrawionej pojedynczej nici jako wzorca (66). Dobudowana część DNA jest kowalencyjnie związana z resztą 3'-hydroksylową wzorca. Odtworzony DNA ma zarówno własności fizykochemiczne, jak i zdolności transformacyjne takie same jak znakowany DNA. Jest bardzo możliwe, że dzięki polimerazie DNA komórka zdolna jest do „reperacji” uszkodzonego pod wpływem promieni nadfioletowych DNA, zapobiegając w ten sposób mutacji lub śmierci (111).

Synteza DNA *in vitro* w obecności polimerazy DNA, czterech dezoksyrybonukleozydotrójfosforanów i wzorca daje jednak DNA różniące się od natywnego opornością na denaturację, rozgałęzioną strukturą i brakiem aktywności biologicznej (26, 66). Nie ma wątpliwości, że zarówno stan w jakim znajdują się cząsteczki DNA, jak i mechanizm zapoczątkowujący i kończący replikację są różne w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Ostatnio wykazano, że genom bakteryjny składa się z pojedynczych oraz powtarzających się jednostek DNA (76). Jednostka taka posiada długość 1 mm i zawiera około 3×10^6 par zasad. Replikacja tak dużej cząsteczki DNA w małej komórce bakteryjnej stwarza niewątpliwie trudności w rozwijaniu się podwójnych nici, czego nie napotyka się w doświadczeniach *in vitro* ze zdenaturowanym DNA.

Wykazano, że do zainicjowania replikacji DNA *in vivo* potrzebna jest biosynteza białka (53, 77). Zablokowanie biosyntezy białka nie powoduje wprawdzie zahamowania już rozpoczętego cyklu replikacji, nie zostaje on jednak powtórzony, póki synteza białka nie zostanie podjęta przez komórkę *de novo*. Sugeruje to, że biosynteza polipeptydu zapoczątkowuje replikację dwóch nici DNA, z których jedna ma zastąpić cząsteczkę DNA zużytą w poprzedniej replikacji. Trudności w zrozumieniu duplikacji DNA *in vivo* wynikają również z budowy genomu. Składa się on z około 100 długich nici DNA oddalonych od siebie o 40–60 Å. Tak upakowana struktura nie pozwala na swobodną penetrację enzymów potrzebnych do syntezy informacyjnego RNA. Jeżeli jednak synteza mRNA przebiega w tych warunkach, to można sobie wyobrazić, że sprzyja ona rozwijaniu się podwójnego heliksu DNA. Z drugiej jednak strony sytuacja taka utrudnia niewątpliwie uwolnienie się zsyntetyzowanej cząsteczki mRNA.

Prace z bakteriofagami w znacznym stopniu ułatwiły zrozumienie procesów replikacji materiału genetycznego. Wykazano, że bakteriofag $\phi \times 174$ zawierający pojedynczą nić DNA, po dostaniu się do komórki *E. coli* przechodzi w formę podwójnej nici (116). Przyпуска się,

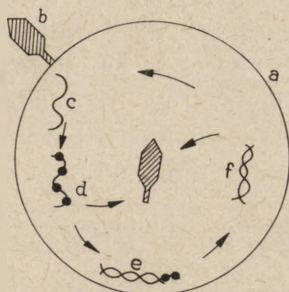
że przejściowym stadium w tym procesie jest kompleks DNA faga z DNA komórkowym (131). Naświetlanie faga promieniami nadfioletowymi obniża ilość powstającego po zakażeniu komórki dwuniciowego DNA. Replikacja formy dwuniciowej nie jest uzależniona od biosyntezy białka komórkowego i odbywa się najprawdopodobniej przy udziale kopiującego układu obecnego w komórce gospodarza. W jakiś czas po rozpoczęciu syntezy dwuniciowego DNA zaczyna się synteza jednoniciowego, co sugeruje, że forma dwuniciowa odgrywa rolę w powstawaniu DNA profaga.

Badania Matsubary, Takai i Takagi (80) wykazały jednak, że dwuniciowy DNA nie jest bezpośrednim prekursorem jednoniciowej formy, lecz prawdopodobnie asymetryczną matrycą dla fagowego mRNA, odpowiedzialnego za syntezę białka fagowego i polimerazy odtwarzającej pojedynczą nić DNA faga. Za interpretacją tą przemawia fakt, że nawet po rozpoczęciu syntezy podwójnej nici DNA, pojedyncza nić powstaje tylko wtedy, gdy synteza białka przebiega *de novo*.

Mechanizm replikacji materiału genetycznego wirusa różni się nieco od wspomnianego. Wykazanie, że w bezkomórkowym układzie z *E. coli* fag f2 zawierający jednoniciowy RNA przekazuje informację o syntezie białka fagowego, jest dowodem, że RNA ten spełnia rolę informatora (149). Natomiast replikacja wirusowego RNA nie jest zależna od DNA komórkowego (148). Aktynomycyna D, która blokuje syntezę RNA zależną od DNA, hamuje replikację wirusów zawierających DNA, nie wpływa natomiast na namnażanie wirusów posiadających jednoniciowy RNA (46). Istnieją jednak i analogie w przekazywaniu informacji genetycznej przez DNA i RNA. Podobnie jak w przypadku faga zawierającego DNA, wirusowy RNA ulega w komórce przekształceniu w zdolną do replikacji formę dwuniciową. Proces ten zachodzi pod wpływem syntetazy RNA — enzymu indukowanego w komórkach *E. coli* pod wpływem faga MS2. Enzym taki wyizolowano z zakażonych komórek *E. coli* w postaci kompleksu z dwuniciowym RNA faga (99). Kompleks ten jest zdolny do syntezy fagowego RNA *in vitro* bez dodatku RNA jako wzorca. W doświadczeniach ze znacznymi ^{14}C nukleozydotrójfosforanami 85% radioaktywności zawartej w RNA odnajdywano w jednej z nici podwójnego heliksu RNA (99). Wskazuje to, że nowo utworzona cząsteczka RNA zastępuje odpowiadającą cząstkę w dwuniciowym RNA. Tak więc replikacja RNA, podobnie jak opisywana poprzednio replikacja dwuniciowego DNA faga, jest asymetryczna, tzn. tylko jedna nić jest kopiowana. Nie ma jednak powszechnej zgodności w wynikach uzyskanych *in vitro* (78). Na podstawie opisanych badań Ochoa i współpracownicy (99) zaproponowali mechanizm replikacji fagowego RNA, który schematycznie przedstawiony jest na rysunku 2.

Jednoniciowy RNA faga po dostaniu się do komórki łączy się z rybosomami przekazując informację o syntezie białka fagowego i enzymów

zaangażowanych w kopiowaniu RNA (enzym dobudowujący drugą nić RNA i syntetaza RNA współdziałająca z dwuniciowym RNA). Po utworzeniu cząsteczki komplementarnej do fagowego RNA, powstaje forma dwuniciowa, która przy udziale syntetazy RNA jest asymetrycznie kopio-



Rys. 2. Schemat replikacji fagowego RNA (wg 99)

a) komórka, b) fag, c) jednoniciowy RNA faga, d) synteza przy udziale rybosomów komórkowych białka fagowego i enzymów biorących udział w replikacji RNA faga, e) utworzenie zdolnej do replikacji podwójnej nici RNA, f) replikacja RNA faga

wana z utworzeniem jednoniciowego RNA faga. Replikacja ta odbywa się na zasadzie ciągłej wymiany jednej nici formy dwuniciowej przez nowo zsyntetyzowaną cząsteczkę RNA. W ten sposób uwalnia się jednoniciowy RNA faga, który łącząc się z rybosomami w polisomy przekazuje informacje o kolejnej syntezie kapsomerów i enzymów biorących udział w replikacji faga. Po zsyntetyzowaniu odpowiedniej ilości białka i RNA fagowego następuje uformowanie cząsteczki faga.

W doświadczeniach *in vivo* z bakteriami i zwierzętami wykazano, że pewna ilość DNA w rozwijających się komórkach istnieje w postaci zdolnej do replikacji formy metatrwałej (113). W zależności od warunków izolowania DNA forma ta przechodzi w postać natywną lub zdenaturowaną. Metatrwała postać DNA jest zaangażowana w syntezie DNA i najprawdopodobniej mRNA. Spostrzeżenia te są zgodne z ostatnimi wynikami doświadczeń *in vitro* wykazującymi, że DNA może istnieć w roztworze w formie przejściowej między postacią natywną i zdenaturowaną (74).

III. Przenoszący kwas rybonukleinowy

Pierwszym etapem biosyntezy białka jest aktywacja aminokwasów (126). Polega ona na aktywacji grupy karboksylowej aminokwasu, który łączy się następnie z niskocząsteczkowym rozpuszczalnym RNA (sRNA), określanym często jako akceptorowy lub przenoszący (tRNA) (57, 64). W reakcji tej bierze udział ATP i enzymy aktywujące, dla których powszechnie przyjęła się nazwa syntetazy aminoacylo-sRNA (9, 10).

Jeszcze przed odkryciem relacji między sRNA i aminokwasami, w 1958 roku C r i c k — na podstawie rozważań teoretycznych — opublikował hipotezę znaną dziś pod nazwą „teorii adaptorowej” (30). Uważał on, że jeśli istotnie RNA jest matrycą, zapewniającą specyficzną sekwencję aminokwasów w syntetyzowanym białku, to niezbędna jest wstępna reakcja między aminokwasem i cząsteczką jakiegoś „adaptora”, który mógłby łatwiej „rozpoznać” właściwe dla aminokwasu miejsce na matrycy niż mało specyficzna reszta aminokwasowa.

Masa cząsteczki tRNA wynosi około 25 000, co odpowiada 70 nukleotydów w łańcuchu. Jest on w procesach biosyntezy białka pośrednikiem między wolnymi aminokwasami a matrycą, na której aminokwasy ulegają polimeryzacji do polipeptydu. Termin tRNA jest pojęciem bardziej dokładnym niż sRNA i odnosi się do tej części rozpuszczalnych kwasów rybonukleinowych, która zaangażowana jest w przenoszeniu aminokwasów na rybosomy. Mimo to powszechnie jest stosowany skrót sRNA, pod którym rozumiemy całość rozpuszczalnych kwasów nukleinowych.

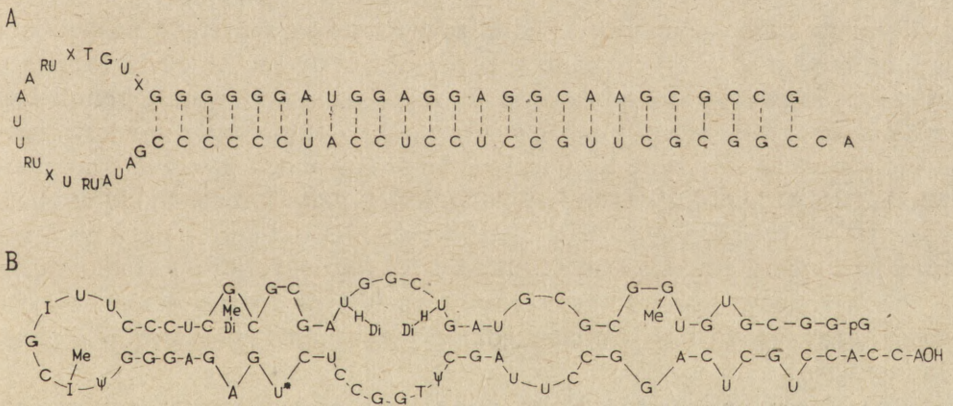
Prace prowadzone obecnie nad sRNA zmierzają do rozwiązania trzech podstawowych problemów: 1) wyjaśnienia ich budowy i lokalizacji centrów aktywnych w ich łańcuchu, 2) wyjaśnienia miejsca i mechanizmu ich biosyntezy, 3) wyjaśnienia ich specyficzności, w biosyntezie białka.

Ustalono, że na końcu łańcucha sRNA, do którego przyłącza się aminokwas, występuje trójnukleotyd o następującym składzie: ...CpCpA (54). Przeciwny kraniec cząsteczki sRNA zakończony jest kwasem 3'-guanylowym (115, 147). Te elementy są wspólne dla każdego sRNA, niezależnie od jego pochodzenia i rodzaju przyłączonego aminokwasu. Tak więc specyficzność sRNA, tj. jego zdolność do reakcji najpierw z odpowiednim aminokwasem, a potem z właściwym antykodonem na mRNA, określona być musi sekwencją nukleotydów w innych niż terminalne rejonach łańcucha. Jakkolwiek analiza oligonukleotydów otrzymanych z łańcucha sRNA pod działaniem nukleaz nie pozwalała początkowo na jednoznaczne ustalenie sekwencji nukleotydów, to jednak umożliwiła poznanie wielu jego fragmentów. Przykładem może tu być zaproponowany przez H o l l e y a model cząsteczki sRNA z drożdży, specyficznego dla alaniny (59), lub podana przez C a n t o n i e g o budowa „przeciętnego” sRNA z wątroby królika (84). Dopiero odkrycie zjawiska selektywnego działania RN-azy T1 z takadiastazy na łańcuch sRNA w temp. 0°, a także opracowanie nowych metod rozdzielania oligonukleotydów, pozwoliło H o l l e y'owi i współpracownikom bezbłędnie ustalić sekwencję wszystkich nukleotydów w łańcuchu sRNA z drożdży, specyficznego dla alaniny (60). Badania widm dyfrakcyjnych cząsteczki sRNA wykazały w niej obecność struktury dwuniciowej (18, 69). Stopień hiperchromazji, a także wielkość zmian w skręcalności optycznej podczas ogrzewania sRNA w rozcieńczonych roztworach soli pozwalają na wyliczenie, że 60—70% zasad łączy się w pary mostkami wodorowymi i pozostaje w układzie dwunicio-

wym (18, 41). Łańcuch jest więc zagięty mniej więcej w połowie swej długości w kształcie litery U. Część zasad, pozostających w postaci pojedynczego łańcucha, tworzy jedną lub więcej pętli (18, 60). Rysunek 3 przedstawia budowę cząsteczki „przeciętnego” sRNA z wątroby królika, oraz cząsteczki sRNA drożdży specyficznego dla alaniny.

Wszystkie kwasy nukleinowe (z DNA włącznie) zawierają obok czterech podstawowych zasad także pewną ilość ich pochodnych metylowych. W sRNA wykazano obecność co najmniej dziesięciu różnych zmetylowanych zasad (35, 71). Co więcej, zawiera on niezwykle rybozyd, pseudourydynę, w której ryboza przyłączona jest do atomu węgla pierścienia pirymidyny w położeniu 5 (25). Przytoczone fakty mogły nastęrczać trudności w interpretacji mechanizmu syntezy sRNA na matrycach DNA, ponieważ model Watsona i Cricka nie przewiduje możliwości określenia przez DNA miejsca zmetylowanych zasad i pseudourydyny. Wątpliwości te zostały rozwiane, gdy Srinivasan i Borek znaleźli enzymy transmetylujące zasady na poziomie polinukleotydu (124). W reakcji tej bierze udział adenozyłometionina.

Nihei i Cantoni stwierdzili występowanie nietypowych zasad w obrębie jednoniciowej pętli sRNA (90). Można przypuszczać, że właśnie w tym rejonie znajduje się tryplet odpowiedzialny za specyficzną wo-



Rys. 3. Sekwencja nukleotydów w sRNA.

A — budowa cząsteczki „przeciętnego” sRNA z wątroby królika (wg 84), B — cząsteczka sRNA z drożdży, specyficznego dla alaniny (wg 60)

bec mRNA. Obecność na tym odcinku zmetylowanych zasad zapewnia być może niezbędną precyzję w procesie łączenia się kodonu z antykodem. W konsekwencji centra odpowiedzialne za reakcję sRNA z odpowiednimi syntetazami oraz transferazami aminoacylo-sRNA winny znajdować się w innych niż pętla rejonach cząsteczki.

W skomplikowanym procesie biosyntezy polipeptydu, sRNA zajmuje szczególną pozycję. Musi on wykazywać określoną specyficzną wobec enzymów przyłączających aminokwasy, wobec enzymów przeno-

szących i wreszcie wobec informacyjnego RNA. W tej sytuacji biosynteza sRNA musi być procesem wysoce specyficznym. Nie ustalono dotąd z całą pewnością jej miejsca w komórce. Możliwość hybrydyzacji DNA-sRNA oraz jej specyficzność gatunkowa (47), jak również stwierdzenie, że izolowane jądra zdolne są włączać znakowane prekursorzy nukleotydów do niskocząsteczkowych kwasów nukleinowych (24) sugerują, że synteza sRNA zlokalizowana jest w jądrze. Jakkolwiek pogląd ten zgodny jest z ogólnie przyjętą dziś koncepcją centralnej roli matrycy DNA w procesach replikacji w komórce, nieco inną interpretację tego zagadnienia podaje C a n t o n i (83). Punktem wyjścia jego hipotezy jest znaczne podobieństwo własności fizykochemicznych sRNA z różnych organizmów. Aminoacylo-sRNA pochodzący z *E. coli* bierze np. udział w syntezie hemoglobiny prowadzonej *in vitro* z rybosomami z retikulocytów królika (36). Tak więc synteza sRNA byłaby wysoce niespecyficzna. Warunkom tym nie odpowiada matryca DNA, wykazująca duże zróżnicowanie gatunkowe, czy nawet osobnicze. W konkluzji Cantoni wysuwa możliwość auto-replikacji sRNA!

Ciekawym przyczynkiem do rozważań nad wewnątrzkomórkową lokalizacją biosyntezy sRNA jest obserwacja, że pierwsza uchwytana synteza sRNA podczas rozwoju embrionów jeźowca zbiega się z uformowaniem w jądrze jąderka, co następuje w stadium gastruli (26, 27).

Synteza aminoacylo-sRNA, katalizowana przez syntetazy posiadające co najmniej dwa aktywne centra, przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap to aktywacja aminokwasu polegająca na powstawaniu kompleksu AMP-aminokwas-enzym (58). Specyficzność na tym etapie nie jest absolutna, bowiem np. syntetaza izoleucylo-sRNA może tworzyć kompleks także z innym aminokwasem — walina, który jednak rozpada się w obecności sRNA specyficznego dla izoleucyny (94). Drugi etap polega na przeniesieniu reszty aminokwasu na sRNA i przyłączeniu jej do atomu węgla 2' lub 3' końcowej reszty adenozyliny (145). W tym drugim etapie, wysoce specyficzny łańcuch sRNA bezbłędnie „rozpoznaje” właściwy dla niego aminokwas.

Syntetazy aminoacylo-RNA wykazują specyficzność gatunkową. Oczyszczona syntetaza walilo-sRNA z drożdży „rozpoznaje” 10%—15% specyficznego dla waliny sRNA pochodzącego z *E. coli*. Taka sama syntetaza otrzymana z *E. coli* reaguje zaledwie z 3%—6% odpowiedniego sRNA drożdżowego. Gdy źródłem syntetazy fenyloalanylo-sRNA jest *E. coli*, nie obserwuje się w ogóle przenoszenia fenyloalaniny na drożdżowy sRNA, zaś w sytuacji odwrotnej reakcja ta zachodzi z wydajnością 1%—2% (68). W omówionych przykładach punktem odniesienia były reakcje w układach homologicznych, których wydajność przyjęto za 100%. Brak kompetycji wśród aminokwasów o miejsce na określonym sRNA wskazuje, że każdemu aminokwasowi odpowiada specyficzny sRNA. Co więcej, podczas prac nad frakcjonowaniem sRNA odkryto w wielu przypadkach

zjawisko jego heterogenności w stosunku do pojedynczego aminokwasu (34). Z pracy *Berga* (8) wynika, że otrzymany z *E. coli* sRNA specyficzny dla leucyny zawiera dwa typy łańcuchów, różniące się sekwencją nukleotydów w sąsiedztwie końcowego trójnukleotydu ... CpCpA. Stosując technikę rozdziału przeciwwprądowego, udało się wykazać niejednorodność całego szeregu frakcji sRNA specyficznych dla określonych aminokwasów. W przypadku rozdziału sRNA z *E. coli* B (45) otrzymano pojedyncze frakcje dla 6 aminokwasów, podwójne dla 8, zaś sRNA specyficzny dla proliny składał się z 3, a dla leucyny nawet z 4 frakcji. Nie jest wykluczone, że heterogenność niektórych sRNA mogła być spowodowana uszkodzeniem łańcucha podczas preparatyki i rozdziału. W świetle jednak badań *Ehrensteina* i *Daisa* (37), którzy rozdzielili sRNA z *E. coli* specyficzny dla leucyny na 3 frakcje z zachowaniem aktywności w układach z syntetycznymi polinukleotydami, ewentualność taka wydaje się mało prawdopodobna.

Przeniesienie aminoacylo-sRNA na matrycę, czyli krok poprzedzający polimeryzację aminokwasów odbywa się przy udziale enzymów przenoszących, występujących w rozpuszczalnej frakcji białek komórkowych. W reakcji tej aminoacylo-sRNA wiąże się zarówno z mRNA, jak i z rybosomami. Połączenie w pierwszym przypadku zachodzi na zasadzie komplementarności kodonu, do antykodonu. Mechanizm ten pod nazwą adaptorowej teorii został zaproponowany przez *Cricka* (30). Doświadczenia wykazały (31), że fragmentem odpowiedzialnym w sRNA za właściwe przyłączenie do mRNA jest trójka nukleotydów zwana trypletem lub kodonem. Komplementarna trójka nukleotydów w mRNA została nazwana antykodonem.

Na przeniesienie aminoacylo-sRNA na matrycę nie ma wpływu struktura przyłączonego aminokwasu. Słuszność tego poglądu wykazano na przykładzie włączania do białka alaniny przyłączonej do sRNA specyficznego dla cysteiny (21). Również hybryd mieszany szczawiooctan-sRNA^{Asp}, uzyskany za pomocą transaminacji kwasu asparaginowego przyłączonego do sRNA jest prawdopodobnie włączany do polipeptydu (127). Sposób połączenia aminoacylo-sRNA z rybosomami nie został bliżej wyjaśniony. Przyłączenie aminoacylo-sRNA do rybosomu wymaga obecności w układzie GTP, Mg⁺⁺ a także jonów jednowartościowych jak K⁺, a zwłaszcza NH₄⁺ (122). Są jednak doniesienia wykazujące, że także pozbawiony aminokwasów sRNA może, w określonych warunkach, łączyć się z rybosomami (3, 133). W przypadku rybosomów z *E. coli*, miejscem przyłączenia cząsteczki sRNA jest podjednostka 50 S (19).

Grupę transferaz aminoacylo-sRNA z *E. coli* udało się ostatnio rozdzielić na dwie dopełniające się w działaniu frakcje (2). Frakcja A zawiera prawdopodobnie polimerazę aminokwasów, natomiast frakcja B wydaje się związana z funkcją GTP i byłaby odpowiedzialna za proces przyłączania sRNA do rybosomów.

Są liczne teorie na temat roli GTP w procesie biosyntezy białka, według jednej z nich związek ten może być odpowiedzialny za aktywację grupy aminowej aminokwasu związanego z sRNA. Ta niewątpliwie atrakcyjna hipoteza jest jednak niezgodna z obserwacją, że GTP rozpada się także pod nieobecność aminoacylo-sRNA w układzie (70).

IV. Informacyjny kwas rybonukleinowy

Pierwsze wskazówki, że w komórkach *E. coli* zakażonych fagiem T₂ pojawia się nietrwały RNA podobny składem nukleotydowym do DNA faga podali w 1958 roku Volkin, Astrachan i Counfryman (138). Obserwacje te, jak również wyniki prac Halla i Spiegelmana i Nomury (52, 93) doprowadziły do wysunięcia hipotezy, że matrycą w syntezie białek jest RNA, którego sekwencja nukleotydowa kontrolowana jest przez DNA. Zgodnie z tą hipotezą frakcja RNA, nazwana *messenger* — informacyjny RNA (mRNA) powinna mieć skład i sekwencję nukleotydową odpowiadającą aktywnemu odcinkowi DNA, a zatem stanowić może niewielki tylko procent RNA komórkowego. Prace późniejsze dostarczyły wiele dowodów na potwierdzenie wysuniętych przypuszczeń. W komórkach bakteryjnych zwierzęcych i roślinnych (105) wykazano obecności frakcji RNA odpowiadającej kryterium mRNA. U *E. coli* jest on nietrwały, a stała sedymentacji waha się w granicach 14 S—16 S. Zarówno drożdżowy mRNA, jak i pochodzący z ziaren grochu jest także nietrwały. W gruczołach jedwabnika morwowego natomiast mRNA w okresie maksymalnej syntezy fibroiny wydaje się trwały. Podobnie jest w retikulocytach królika syntetyzujących głównie hemoglobinę. W komórkach wątrobowych szczura, których czas generacji wynosi około roku, cytoplazmatyczny mRNA jest trwały co najmniej 40 godz. (106). Natomiast komórki *Bacillus subtilis* o okresie generacji około 100 dni zawierają mRNA o półokresie trwania 2,5 minut. Dane te wskazują, że czas trwania mRNA w różnych organizmach waha się w szerokich granicach i jest niezależny od okresu generacji komórek. Nie jest wykluczone, że trwałość mRNA nawet w tych samych komórkach jest cechą zmienną, co tłumaczyłoby kontrowersyjne wyniki (136).

Liczne badania wykazały, że mRNA stanowi 1%—4% RNA komórkowego. Jego masa cząsteczkowa zmienia się w zależności od masy zsyntetyzowanego białka i np. w przypadku białka składającego się z 700 aminokwasów wynosi około 6×10^5 .

Istnieje szereg przekonujących dowodów aktywności biologicznej mRNA. Dodatek — pochodzącej z *E. coli*, drożdży lub wirusa mozaiki tytoniowej — frakcji bogatej w mRNA do bezkomórkowego układu z *E. coli* wzmacnia kilkakrotnie syntezę białka (91). RNA ze środkowych odcinków gruczołów przednich jedwabnika morwowego wzmacnia włączenie aminokwasów do białek w układach z *E. coli*, w proporcjach odpowia-

dających zawartości aminokwasów w serycynie (128). Wyizolowany RNA z faga T2 przekazuje w układzie bezkomórkowym z *E. coli* informacje o syntezie białka faga.

Stosowane od kilku lat metody hybrydyzacji mRNA (13, 120) otworzyły możliwości badań nad mechanizmem biosyntezy mRNA i genetycznym podobieństwem różnych organizmów (82). Otrzymane wyniki pozwalają również wnioskować o kierunku zmian ewolucyjnych. Mc Carthy i Bolton (81) stosując agarową metodę hybrydyzacji sugerują, że tylko jedna nić DNA zaangażowana jest w transkrypcji. Nagromadza się jednak coraz więcej danych świadczących, że formą zdolną zarówno do replikacji, jak i do syntezy mRNA w komórce jest dwuniciowy DNA (15). Rich (107) i Zubay (150) wysunęli hipotezę, według której synteza mRNA zachodzi na dwuniciowym DNA z zachowaniem wiązań wodorowych. Przyłączenie rybonukleotydów odbywałoby się na zasadzie nowo utworzonych wiązań wodorowych. Niedostatkim tej hipotezy jest brak wyjaśnienia sposobu uwalniania się zsyntetyzowanej cząsteczki mRNA od podwójnego heliksu DNA. Alternatywny model zaproponowany przez Chamberlina i Berga (20) ma najwięcej zwolenników. Zakłada on utworzenie się kompleksu dwuniciowej formy DNA z polimerazą w miejscu, gdzie rozpoczynałaby się synteza mRNA. Przyłączenie to mogłoby zachodzić na jednym z końców podwójnego łańcucha DNA z miejscowym rozerwaniem nici. Kopiowanie mogłoby wówczas odbywać się równocześnie z przesuwanym się rozrywaniem wiązań wodorowych obu nici DNA i utworzeniem komplementarnego odcinka mRNA. Mechanizm ten byłby podobny do kopiowania pojedynczej nici DNA. Zsyntetyzowana cząsteczka mRNA mogłaby wówczas odłączać się od heliksu DNA na zasadzie większego powinowactwa formy DNA-DNA w stosunku do hybrydu DNA-RNA. Nie jest jednak wykluczone, że uwolnienie to zachodzi na drodze enzymatycznej. W tym przypadku istniałaby zasadnicza różnica w mechanizmie działania polimerazy RNA i polimerazy DNA.

Powstawanie kompleksu DNA-RNA zostało potwierdzone *in vitro* z polimerazą RNA zależną od DNA (95).

Jednym z podstawowych problemów genetyki molekularnej jest mechanizm „odczytywania” odcinków mRNA odpowiadających określonym cząsteczkom białka. Innymi słowy wykazanie w jaki sposób jest oddzielony cistron od cistronu pozwalający na to, że utworzony na nich mRNA decyduje we właściwym momencie o rozpoczęciu i zakończeniu syntezy polipeptydu. Nie ma w obecnej chwili definitywnej odpowiedzi na to pytanie, niemniej jednak istnieje szereg wskazówek. Można przypuszczać, że szereg znalezionych ostatnio aminokwasów związanych kowalencyjnie z DNA (100) odgrywa rolę przecinków na operonie. To samo przypuszczenie możnaby odnieść do nietypowych zasad, występujących w cząsteczce DNA. Ponadto badania struktury mRNA za pomocą dyfrakcji promie-

ni X wskazują, że podobnie jak sRNA może on w obrębie pojedynczej nici tworzyć odcinki dwuniciowe, które mogłyby być przecinkami dla mechanizmu odczytującego. Tę samą rolę mogłyby spełniać „nonsensowne” tryplety.

V. Rybosomy

Oprócz mRNA i sRNA, które występują jako wolne kwasy nukleino-
we, znajdujemy w komórce typ kwasów nukleinowych, zawsze związany
ze specyficznym białkiem. Jak wykazali Palade i Siekevitz (101),
owe rybonukleoproteidy połączone w zespoły występują u ssaków we
frakcji mikrosomowej komórek, zaś u roślin i mikroorganizmów, których
komórki pozbawione są endoplazmatycznego retikulum, zawieszane są
luźno w cytoplazmie, a część ich związana jest z błoną komórkową. Te
zespoły rybonukleoproteidów nazywano początkowo „granulami” Pala-
de’a lub cząstkami RNP (rybonukleoproteidowymi). Nazwę „rybosomy”
zawdzięczamy Robertsowi (112).

Rybosomy mogą dysocjować na podjednostki, mogą też tworzyć przy
udziale mRNA zespoły zwane polirybosomami lub polisomami. Poświęca
się im ostatnio wiele uwagi, ponieważ są uważane powszechnie za aktyw-
ne jednostki syntezy łańcucha peptydowego. Rybonukleoproteidowe
cząstki o właściwościach rybosomów wyizolowano też z mitochondriów
i jąder.

Rybosomy mają kształt bliski kulistemu. Średnica ich waha się, w za-
leżności od pochodzenia, w granicach od 150 Å do 350 Å. Masę rybosom-
ów stanowią głównie białka i kwasy nukleinowe, przy czym proporcje
przesunięte są nieco w kierunku kwasów nukleinowych. Także i w tym
przypadku obserwujemy pewną zależność gatunkową.

Analiza N-końcowych aminokwasów białek rybosomów wykazała 47%
metioniny, 38% alaniny, 11% seryny i niewielkie ilości pozostałych ami-
nokwasów. Skład aminokwasowy białka różnych podjednostek rybosom-
ów jest bardzo zbliżony. Przeciętna masa cząsteczki białkowej wynosi
25 000 (139).

W rybosomach z wątroby szczura znaleziono białko typu histonów od-
znaczające się wysoką zawartością aminokwasów zasadowych, niską zaś
cysteiny i tryptofanu. Posiada ono niewielką masę cząsteczkową i wy-
różnia się skłonnością do agregacji (29).

Kwasy nukleinowe zawarte w rybosomach wykazują bardzo małe
różnicowanie pod względem masy cząsteczkowej. Kwas nukleinowy wy-
izolowany przez Littauera (72) z rybosomów *E. coli*, składał się
z frakcji 16,5 S (65%) i 23,7 S (35%). RNA rybosomów z retikulocytów
królika zawierał komponenty o stałych sedymentacji: 4 S, 17 S i 28,6 S
(28), rybosomów z wątroby szczura: 16 S, 22 S (10% całej ilości) i 28 S.
Masy cząsteczkowe kwasów nukleinowych 16 S i 22 S ustalono odpowied-

nio jako $0,55 \times 10^6$ i $1,65 \times 10^6$ (104). Skład zasad rybosomowego RNA odbiega składem nukleotydowym od DNA (7, 22) i podlega wahaniom gatunkowym. Skład zasad purynowych w rybosomowym RNA z tkanek zwierzęcych wynosi około 50% całej ilości zasad (48), z mikroorganizmów natomiast dochodzi często do 60% (86).

Spośród wszystkich przebadanych jonów metali, największy wpływ na funkcje rybosomów ma jon magnezowy. Rybosomy zawieszane w środowisku pozbawionym jonów Mg^{2+} rozpadają się szybko na podjednostki, a zatem jony te regulują stopień ich agregacji. Magnez zapewnia również rybosomom zdolność do przyłączania zarówno sRNA, jak i mRNA. W rybosomach z grochu znaleziono jony wapnia (137). Wapń nawet skuteczniej niż magnez agreguje rybosomy (132), ma jednak mniejszy wpływ na włączanie aminokwasów do białka w układach zawierających rybosomy z *E. coli* (135), grochu (1) czy wątroby szczura (56). Jony manganu, choć stymulują włączanie aminokwasów do rybosomów z *E. coli*, są jednak tylko w połowie tak efektywne jak jony Mg^{2+} (135). Natomiast w stabilizacji rybosomów z kielków pszenicy i grochu, skuteczniejsza od samego magnezu jest mieszanina jonów Mn^{2+} i Mg^{2+} (75). Także jon kobaltu wykazuje duże powinowactwo do rybosomów. Zauważono, że zawierająca go witamina B_{12} jest silnie wiązana przez rybosomy z *E. coli* i *L. leichmanii* (63).

Podobnie jak jony metali, poliaminy będące normalnymi składnikami komórki mogą silnie wiązać się z rybosomami. Trudno jest odpowiedzieć, czy ich obecność ma istotny wpływ na funkcję i stabilność rybosomów. W rybosomach z *E. coli* znaleziono putrescynę, spermidynę, kadawerynę i ślady sperminy (118). Wykazano, że obecność poliamin stymuluje w pewnym stopniu włączanie aminokwasów do białek w układach zawierających rybosomy *E. coli* (89), drożdży (73) i wątroby szczura (56).

Integralną częścią rybosomów są enzymy nukleolityczne. W rybosomach z *E. coli* znaleziono RN-azę oraz fosfodwuesterazę rozkładającą RNA do 5'-mononukleotydów (119). Oba te enzymy pozostają tak długo nieaktywne, dopóki struktura rybosomu jest nienaruszona. W rybosomach z *E. coli* wykryto ponadto polimerazę RNA (4), fosfatazę kwaśną (119) i aldolazę (38). Trudno jeszcze dziś uzasadnić obecność w rybosomach tak różnych enzymów. Niektóre z nich są prawdopodobnie zaadsorbowane, część jednak, jak np. enzymy nukleolityczne, może brać udział w procesie biosyntezy polipeptydu. Rybosomy zawierają prawdopodobnie także dezaminazy oraz nukleozydazy. Za hipotezą tą przemawiają obserwacje, że z rybosomów *E. coli* (129), a także z frakcji mikrosomowej i z rybosomów wątroby świnki morskiej (130) uwalniają się zdeaminowane zasady azotowe i odpowiednie nukleozydy, pochodzące prawdopodobnie z rozkładu informacyjnego RNA.

Prace Spirina i Kisseleva (121) rzuciły nieco światła na strukturę rybosomów. Jeżeli usunąć z nich RN-azę działaniem 0,5 N chlorku

amonu, dysocjują one na podjednostki 50 S i 30 S. W środowisku pozbawionym magnezu oraz o niewielkiej sile jonowej, podjednostki 50 S i 30 S rozwijają się z utworzeniem pojedynczych nici rybonukleoproteidowych, o średnicy 30 Å lub 40 Å. Proces ten jest odwracalny i w obecności jonów Mg^{2+} przywrócona zostaje pierwotna, upakowana i zorganizowana struktura podjednostek rybosomowych. Obraz mikroskopowy podjednostki 50 S wskazuje, że ma ona kształt cylindra o wysokości 120 Å i średnicy 160 Å, na którego powierzchni widać przebiegające równoległe do osi prążki odpowiadające skrętom zwiniętego spiralnie łańcucha rybonukleoproteidowego. Podobny kształt mają podjednostki 30 S, są tylko bardziej spłaszczone. Asocjacja podjednostek 30 S i 50 S w rybosom 70 S powoduje istotną zmianę ich kształtu polegającą na wypuklaniu się części dystalnych cylindrów. Wskazuje to na dużą elastyczność struktury rybosomu.

Do izolowania rybosomów stosowano początkowo metody dość drastyczne: homogenizację tkanek, działanie roztworów dezoksycholenu itp. W 1963 roku Henshaw, Bojarski i Hiatt (55) zauważyli, że rybosomy związane z endoplazmatycznym retikulum są znacznie bardziej aktywne od rybosomów wydzielonych.

Równocześnie Warner, Knopf i Rich (140) stosując łagodne metody preparatywne, np. szok osmotyczny otrzymali frakcję rybosomową o charakterystycznych skupiskach rybosomów. Zdjęcia w mikroskopie elektronowym wykazały, że skupiska te (polisomy) powstają na skutek połączenia rybosomów nicią kwasu nukleinowego, którym jest najprawdopodobniej mRNA. Za interpretacją tą przemawia szereg faktów. Polisomy rozpadają się pod działaniem RN-azy i detergentów, ich wytrzymałość na urazy mechaniczne jest niewielka, średnica łączącej rybosomy nici odpowiada wartościom otrzymywanym dla wolnych łańcuchów RNA (10 Å — 20 Å), wreszcie nie ta barwi się octanem urynylu. Dalszych dowodów dostarczyły prace Spyridesa i Lipmanna (123) oraz Gilberta (43), którzy wykazali, że syntetyczne polinukleotydy łatwo tworzą agregaty z wolnymi rybosomami. Rybosom przyłączony do łańcucha mRNA zajmuje odcinek o długości około 180 Å, co odpowiada szeregowi zbudowanemu z 27 reszt nukleotydów (134).

Polisomy wyodrębniono już z różnych materiałów zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. Szczególnie duże polisomy znaleziono w komórkach nowotworów złośliwych. Rich i współpracownicy (109) otrzymali z komórek *HeLa* polisomy zawierające do 40 rybosomów. Po zainfekowaniu komórek *HeLa* wirusem *polio*, ilość rybosomów w poszczególnych polisomach wzrastała do 60 jednostek.

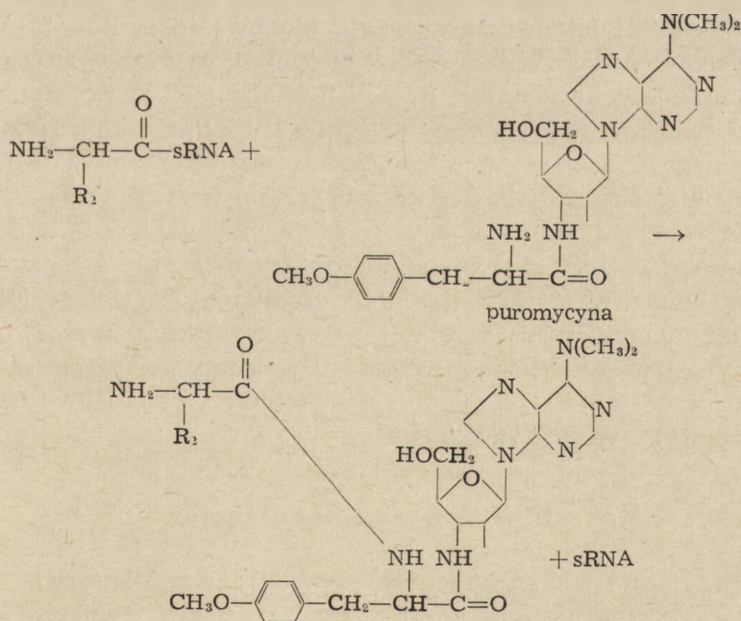
Miejsce wiązania mRNA i sRNA w rybosomie jest ściśle zlokalizowane, np. w rybosomach z *E. coli* sRNA wiąże się z podjednostką 50 S, zaś mRNA — z podjednostką 30 S. W ten sposób powstają specyficzne zespoły — polisomy.

O mechanizmie współdziałania rybosomu z mRNA i sRNA niewiele jeszcze wiadomo. Wielu zwolenników ma hipoteza Richa (108), według której rybosom przesuwa się wzdłuż nici mRNA począwszy od określonego jej końca. Podczas jego przesuwania się wydłuża się polipeptyd syntetyzowany z dołączonych do rybosomów aminoacylo-sRNA. Z badań nad syntezą hemoglobiny, wiemy, że powstawanie polipeptydu odbywa się sukcesywnie począwszy od N-końcowego aminokwasu (12, 33, 44). Do rosnącego polipeptydu przyłącza się nowy aminoacylo-sRNA, powstaje wiązanie peptydowe z udziałem grupy acylowej i grupy aminowej kolejnego aminokwasu, przy czym uwalnia się sRNA. Pierwszorzędowa struktura polipeptydu decyduje prawdopodobnie o drugo- i trzeciorzędowej budowie białka (98), toteż pofałdowanie cząsteczki następować może już częściowo na rybosomie.

Agregacja polipeptydów z wytworzeniem natywnego białka zachodzi już po ich odłączeniu się od rybosomów.

VI. Hamowanie biosyntezy białka

W badaniach nad mechanizmem biosyntezy białka dużą rolę odgrywają niektóre antybiotyki. Część z nich, jak np. chloromycetyna i streptomycyna, znalazły szerokie zastosowanie kliniczne, inne zaś, jak np. puromycyna, mimo braku aspektu praktycznego umożliwiają poznanie mechanizmu hamowanych przez siebie reakcji. Analogie strukturalne między puromycyną i aminoacylo-sRNA stworzyły podstawę do przypuszczeń, że antybiotyk ten może działać na tym etapie syntezy poli-



Rys. 4. Schemat działania puromycyny (wg 87)

peptydu (146). Nathans (87) sugeruje następujący przebieg reakcji (rysunek 4).

Jako analog strukturalny aminokwasów puromycyna reaguje swą wolną grupę aminową z aktywowaną grupą karboksylową tworzącego się peptydu uwalniając równocześnie cząsteczkę sRNA i blokując sukcesywne przyłączanie aminokwasów. Niedokończone peptydy z puromycyną na końcu łańcucha zostały wyizolowane przez Nathansa (88). Działa ona zarówno w układach bakteryjnych, jak i zwierzęcych.

W przeciwieństwie do puromycyny, działanie chloramfenikolu zależy od organizmu, z którego pochodzi układ syntetyzujący białka. Antybiotyk ten w stężeniu 10^{-5} — 10^{-4} M (które uzyskuje się *in vivo*) hamuje powstawanie polipeptydu w bezkomórkowych układach z bakterii w 75—90%, nie hamuje jednak biosyntezy białka w preparatach z tkanek zwierzęcych (36) lub drożdży (117). Blokowanie polimeryzacji aminokwasów pod wpływem chloramfenikolu spowodowane jest prawdopodobnie reakcją antybiotyku z rybosomami, które tracą zdolność przyłączania mRNA. Przypuszczenie to wynikało z obserwacji, że w obecności chloramfenikolu nagromadza się w komórkach bakteryjnych RNA, przypominający własnościami mRNA (51).

Istnieją sugestie, że chloramfenikol blokuje biosyntezę białka tylko wówczas, gdy następuje przyłączenie nowej cząsteczki mRNA do rybosomów. Ponieważ mRNA pochodzenia zwierzęcego jest zazwyczaj trwałą, nie ma konieczności ciągłej jego wymiany, tak jak to ma miejsce w preparatach bakteryjnych. Ta różnica w trwałości informacyjnych RNA obu układów może być przyczyną zróżnicowanej aktywności antybiotyku. Za słusznością tej hipotezy przemawia blokowanie syntezy przeciwiiał pod wpływem chloramfenikolu (142). Również zastosowanie syntetycznych polinukleotydów zamiast homologicznego mRNA czyni układ pochodzenia zwierzęcego czułym na działanie chloramfenikolu (142).

Mechanizm hamowania syntezy białka przez streptomycynę jest jeszcze bardzo niejasny (17), jakkolwiek wykazano jej wpływ na aktywność rybosomów (39). Przypuszcza się, że wiąże się ona trwale z cząstkami 30 S rybosomów (28, 32), wywołując zmiany związane z mechanizmem kodowania aminokwasów. Działanie streptomycyny wywołane jest prawdopodobnie poliaminowym charakterem tego związku, ponieważ spermina i spermidyna wywołują podobne efekty. Rybosomy pochodzące z bakterii opornych na działanie streptomycyny są również niewrażliwe na wpływ tego antybiotyku w układach *in vitro*.

VII. Kodowanie aminokwasów

Dziś przyjmuje się powszechnie, zgodnie z sugestią Cricka (31), że informacja genetyczna zakodowana jest w postaci trypletów o odpowiedniej sekwencji zasad. Odczytywanie kodu odbywa się w jednym

tylko kierunku, przy czym o początku decyduje najprawdopodobniej gen operatorowy znajdujący się na jednym z krańców operonu (125).

Spostrzeżenie Nirenberga i Matthaei (91), że syntetyczne polinukleotydy mogą kierować syntezą określonych polipeptydów w bezkomórkowym układzie z *E. coli* zapoczątkowało nowy okres w badaniach nad kodowaniem aminokwasów. Stały się one możliwe dzięki odkryciu Grunberg-Manago, Ortiza i Ochoa (50) fosforylasy polinukleotydowej. Enzym ten syntetyzuje homopolinukleotydy i kopolinukleotydy z rybonukleozydo-5'-dwufosforanów, z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu. Struktura chemicznie zsyntetyzowanych polinukleotydów jest identyczna z naturalnym RNA z wyjątkiem nieuporządkowanego rozmieszczenia zasad. Ta cecha syntetycznych polinukleotydów jest podstawą do obliczania trypletów kodujących aminokwasy. W przypadku homopolinukleotydów, jak np. poli-U kierującego powstawaniem poli-feniloalaniny, trypletem kodującym może być tylko UUU. Natomiast w przypadku kopolinukleotydów określenie trypletu można wyliczyć ze stosunku molarnego nukleotydów użytych do syntezy. Jeżeli np. do otrzymania poli-UG użyto nukleotydy w stosunku U do G jak 5:1, to powstający kwas poliurydyloguanylowy ma również ten sam stosunek zasad, jednak o nieuporządkowanym rozmieszczeniu. Można jednak wyliczyć częstotliwość występowania różnych trypletów w łańcuchu. W omawianym przypadku, częstotliwość występowania UUU określa się liczbą 125, UUG, UGU i GUU — 25, UGG, GUG i GGU — 5, a trypletu GGG — liczbą 1. Z częstotliwości występowania trypletów oblicza się stosunek częstotliwości dla możliwych w danym przypadku trypletów biorąc za odnośnik tryplet UUU. A więc stosunek częstotliwości dla UUU wynosi $125:125=1$, dla UUG, UGU, GUU $125:25=5$, dla UGG, GUG, GGU — $125:5=25$, dla GGG — $125:1=125$. Porównując następnie stosunek włączania różnych aminokwasów (tzn. intensywność włączania danego aminokwasu do intensywności włączania feniloalaniny) do stosunku częstotliwości występowania trypletów w polinukleotydzie możemy powiedzieć jaki tryplet odpowiedzialny jest za włączenie danego aminokwasu (96).

W ten sposób stosując bezkomórkowy układ z *E. coli* i syntetyczne polinukleotydy oraz znaczone aminokwasy określono tryplety dla 20 aminokwasów. Tablica 1 przedstawia 64 tryplety zebrane w 20 seriach oraz aminokwasy odpowiadające 46 trypletom (98). Z wyjątkiem AAA, UUU, CCC, w żadnym z pozostałych trypletów nie jest znana sekwencja nukleotydowa.

Puste miejsca (kreski) są przeznaczone dla nieoznaczonych jeszcze aminokwasów, kodowanych przez przewidziane tryplety. Dla serii trypletów Nr 5, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 18 znane są już wszystkie aminokwasy. Takie polinukleotydy powinny syntetyzować ciągły łańcuch peptydowy. Z tablicy widać, że kod jest wysoce zdegenerowany. Przyczyną degeneracji jest prawdopodobnie występowanie różnych sRNA dla tego samego

aminokwasu. W takim przypadku zamiana jednej zasady w drugą nie zawsze prowadziłaby do zamiany aminokwasu w białku. Tak więc z punktu widzenia ewolucji organizmów degeneracja kodu byłaby czynnikiem stabilizującym i zmniejszałaby częstotliwość mutacji. Bardzo ważną rolę w kodowaniu odgrywa drugorzędowa struktura polinukleotydu (97, 114).

Tablica 1

Tryplety i odpowiadające im aminokwasy (wg 98)

Nr serii	Tryplety	Aminokwasy
1	AAA	Liz
2	UUU	Fen
3	CCC	Pro
4	GGG	—
5	AUU, UAU, UUA	Tyr, Leu, Ileu
6	AGG, GAG, GGA	—, Gli, —
7	ACC, CAC, CCA	His, Pro, Tre
8	UAA, AUA, AAU	AspNH ₂ , Liz, Ileu
9	UGG, GUG, GGU	Try, Gli, —
10	UCC, CUC, CCU	Ser, Pro, Leu
11	GAA, AGA, AAG	Arg, —, Glu
12	GUU, UGU, UUG	Cys, Leu, Wal
13	GCC, CGC, CCG	Arg, —, Ala
14	CAA, ACA, AAC	AspNH ₂ , Tre, GluNH ₂
15	CUU, UCU, UUC	Ser, Fen, Leu
16	CGG, GCG, GGC	—, Gli, —
17	AUG, AGU, UAG	Glu, Met, —
	UGA, GAU, GUA	—, —, Asp
18	AUC, ACU, UAC	His, Tyr, GluNH ₂
	UCA, CAU, CUA	Tre, Ileu, AspNH ₂
19	AGC, ACG, GAC	—, Ser, —
	GCA, CAG, CGA	Asp, Ala, —
20	UGC, UCG, GUC	—, —, Arg
	GCU, CUG, CGU	—, Ala, —

Poli-G odznaczający się dużą zdolnością do tworzenia drugorzędowej struktury nie stymuluje włączania aminokwasów do białka, prawdopodobnie z powodu braku reakcji z rybosomami.

Bardzo ciekawą technikę badania kodu aminokwasowego podali niedawno Nirenberg i Leder (92). Polega ona na reakcji ¹⁴C-aminoacylo-sRNA z trójnukleotydami powiązаныmi z rybosomami izolowanymi z *E. coli*. Przyłączony do rybosomów trójnukleotyd spełnia rolę antykodonu, do którego przyłącza się właściwy sRNA. Za pomocą wspomnianej techniki stwierdzono, że fenyloalanylo-sRNA jest kodowany przez UpUpC i UpUpU, serylo-sRNA — przez UpCpC i UpCpU, a prolilo-sRNA — przez CpCpC i CpCpU. Trypletem dla waliny okazał się GpUpU, cysteiny UpGpU, a leucyny UpUpG. Bernfield i Nirenberg

(11) sugerują, że przyczyną degeneracji kodu może być zmienny końcowy 3'-nukleozyd występujący obok pozostałych dwóch identycznych zasad w trypletach, np. XpYpU i XpYpC. Opisana metoda jest bardzo szybka i dużo nadziei wiąże się z nią w badaniach nad sekwencją zasad w trypletach.

VIII. Uwagi końcowe

Sukcesy współczesnej biochemii kwasów nukleinowych i białek spowodowały, że jesteśmy coraz bliżsi ostatecznego wyjaśnienia skomplikowanego mechanizmu biosyntezy łańcucha polipeptydowego. Najwcześniej poznany etapem biosyntezy białka była aktywacja aminokwasów. Aminokwasy, zaktywowane w obecności ATP i odpowiednich syntetaz aminoacylo-sRNA, przenoszone są następnie na sRNA i przyłączane do niego w pozycji 2', 3' końcowej reszty adenozy. Przeniesienie połączenia aminokwas-sRNA na mRNA katalizowane jest przez enzymy przenoszące, występujące w rozpuszczalnej frakcji białek komórkowych. Wymagana jest tu obecność GTP oraz jonów Mg^{2+} . Ostatnim etapem biosyntezy polipeptydu jest polimeryzacja aminokwasów przebiegająca na mRNA w obecności enzymów polimeryzujących. Struktura aminokwasu decyduje tylko o specyficzności procesu jego aktywacji. Dalsze reakcje związane z umieszczeniem aminokwasu w odpowiednim miejscu polipeptydu zależą już wyłącznie od budowy współdziałających ze sobą sRNA i mRNA. Informacyjny RNA, syntetyzowany na matrycach z DNA, jest czynnikiem determinującym właściwą kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Oznacza to, że informacja genetyczna zawarta w DNA zostaje zakodowana w postaci odpowiedniej sekwencji nukleotydów mRNA, następnie zaś „rozszyfrowana” w procesie reakcji trójnukleotydowego kodonu mRNA z właściwym antykodonem aminoacylo-sRNA. Mechanizm ten zapewnia ścisłą specyficzność syntetyzowanemu białku, a tym samym dziedziczenie cech fizjologicznych i morfologicznych organizmów w następujących po sobie pokoleniach.

Znamy już funkcję dwóch spośród trzech partnerów współpracujących ze sobą podczas syntezy polipeptydu: sRNA i mRNA. Tym trzecim jest rybonukleoproteid zorganizowany w cząstkę zwaną rybosomem. Obecność rybosomów jest konieczna w procesie polimeryzacji aminokwasów, jednak nie wszystko jeszcze wiadomo o ich roli. Wykazują one duże powinowactwo do mRNA, z którym tworzą agregaty (polisomy) uważane za jednostki funkcjonalne w biosyntezie białka. Rybosomy łączą się też z aminoacylo-sRNA, a za jego pośrednictwem z nowo powstającym peptydem. Czy tylko ta mechaniczna niejako funkcja „zbliżania” i przytrzymywania w krytycznym momencie reagujących ze sobą mRNA i aminoacylo-sRNA jest cechą rybosomów — wykażą niewątpliwie badania najbliższych lat.

LITERATURA

1. Abdul-Nour B., Webster G. C., *Exptl. Cell. Res.* **20**, 226 (1960).
2. Allende J. E., Monro P., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1211 (1964).
3. Arlinghaus R., Shaeffer J., Schweet R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1291 (1964).
4. August J. T., Ortiz P. J., Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3786 (1962).
5. Beermann W., Clever U., *Sci. Amer.* **210**, 50 (1964).
6. Belozerski A. N., Spirin A. S., *The Nucleic Acids*, III, Academic Press, New York 1960.
7. Belozerski A. N., Spirin A. S., *Nature* **182**, 111 (1958).
8. Berg P., Lagerkwist U., Dieckmann M., *J. Mol. Biol.* **5**, 159 (1962).
9. Berg P., Sixth Internatl. Congress Biochem., New York 1964, Abstracts I, str. 7.
10. Berg P., *Ann. Rev. Biochem.* **30**, 293 (1961).
11. Bernfield M. R., Nirenberg M. W., *Science* **147**, 479 (1965).
12. Bishop J., Leahy J., Schweet R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **46**, 1030 (1960).
13. Bolton E. T., McCarthy B. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1390 (1962).
14. Brachet J., *The Nucleic Acids*, II, Academic Press, New York 1955.
15. Bremer H., Konrad M. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 801 (1964).
16. Brenner S., *Cold Spring Harbor Symposia* **26**, 101 (1961).
17. Brock T. D., *Fed. Proc.* **23**, 965 (1964).
18. Brown G. L., Zubay G., *J. Mol. Biol.* **2**, 287 (1960).
19. Cannon M., Krug R., Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **7**, 360 (1963).
20. Chamberlin M., Berg P., *J. Mol. Biol.* **8**, 297 (1964).
21. Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weisblum B., Ray W. J., Benzer F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 1086 (1962).
22. Chargaff E., *Essays on Nucleic Acids*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, London, New York 1963.
23. Chargaff E., *The Nucleic Acids I*, Academic Press, New York 1955.
24. Chipchase M. J. H., Birnstiel M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **49**, 692 (1963).
25. Cohn W. E., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 569 (1959).
26. Comb D. G., Katz S., *J. Mol. Biol.* **8**, 790 (1964).
27. Cowden R. R., Lehman H. E., *Growth* **27**, 185 (1963).
28. Cox R. A., Arnstein H. R. W., *Biochem. J.* **83**, 4P (1962).
29. Crampton C. F., Petermann M. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 2642 (1959).
30. Crick F. H. C., *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 138 (1958).
31. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., *Nature* **192**, 1227 (1961).
32. Davies J., Gilbert W., Gorini L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 883 (1964).
33. Dintzis H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 247 (1961).
34. Doctor B. P., Apgar J., Holley R. W., *J. Biol. Chem.* **236**, 1117 (1961).
35. Dunn D. B., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 286 (1959).
36. von Ehrenstein G., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 941 (1961).

37. von Ehrenstein G., Dais D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **50**, 81 (1963).
38. Elson D., Protein Biosynthesis (R. J. C. Harris, ed.), Academic Press, London 1961, str. 291.
39. Erdos T., Ullmann A., *Nature* **192**, 633 (1959).
40. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Williams R. C., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 87 (1957).
41. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P., *Nature* **188**, 98 (1960).
42. Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **6**, 389 (1963).
43. Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **6**, 374 (1963).
44. Goldstein A., Brown B. J., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 438 (1961).
45. Goldstein J., Bennett T. P., Craig L. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51** 119 (1964).
46. Goldberg J. H., Reich E., *Fed. Proc.* **23**, 958 (1964).
47. Goodman H. M., Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 2101 (1962).
48. Goswami P., Barr G. C., Munro H. N., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 408 (1962).
49. Gros F., *The Nucleic Acids*, III, Academic Press, New York 1960.
50. Grunberg-Manago M., Ortiz P. J., Ochoa S., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 269 (1956).
51. Hahn F. E., Wolfe A. D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 464 (1962).
52. Hall B. D., Spiegelmann S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 137 (1961).
53. Hanawalt P. C., Maaløe O., Cummings D. J., Schaechter M., *J. Mol. Biol.* **3**, 156 (1961).
54. Hecht L. J., Stephenson M. L., Zamecnik P. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 505 (1959).
55. Henshaw E. C., Bojarski T. B., Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **7**, 122 (1963).
56. Hershko A., Amoz S., Mager J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**, 46 (1961).
57. Hoagland M. B., Zamecnik P. C., *Fed. Proc.* **16**, 197 (1957).
58. Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Symposium on Molecular Biology, Ed. Raymond E. Zirkle, University of Chicago Press, 1959.
59. Holley R. W., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Zamir T., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 9.
60. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Merrill S. H., Penswick J. R., Zamir A., *Science* **147**, 1462 (1965).
61. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
62. Jacob F., Wollman E. L., Sexuality and the Genetics of Bacteria Academic Press, New York, London 1961.
63. Kashket S., Tave J. L., Beck W. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 435 (1960).
64. Keller E. B., Zamecnik P. C., *J. Biol. Chem.* **221**, 45 (1956).
65. Kłopotowski T., *Post. Biochem.* **8**, 421 (1962).
66. Kornberg A., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 15.
67. Kornberg A., Zimmermann S. B., Kornberg S. R., Josse J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 772 (1959).
- 67a. Kwiatkowska J., *Post. Biochem.* **11**, 267 (1965).
68. Lagerkvist U., Waldenstrom J., *J. Mol. Biol.* **8**, 28 (1964).
69. Langridge L., Gomatatos P. J., *Science* **141**, 694 (1963).

70. Lipmann F., Bennett P. T., Conway T. W., Goldstein J., Nakamoto T., Spyrides G. J., *New Perspectives in Biology*, B. B. Acta Library, Volume 4, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1964, str. 69.
71. Littauer U. Z., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 11.
72. Littauer U. Z., *Protein Biosynthesis*, Ed. R. J. C. Harris, Academic Press London 1961, str. 143.
73. Lucas J. M., Schüürs A.H.W.M., Simpson M.V., *Fed. Proc.* **22**, 302 (1963).
74. Luzzati V., Mathis A., Masson F., Witz J., Sixth Internatl. Congress Biochem., New York 1964, Abstracts I, str. 13.
75. Lyttleton J.W., *Nature* **187**, 1026 (1960).
76. Maaløe O., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 17.
77. Maaløe O., Hanavalt P. C., *J. Mol. Biol.* **3**, 144 (1961).
78. Marmur J., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 21.
79. Martin R., *Cold Spring Harbor Symp.* **28**, 357 (1963).
80. Matsubara K., Takai M., Takagi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 372 (1963).
81. McCarthy B. J., Bolton E. T., *J. Mol. Biol.* **8**, 184 (1964).
82. McCarthy B. J., Bolton E. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **50**, 156 (1963).
83. McCully K. S., Cantoni G. L., *J. Mol. Biol.* **5**, 80 (1962).
84. McCully K. S., Cantoni G. L., *J. Mol. Biol.* **5**, 497 (1962).
85. Meselson M., Stahl F. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 671 (1958).
86. Midgley J.E.M., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 513 (1962).
87. Nathans D., *Fed. Proc.* **23**, 984 (1964).
88. Nathans D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 585 (1964).
89. Nathans D., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 497 (1961).
90. Nihei T., Cantoni G. L., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 493 (1962).
91. Nirenberg M. W., Matthaei J.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1588 (1961).
92. Nirenberg M. W., Leder P., *Science* **145**, 1399 (1964).
93. Nomura M., Hall B. D., Spiegelman S., *J. Mol. Biol.* **2**, 306 (1960).
94. Norris A. T., Berg P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **52**, 330 (1964).
95. Nygaard A. P., Hall B. D., *J. Mol. Biol.* **9**, 125 (1964).
96. Ochoa S., *Fed. Proc.* **22**, 62 (1963).
97. Ochoa S., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 35.
98. Ochoa S., *Bull. New York Acad. Medicine*, Second Ser., **40**, 387 (1964).
99. Ochoa S., Weismann Ch., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., *Fed. Proc.* **23**, 1285 (1964).
100. Olenick J. G., Hahn F. E., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 535 (1964).
101. Palade G. E., Siekevitz P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 171 (1956).
102. Pardee A. B., Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **1**, 165 (1959).
103. Pauling L., Corey R. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 164 (1956).
104. Peterman M. L., Pavlovic A., *J. Biol. Chem.* **238**, 3717 (1963).
105. Peterman M. L., *The Physical and Chemical Properties of Ribosomes*, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1964.
106. Revel M., Hiatt H. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 810 (1964).
107. Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **46**, 1044 (1960).
108. Rich A., *Sci. Amer.* **209**, 44 (1963).

109. Rich A., Penman S., Becker Y., Darnell J., Hall C., *Science* **142**, 1658 (1963).
110. Richardson C. C., Inman R. B., Kornberg A., *J. Mol. Biol.* **9**, 46 (1964).
111. Roane P.R.J., Roizman B., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 168 (1964).
112. Roberts R. B., *Microsomal Particles and Protein Synthesis*, Pergamon Press, Oxford 1958.
113. Rosenberg B. H., Cavalieri L. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 826 (1964).
114. Shugar D., Szer W., Sixth Internatl. Congress Biochem., New York, 1964, Abstracts I, str. 5.
115. Singer M.F., Cantoni G.L., *Biochem. Biophys. Acta* **39**, 182 (1960).
116. Sinsheimer R. L., Starman B., Nagler C., Guthrie S., *J. Mol. Biol.* **4**, 142 (1962).
117. So A.G., Davie E.W., *Biochemistry* **2**, 132 (1963).
118. Spahr P.F., *J. Mol. Biol.* **4**, 395 (1962).
119. Spahr P. F., Hollingworth B. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 823 (1961).
120. Spiegelman S., *Sci. Amer.* **210**, 48 (1964).
121. Spirin A. S., Kisselev N. A., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 32.
122. Spyrides G. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1220 (1964).
123. Spyrides G. J., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1977 (1962).
124. Srinivasan P.R., Borek E., *Science* **145**, 548 (1964).
125. Stent G.S., *Science* **144**, 816 (1964).
126. Szafranski P., *Post. Biochem.* **5**, 67 (1959).
127. Szafranski P., Klita S., *Acta Biochim. Polon*, **11**, 61 (1964).
128. Szafranski P., Lutowicz J., Pużyńska L., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 71 (1964).
129. Szafranski P., Lane B. G., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 141 (1962).
130. Szafranski P., Perzyński S., Krasicka B., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 159 (1964).
131. Takagi Y., Matsubara K., Shimada K., Hori K., Anai M., Morisawa S., Sixth Internatl. Congress Biochem. New York 1964, Abstracts I, str. 19.
132. Takanami M., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 318 (1960).
133. Takanami M., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 132 (1962).
134. Takanami M., Zubay G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 834 (1964).
135. Tissières A., Schlessinger D., Gros F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **46**, 1450 (1960).
136. Trakatellis A.C., Axelrod A.E., Montjar M., *J. Biol. Chem.* **239**, 4237 (1964).
137. Ts'o P.O.P., Bonner J., Vinograd J., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 570 (1958).
138. Volkin E., Astrachan L., Countryman J. L., *Virology* **6**, 545 (1958).
139. Waller J.P., Harris J.I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 18 (1961).
140. Warner J. R., Knopf P. M., Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **49**, 122 (1963).
- 140a. Wartak J., *Post. Biochem.* **9**, 367 (1963).
141. Watson J.D., Crick F.H.C., *Nature* **171**, 964 (1953).
142. Weisberger A.S., Wolfe S., *Fed. Proc.* **23**, 976 (1964).
143. Weis's S.B., Nakamoto T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1400 (1961).
144. Wilkins M.H.F., Stokes A.R., Wilson H.R., *Nature* **171**, 738 (1953).

145. Wolfenden R., Rammler D.H., Lipmann F., *Biochemistry* **3**, 329 (1964).
146. Yarmolinsky M.B., De La Haba, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **44**, 885 (1958).
147. Zillig W., Schachtschabel D., Krone W. Z., *Z. Physiol. Chem.* **318**, 100 (1960).
148. Zinder N. D., *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*, 1963, str. 173.
149. Zinder N.D., *Sixth Internatl. Congress Biochem., Biochemical Genetics* New York, 1964, str. 222.
150. Zubay G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **48**, 456 (1962).

ADDENDUM

W trakcie druku tego artykułu ukazała się praca Nirenberga i innych (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **53**, 1161, 1965) zawierająca sekwencję nukleotydów w 64 trypletach, z których 45 przebadano eksperymentalnie, a pozostałe przewidziano. Dalsze prace Nirenberga potwierdziły przewidywania teoretyczne. Obecnie już sekwencja 62 trypletów została potwierdzona eksperymentalnie (Nirenberg — osobiste doniesienie). Pozostały jeszcze do potwierdzenia tryplety GpGpA i GpGpG dla glicyny. Niektóre tryplety posiadają albo słabą aktywność w stosunku do aminokwasów, albo nie posiadają jej wcale i mogą być uważane za nonsensowne. Nie jest jednak wykluczone, że tryplety nonsensowne na końcu łańcucha RNA mogą być odczytywane przez odpowiednie aminoacylo-sRNA wewnątrz łańcucha.

P. S. i S. K.

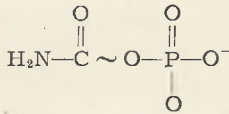
KAZIMIERZ KLECZKOWSKI*

Drogi syntezy i rola metaboliczna karbamoilofosforanu

Synthesis and Metabolic Role of Carbamoylphosphate

Biosynthesis and metabolic significance of carbamoylphosphate in animals and plant are discussed.

Przed przeszło 30 laty Krebs i Henseleit (26) wykazali katalityczną rolę cytruliny w syntezie mocznika. Potrzeba było jednak 20 lat badań do stwierdzenia (18), że donorem grupy karbamoilowej w syntezie cytruliny z ornityny jest karbamoilofosforan (CP) (I). W 1955 roku w pracowni Lipmanna (17) otrzymano na drodze syntezy chemicznej sól dwulitową karbamoilofosforanu zawierającą 60—80% czystego składnika. W pięć lat później Metzberg, Marshall i Cohen (37) opracowali metodę preparatyki chemicznie czystego, krystalicznego karbamoilofosforanu w postaci soli dwuamonowej i dwusodowej.



I

Związek ten zawiera wysokoenergetyczne wiązanie fosforanowe, którego energia jest wykorzystywana w szeregu biologicznie ważnych przemian komórki. Występuje on w warunkach fizjologicznych w postaci dwuanionu. Wysokoenergetyczne wiązanie karbamoilofosforanu, jak wykazały badania Jones i Lipmanna (19), jest o około 1,8 kkal wyższe od końcowego wiązania fosforanowego ATP. Własność ta może tłumaczyć łatwość, z jaką przebiega synteza ATP z karbamoilofosforanu i ADP w obecności kinazy karbaminianowej — enzymu występującego u szeregu mikroorganizmów. Karbamoilofosforan jest bodaj jedynym znanym niskocząsteczkowym związkiem o tak wysokiej energii wiązania fosforanowego, który można otrzymać na drodze chemicznej syntezy z nieorga-

* Doc., dr, docent Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

Stosowane skróty: CP — karbamoilofosforan, AcGlu — N-acetylglutaminian.

nicznych składników. Poza tym biosynteza karbamoilofosforanu jest jedyną w swoim rodzaju przemianą, która łączy w sobie wiązanie CO_2 i NH_3 z równoczesną syntezą związku bogatego w energię.

Można przypuszczać, że wykrycie chemicznej syntezy karbamoilofosforanu z nieorganicznych składników może w przyszłości odegrać istotną rolę w wyjaśnieniu dróg syntezy złożonych związków organicznych, które mogły dać początek pierwotnym najprostszym organizmom żywym na naszej planecie.

I. Drogi syntezy enzymatycznej

Poznano kilka dróg biosyntezy karbamoilofosforanu, zachodzącej przy udziale różnych substratów i katalizowanej przez różne enzymy. Substratem reakcji katalizowanej przez kinazę karbaminianową jest kwas karbaminowy, przez syntetazę karbamoilofosforanu — dwutlenek węgla i amoniak. Enzymy biorące udział w biosyntezie karbamoilofosforanu z innych substratów: asparaginy, puryn i kreatyniny nie zostały dotychczas wydzielone.

1. Kinaza karbaminianowa (fosfotransferaza ATP: karbaminian EC 2.7.2.2.)

Występowanie kinazy karbaminianowej stwierdzili po raz pierwszy w 1955 roku Jones, Spector i Lipman (17, 18) u *Streptococcus faecalis*. Chemiczna synteza karbamoilofosforanu i wykrycie tego enzymu umożliwiły identyfikację tzw. „związku X”, wyizolowanego w 1952 roku przez Cohena i współpracowników (11) w trakcie badań nad syntezą cytruliny z ornityny w preparatach z wątroby bydłowej. Do syntezy karbamoilofosforanu przy udziale kinazy karbaminianowej niezbędna jest obecność karbaminianu, ATP i jonów magnezu. Przemiana ta, przedstawiona równaniem 1, jest odwracalna i równowaga jej jest przesunięta w kierunku syntezy ATP (4, 18, 19). Własność tę wykorzystuje się przy stosowaniu układów wymagających systemu regenerującego ATP (16, 38), jak również do otrzymywania znakowanych pochodnych nukleotydowych wychodząc z ^{32}P -karbamoilofosforanu (38).



Kinaza karbaminianowa występuje i u innych mikroorganizmów, jak np. *Streptococcus lactis* (40), *Serratia marcescens* (9), *Pseudomonas*, *Clostridium*, w drożdżach, *Nostoc muscorum* i *Neurospora* (6).

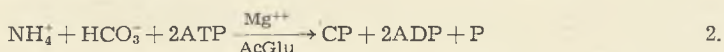
Z *Serratia marcescens* i *Streptococcus faecalis* otrzymano częściowo oczyszczone preparaty kinazy karbaminianowej (9, 38, 40). Mimo stosunkowo prostej procedury otrzymywania, brak jednak dotychczas systematycznych danych o fizycznych i kinetycznych własnościach tego enzymu.

Stwierdzono stabilizujący wpływ 0,5 M roztworu siarczanu amonowego na częściowo oczyszczony preparat kinazy karbaminianowej (40). Enzym zinktywowany w czasie dializy reaktywuje się w środowisku 0,5 M siarczanu amonowego i jest bardziej odporny na ogrzewanie w temperaturze do 60°. Czynnikiem stabilizującym są jony siarczanowe. Optymalne warunki dla działania kinazy karbaminianowej są następujące: *pH* w granicach 8,5—8,8 dla syntezy karbamoilofosforanu i 7,4 dla reakcji w kierunku odwrotnym, stężenie jonów magnezu od 1×10^{-3} do 2×10^{-3} M, ATP 4 μ M, NaHCO₃ 50 μ M, NH₄Cl 100 μ M (4).

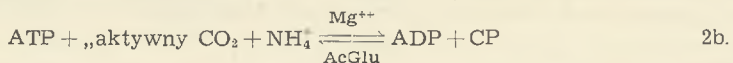
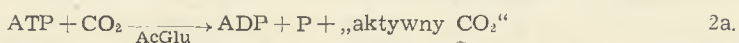
2. Syntetaza karbamoilofosforanu (fosforansferaza ATP: karbaminian (defosforylująca) EC 2.7.2.5.)

Syntetaza karbamoilofosforanu została wykryta przez Cohena i współpracowników (5, 10) w wątrobie ssaków dużo wcześniej niż kinaza karbaminianowa. Nie zdołano jednak wówczas zidentyfikować powstającego produktu, stwierdzono jedynie, że do syntezy cytruliny z ornityny w preparatach z wątroby ssaków niezbędna jest poza ornityną obecność amoniaku, jonów węglanowych, magnezu, ATP i specyficznej pochodnej kwasu glutaminowego, która później okazała się N-acetyloglutaminianem (AcGlu),

Po wykryciu w 1955 roku kinazy karbaminianowej i otrzymaniu syntetycznego karbamoilofosforanu (17) grupa Cohena rozpoczęła systematyczne badania nad mechanizmem syntezy tego związku u zwierząt ureotelicznych. Wynikiem tych badań było stwierdzenie, że droga syntezy karbamoilofosforanu u tych zwierząt różni się od drogi stwierdzonej przez grupę Lipmanna u mikroorganizmów (35). W odróżnieniu od reakcji katalizowanej przez kinazę karbaminianową, reakcja katalizowana przez syntetazę karbamoilofosforanu zużywa 2 mole ATP i wymaga obecności N-acetyloglutaminianu. L-Glutaminian, α -ketoglutaran, glutaran i L-2-hydroksyglutaminian są w tym układzie współzawodniczymi inhibitorami N-acetyloglutaminianu (7). Syntezę tę można przedstawić równaniem 2.



Wykazano również, że synteza ta jest dwustopniowa i zaproponowano następujący schemat przemian (równania 2a i 2b) (35).



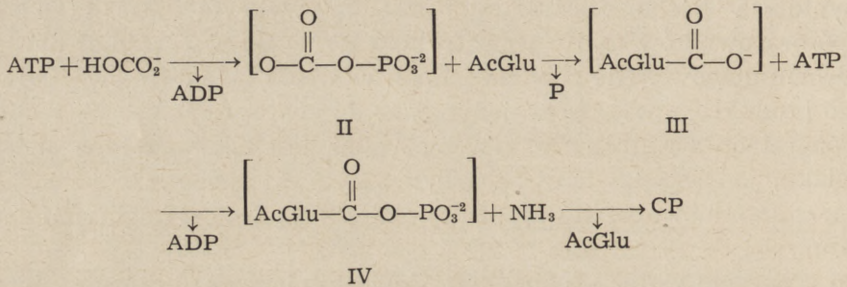
Jak widać reakcja 2a jest nieodwracalna, a reakcja 2b — odwracalna, wymaga jednak do przebiegu w kierunku odwrotnym 50-krotnie wyższego stężenia enzymu.

Aktywatorami syntezy karbamoilofosforanu w preparatach i tkankach

zwierzęcych mogą być N-acetylo-, N-chloroacetylo-, N-karbamoilo-, N-propionnylo- i N-formylo-pochodne kwasu glutaminowego, jednakże jedynym naturalnie występującym aktywatorem tej syntezy jest N-acetyloglutaminian (14).

Zarówno mechanizm syntezy karbamoilofosforanu w obecności syntezy karbamoilofosforanu, jak i katalityczna rola N-acetyloglutaminianu w tej przemianie nie zostały dotąd dokładnie wyjaśnione.

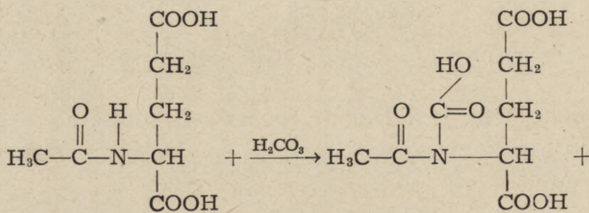
Zastosowanie ^{18}O -wody i ^{18}O -kwaśnego węgla (20, 36, 44) wykazało, że bezpośrednim donorem atomu tlenu grupy fosforanowej karbamoilofosforanu nie jest ^{18}O -wody, lecz raczej jonu węglanowego. Na podstawie tych wyników Jones (21) proponuje mechanizm syntezy karbamoilofosforanu, podany na schemacie 1.



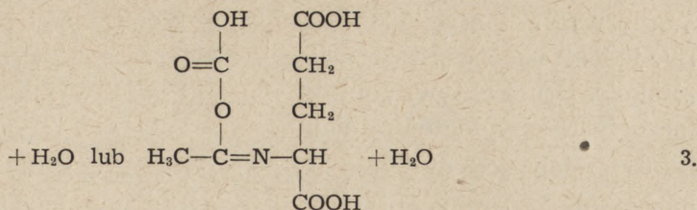
Schemat 1. Mechanizm syntezy karbamoilofosforanu (wg 21)

W tym ciągu reakcji karboksyacetyloglutaminian (III) jest według Jones (21) hipotetycznym związkiem pośrednim przemian, w których najpierw ma miejsce fosforylacja dwuwęgla przy udziale ATP do karboksylosforanu (II) i ADP, przy czym bezwodnikowy atom tlenu pochodzi z węglanu. Drugim etapem tej przemiany jest przeniesienie reszty węglanowej na N-acetyloglutaminian z uwolnieniem ortofosforanu. Powstały karboksyacetyloglutaminian (III) w trzecim etapie wymagającym udziału drugiej cząsteczki ATP ulega fosforylacji do hipotetycznej pochodnej fosforanowej karboksyacetyloglutaminianu (IV), która ulega amonolizie z wytworzeniem karbamoilofosforanu i uwolnieniem acetyloglutaminianu.

Jones i Spector (20) sugerują, że „aktywny CO_2 ” pojawiający się w pierwszym etapie syntezy mógłby mieć budowę V lub VI i powstawać zgodnie z równaniem 3.



V

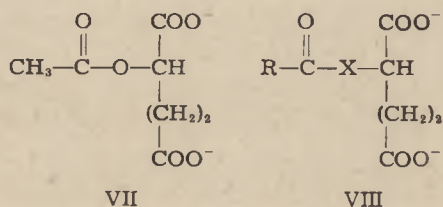


VI

W związku V przyłączenie węglanu następowałoby do atomu azotu amidowego, w związku VI — do atomu tlenu reszty acetylowej N-acetyloglutaminianu.

W inny sposób niż Jones i Spector tłumaczą udział N-acetylopochodnych w reakcji katalizowanej przez syntezę karbamoilofosforanu Schooler, Fahien i Cohen (46). Stwierdzili oni, że 2-acetoksyglutaran (VII) jest równie dobrym aktywatorem tej syntezy jak i acetyloglutaminian, jakkolwiek nie zawiera atomu azotu. Fakt ten wyklucza udział związku o budowie V proponowanego przez Jones i Spector.

Z badań kinetycznych wynika, że związek aktywujący syntezę karbamoilofosforanu musi zawierać łańcuch pięciowęglowy glutaranu z zacylowanym podstawnikiem w położeniu α w stosunku do jednej z grup karboksylowych. Ogólną strukturę aktywatora Fahien, Schooler, Gehrad i Cohen (7) przedstawiają wzorem VIII.



Jedynie L-izomery mogą być aktywatorem. Aktywność i stopień związania enzymu z aktywatorem wzrasta, jeśli R jest grupą metylową. Jeśli R jest grupą aminową jak np. w karbamoiloglutaminianie, to związek jest aktywny, ale wartość K_m wzrasta, podczas gdy wartość V_{max} maleje. Jeśli R jest $\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-$ jak w glicyloglutaminianie, to związek taki jest inhibitorem syntezy karbamoilofosforanu ze stałą inhibicji popównywalną z K_m karbamoiloglutaminianu. Jeśli X jest atomem tlenu jak w przypadku 2-acetoksyglutaranu, obserwuje się wzrost wartości K_m w porównaniu z reakcją z N-acetyloglutaminianem. Jest to jedyna wykrywalna zmiana w reaktywności obu tych związków w reakcji katalizowanej przez syntezę karbamoilofosforanu.

W dalszych badaniach kinetycznych nad syntezą karbamoilofosforanu z wątroby żaby Fahien i Cohen (8) stwierdzili, że w enzymie tym występują dwa różne kinetycznie aktywne punkty wiązania ATP.

W pierwszym z nich ATP wiąże się w nieobecności N-acetyloglutaminianu, jednak obecność tego związku zwiększa stałą dysocjacji ATP w tym punkcie. Drugi aktywny punkt wiązania ATP wymaga uprzedniego przyłączenia N-acetyloglutaminianu.

Przemiana jednej cząsteczki ATP do ADP w syntezie jednej cząsteczki karbamoilofosforanu przy udziale syntetazy karbamoilofosforanu ma miejsce w czasie aktywacji węglanu, drugiej — w czasie fosforylacji „aktywnego CO₂”. Jony amonowe hamują pierwszą przemianę, a przyspieszają drugą. W obecności jonów amonowych stała Michaelisa wiązania N-acetyloglutaminianu ma tę samą wartość liczbową co stała dysocjacji kompleksu enzym-acetyloglutaminian, a stała Michaelisa wiązania ATP w pierwszym aktywnym punkcie (aktywacja CO₂) jest równa wartości stałej dysocjacji kompleksu enzym-ATP. W nieobecności jonów amonowych stała Michaelisa dla ATP w obu aktywnych punktach są identyczne.

Jeszcze inną interpretację udziału N-acetyloglutaminianu w reakcji zachodzącej przy udziale syntetazy karbamoilofosforanu wysunęła w 1961 roku grupa C o h e n a (30). Przypuszczają oni, że związek ten nie uczestniczy w przemianie jako przejściowy substrat, lecz aktywuje syntetazę karbamoilofosforanu drogą indukcji zmian konformacyjnych trzeciorzędowej struktury enzymu z formy nieaktywnej w aktywną.

Najlepszym źródłem syntetazy karbamoilofosforanu jest wątroba żaby (29). Enzym ten otrzymany z wątroby bydłowej jest bardzo labilny i trudny do oddzielenia od innych enzymów, a szczególnie miokinazy, która przeszkadza w badaniach kinetycznych (34). Toteż badania fizycznych i chemicznych własności syntetazy karbamoilofosforanu prowadzono głównie na enzymie z wątroby żaby, oczyszczonym w 90% (7, 8, 30). Tak oczyszczona syntetaza karbamoilofosforanu ma stałą sedymentacji S_{20w} równą 11,2, punkt izoelektryczny w pH 6,5, masę cząsteczkową 315 000. Z masy cząsteczkowej i maksymalnej specyficznej aktywności wyliczono, że aktywność molekularna jest równa 840 moli syntetyzowanego karbamoilofosforanu na mol enzymu w ciągu 1 minuty w 37° (30). Obliczono, że mol enzymu wiąże około 0,03 mola L-N-acetyloglutaminianu. Stosując hydroksybenzoesan rtęciowy wykazano obecność 41—44 grup SH na mol enzymu. Preinkubacja z acetyloglutaminianem lub karbamoiloglutaminianem zmniejsza hamujący aktywność enzymu wpływ hydroksybenzoesanu rtęciowego. Obecność jonów K⁺ w mieszaninie inkubacyjnej zwiększa powinowactwo syntetazy karbamoilofosforanu do jonów NH₄⁺, co ma fizjologiczne uzasadnienie, związane ze stosunkowo niskim poziomem amoniaku w wątrobie i jego toksycznością dla organizmu. Optimum pH dla syntetazy karbamoilofosforanu z wątroby żaby wynosi 7,2—7,4.

3. Syntetaza karbamoilofosforanu wymagająca obecności L-glutaminy jako donora azotu

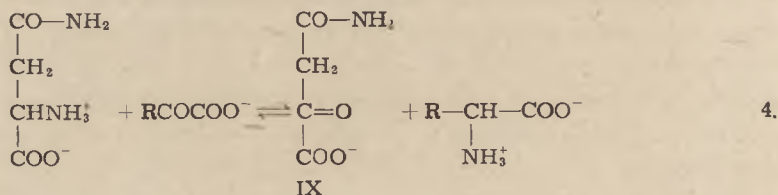
W 1962 roku Levenberg (27) wykazał, że specyficznym donorem azotu w syntezie grupy karbamoilowej cytruliny u *Agaricus bisporus* jest L-glutamina. To samo stwierdził Kleczkowski (24, 25) badając drogę biosyntezy grupy karbamoilowej cytruliny w homogenatach z kiełków grochu oraz w wyciągach z proszków acetonowych otrzymanych z kiełków grochu.

Na podstawie wyżej przytoczonych danych należało przyjąć możliwość występowania trzeciej drogi syntezy karbamoilofosforanu, w której specyficznym donorem azotu jest grupa amidowa L-glutaminy. Droga ta jest typowa dla wyższych grzybów (27) oraz jak wykazały badania Kleczkowskiego (25) również dla roślin wyższych. Enzym biorący udział w tej przemianie nazwano również syntetazą karbamoilofosforanu (21).

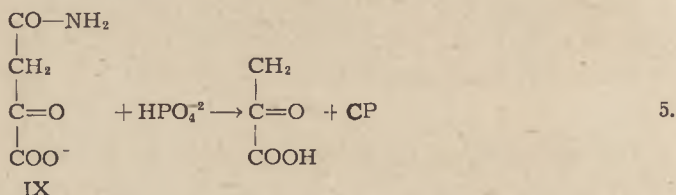
Nie stwierdzono zasadniczych różnic w zapotrzebowaniu na substraty i aktywatory dla preparatów syntetazy karbamoilofosforanu z grzybów i roślin wyższych. Optimum pH dla enzymu z obu źródeł mieści się w granicach pH 7,4-7,7, D-glutamina nie może zastąpić L-formy. W badaniach Levenberga (27) z preparatem z *A. bisporus* w optymalnym pH , aktywność syntezy cytruliny przy udziale jonu amonowego wynosiła zaledwie 1/16 aktywności otrzymywanej przy udziale L-glutaminy, zaś L-asparagina, jak również pochodne L-glutaminy nie brały udziału w tej reakcji. W podobnych badaniach na wyciągach z proszku acetonowego otrzymanego z kiełków grochu (25) stwierdzono, że L-asparagina wykazuje 30% aktywności L-glutaminy, a jon amonowy 9—12%. Amidy kwasu benzoowego, mrówkowego i bursztynowego nie mogą zastąpić L-glutaminy. Optymalne stężenie L-glutaminy dla enzymu roślinnego wynosi 10 $\mu M/ml$. Wyższe od optymalnego stężenie L-glutaminy nie wpływa na szybkość reakcji. Dla aktywności obu preparatów niezbędna jest obecność jonów Mg^{++} . Ich optymalne stężenie dla preparatu z roślin wynosi 15 $\mu M/ml$, zaś inne dwuwartościowe kationy w tym stężeniu dają: Mn^{++} — 25%, Co^{++} — 13%, Ni^{++} — ślady, $Mg^{++} + Co^{++}$ — 50% aktywności w porównaniu z Mg^{++} (25). W preparacie z *A. bisporus* jony Co^{+} w stężeniu $6 \times 10^{-3} M$ zwiększają dwukrotnie aktywność syntezy cytruliny w porównaniu z jonami Mg^{++} , jony Fe^{++} dają 45%, jony Mn^{++} — 15% aktywności, a jony Ca^{++} , Ni^{++} i Zn^{++} nie aktywują wcale enzymu (27). Poza tym w przeciwieństwie do preparatu roślinnego jony F^{-} znacznie stabilizują enzym z *A. bisporus*. Jak wynika z badań Levenberga (27) żaden ze znanych nukleotydów trójfosforanowych nie może zastąpić ATP w tej przemianie.

4. Inne możliwe drogi

Wykazano, że asparagina zdolna jest reagować z α -ketokwasem dając w wyniku kwas α -ketobursztynamowy (IX) zgodnie z równaniem 4.

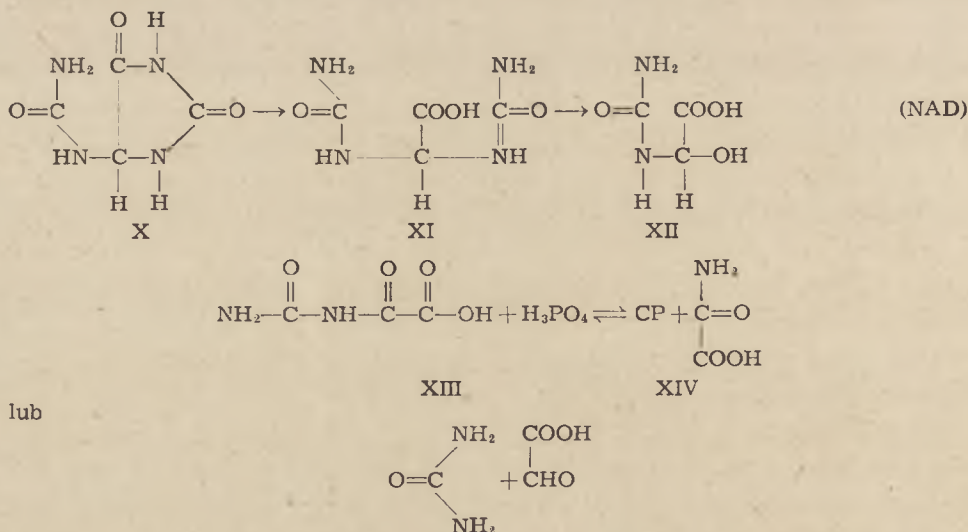


Cohen (6) sugeruje możliwość fosforolitycznego rozpadu kwasu α -ketobursztynamowego do pirogronianu i karbamoilofosforanu według równania 5.



Pirogronian może być przekształcony w szczawiooctan, a ten z kolei w asparaginian. W ten sposób istniałaby cykliczna przemiana, która mogłaby służyć do regeneracji karbamoilofosforanu z CO_2 i amoniaku. Sugestia ta wymaga jednak eksperymentalnego potwierdzenia.

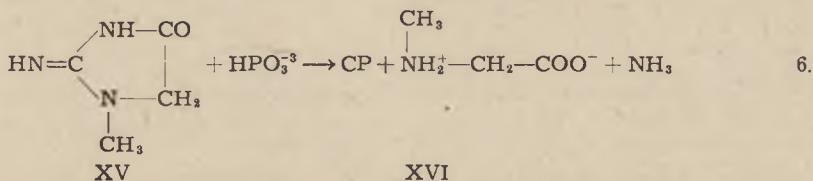
Valentine i Wolfe (49, 50) podają, że *Streptococcus allantoicus* zdolny jest rozkładać allantoinę (X) do karbamoilofosforanu i kwasu oksamowego (XIV) (schemat 2). Produktami pośrednimi byłyby: kwas allantoinowy (XI), glioksyloczynnik (XII) i kwas karbamoilooksamowy (XIII).



Schemat 2. Mechanizm rozkładu allantoiny do karbamoilofosforanu i kwasu oksamowego (wg 49, 50)

Możliwość fosforolitycznego rozpadu kwasu karbamoilooksamowego (oksalurowego) do karbamoilofosforanu stwierdzono w szeregu tkanek włącznie z wątrobą gołębia i szczupaka (6). Nie wykryto tej przemiany w tkankach ssaków. Jeśli się uwzględni, że ani w wątrobie gołębia, ani też szczupaka nie udało się wykryć kinazy karbaminianowej ani też syntetazy karbamoilofosforanu (48), a wykryto aktywną karbamoilotransferazę asparaginianową, to synteza karbamoilofosforanu na drodze rozkładu kwasu moczowego poprzez allantoinę nabiera szczególnego znaczenia dla tych organizmów. Tą drogą bowiem są one zdolne do zabezpieczenia syntezy kwasu karbamoiloasparaginowego, niezbędnego ogniwa w syntezie pirymidyn.

Szulmajster (48) stwierdził, że wyciągi z *Eubacterium sarcosinogenum* są zdolne rozkładać kreatyninę (XV) z wytworzeniem karbamoilofosforanu i sarkozyny (XVI) zgodnie z równaniem 6.

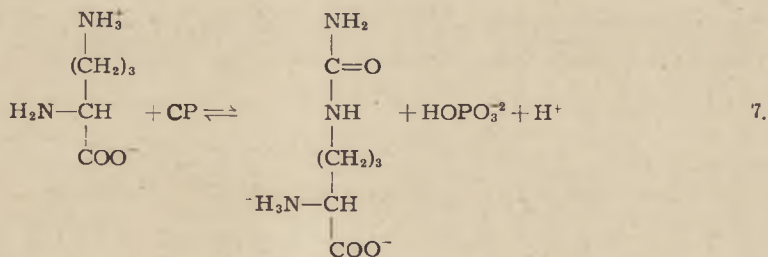


Pośrednie stopnie przemiany nie zostały dotąd wykryte, stwierdzono jednak, że atom węgla grupy guanidynowej kreatyniny zostaje wbudowany do karbamoilofosforanu.

Kleczkowski (24) sugeruje możliwość udziału mocznika w syntezie karbamoilofosforanu. Działaniem ureazy ulegałby on rozkładowi do amoniaku i karbaminianu, a ten z kolei mógłby ulegać fosforylacji w reakcji podobnej do reakcji syntezy karbamoilofosforanu katalizowanej przez kinazę karbaminianową. Sugestia ta wymaga eksperymentalnego potwierdzenia.

II. Rola w metabolizmie

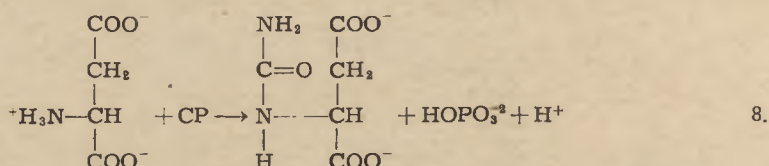
Jak już wspomniano karbamoilofosforan jest donorem grupy karbamoilowej w syntezie szeregu związków. Enzymy uczestniczące w tych przemianach nazwano karbamoilotransferazami. Pierwszym wykrytym enzymem z tej grupy jest karbamoilotransferaza ornitynowa (karbamoilotransferaza karbamoilofosforan:L-ornityna EC 2.1.3.3) katalizująca syntezę cytruliny zgodnie z równaniem 7 (3, 11, 43).



Enzym ten wykryto u zwierząt ureotelicznych (2), roślin (23, 45) i mikroorganizmów (6). Nie stwierdzono jego obecności w wątrobie ptaków, większości ryb i gadów (6).

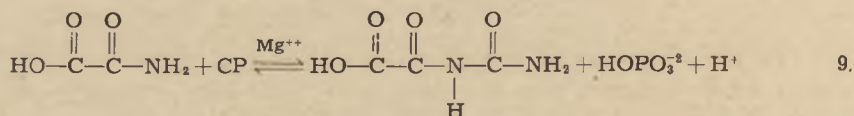
Cytrulina jest związkami pośrednim w cyklu ornitynowym — ważnym ogniwie ogólnej przemiany azotowej u zwierząt ureotelicznych, za pośrednictwem którego organizm wydala nadmiar niezmetabolizowanego, toksycznego dla organizmu amoniaku w postaci mocznika (22). Jest również ogniwem cyklu ornitynowego u roślin odgrywającego w tych organizmach inną rolę niż u zwierząt (24). Jest wreszcie substratem w syntezie argininy, będącej składnikiem białek.

Drugim niemniej istotnym enzymem z tej grupy jest karbamoilotransferaza asparaginianowa (karbamoilotransferaza karbamoilofosforan:L-asparaginian EC 2.1.3.2), która przenosi grupę karbamoilową na kwas L-asparaginowy według równania 8.



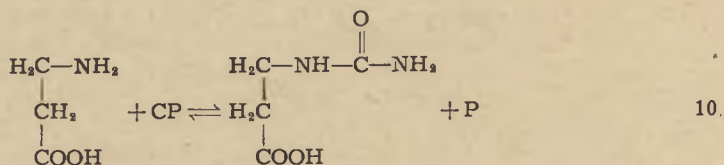
Wytworzony karbamoiloasparaginian jest prekursorem kwasu orotowego, ważnego ogniwa na drodze syntezy pirymidyn (41, 52). Karbamoilotransferaza asparaginianowa jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w świecie organizmów żywych (6, 31). Shepherdson i Pardee (47) otrzymali ją w postaci krystalicznej z indukowanego szczepu *E. coli*.

Enzym przenoszący grupę karbamoilową z karbamoilofosforanu na kwas oksamowy z wytworzeniem kwasu karbamoilooksamowego wyizolowali Valentine i Wolfe (49, 50) z *Streptococcus allantoicus* (równanie 9).



W przeciwieństwie do karbamoilotransferazy asparaginianowej i ornitynowej enzym ten wymaga obecności jonów Mg^{++} (50).

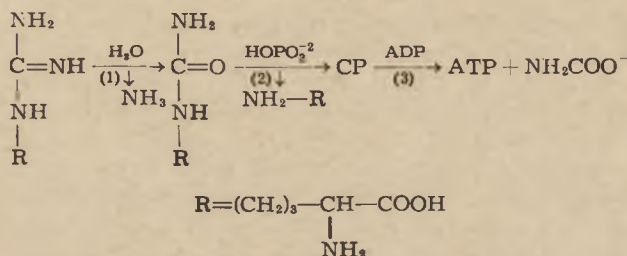
Karbamylację β -alaniny do kwasu β -ureidopropionowego (karbamoilo- β -alaniny) wykazali Grisolia i Wallach (12) w mitochondriach wątroby szczura oraz wyciągach bakteryjnych. (równanie 10).



Poza karbamoilotransferazą asparaginianową, dla której nie wykazano możliwości odwracalnej reakcji, wszystkie omówione transferazy zdolne są katalizować zarówno syntezę związków karbamoilopochodnych z karbamoilofosforanu i odpowiedniego akceptora grupy karbamoilowej, jak również rozkładać te związki do produktów wyjściowych. Własność ta ma bardzo istotne znaczenie dla szeregu mikroorganizmów zawierających kinazę karbaminianową.

Jak już wspomniano kinaza karbaminianowa ma przesuniętą równowagę zarówno kinetycznie, jak i termodynamicznie w kierunku syntezy ATP (19), co umożliwi mikroorganizmom zawierającym ten enzym wykorzystanie do syntezy ATP z ADP energii karbamoilofosforanu powstałego w wyniku rozpadu związków karbamoilowych, takich jak cytrulina, kwas karbamoilooksamowy i karbamoilo- β -alanina.

Wykorzystując ten mechanizm *Streptococcus faecalis*, który nie jest zdolny do syntezy argininy z cytruliny, rozkłada argininę z podłoża



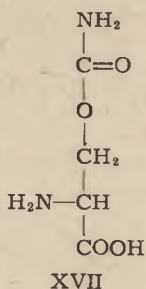
Schemat 3. Mechanizm rozkładu argininy przez *Streptococcus faecalis* (wg 1, 51)

1 — dezimidaza argininowa, 2 — karbamoilotransferaza ornitynowa, 3 — kinaza karbaminianowa

zużytkowując energię wytworzonego karbamoilofosforanu do syntezy ATP według schematu 3 (I, 51).

W podobny sposób *Eubacterium sarcosinogenum* wykorzystuje do regeneracji ATP karbamoilofosforan powstały w wyniku rozpadu kreatyniny (48), a *Streptococcus allantoicus* — z rozpadu kwasu karbamoilooksamowego (49, 50).

Wydaje się, że poznane dotychczas przemiany, w których bierze udział karbamoilofosforan, nie wyczerpują jego roli w metabolizmie. Jones (21) sugeruje możliwość reagowania karbamoilofosforanu z hydroksylowymi grupami z wytworzeniem uretanów, jak również z grupami aminowymi z wytworzeniem ureidozwiązków. W przyrodzie znane są dwa związki O-karbamoilowe (grupa karbamoilowa połączona przez tlen). Są to karbamoilo-D-seryna (XVII) wykryta u *Streptomyces* (13) oraz antybiotyk novobiocyna produkowana przez *Streptomyces spheroides* i *niveus* (15). Według sugestii L y n e n a karbamoilofosforan uczestniczy w syntezie biotyny będąc donorem grupy ureidowej tego związku.



Jeśli się uwzględni, że karbamoilofosforan wykryto dopiero przed 10 laty, można się spodziewać w niedalekiej przyszłości rozszerzenia naszych wiadomości o jego udziale w dalszych biologicznie ważnych przemianach komórki.

LITERATURA

1. Bauchop T., *J. Gen. Microbiol.* **18**, VIIp (1958).
2. Brown G. W. Jr, Cohen P. P., *Biochem. J.* **75**, 82 (1960).
3. Burnett G. H., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **229**, 337 (1957).
4. Caravaca J., Grisolia S., *J. Biol. Chem.* **235**, 684 (1960).
5. Cohen P. P., Hayano M., *J. Biol. Chem.* **166**, 239 (1946).
6. Cohen P. P., *The Enzymes*, vol. 6, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, Academic Press, New York 1962, str. 327, 477.
7. Fahien L. A., Schooler J. M., Gehrad G. A., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1925 (1964).
8. Fahien L. A., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1925 (1964).
9. Glaszion K. T., *Australian J. Biol. Sci.* **9**, 253 (1956).
10. Grisolia S., Burris R. H., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **191**, 203 (1951).
11. Grisolia S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **198**, 561 (1952).
12. Grisolia S., Wallach D. P., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 449 (1955).
13. Hagemann G., Penasse L., Teillon J., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 240 (1955).
14. Hall L. M., Metzenberg R. L., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **230**, 1013 (1958).
15. Hinman J. W., Caron E. L., Hoeksema H., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3789 (1957).
16. Hokin M. R., Hokin L. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1381 (1959).
17. Jones M. E., Spector L., Lipmann F., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 819 (1955).
18. Jones M. E., Spector L., Lipmann F., *Conferences et Rapports 3-eme Congres International de Biochimie, Bruxelles, 1955*, str. 278.
19. Jones M. E., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **46**, 1194 (1960).
20. Jones M. E., Spector L., *J. Biol. Chem.* **235**, 2897 (1960).
21. Jones M. E., *Science* **140**, 1373 (1963).
22. Kleczkowski K., *Post Biochem.* **7**, 71 (1961).
23. Kleczkowski K., Cohen P. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 271 (1964).
24. Kleczkowski K., *Enzymy cyklu ornitynowego w roślinach wyższych, Monografie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego*, zes. 6, Warszawa 1965.
25. Kleczkowski K., *Acta Biochim. Polon.* (w druku).

26. Krebs H. A., Henseleit K., *Z. Physiol. Chem.* **210**, 33 (1932).
27. Levenberg B., *J. Biol. Chem.* **237**, 2590 (1962).
28. Löwenstein J. M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **220**, 57 (1956).
29. Marshall M., Metzenberg R. L., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **233**, 102 (1958).
30. Marshall M., Metzenberg R. L., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 2229 (1961).
31. Mazuś B., Kleczkowski K., *Bull. Acad. Polon. Sci., s. sci. biol. Cl. II*, **13**, 207 (1965).
32. Meister A., Sober H. A., Tice S. V., Fraser P. E., *J. Biol. Chem.* **197**, 319 (1952).
33. Meister A., Fraser P. E., *J. Biol. Chem.* **210**, 37 (1954).
34. Metzenberg R. L., Hall L. M., Marshall M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **229**, 1019 (1957).
35. Metzenberg R. L., Marshall M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **233**, 1560 (1958).
36. Metzenberg R. L., Marshall M., Cohen P. P., Miller W. G., *J. Biol. Chem.* **234**, 1534 (1959).
37. Metzenberg R. L., Marshall M., Cohen P. P., *Biochem. Preparations* **7**, 23 (1960).
38. Mokrasch L. C., Caravaca J., Grisolia S., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 442 (1960).
39. Monder C., Meister A., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 202 (1958).
40. Ravel J. M., Sund R. F., Shive W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**, 186 (1959).
41. Reichard P., Lagerkvist U., *Acta Chem. Scand.* **7**, 1207 (1953).
42. Reichard P., Hanshoff G., *Acta Chem. Scand.* **10**, 548 (1956).
43. Reichard P., *Acta Chem. Scand.* **11**, 523 (1957).
44. Reichard P., 4th International Congress of Biochemistry Vienna 1958, vol. 13, Pergamon Press, New York 1959, str. 119.
45. Reifer I., Kleczkowski K., Klimowicz E., Zielińska A., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 151 (1963).
46. Schooler J. M., Fahien L. A., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **238**, 1909 (1963).
47. Shepherdson N., Pardee A. B., *J. Biol. Chem.* **235**, 3233 (1960).
48. Szulmajster J., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 173 (1960).
49. Valentine R. C., Wolfe R. S., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 389 (1960).
50. Valentine R. C., Wolfe R. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 384 (1960).
51. Volcani B. E., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **174**, 893 (1948).
52. Wright L. D., Huff J. W., Skeggs H. R., Valentik K. A., Rosshardt D. K., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2312 (1950).

GRZEGORZ RACZYŃSKI* i BOGUSŁAW ŻBIKOWSKI**

Lipoaminokwasy i lipopeptydy

Lipo-amino acids and lipo-peptides

The occurrence and structure of lipo-amino acids and lipo-peptides as well as their presumable significance in nature are reviewed.

W 1939 roku Christensen (7) oraz Folch i Van Slyke (12) ekstrahując osocze krwi rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak eter etylowy i naftowy zauważyli, że niektóre aminokwasy przechodzą do fazy organicznej wraz z lipidami. Fakt ten tłumaczono początkowo błędami metodycznymi, jak również zdolnością rozpuszczania aminokwasów przez niektóre lipidy. W 1950 roku Wynn i Williams (60) badając skład aminokwasowy osocza krwi ludzkiej stwierdzili, że około 20% azotu aminowego występuje w jego frakcji lipidowej i że dializa materiału lipidowego nie usuwa: seryny, glicyny, waliny, leucyny, kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego.

Zjawisko występowania w tłuszczowcach aminokwasów różnych od seryny wywołało duże zainteresowanie. Zagadnienie to stało się przedmiotem licznych badań, które doprowadziły do wyodrębnienia i scharakteryzowania kilku typów połączeń lipoaminokwasowych. Ogólnie, połączenia te można podzielić na lipoaminokwasy i lipopeptydy.

I. Lipoaminokwasy

Nazwę lipoaminokwas przypisuje się związkom, posiadającym charakterystyczne własności fizyczne lipidów i zawierającym pojedynczy aminokwas połączony z częścią lipidową za pomocą grupy aminowej lub karboksylowej.

Tworzenie się lipoaminokwasów stwierdzono w licznych preparatach tkanek i u mikroorganizmów. Hendler badał ich powstawanie w skrawkach jajowodu kurzego (24, 25), Gaby i współpracownicy (14, 15, 16) w *Penicillium chrysogenum*, komórkach nowotworowych i wątrobie, a Hunter (32, 33, 34) — w protoplastach *Bacillus megaterium*. Badania prowadzone przy użyciu radioaktywnych aminokwasów dodawanych do preparatów komórkowych w warunkach sprzyjających meta-

* Mgr, asystent Katedry Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Warszawie.

** Mgr, asystent tej samej Katedry.

bolizmowi wykazały występowanie radioaktywności w surowych lub oczyszczonych frakcjach ekstrahujących się rozpuszczalnikami lipidowymi. Po hydrolizie frakcji lipidowej odzyskiwano znaczone aminokwasy w niezmienionej postaci.

Wykryto dwa rodzaje naturalnych lipoaminokwasów: estry aminokwasowe fosfatydyloglicerolu i N-acyloaminokwasy.

1. Estry aminokwasowe fosfatydyloglicerolu

W 1962 roku badaczka angielska Macfarlane (42) wyizolowała połączenia lipoaminokwasowe z hodowli *Clostridium welchii*. Rozdzielając ekstrakt lipidowy bakterii na kolumnie z kwasu krzemowego przy wzrastającym gradiencie stężenia metanolu w chloroformie otrzymała ona kilka frakcji fosfolipidowych, w których stosunek N:P wynosił 1:1. Podczas chromatografii na bibule nasyconej kwasem krzemowym, w układzie: dwuizobutyloketon:kwas octowy:woda (40:20:3) wykazano, że wszystkie te frakcje zawierają substancję lipidową o wartości R_F zbliżonej do R_F fosfatydyloglicerolu oraz reagują z ninhydriną. Widmo w podczerwieni wydzielonych frakcji różniło się znacznie od widma fosfatydyloglicerolu wyizolowanego poprzednio przez badaczkę z *Micrococcus lysodeikticus* (40). Alkaliczna hydroliza przeprowadzona w bardzo łagodnych warunkach dała glicerylofosforyloglicerol i aminokwasy, głównie: ornitynę, lizynę i alaninę. Badanie zmian ilościowych P i N podczas wytrząsania roztworu eterowego lipidu z rozcieńczonymi roztworami wodorotlenku sodowego lub amonowego wykazało, że jednocześnie z uwolnieniem się aminokwasu (ubytkiem azotu aminowego w fazie organicznej) następuje wytwarzanie się układu dwuglikolowego, zdolnego do wytwarzania aldehydu mrówkowego pod działaniem kwasu nadjodowego (tablica 1).

Tablica 1

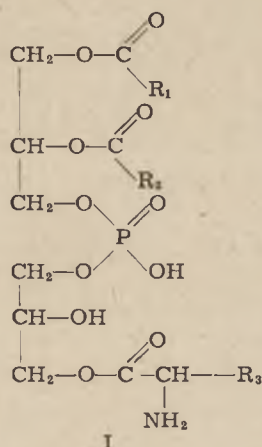
Rozkład estrów aminokwasowych fosfatydyloglicerolu w środowisku zasadowym (wg 42)

Doświadczenie nr	Czynnik hydrolytyczny	Czas	Składniki fazy eterowej w μ molach		
			P	N aminowy	HCHO
1	1N NH_4OH 20°	0	1,61	1,60	0,14
		2 godz.	1,26	0,20	0,93
2	0,05N NaOH 40°	0	2,06	2,07	0,16
		5 min.	2,03	1,14	0,98
		15 „	2,00	0,64	1,22
		30 „	1,58	0,43	1,06

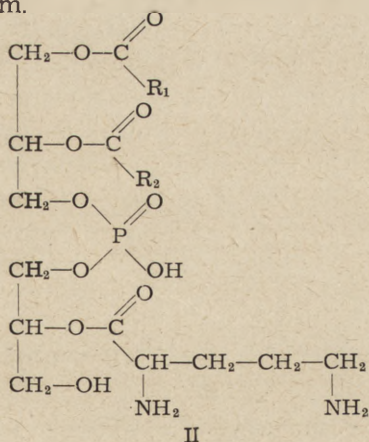
Otrzymana pochodna DNF-lipidu uwalnia DNF-aminokwas w wyniku ogrzewania z 2%-owym roztworem K_2CO_3 , co wskazywało na ist-

nienie wiązania estrowego pomiędzy aminokwasem i I-rzędową grupą alkoholową fosfatydyloglicerolu.

Na podstawie omówionych wyników Macfarlane zaproponowała dla wydzielonych związków wzór I, w którym R_1 i R_2 odpowiadają łańcuchom węglowodorowym kwasów tłuszczowych, a R_3 — reszcie specyficznej aminokwasu.



Podobne połączenia wyizolował Houtsmuller i Van Deenen (30) z *Bacillus cereus* hodowanego na pożywce, do której dodano promieniotwórczy kwas ortofosforowy. Dwukrotny rozdział wyciągu lipidowego bakterii przeprowadzony na kolumnie z kwasu krzemowego według metody opisanej przez Haverkate, Houtsmullera i Van Deenena (20), dał chromatograficznie jednorodną substancję, która zawierała znakowany ^{32}P i reagowała z ninhydryną. Ujemna reakcja z nadjodanem wskazywała na brak w badanym związku układu dwuglikolowego. W wyniku alkalicznej i kwaśnej hydrolizy (5) związek ten ulegał rozszczepieniu do glicerylofosforyloglicerolu, fosforanu glicerolu i ornityny. Lipoaminokwasowi otrzymanemu z *B. cereus* Houtsmuller i Van Deenen przypisują budowę II, popartą doświadczeniem modelowym i badaniami enzymatycznym.



Nie znaleziono dotychczas wystarczających dowodów, które potwierdziłyby występowanie dwóch rodzajów estrów aminokwasowych fosfadyloglicerolu. Dotychczasowe dane nie pozwalają również na rozstrzygnięcie, który z dwóch proponowanych wzorów I czy II odpowiadałby rzeczywistej budowie tych połączeń.

2. N-acyloaminokwasy

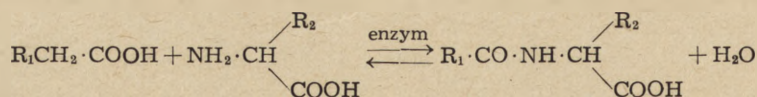
W latach 1959—1961 Axelrod, Fukui i Haining (1, 13, 17, 18) wyizolowali z wątroby szczura frakcję enzymatyczną, która w obecności akceptora lipidowego, takiego jak: kwas olejowy, kwas palmitynowy lub α -monooleinian, katalizowała włączenie D,L- ^{14}C -fenyloalaniny oraz innych aminokwasów do frakcji lipidowej. Otrzymane wyniki włączenia znakowanej fenyloalaniny do różnych preparatów lipidowych przedstawiono w tablicy 2.

Tablica 2

Włączenie ^{14}C -fenyloalaniny do czystych preparatów lipidowych (wg 13)

Nazwa lipidu	^{14}C -fenyloalanina włączona (impulsy/min)
Surowy ekstrakt lipidowy	950
α -Monooleinian	1670
α -Monopalmitynian	535
Trójoleinian	25
Trójpalmitynian	25
Kwas olejowy	2050
Kwas palmitynowy	2315
Lecytyna	1725

Wyniki te były trudne do interpretacji ponieważ nie wskazywały jaki typ reakcji katalizuje badany preparat enzymatyczny. Próby chromatograficznego oczyszczenia produktu wytworzonego z α -monooleinianu i D,L- ^{14}C -fenyloalaniny doprowadziły do wyizolowania nie zawierającej glicerolu radioaktywnej substancji, w której molowy stosunek fenyloalaniny do kwasu olejowego wynosił 1:1. Wskazywało to, że badany preparat enzymatyczny zawierał esterazę rozszczepiającą monooleinian, a właściwą katalizowaną przeciw reakcją jest wytworzenie N-acyloaminokwasu (schemat 1).



Schemat 1. Reakcja aminokwasu z wyższym kwasem tłuszczowym

Słuszność wzoru, zaproponowanego dla wyizolowanej promieniotwórczej substancji potwierdzono w następujący sposób. Ulega ona redukcji z glinowodorkiem litu, dając po hydrolizie 2-amino-3-fenylopropanol, zaś pod wpływem karboksypeptydazy rozszczepia się do fenyloalaniny i kwasu olejowego. Wykazano również, że reakcja jest stereospecyficzna dla naturalnej formy L-aminokwasu a fizostygmina i dwuizopropylodifluorofosforan hamują jej przebieg.

Jakkolwiek opisane doświadczenia wskazały na możliwość biosyntezy *in vivo* aminokwasów N-acylowanych wyższymi kwasami tłuszczowymi, to dopiero w 1963 roku badacze francuscy Laneelle M. A. i Laneelle G. (39) wyodrębnili związek o podobnej budowie. Podczas rozdziału lipidów *Mycobacterium* metodą kolumnową na kwasie krzemowym wydzielili oni frakcję nie zawierającą fosforu, która po hydrolizie uwolniła obok kwasów tłuszczowych ornitynę.

Widmo w podczerwieni tej frakcji wykazało obecność wiązania amidowego oraz łańcucha polimetylenowego. Połączenie między kwasem tłuszczowym a aminokwasem jest więc typu opisanego przez Axelroda i współpracowników.

II. Lipopeptydy

Zagadnienie lipopeptydów jest jeszcze mniej wyjaśnione niż zagadnienie lipoaminokwasów. W latach 1951—1959 liczni badacze (2, 4, 6, 10, 19, 22, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 57, 58, 59) opisali występowanie rozmaitych aminokwasów w hydrolizatach frakcji fosfolipidowych, sugerując, że połączone peptydowo tworzą one z lipidami tak zwane lipopeptydy. Jedni z nich przyjmowali, że między dwoma głównymi składnikami lipopeptydu występuje połączenie typu jonowego, inni — typu atomowego.

W 1954 roku Schrade, Becker i Böhle (52) badając lipidy surowicy krwi, wyodrębnili frakcję, wytrącającą się acetonem z roztworu eterowego i charakteryzującą się wysokim stosunkiem N:P wynoszącym 5:1. Poddając tę frakcję badaniu chromatograficznemu w układzie: butanol:kwas octowy:woda (4:1:5) rozdzielili ją na bibule na 4 ninhydrinopoztywne pasma, które barwiły się również odczynnikami na cholinę i reagowały z czernią sudanową. Rechromatografia w układzie: metanol:kwas octowy:woda (98:1:1) pozwoliła na rozdzielenie pasma I (najmniej ruchliwego) na 5 frakcji, II na 3, III na 3, IV na 2 frakcje. Pełna hydrolyza każdej z 13 tak wyodrębnionych frakcji dała liczne aminokwasy (tablica 3).

W peptydzie 4 stwierdzono obecność glukozaminy. Zastosowanie dializy wobec wody wykazało, że z 13 peptydów wykrytych początkowo, 8 nie dializowało i poza nielicznymi wyjątkami nie zmieniły one swego składu aminokwasowego.

W tym samym roku H a k o m o r i (19) wyizolował z wątroby człowieka lipopeptyd połączony z wielocukrem, który hamuje izoaglutynację erytrocytów. Według tego badacza w związku tym peptyd łączy się za pomocą C-końcowej grupy karboksylowej kwasu glutaminowego wiązaniem amidowym z grupą aminową fosfatydyloetanolaminy, zaś za po-

Tablica 3

Wartości R_f lipopeptydów surowicy krwi oraz ich skład aminokwasowy (wg 52)

Frakcja Nr	Peptyd Nr	Układ rozwijający: metanol: kwas octowy: woda (18 : 1 : 1)	Aminokwasy — Rodzaj
I	1	0,32	Asp-NH ₂ , Arg, Pro-OH, Pro, Fen, Tre
	2	0,40	Asp, Asp-NH ₂ , Ala, Fen, Ser, Wal, Arg, Leu, Pro
	3	0,48	Glu, Ala, Wal, Tre, Tyr
	4	0,68	Gli, Wal
	5	0,68	Ala, Glu, Gli, nor-Leu, Ser
II	6	0,44	Glu, Gli, Leu, Fen, Ser, Tre
	7	0,61	Cys, Asp, Orn, Pro-OH, Tre, Wal, iLeu, Fen
	8	0,78	Asp-NH ₂ , Glu, Pro, iLeu, Fen
III	9	0,50	nor-Leu, nor-Wal, Fen
	10	0,70	Asp-NH ₂ , Asp, Ala, Ser, Glu-NH ₂ , Wal, Fen, Pro
	11	0,85	Asp-NH ₂ , Asp, Ala, iLeu, nor-Wal, nor-Leu, Fen
IV	12	<0,5	Cys, Gli, Met, Ala, Fen
	13	>0,5	Cys, Ser, Gli, Tre, Ala, Pro

mocą N-końcowej grupy, którą jest również cząsteczka kwasu glutaminowego — z fragmentem cukrowcym.

Badania Westleya, Wrena i Mitchella (55) nad fosfolipidami wyodrębnionymi z *Drosophila*, jaja kurzego, mózgu i nerki szczura, potwierdziły występowanie lipopeptydów we frakcjach oczyszczonych za pomocą chromatografii kolumnowej oraz elektroforezy. Metody te pozwoliły na usunięcie aminokwasów i peptydów nie związanych z lipidami. Mimo to wydzielone frakcje fosfolipidowe uwolniły po hydrolizie różne aminokwasy, np. z *Drosophila*: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, cystynę, serynę, z jaja kurzego: kwas asparaginowy, glutaminę, serynę, z mózgu szczura: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, serynę, a z nerki szczura: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, serynę i cystynę.

W 1964 roku De König (38) oddzielił lipopeptydy *Sardina ocellata* od innych tłuszczowców metodą chromatografii kolumnowej na żelu

krzemowym. Obecność składnika peptydowego wykazał on na drodze kwaśnej hydrolizy lipidów oraz badania zmian wolnego azotu aminowego przed i po hydrolizie. Działanie dwunitrofluorobenzenu na lipid i całkowita hydroliza w kwasie solnym dała DNF-pochodne seryny i etanoloaminy. Ekstrakcja eterowego roztworu fosfolipidów 0,1 N HCl powodowała przejście do roztworu wodnego wszystkich ninhydrynopozytywnych związków oprócz dwóch wymienionych, wskazując na ich nietrwałe wiązanie z częścią lipidową. Na podstawie tych badań De Konig wnioskuje, że w fosfolipidach istnieją wolne grupy aminowe seryny i etanoloaminy, a łańcuchy peptydowe łączą się z częścią lipidową wiązaniem jonowym.

Tak więc rodzaj wiązania między składnikiem lipidowym a peptydem w lipopeptydzie pozostaje nadal sprawą dyskusyjną. Wydaje się, że wiązanie to jest słabsze od atomowego, jednak na tyle silne, że nie ulega zerwaniu w wyniku stosowania różnych układów rozpuszczalników w czasie chromatografii, dość szerokiego zakresu pH w czasie elektroforezy, a zastosowanie dializy wskazuje na wielkocząsteczkowy charakter tych połączeń.

III. Uwagi końcowe

W obecnej chwili możemy przyjąć istnienie połączeń aminokwasów i peptydów z tłuszczowcami za udowodnione. Synteza N-acyloaminokwasów odbywa się prawdopodobnie w żywej komórce i nie wymaga ATP ani innych trójfosforanów nukleozydów jako źródła energii. Przypuszcza się, że reakcja ta jest typowa dla wielu organizmów oraz przypisuje się jej rolę w usuwaniu szkodliwych wolnych kwasów tłuszczowych (44).

W 1964 roku Houtsmuller i Van Deenen (31) przypisali powstawanie estru fosfatydyloglicerolu i lizyny u *Streptococcus aureus* reakcji katalizowanej przez nieznany dotąd układ enzymatyczny, którego optimum działania przypada na pH 4,8—5,2. Gromadzenie się tego estru w pH 4,8 podczas wzrostu kultury bakteryjnej autorzy tłumaczą rolą fosfatydyloglicerolu w dostarczaniu lizyny do syntezy błony komórkowej. Przypuszczenie to zgadza się ze spostrzeżeniem Macfarlane (44), która wykazała, że u Gram-dodatnich bakterii (*Sarcina*, *Staphylococcus* i *Lactobacillus*), u których fosfatydyloglicerol jest podstawowym fosfolipidem, tworzenie estrów aminokwasowych wiąże się ściśle z logarytmiczną fazą wzrostu.

Istnieją również przypuszczenia, że połączenia lipoaminokwasowe odgrywają rolę w transporcie aminokwasów przez błonę komórkową, względnie biorą udział w syntezie białka (14, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 28, 32, 33, 34). Brak jednak jest dostatecznych danych doświadczalnych na potwierdzenie słuszności tych hipotez.

LITERATURA

1. Axelrod B., Haining J. L., Fukui T., *Amino Acids Pools*, red. J. T. Holden, Amsterdam-London-New York 1962, str. 742.
2. Becker G., Bode F., Schrade W., *Klin. Wochenschr.* **31**, 593 (1953).
3. Barnabei O., Ferrari R., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 79 (1961).
4. Le Baron F. N., Folch J., *J. Neurochem.* **1**, 101 (1956).
5. Benson A.A., Mauro B., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 189 (1958).
6. Cheftel R. J., Moretti J., Polonovski J., *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 291 (1957).
7. Christensen H. N., *J. Biol. Chem.* **129**, 530 (1939).
8. Van Deenen L. L. M., Houtsmuller U. M. T. *Proc. Deul Conf. on Lipids*, Santa Barbara, 1962.
9. Ferrari R. A., Benson A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 185 (1961).
10. Folch J., Le Baron F. N., *Federation Proc.* **10**, 183 (1951).
11. Folch J., Le Baron F. N., *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 305 (1956).
12. Folch J., Van Slyke D. D., *J. Biol. Chem.* **129**, 539 (1939).
13. Fukui T., Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **236**, 816 (1961).
14. Gaby W. L., Naughten R. N., Logan C., *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 34 (1959).
15. Gaby W. L., Silberman R., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 188 (1960).
16. Gaby W. L., Wolin H. L., Zajac J., *Canc. Res.* **20**, 1508 (1960)
17. Haining J. L., Fukui T., Axelrod B., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1259 (1959).
18. Haining J. L., Fukui T., Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **235**, 160 (1960).
19. Hakomori S., Tohoku J., *J. Exp. Med.* **60**, 331 (1954).
20. Haverkate F., Houtsmuller U. M. T., Van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 547 (1962).
21. Hawthorne J. N., *Chem. Ind.* 1171 (1956).
22. Hawthorne J. N., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 636 (1957).
23. Hawthorne J. N., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* **206**, 27 (1954).
24. Hendler R. W., *Science* **143**, 128 (1958).
25. Hendler R. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 1466 (1959).
26. Hendler R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 297 (1961).
27. Hendler R. W., *Amino Acid Pools*, red. J. T. Holden, Amsterdam-London-New York 1962, str. 750.
28. Hendler R. W., Love E., *Federation Proc.* **20**, 390 (1960).
29. Houtsmuller U. M. T., Van Deenen L. L. M., *Proc. Koninkl. Ned. Acad. Wetenschap.* **66B**, 236 (1963).
30. Houtsmuller U. M. T., Van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 211 (1963).
31. Houtsmuller U. M. T., Van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys.* **84**, 96 (1964).
32. Hunter G. D., Brookes P., Crathorn A. R., Butler J. A. V. *Biochem. J.* **73**, 369 (1959).
33. Hunter G. D., Goodsall R. A., *Biochem. J.* **74**, 34 P (1960).
34. Hunter G. D., Goodsall R. A., *Biochem. J.* **78**, 564 (1961).
35. Hubscher G., Hawthorne J. N., Kemp P., *J. Lip. Res.* **1**, 433 (1960).
36. Kennedy E. P., 6-th Int. Congr. Biochem. New York, VII, s-12, (1964).
37. Koffler H., *Science* **130**, 1419 (1959).
38. De Konig A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 467 (1964).
39. Laneelle M. A., Laneelle G., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 99 (1963).

40. Macfarlane M. G., *Biochem. J.* **80**, 45 P (1961).
41. Macfarlane M. G., *Biochem. J.* **82**, 40 P. (1962).
42. Macfarlane M. G., *Nature* **196**, 136 (1962).
43. Macfarlane M. G., *Adv. Lipid Res.* **2**, (1964).
44. Macfarlane M. G., 6-th Int. Congr. Biochem. New York, VII, s-10, (1964).
45. Macfarlane M. G., Gray G. M., Wheeldon L. W., *Biochem. J.* **77**, 626 (1960).
46. Marinetti G. V., Erbland J., Albrecht M., Stotz E., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 130 (1957).
47. Marinetti G. V., Erbland J., Stotz E., *J. Biol. Chem.* **233**, 562 (1958).
48. Marinetti G. V., Erbland J., Kochen J., *Federation Proc.* **16**, 837 (1957).
49. Marinetti G. V., Scaramuzzino D. J., Stotz E., *J. Biol. Chem.* **224**, 819 (1957).
50. Marinetti G. V., Stotz E., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 168 (1956).
51. Marinetti G. V., Witter R. F., Stotz E., *Federation Proc.* **15**, 308 (1956).
52. Schrade W., Becker G., Böhle E., *Klin. Wochenschr.* **32**, 27 (1954).
53. Silberman R., Gaby W. L., *J. Lip. Res.* **2**, 172 (1961).
54. Wachsman J. T., Fuhuhure H., Nisman R., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 388 (1962).
55. Westley J., Wren J. J., Mitchell H. K., *J. Biol. Chem.* **229**, 131 (1957)
56. Wheeldon L. W., Collins F. D., *Biochem. J.* **66**, 435 (1957).
57. Wren J. J., *Nature* **185**, 295 (1960).
58. Wren J. J., Mitchell H. K., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **99**, 431 (1958).
59. Wren J. J., Mitchell H. K., *J. Biol. Chem.* **234**, 2823 (1959).
60. Wynn V., Williams T. N. V., *Nature* **165**, 768 (1950).

TOMASZ GOŁASZEWSKI*

Związki białkowo-cukrowcowe moczu ludzkiego

The Glycoproteins of Human Urine

Protein-carbohydrate compounds of the human urine are reviewed. Their properties, heterogeneity and possible functions are discussed.

W płynach ustrojowych występuje bogactwo związków o charakterze połączeń białek względnie peptydów z cukrowcami. Znaczne ilości kompleksów białkowo-cukrowcowych znajdują się we krwi (12) oraz w tkance łącznej (58a). Znalaziono je jednak również i w innych płynach ustrojowych, jak np. w płynie nasiennym (4, 51, 95), ślinie (99), mleku (46) i poocie (89). Obfitym źródłem tych połączeń jest mocz. Jak podają Hamerman, Hatch, Reife i Bartz (58), 80% ciał stałych niedializujących moczu ludzkiego stanowią połączenia białkowo- lub peptydowo-cukrowcowe. Podobną wartość podały Mejbäum-Katzenellenbogen, Morawiecka i Dobryszczycka (83), badając frakcję białkową moczu rozpuszczalną w kwasie sulfosalicylowym. Również Berggard (10) podkreśla, że większa część substancji białkowych moczu pozostaje w powiązaniu z cukrowcami. Jednakże dopiero od niedawna daje się zauważyć szersze zainteresowanie związkami białkowo-cukrowcowymi moczu. Otrzymane wyniki — podobnie jak wyniki badań nad peptydami moczu — są jeszcze zbyt rozbieżne i nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych uogólnień. Przyczyną może być zarówno wielka heterogenność tych związków, jak i stosowanie różnorodnej techniki wydzielenia i oczyszczania, prowadzącej do otrzymywania bądź różnych mieszanin, bądź destruktywów związków natywnych.

I. Nazewnictwo

W moczu ludzkim występuje kilka grup związków, których składnikami są białka, względnie peptydy o różnej masie cząsteczkowej oraz węglowodany o różnym składzie i o różnej długości łańcucha. Najogólniej

* Dr, st. asystent Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

można te związki podzielić na substancje dializujące i niedializujące (65, 22), choć podział ten będzie podziałem nieco arbitralnym — należałoby bowiem sprecyzować jakość błony półprzepuszczalnej, użytej w danym przypadku (14). Typowe białka, wykrywane w moczu jak albuminy i globuliny mogą być powiązane ze składnikami węglowodanowymi (13, 54, 74, 106, 107). Ich pozycja klasyfikacyjna nie nastęrcza w zasadzie trudności. Znacznie trudniej jest sklasyfikować białka o mniejszej od nich cząsteczce lub peptydy, połączone z cukrowcami w przypadku, gdy składnik cukrowcowy dominuje nad peptydem.

Nazewnictwo poszczególnych klas związków białkowo-cukrowcowych ulegało licznym zmianom i do dziś nie jest sprecyzowane. Dlatego uwzględnione zostaną tylko najważniejsze propozycje.

Nazwą mukopolisacharyd określił Meyer (cyt. wg 4) polisacharyd posiadający w swym składzie heksozaminę. Według tego autora kompleksy mukopolisacharydów z peptydami, w których zawartość heksozamin jest większa niż 4%, stanowią oddzielną klasę tzw. mukoidów lub mukoproteidów. Tego samego typu związki zawierające mniej niż 4% heksozamin określił on mianem glikoproteidów. Do tej grupy należałyby np. albuminy i globuliny powiązane z niewielką resztą cukrowcową. Był to dogodny podział, gdyż mukoproteidy (mukoidy) wytrącone etanolem zachowywały zdolność rozpuszczania się w wodzie, natomiast druga z wymienionych grup — glikoproteidy własność tę traciły. Okazał się on jednak niewystarczający.

Nieco odmienną propozycję podziału kompleksów białkowocukrowcowych podał Winzler (112). Mukopolisacharydy podzielił on na dwie grupy: obojętne — zawierające heksozaminę i obojętne monocukry oraz kwaśne — zawierające heksozaminę i kwas uronowy, a także niekiedy kwas siarkowy. Oprócz tej grupy wprowadził on grupę mukoproteidów, tj. białek powiązanych z mukopolisacharydami. Glikoproteidy podzielił na glikoidy — zawierające małe ilości heksozamin i mukoidy — w cząsteczce których występują heksozaminy w ilości większej niż 4%. Podobny podział zaproponował Morgan (87). Mukoidami nazywa on kompleksy, w których dominującym (stanowiącym powyżej 70%) składnikiem jest mukopolisacharyd (jak np. kwas hialuronowy, chondroityno-siarczan, heparyna). Przykładem takich połączeń byłyby substancje grupowe krwi. Mukoproteidami nazywa Morgan połączenia, w których dominuje składnik białkowy (peptydowy) nad cukrowcowym.

W 1956 roku Meyer, Davidson, Linker i Hoffman (84) wprowadzili podział oparty na różnicach w składzie chemicznym składnika cukrowego i pewnych jego własności (skręcalność optyczna, rozpuszczalność i podatność na działanie niektórych enzymów). Skład chemiczny i własności wszystkich tych klas związków są szeroko dyskutowane w wydanej niedawno monografii Brimacombe'a i Webera (31).

W 1963 roku Jaenloz (59, 60), po gruntownej dyskusji w gronie

czołowych badaczy w tej dziedzinie podzielił kompleksy białkowo-cukrowcowe i lipidowo-cukrowcowe na 4 główne grupy: 1) związki zawierające składnik węglowodanowy słabo związany z polipeptydem, 2) analogiczny typ związków ale z silnym wiązaniem kowalencyjnym między obu składnikami, 3) związki lipidowo-cukrowcowe i 4) związki cukrowcowo-lipidowo-polipeptydowe. Dwie ostatnie grupy były często dawniej zaliczane niesłusznie do mukopolisacharydów. Tak zwane kwaśne mukopolisacharydy określono mianem glikozaminoglikuronoglikanów, wyjaśniającym skład chemiczny tej grupy związków — są to bowiem polimery heksozaminy powiązanej wiązaniem glikozydowym z resztami kwasu uronowego. Dla kwaśnych polisacharydów powiązanych z białkami nie podano oddzielnej nazwy. Największą trudność sprawiła grupa druga obejmująca wiele ważnych biologicznie substancji (substancje grupowe krwi, substancje sekrecyjne i inn.). Związki te różnią się między sobą nie tylko stopniem spolimeryzowania ale i proporcją składników cukrowego i białkowego. Ich budowa nie jest wyjaśniona — nieznany jest kształt łańcuchów i sposób wiązania cukrów z częścią białkową. Zaproponowano dla tych połączeń nazwę ogólną — glikopeptydy, bez względu na to czy w skład ich wchodzi rzeczywiście peptydy o małej masie cząsteczkowej, czy też cząsteczki odpowiadające swymi własnościami białkom.

Dla uzupełnienia tego krótkiego przeglądu nazewnictwa kompleksów białkowo-cukrowcowych należy jeszcze dodać, że w literaturze można spotkać nazwy odzwierciedlające skład chemiczny otrzymanych frakcji, jak np. sulfosjalopolisacharydo-peptydy (18), bądź też nazwy odzwierciedlające źródło, z którego dana frakcja została otrzymana, np. uromukoidy (z moczu) (68, 103), seromukoidy (z surowicy) (41). Jak słusznie zaznaczył Schmidt (98) termin mukoproteid jest nazwą ogólną i może być stosowany nawet w przypadku znacznej heterogenności połączeń białkowo-(peptydowo)-cukrowcowych w badanej tkance czy płynie ustrojowym.

II. Występowanie, heterogenność i skład

Pierwsze stwierdzenie obecności materiału białkowo-cukrowcowego w moczu ludzkim zawdzięczamy Moernerowi (cyt. wg 14) w ostatnich latach ubiegłego stulecia. W 40 lat później ukazały się dwie prace: Jorpesa i Norlina (61) oraz Freudenberg i Eichela (44) donoszące o wykryciu w moczu ludzkim składników o charakterze połączeń białkowo-cukrowcowych, wykazujących aktywność substancji grupowych krwi. W 1938 roku Kobayashi (72) stwierdził we frakcji składników moczu ulegających wytrąceniu octanem ołowiu obecność dwóch frakcji polisacharydowych, zaś Gurin, Bachman i Wilson (55) znaleźli w moczu ciężarnych kobiet hormon gonadotropinę — o budowie polipeptydu połączonego ze składnikiem cukrowym. Były to jednak prace wstępne, a okres pogłębionych studiów nad związkami

białkowo-cukrowcowymi w moczu rozpoczął się dopiero na początku lat pięćdziesiątych. Przełomową datą był rok 1950, kiedy to Tamm i Horsfall (100) wyizolowali z moczu frakcję mukoproteidową przez wytrącenie alkoholem. Frakcja ta wykazywała pozytywną reakcję Molischa, zawierała około 10% azotu, a jednocześnie okazała się inhibitorem wirusowej hemaglutynacji erytrocytów (50, 100). Ci sami autorzy zastosowali później do wytrącenia tej frakcji składników moczu 0,58 M chlorek sodu, okazało się bowiem, iż zmniejsza wydatnie on rozpuszczalność mukoproteidów w wodzie, podczas gdy temperatura i pH nie są w tym przypadku czynnikami krytycznymi (101). Otrzymana frakcja mukoproteidów okazała się elektroforetycznie homogenna (90), jej masa cząsteczkowa była rzędu $7 \cdot 10^6$ (102). Jak wykazały badania w mikroskopie elektronowym cząsteczki wydzielonego mukoproteidu miały niezwykle wydłużony kształt, co wydaje się być cechą ogólną tego typu związków (91). Podobną substancję mukoproteidową zawierającą około 20% cukrowców wydzielili również Gottschalk i współpracownicy oraz podali bliższe dane odnośnie jej składu chemicznego (1, 35, 47, 48, 49). Substancja ta zawiera galaktozę, heksozaminy, śladowe ilości fukozy oraz 2-karboksy-pirol (49, 88, 104, 105). Substancje tego typu charakteryzują się odpornością termiczną (4, 43, 108), choć nie jest wykluczone, że podwyższona temperatura oddziela od nich niskocząsteczkowy składnik (102). Ich cechą charakterystyczną jest niewrażliwość na czynniki powszechnie stosowane do wytrącania białek, pomimo iż ilościowo głównym ich składnikiem jest część białkowa (2, 4, 43). Jedną z frakcji mukoproteidów moczu wykazuje własności urykazy (64). Nie jest wiadome pochodzenie tego enzymu, przypuszcza się jednak, że powstaje on w nabłonku przewodów moczowych. Część peptydowa mukoproteidów charakteryzuje się bardzo dużą zawartością aminokwasów kwaśnych (68, 69, 81). W części cukrowcowej występuje oprócz monoz kwas sjałowy (N-acetyloneuraminowy) (88), który został nawet z mukoproteidów wykrystalizowany (70, 71).

Dogodną metodą wykrywania mukoproteidów w moczu jest elektroforeza (57, 93, 106, 107). Rozdzielenie ich możliwe jest jednak dopiero po wstępnym oczyszczeniu.

W 1954 roku Anderson i MacLagan (2) opracowali nową metodę izolowania mukoproteidów z moczu, polegała ona na absorpcji tych związków za pomocą kwasu benzoowego. Oczyszczanie uzyskanej frakcji prowadzono przez kolejne jej wytrącanie acetonem z roztworu wodnego (3, 4). Frakcja uzyskana przez Andersona miała podobne własności biologiczne jak frakcja Tamma i Horsfalla — hamowała wirusową hemaglutynację erytrocytów (3, 4, 5). Anderson i MacLagan opracowali także ilościową metodę oznaczania mukoproteidów przy użyciu odczynnika dwufenyloaminowego (4). Daje on chromogen z kwasem sjałowym o charakterystycznym widmie absorpcyjnym z maksimum przy 530 m μ (110). Chromogen wytwarzany z tym odczynnikiem przez 2-dezoksypen-

toży ma maksimum absorpcji przy innej długości fali i nie przeszkadza w oznaczaniu kwasu sjałowego (75). Stosując tę metodę oznaczania mukoproteidów można było stwierdzić zwiększone ich wydzielanie w moczu w różnych stanach patologicznych (14, 19, 20, 30, 34, 75, 82, 108, 109). W stanach nowotworowych zaobserwowano pojawianie się dodatkowej frakcji mukoproteidów w moczu (85).

Dokładniejsze badania mukoproteidów moczu wykazały ich heterogenność. Podobną heterogenność wykazują frakcje mukoproteidowe surowicy (41, 92). Różni autorzy zwracali uwagę na podobieństwo elektroforetyczne frakcji uzyskiwanych z obu tych płynów ustrojowych (11, 28, 76). Anderson i współpracownicy (6) badając heterogenność niedializujących składników mukoproteidowych wydzielonych z moczu stwierdzili obecność 8 frakcji, dających rozdzielić się za pomocą chromatografii kolumnowej na DEAE-celulozie, Boyce i King (29) znaleźli 6 frakcji w materiale otrzymanym w podobny sposób. Bourillon i współpracownicy (23, 24, 25, 26) frakcjonując mukoproteidy moczu alkoholem uzyskali 4 główne frakcje niedializujące. Wszystkie one zawierały wysoki procent składnika cukrowego (50—80%), przy czym jego ilość była większa we frakcjach wytrącających się przy wyższym stężeniu alkoholu. Natomiast ilość kwasu sjałowego malała wraz ze wzrostem całkowitej ilości cukrowców.

Na dużą heterogenność składników białkowo-cukrowcowych moczu wskazują też prace prowadzone pod kierunkiem Berggarda (10, 12, 13, 14, 15, 73). W moczu normalnym znaleziono 20 różnych immunoelektroforetycznie składników białkowo-cukrowcowych. Dwa z nich Ba- α i Zn- β o charakterze glikoproteidowym pochodzą prawdopodobnie z krwi (17). Według Berggarda większość białek moczu pochodzących z surowicy zawiera składnik cukrowcowy. Badacz ten rozfrakcjonował materiał niedializujący moczu na drodze ultrafiltracji i wykazał, że nawet frakcje o podobnej wielkości cząsteczek poddane elektroforezie są heterogenne (14, 15). Ostatnio Lundblad i Berggard (73) uzyskali kilka niskocząsteczkowych frakcji mukoproteidowych przy użyciu *Sephadex-G 25*.

Również glikopeptydy wytrącone z moczu octanem ołowiu (56, 82) okazały się niejednorodne — chromatografia na żywicy jonowymiennej pozwoliła na otrzymanie kilku frakcji zawierających około 13% cukrów, lecz różniących się między sobą składem aminokwasowym.

Składniki cukrowcowe muko- i glikoproteidów są na ogół mało poznane. Występowanie kwasu chondroityno-siarkowego sugerowała w 1954 roku Kerby (62) po znalezieniu w hydrolizacie niedializującej frakcji moczu heksozamin oraz kwasu heksuronowego i siarczanu. Nieco później Di Ferante i Rich wytrącili z moczu za pomocą bromku cetylotrójmetryloamoniowego frakcję zawierającą chondroitynosiarczan (37, 38). Na powiązanie tego wielocukrowca z białkiem wskazywała utrata zdolności badanej frakcji wybarwiania się błękitem bromofenolowym

po zadziałaniu nań trypsyną (37). Wyniki Di Ferrante i Richa potwierdzili następnie Heremans (57) i Berggard (14). Wykazano elektroforetycznie trzy frakcje kwaśnych mukopolisacharydów. Obecność heparyny w moczu była sprawą sporną (8, 75), póki King i współpracownicy (69) nie wydzielili z moczu jej pochodnej — siarczanu heparytyny. W obecności kwasu hialuronowego w moczu doniosła już dawniej Kerby (62) i Di Ferrante (36).

Systematyczne badania materiału białkowo-cukrowcowego w moczu przeprowadziła grupa pracująca pod kierunkiem Dischego (40, 45, 96). Po oddzieleniu wysokospolimeryzowanych mukoproteidów odpowiadających frakcji uzyskanej przez Tamma i Horsfalla (100), stwierdzono obecność glikoproteidów niedializujących, lecz zdolnych do przenikania przez błonę półprzepuszczalną pod zmniejszonym ciśnieniem (ultrafiltracja). Te zdolne do ultrafiltracji glikoproteidy, stanowiące około 90% całej frakcji niedializującej, rozdzielono za pomocą frakcjonowanego wytrącania na 4 frakcje; trzy z nich wytrącały się przy różnym stężeniu alkoholu izopropylowego, czwarta — mieszaniną tego alkoholu i eteru. Z kolei te frakcje poddawano elektroforezie uzyskując w każdym przypadku kilka podfrakcji (96). Jedna z nich zawierała kwas heksurowy jako jedyny składnik części cukrowcowej (45). Jako wynik końcowy autorzy ci uzyskali około czterdziestu różnych frakcji niedializującego materiału białkowo-cukrowcowego moczu.

Przeprowadzając szczegółową analizę poszczególnych frakcji elektroforetycznych zwrócono przede wszystkim uwagę na określenie stosunków molarnych poszczególnych składników części cukrowcowej. Dane te pozwalały bowiem łatwiej niż dane dotyczące części białkowej różnicować uzyskane substancje i ewentualnie wyjaśniać ich pochodzenie. Za najbardziej charakterystyczne uznano następujące stosunki: 1) fukozy do sumy galaktozy i mannozy, 2) galaktozy do mannozy, 3) glukozaminy do galaktozaminy oraz 4) sumy kwasu sjałowego i fukozy do całkowitej ilości heksoz. Poszczególne frakcje wykazywały różnice wymienionych stosunków molarnych, jednakże autorom nie udało się wykazać ich podobieństwa do glikoproteidów pochodzących z innych płynów czy tkanek — wyjątkiem były jedynie glikopeptydy śluzu dwunastnicy.

Heterogenność nie jest cechą unikalną uromukoidów, podobną heterogennością charakteryzują się seromukoidy (41, 92). Heterogenność uromukoidów można tłumaczyć przyjmując, że pochodzą z wielu źródeł. Są jednak sugestie (103), zwracające uwagę na to, że w zależności od techniki izolowania możliwe jest uzyskiwanie różnych podjednostek większych cząsteczek wydzielonych przez Tamma i Horsfalla. Wydzielono frakcję o masie cząsteczkowej dwa razy mniejszej niż masa preparatu Tamma i Horsfalla (39, 80), jednakże nie wydaje się aby heterogenność mukoproteidów moczu dała się wyjaśnić wyłącznie występowaniem serii polimerów o różnym stopniu polimeryzacji (77, 78, 79, 80, 103). Wysoce hete-

rogenny materiał otrzymany przez Dischego (40) i Berggarda (14, 15) był odmienny niż uzyskany przez Tamma i Horsfalla (100).

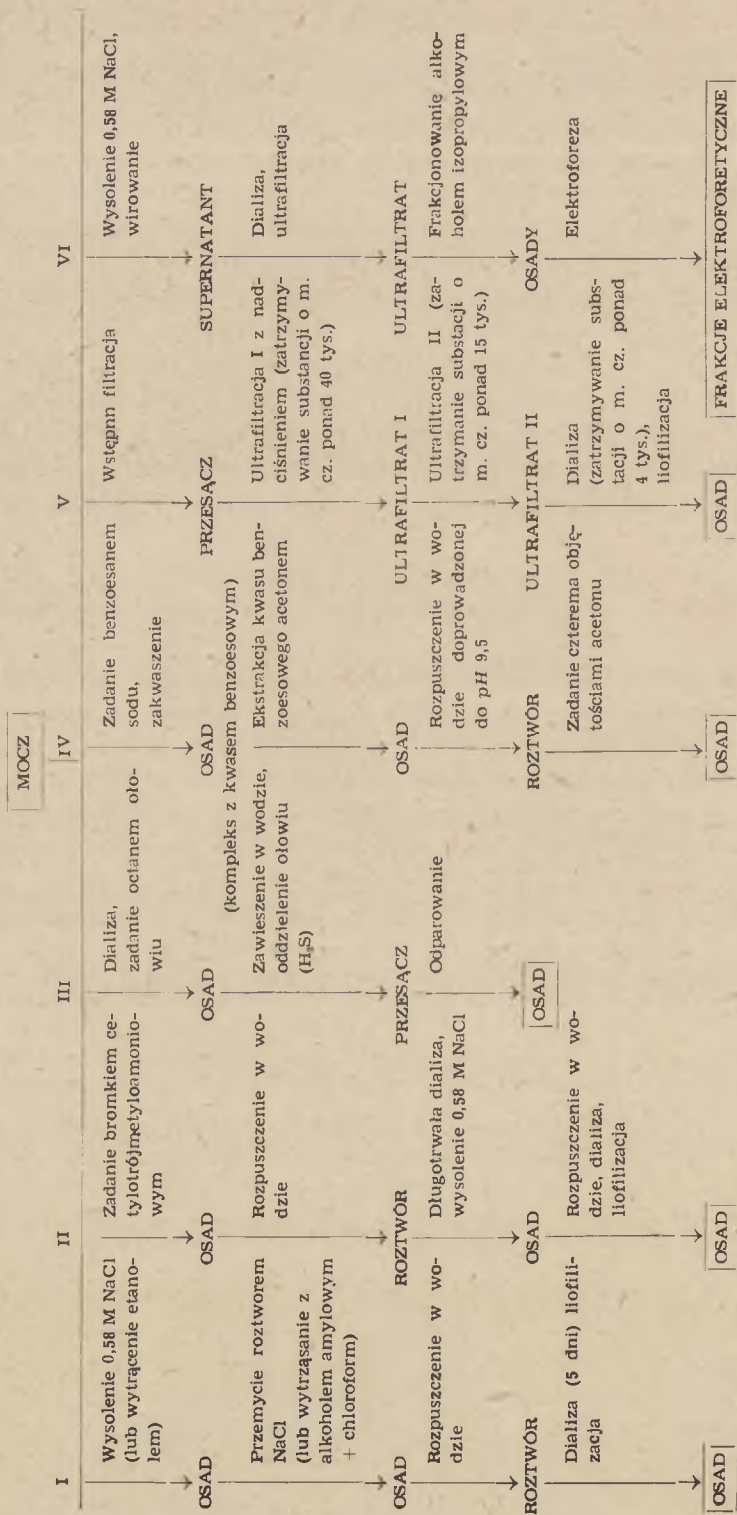
Zestawienie metod wydzielania i rozdzielania uromukoidów, stosowanych przez różnych autorów podano na schemacie 1.

Odmienne od podanych sposobów wydzielania mukoproteidów zastosował B a a r (9) do moczu pacjentów poparzonych. Absorbował on niskocząsteczkowe substancje na węglu aktywnym, a następnie wymywał je kwasem octowym. I w tym przypadku materiał okazał się niejednorodny — autor uzyskał kilka frakcji peptydowych związanych z resztami węglowodanowymi. Jednakże frakcja wydzielona z moczu traktowanego uprzednio węglem aktywnym w podwyższonej temperaturze wydaje się jednorodną. Nie ulega ona rozdziałowi na podfrakcje przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej na *Sephadex* i chromatografii bibułowej (42). Ta frakcja mukoproteidów moczu — w przeciwieństwie do innych frakcji wydzielonych dotychczas — wykazała przewagę aminokwasów zasadowych i niewielką ilość składników cukrowcowych (43).

III. Pochodzenie

Obecność w moczu ludzkim wielu związków o charakterze połączeń białkowo-cukrowcowych nie budzi już wątpliwości. Pamiętać trzeba jednak, że nie jest wykluczone występowanie w nim oprócz tych związków zarówno wolnych białek, jak i wolnych wielocukrowców (52). Jak już wspomniano, w moczu patologicznym ilość materiału białkowo-cukrowcowego ulega zwiększeniu, pojawiają się nowe frakcje i obraz komplikuje się jeszcze bardziej. Nieznane jest dotychczas źródło tych składników moczu, drogi, na których one powstają, ani znaczenie ich wydzielania dla organizmu. Mogą być one zarówno bezwartościowymi produktami przemian katabolicznych lub też być syntetyzowane w jakimś określonym celu, dla spełnienia określonych funkcji fizjologicznych czy biochemicznych.

Liczni autorzy (11, 29, 63, 76) zwracali uwagę na podobieństwo niektórych frakcji mukoproteidowych moczu i krwi. Niewątpliwie pewne z tych związków dostają się do moczu z krwi (21). Należy jednak pamiętać, iż dla wielu z nich krew może być jedynie płynem transportującym. Pewnym wyjaśnieniem pochodzenia mukoproteidowych składników moczu mogą być obserwacje wzrostu ich ilości w stanach patologicznych, związanych z silnym uszkodzeniem tkanek. Przykładem mogą tu być oparzenia, kiedy to stwierdzany jest ogólny wzrost ilości wydalanych substancji azotowych, doprowadzający nawet do ujemnego bilansu azotowego organizmu (111). Jedną z przyczyn tego stanu jest pojawienie się w moczu licznych produktów rozpadu tkanki łącznej, o której z kolei wiadomo, iż zawiera bogaty zestaw mukopolisacharydów. Badanie frakcji mukoproteidowej moczu ludzi poparzonych może dać pewną wskazówkę co do pochodzenia



Schemat 1. Zestawienie metod wydzielenia i rozdzielania uromukoidów

I — wg Tamma i Hoorsfalla (101), II — wg Maxfiellda (77), III — wg Kobayashi (72), IV — wg Andersona i MacLagana (4), V — wg Berggarda (14), VI — wg Dischego i współpracowników (40)

przynajmniej jej części peptydowej (42). Okazało się bowiem, że zawiera ona znacznie podwyższoną — w porównaniu z analogiczną frakcją mukoproteidową moczu normalnego — ilość hydroksylizyny, aminokwasu występującego niemal wyłącznie w tkance łącznej jako składnik kolagenu (43).

Wydaje się, że związki cukrowcowo-białkowe w moczu w pewnym stopniu są odbiciem procesów metabolizmu i wymiany zachodzących w tkance łącznej. Tkanka łączna może być głównym źródłem składników mukoproteidowych moczu, jednak niektóre z nich pochodzą prawdopodobnie z nabłonka przewodów moczowych (27, 53) lub z systemu płciowego — obecność tego typu substancji w płynie nasiennym była stwierdzana już dawniej (4, 51, 95). Ostatnią możliwość potwierdza w pewnej mierze znacznie wyższa zawartość mukoproteidów w moczu mężczyzn niż kobiet (4). Należy podkreślić, iż nawet uzyskanie podobnych frakcji z różnych tkanek i płynów ustrojowych nie pozwoliłoby na daleko idące wnioski — jak się bowiem okazało, w moczu wołu (33) występują mukoproteidy o bardzo podobnych własnościach do frakcji otrzymanej przez Tamma i Horsfalla z moczu ludzkiego, ponadto obserwuje się dużą zmienność osobniczą składu niektórych frakcji tych związków.

Możliwość udziału przynajmniej niektórych frakcji mukoproteidów w jakichś bliżej jeszcze nieokreślonych przemianach sugeruje intensywne włączanie znakowanej ^{14}C -glukozaminy do nierozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym frakcji z komórek wątroby (86, 94). Piętnowane związki wykrywano później w surowicy, we frakcji rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym. Ponadto puromycyna, hamująca syntezę białek, hamowała równocześnie włączanie glukozaminy do frakcji nierozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym. Wątroba wydaje się być głównym organem syntetyzującym frakcje mukoproteidowe, które z niej dostają się do krwi. Jak sugeruje ostatnio Winzler (113), w stanach pourazowych czynniki humoralne uwalniane z uszkodzonych tkanek mogą indukować syntezę specyficznego dla mukoproteidów informacyjnego kwasu rybonukleinowego, właśnie w wątrobie. Nie wiadomo jednak, na którym etapie syntezy białka następowałoby przyłączenie części cukrowcowej do reszty peptydowej — czy proces ten zachodziłby na matrycy, czy po uwolnieniu z niej gotowego peptydu. Nie można również wykluczyć przypuszczenia, że gotowy łańcuch oligosacharydowy mógłby przyłączać kolejno poszczególne aminokwasy.

Brak również danych o fizjologicznej funkcji mukoproteidów. Wysłano sugestię, że odgrywają one rolę ochronną przeciw nadmiernemu tworzeniu się kamieni moczowych przez obudowywanie zarodki wapniowych (66, 113). Dwukrotnie jednak zwiększona ilość tych substancji w moczu cierpiących na kamicę nie jest zgodna z tym przypuszczeniem (7). Nie jest natomiast wykluczony udział mukoproteidów w transporcie substancji szkodliwych (113).

LITERATURA

1. Ada G.L., Gottschalk A., *Austral. J. Sci.* **14**, 160 (1952).
2. Anderson A.J., MacLagan N.F., *J. Physiol.* **125**, 44 P (1954).
3. Anderson A. J., *Biochem. J.* **56**, XXV (1954).
4. Anderson A.J., MacLagan N.F., *Biochem. J.* **59**, 638 (1955).
5. Anderson A.J., Lockey E., MacLagan N.F., *Biochem. J.* **60**, XLI (1955).
6. Anderson A.J., Lepper R.H., Winzler R.J., *Biochem. J.* **77**, 581 (1960).
7. Amthor K.J., Kretschmer K., Hasselbacher K., *Clin. Chim. Acta* **6**, 281 (1961).
8. Astrup P., *Acta Pharmac. Toxic.* **3**, 165 (1947).
9. Baar S., *J. Clin. Path.* **9**, 144 (1956).
10. Berggard I., *Acta Soc. Med. Upsaliensis* **64**, 156 (1959).
11. Berggard I., *Nature* **187**, 776 (1960).
12. Berggard I., *Clin. Chim. Acta* **6**, 413 (1961).
13. Berggard I., *Clin. Chim. Acta* **6**, 546 (1961).
14. Berggard I., *Arkiv Kemi* **18**, 291 (1962).
15. Berggard I., *Arkiv Kemi* **18**, 315 (1962).
16. Berggard I., Rissinger G., *Acta Soc. Med. Upsaliensis* **66**, 217 (1961).
17. Berggard I., Cleve H., Bearn A.G., *Clin. Chim. Acta* **10**, I (1964).
18. Bignardi C., Aurelli G., Balduini C., Castellani I., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **17**, 310 (1964).
19. Bisserte G., Tayaue F., Montreuil J., Holleman J., Deautrevaux M., *Clin. Chim. Acta* **1**, 115 (1956).
20. Bjoerenajoe K.B., Werner I., Odin L., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **11**, 238 (1959).
21. Blix G., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **10**, Part 2, 128 (1958).
22. Boulanger P., Biserte G., Gourtot F., *Bull. Soc. Chim. Biol., Paris* **34**, 366 (1952).
23. Bourillon R., Kaplan J.C., *Clin. Chim. Acta* **5**, 732 (1960).
24. Bourillon R., Got B., Michon J., *Clin. Chim. Acta* **6**, 91 (1961).
25. Bourillon R., Got B., Cornillot P., *Clin. Chim. Acta* **6**, 730 (1961).
26. Bourillon R., Cornillot P., Got R., *Clin. Chim. Acta* **7**, 506 (1962).
27. Boyce W.H., Garvey F.K., Norfleet C.M., *J. Urol.* **72**, 1019 (1954).
28. Boyce W.H., Swanson M., *J. Clin. Invest.* **34**, 1581 (1955).
29. Boyce W.H., King J.S., *J. Clin. Invest.* **38**, 1525 (1959).
30. Brada Z., Abstracts of V Internat. Congress of Biochem. Moskwa 1961.
31. Brimacombe J.S., Weber J.M., *BBActa—Library, Elv. Publ. Co.* vol. 6 (1964).
33. Cornelius C.E., Pangborn J., Heckly R.J., *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 403 (1963).
34. Cradock J.G., Kerby G.P., Durham N.C., *J. Lab. Clin. Med.* **46**, 193 (1955).
35. Curtain C.C., *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **31**, 255 (1953).
36. Di Ferrante N., *J. Clin. Invest.* **36**, 1516 (1956).
37. Di Ferrante N., Rich C., *J. Lab. Clin. Med.* **48**, 491 (1956).
38. Di Ferrante N., Rich C., *Clin. Chim. Acta* **1**, 519 (1956).
39. Di Ferrante N., Popenoe E.A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **10**, 268 (1958) Suppl. 31.
40. Dische Z., Kawasaki H., Rothschild C., Danilczenko D., Zinsser H. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 209 (1964).
41. Dolazalowa D., Brada Z., *Clin. Chim. Acta* **10**, 34 (1964).

42. Estes F.L., Gołaszewski T., *Fed. Proc.* **24**, 606 (1965).
43. Estes F.L., Gołaszewski T., Carpentieri U., — w druku.
44. Freudenberg K., Eichel H., *Ann. Chem.* **510**, 240 (1934).
45. Gabriel O., Dain J., Zinsser H.H., Dische Z., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 155 (1960).
46. Got G., Font J., Bourillon R., Cornillot P., *Biochem. Biophys. Acta* **74**, 247 (1963).
47. Gottschalk A., *Nature* **167**, 845 (1951).
48. Gottschalk A., *Nature* **170**, 662 (1952).
49. Gottschalk A., *Nature* **172**, 808 (1953).
50. Gottschalk A., *Chemistry and Biology of Mucopolisaccharides*, Eds. — Wolstenholme G.E.W., O'Connor M., Boston 1958, str. 287.
51. Goldblatt M.W., *Biochem. J.* **29**, 1346 (1935).
52. Grant G.H., *J. Clin. Path.* **12**, 510 (1959).
53. Grant G.H., *J. Clin. Path.* **10**, 360 (1957).
54. Gunton N., Burton A.C., *J. Clin. Invest.* **26**, 892 (1947).
55. Gurin S., Bachman C., Wilson D.W., *J. Biol. Chem.* **128**, 525 (1939).
56. Hakomori S., Kawauchi H., Ishimoda T., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 546 (1962).
57. Heremans J.F., Vaerman J.P., Heremans M.T., *Nature* **183**, 1606 (1959).
58. Hamerman D., Hatch F.T., Reife A., Bartz K.W., *J. Lab. Clin. Med.* **46**, 848 (1955).
- 58a. Haurowitz F., *The Chemistry and Function of Proteins*, Acad. Press, New York-London, 1963, str. 250.
59. Jaenloz R.W., *Adv. Enzym.* **25**, 433 (1963).
60. Jaenloz R.W., *Arthritis Rheumat.* **3**, 233 (1963).
61. Jorpes E., Norlin G., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **11**, 91 (1934).
62. Kerby G.P., *J. Clin. Invest.* **33**, 1168 (1954).
63. Keutel H.J., Herman G., Licht W., *Clin. Chim. Acta* **4**, 665 (1959).
64. Kickhoefer B., Struwe F.E., Brumfield B., Westphal C., *Biochem. Z.* **330**, 467 (1958).
65. King J.S., Boyce W.H., Little J.M.L., Artom C., *J. Clin. Invest.* **37**, 1658 (1958).
66. King J.S., Boyce W.H., *J. Clin. Invest.* **38**, 1927 (1959).
67. King J.S., Warnock N.H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **92**, 369 (1956).
68. King J.S., Fielden M.L., Boyce W.H., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 424 (1961).
69. King J.S., Fielden M.L., Boyce W.H., *Clin. Chim. Acta* **7**, 316 (1962).
70. Klenk E., Faillard H., Lemprid H., *Z. Physiol. Chem.* **301**, 235 (1955).
71. Klenk E., Lauenstein K., *Z. Physiol. Chem.* **291**, 147 (1952).
72. Kobayashi T., *J. Biochem. (Jap.)* **28**, 31 (1938).
73. Lundblad A., Berggärd I., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 129 (1962; **101**, 46 (1965)).
- 73a. Lockey E., MacLagan A.J., *Brit. J. Cancer* **10**, 209 (1956).
74. MacGarry E., Sehon A.H., Rose B., *J. Clin. Invest.* **34**, 832 (1955).
75. MacLagan N.F., Anderson A.J., *Chemistry and Biology of Mucopolisaccharides*, Eds. — Wolstenholme G.E.W., O'Connor M., Boston 1958, str. 268.
76. Markham R.L., Jacobs J.H., Fletscher E.T.D., *J. Lab. Clin. Med.* **48**, 559 (1956).
77. Maxfield M., *Science* **128**, 1087 (1958).
78. Maxfield M., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 382 (1959).

79. Maxfield M., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 281 (1960).
80. Maxfield M., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 548 (1961).
81. Maxfield M., Stefanye D., *J. Biol. Chem.* **237**, 2522 (1962).
82. Masamune H., Hakomori S., Sugo T., *Tohoku J. Exptl. Med.* **9**, 385 (1959).
83. Mejbaum-Katzennellenbogen W., Morawiecka B., Dobry-szycka W., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 401 (1961).
84. Meyer K., Davidson E., Linker A., Hoffman P., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 506 (1956).
85. Mietinen T. A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **14**, 380 (1962).
86. Molnar J., Robinson J. B., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 3157 (1964).
87. Morgan W. T. J., *Proc. Roy. Soc. Med.* **46**, 783 (1953).
88. Odin L., *Nature* **170**, 663 (1952).
89. Pallaricini J. C., Gabriel O., Di Sant'Agese P., *Ann. N. York Acad. Sci.* **106**, 300 (1963).
90. Perlmann G. E., Tamm I., Horsfall F. L., *J. Exptl. Med.* **95**, 99 (1952).
91. Porter K. M., Tamm I., *J. Biol. Chem.* **212**, 135 (1955).
92. Price W. H., Matanoski G. M., Morrisson G., Prewer A., Wagner G., *Bull. John Hopkins Hosp.* **108**, 227 (1960).
93. Rigas D. A., Heller C. G., *J. Clin. Invest.* **30**, 853 (1951).
94. Robinson G. B., Molnar J., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1134 (1964).
95. Ross V., Moor D. H., Miller E. G., *J. Biol. Chem.* **144**, 667 (1942).
96. Rothschild C., Kawasaki M., Danilczenko A., Dische Z., *Fed. Proc.* **20**, 78 (1961).
97. Satwekar K., Radakrishnan A. N., *Clin. Chim. Acta* **10**, 284 (1964).
98. Schmidt M., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 346 (1962).
99. Szymczyk T., *Bull. Acad. Polon. Sci., Seria B.* **12**, 471 (1964).
100. Tamm I., Horsfall F. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **74**, 108 (1950).
101. Tamm I., Horsfall F. L., *J. Exptl. Med.* **95**, 71 (1952).
102. Tamm I., Bugher J. C., Horsfall F. L., *J. Biol. Chem.* **212**, 125 (1955).
103. Vaerman J. P., Heremans J. F., *Experientia* **15**, 226 (1959).
104. Waldron D. M., *Nature* **170**, 461 (1952).
105. Waldron D. M., Abstracts II Internat. Congress Biochem. Bruxelles, str. 485.
106. Webb T., Rose B., Sehon A. H., *Can. J. Biochem. Biophys.* **36**, 1159 (1958).
107. Webb T., Rose B., Sehon A. H., *Can. J. Biochem. Biophys.* **36**, 1167 (1958).
108. Weicker H., Huhnstock K., Graesslin D., *Clin. Chim. Acta* **9**, 19 (1963).
109. Weicker H., Graesslin D., Adelman B., *Clin. Chim. Acta* **11**, 92 (1965).
110. Werner J., Odin L., *Acta Soc. Med. Upsaliensis* **57**, 230 (1952).
111. Williamson M. B., The Healing of Wounds, Eds. — Williamson M. B., McGraw-Hill Book Company, Inc. N. York-Toronto-London 1957, str. 1.
112. Winzler R. J., Chemistry and Biology of Mucopolisaccharides, Eds. — Wolstenholme G. E. W., O'Connor M., Boston 1958, str. 245.
113. Winzler R. J., *Clinical Chemistry* **11**, 339 (1965).

RYSZARD WIKTOR SCHRAMM* i HALINA SCHRAMMOWA**

Serotonina

Serotonin

The chemical, pharmacological and physiological aspects as well as the methods of determination of serotonin are presented.

Aminy biogenne, związki o charakterze wybitnie zasadowym, z których najważniejsze są: alifatyczna IV-rzędowa zasada aminowa — acetylocholina, katecholaminy — dopamina, noradrenalina (norepinefryna) i adrenalina (epinefryna), pochodna imidazolu — histamina, oraz pochodna tryptofanu — serotonina (5-hydroksytryptamina) pełnią specyficzną rolę w organizmach zwierząt wyższych (86). Aminy te występują w różnych tkankach i wykazują bardzo silne i specyficzne działanie farmakodynamiczne na tkankę nerwową i niektóre rodzaje mięśni gładkich (177). Z racji tego działania określa się je jako neurohormony lub hormony neuro-mięśniowe. Niezależnie od tej aktywności niektóre z tych amin, jak acetylocholina lub histamina, regulują wydzielanie określonych związków przez pewne gruczoły dokrewne.

Drogi syntezy amin biogennych w organizmie żywym są stosunkowo proste i dobrze poznane. Acetylocholina jest syntetyzowana przez specyficzny enzym występujący w mózgu, przenoszący grupę acetylową z acetylo-KoA i wiążący ją z grupą alkoholową choliny. Histamina powstaje przez dekarboksylację histydyny. Katecholaminy: dopamina, noradrenalina i adrenalina są produktami kolejnego utleniania i — w etapie końcowym — metylacji fenyloalaniny. Serotonina wreszcie — podobnie jak histamina z histydyny i dopamina z dwuhydroksyfenyloalaniny — powstaje przez dekarboksylację 5-hydroksytryptofanu (83, 99, 127, 170). Schemat biosyntezy i przemian serotoniny podany jest w artykule Opieńskiej-Blauth i Charęzińskiego (127).

Noradrenalina, adrenalina i histamina znane są już od dawna i doczekały się wielu obszernych opracowań (np. 58, 68). Dopamina, którą

* Doc. dr, kierownik Katedry Biochemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

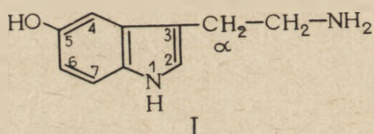
** Doc. dr, adiunkt Kliniki Psychiatrycznej Akademii Medycznej w Poznaniu.

przez długi czas traktowano jedynie jako związek przejściowy w syntezie noradrenaliny i adrenaliny, nie odgrywający żadnej roli fizjologicznej, okazała się być bardzo silnym inhibitorem przewodzenia impulsów nerwowych (120).

Badania centralnego układu nerwowego już od pewnego czasu wskazywały na to, że jego prawidłowa lub nieprawidłowa czynność, przejawiająca się w postaci zaburzeń lub chorób psychicznych, może być związana z prawidłowym lub nieprawidłowym metabolizmem amin biogennych w mózgu (17, 28, 30, 31, 33, 42, 100, 136, 168, 184). Spośród tych amin główną rolę przypisuje się najpóźniej z nich wykrytej serotoninie, uważanej powszechnie za neurohormon, aczkolwiek o niedokładnie jeszcze poznanym działaniu (38, 46, 163, 179).

I. Właściwości chemiczne

Serotonina (I) jest pochodną tryptofanu o nazwie systematycznej: 3-(5-hydroksyindolilo)-etyloamina lub 3-(β -aminoetylo)-5-hydroksyindol.

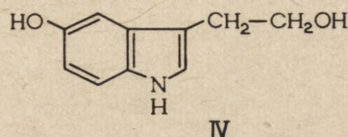
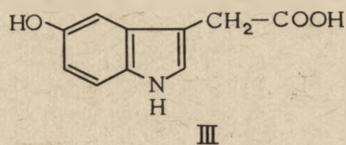
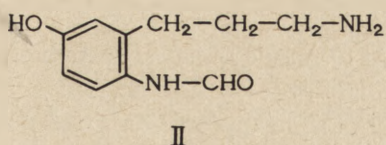


Jest to związek chemicznie dosyć czynny. Będąc równocześnie fenolem i pierwszorzędową aminą alifatyczną ma właściwości amfoteryczne i może zachowywać się jako zasada lub kwas. Jednakże stała dysocjacji jego grupy fenolowej jest znacznie niższa niż grupy aminowej, toteż w warunkach fizjologicznych stężeń jonów wodorowych serotonina wykazuje charakter zasadowy i tworzy sole z kwasami. Dopiero w *pH* powyżej 10 następuje stopniowa dysocjacja grupy fenolowej.

Chemiczna aktywność serotoniny związana jest z obecnością w jej cząsteczce układu indolowego, wchodzącego łatwo w reakcje z aldehydami w położeniu 2 i ulegającego łatwo utlenianiu z rozerwaniem wiązania pomiędzy atomami węgla 2 i 3, przy czym powstaje związek II. Utlenianiu temu sprzyja obecność grupy fenolowej w położeniu 5, natomiast zapobiega podstawienie atomu azotu w położeniu 1 resztą alkilową.

Na drodze reakcji enzymatycznych, przebiegających w żywym organizmie, np. pod działaniem monoaminooksydazy (MAO), zachodzi utlenianie pierwszorzędowej grupy aminowej serotoniny do grupy aldehydowej i dalej do karboksylowej — powstaje kwas 5-hydroksyindoliloctowy (III). Przemiana ta zachodzi w organizmie do końca w obecności erytrocytów; w razie ich braku lub małej ilości powstały z serotoniny alde-

hyd 5-hydroksyindoliloctowy przechodzi w 5-hydroksytryptofol, 3-(β -hydroksyetylo)-5-hydroksyindol (IV) (13).



Istnieją też dane o możliwości hydroksylacji serotoniny w położeniu 6 i wytworzeniu układu 5,6-dwuhydroksyindolowego zarówno *in vitro*, jak *in vivo*. Układ taki jest jednak bardzo nietrwały, co ogromnie utrudnia zbadanie jego powstawania i przemian (199).

Chemiczna synteza serotoniny może być przeprowadzona kilku metodami, przy czym produktem wyjściowym jest najczęściej 5-benzyl-oksyindol. W historycznie pierwszej syntezie przeprowadzono ten związek w 5-benzyl-oksygraminę, a następnie w 3-cyjanometylo-5-benzyl-oksyindol, który zredukowano do 3-(β -aminoetylo)-5-benzyl-oksyindolu, po czym usunięto resztę benzylową przez wodorowanie (79). Obecnie zwykle kondensuje się 5-benzyl-oksyindol z chlorkiem oksalilu na chlorowodorek kwasu 5-benzyl-oksyindolo-3-ketooctowego, który działaniem amoniaku przekształca się w amid, a następnie grupy amidową i ketonową redukuje wodorkiem litu i usuwa się resztę benzylową przez wodorowanie (166).

Wolna serotonina jest łatwo rozpuszczalna w wodzie, natomiast trudno w większości pospolitych rozpuszczalników organicznych. Najlepiej daje się ekstrahować z roztworu wodnego *n*-butanolem w *pH* 10, jednakże w tych warunkach *pH* jest mało trwała. Zwykle uzyskuje się serotoninę w postaci soli, przy czym najłatwiej krystalizuje jej sól z siarczanem kreatyniny. Ze względu na znaczną nietrwałość roztworów serotoniny należy je przygotowywać każdorazowo świeżo i chronić przed światłem i podwyższoną temperaturą.

II. Wykrycie i występowanie

Z biologiczną aktywnością serotoniny spotykano się już dosyć dawno, jednakże objawy przez nią wywoływane przypisywano adrenalinie. Podobnie alkaloidy sporyszu, działające antagonistycznie w stosunku do serotoniny, uważano początkowo za specyficzne antymetabolity adrenaliny (162).

Po raz pierwszy zwrócił uwagę na serotoninę *Erspamer* w 1933 roku (178). Badacz ten zainteresował się charakterystyczną reakcją barwną srebrochłonnych komórek śluzówki jelit. Stwierdził on również, że wyciągi acetonowe śluzówki jelit wykazują działanie farmakodynamiczne na mięśnie gładkie, powodując ich skurcz. Za pomocą testów farmakologicznych odróżnił związek powodujący to działanie od adrenaliny, a za pomocą reakcji barwnych wykazał w nim obecność pierścienia indolowego. Związek ten nazwał enteraminą (48).

W 1948 roku *Rapport, Green i Page* wyizolowali serotoninę z surowicy krwi bydłowej (stąd nazwa związku) w postaci sprzężonej z siarczanem kreatyniny (143, 144). W rok później *Rapport* (142) podał jej wzór chemiczny, potwierdzony w 1951 roku przez syntezę przeprowadzoną przez *Hamlina i Fischera* (79), a następnie przez innych badaczy (8, 80, 167). Serotonina okazała się identyczna z wykrytą przez *Erspamera* enteraminą (8, 53).

Serotonina występuje dosyć powszechnie w organizmach żywych, przede wszystkim u zwierząt. Różni autorzy, w szczególności *Erspamer* (51, 56), wykazali jej obecność w ukwiałach, w jadzie węży, osi skorpionów, w skórze płazów, gruczołach śluzowych ośmiornic, w śluzówce jelit oraz mózgu różnych kręgowców. W tkankach zwierząt niższych występuje ona najprawdopodobniej w postaci siarczanu (104). Wśród roślin znaleziono serotoninę w owocach banana (140) (które poza tym zawierają bardzo duże ilości noradrenaliny oraz dopaminy, występujących co najwyżej w śladowych ilościach u innych roślin), w ananasach (54), w nerwach liści *cowhage*, w babce, pomidorach, niektórych śliwkach i owocach *avocado* (171), w orzechach (121) oraz w ziemniakach (191), jednak wiele roślin wydaje się nie zawierać jej w ogóle (171).

Zawartość serotoniny w tkankach zwierząt wyższych jest bardzo różna. Najwięcej występuje jej w śluzówce jelit, gdzie zgromadzona jest w komórkach srebrochłonnych, poza tym w śledzionie, w płytkach krwi i w szyszynce (75). Osocze zawiera bardzo małe ilości serotoniny (39), co powodowało duże trudności w jej ilościowym oznaczeniu (96, 172, 185, 201, 211).

W tkance nerwowej wykryto serotoninę w 1953 roku. Po raz pierwszy *Florey i Florey* (63) stwierdzili jej obecność w zwojach gwiaździstych małża, a wkrótce potem znaleziono ją w mózgu ssaków (6, 169, 209). Stosunkowo wysoka jest zawartość serotoniny w centralnym układzie nerwowym u małż, gdzie związek ten jest zlokalizowany głównie w retikulum endoplazmatycznym (41, 74, 190, 211). U zwierząt wyższych zawartość serotoniny w różnych częściach mózgu waha się w szerokich granicach: stosunkowo dużo jest jej w pniu mózgu i jądrach migdałowych, brak natomiast w mózdzku i substancji białej mózgu (7, 20, 25, 35, 36, 37, 64, 66, 69, 100, 125, 184). Płyn mózgowo-rdzeniowy, z wyjątkiem niektórych stanów patologicznych, nie zawiera serotoniny (201).

Serotonina w mózgu występuje prawdopodobnie zarówno w formie związanej, jak i wolnej (180) i nie jest wykluczone, że czynna jest w obu tych postaciach, aczkolwiek niektórzy autorzy przypisują aktywność tylko postaci niezwiązanej (161). W mózgu zwierząt obserwuje się wyraźnie różnice gatunkowe w zawartości serotoniny. Działanie elektrowstrząsów powoduje wzrost jej zawartości w mózgu, zwłaszcza w pniu mózgu (24).

Szczególnie dużo uwagi poświęcono zawartości serotoniny w synapsach (43, 44, 78, 117, 198). Okazało się, że w centralnym układzie nerwowym i w synapsach ogromna jej większość związana jest w organellach komórkowych (78, 97, 102, 139, 151), a tylko nieznaczny procent występuje w frakcji mikrosomowej i w supernatancie (122, 150, 181, 192, 210).

Jak stwierdzono u szczurów, zawartość serotoniny w szyszynce wykazuje wyraźną rytmikę dobową: wzrost w dzień (maksimum po 8 godzinach) i spadek w nocy (minimum po 4 godzinach) (141). Rytmika ta jest kontrolowana przez układ nerwowy współczulny i przecięcie nerwów pomiędzy górnym splotem szyjnym a szyszynką powoduje ustanie rytmicznych zmian (62).

Występowanie serotoniny w tkankach lub organach niekoniecznie wiąże się z jej syntezą w tym samym miejscu. Najlepszym tego przykładem są płytki krwi, które mogą zawierać niemal tyle samo serotoniny co śluzówka jelit, mimo że w przeciwieństwie do mózgu i śluzówki jelit nie mają zdolności jej syntetyzowania (199). Wykazują one jednak zadziwiającą zdolność wychwytywania serotoniny z otoczenia w obecności jonów: potasowego i fosforanowego z wykorzystaniem energii ATP (22, 186, 187).

Ta właściwość płytek krwi powoduje, że serotonina wprowadzona do krwi nie jest czynna farmakologicznie, gdyż zostaje przez nie niemal natychmiast wychwyтана. W przypadkach zranienia, gdy zostaje uruchomiony mechanizm krzepnięcia krwi, następuje pęknięcie płytek i uwalnianie z nich serotoniny. To jest powodem, że surowica, w przeciwieństwie do osocza, wywołuje skurcz naczyń. Uwolnienie serotoniny z płytek krwi może *in vitro* nastąpić także na skutek zmiany warunków osmotycznych przez rozcieńczenie zawiesiny płytek wodą destylowaną (199). Niektórzy badacze przypuszczają, że serotonina w płytkach występuje w formie soli z ATP (22). O możliwości wiązania serotoniny przez ATP pozwala przypuszczać fakt, że domięśniowe jej podanie obniża znacznie poziom ATP w mózgu (108).

III. Działanie fizjologiczne i farmakologiczne

Serotoninie przypisuje się u małą bezpośrednie działanie stymulujące na centralny układ nerwowy oraz regulowanie czynności serca (85, 106, 189, 211). Kosztójanc i Rózsa (107) wykazali jej wpływ na spon-taniczną regulację bioelektrycznej aktywności splotów nerwowych,

a Salánki (152) — na działanie kontrolne centralnego układu nerwowego na napięcie mięśni.

U zwierząt wyższych najwyraźniej zaznaczonym działaniem serotoniny jest powodowanie skurczu mięśni gładkich macicy, żołądka, jelit, naczyń krwionośnych i pęcherza (199). Istnieją poważne przesłanki wskazujące na to, że działanie to związane jest z mechanizmem odwracalnego cyklicznego przenikania przez błony komórkowe jonów wapnia, powodujących skurcz mięśni w połączeniu z układem białko kurczliwe typu aktomiozyn — ATP (196, 199). Przypuszcza się, że serotonina łączy się w błonie komórkowej z specyficznym receptorem lipidowym na kompleks, który umożliwiłby związanie jonów Ca^{2+} i przeprowadzenie ich przez błonę, uprzednio dla nich nieprzepuszczalną. Po przeniknięciu przez błonę następuje pod wpływem specyficznego enzymu rozkład całego kompleksu na części składowe, tj. serotoninę, jony Ca^{2+} i lipid. Ten specyficzny receptor lipidowy serotoniny jest najprawdopodobniej gangliozydem (45, 199, 202, 203).

Analogiczny mechanizm przyjmuje się dla wyjaśnienia skurczu mięśni gładkich pod wpływem adrenaliny, acetylocholino i innych amin biogennych. Specyficzność poszczególnych hormonów polega prawdopodobnie na specyficzności receptorów lipidowych i enzymów rozkładających te kompleksy (199). Serotonina wykazuje również bardzo silne działanie inhibycyjne kompetycyjne w fosforylacji oksydacyjnej (4).

Szereg efektów, jakie wywołuje wstrzyknięcie serotoniny do organizmu, jest wynikiem skurczu mięśni gładkich. Należy tutaj wzrost ciśnienia krwi, poprzedzony niekiedy jego chwilowym nagłym spadkiem (95, 130, 132), w czym działanie serotoniny bardzo przypomina działanie adrenaliny. Skurcz naczyń powoduje z kolei zmniejszenie wydzielania wody przez nerki, co szczególnie łatwo daje się zauważyć u zwierząt obciążonych wodą (55). Równocześnie silny skurcz jelit i pęcherza powoduje oddawanie moczu i kału (199). Serotonina wywołuje też wzrost przepuszczalności naczyń włoskowatych, co powoduje przechodzenie płynów do otaczających ją tkanek (131).

Próbowano powiązać działanie serotoniny z kontrolą ciśnienia krwi, jednakże wydaje się, że w normalnym organizmie zależność taka nie istnieje, gdyż wprowadzenie nawet dużych ilości antymetabolitów serotoniny nie zmniejsza ciśnienia krwi (154, 207). Natomiast w stanach patologicznego nadciśnienia te same antymetabolity powodują wyraźny spadek ciśnienia krwi.

Neurofizjologicznie główną cechą serotoniny jest hamowanie przewodzenia bodźców nerwowych (118, 119). W ośrodku wzrokowym działa ona co najmniej na trzy odrębne centra (105).

Serotonina ma wybitny wpływ na komórki oligodendrogleju, które normalnie wykazują rytmiczne skurcze o okresie podobnym do ruchów mięśni gładkich: skurcz trwający około półtorej minuty i rozkurcz trwający około

trzech minut (116). W hodowli *in vitro* tych komórek dodatek 5 μg serotoniny na 1 ml hodowli powoduje silny skurcz tężcowy trwający około 30 minut (15, 16). Na odwrót — w neuronach hodowanych *in vitro* serotonina bardzo silnie wzmacnia ruch cytoplazmy i zwiększa częstotliwość pulsujących ruchów tych komórek (70, 71, 72, 73).

Działanie serotoniny wprowadzonej do organizmu jest krótkotrwałe, gdyż ulega ona szybko rozkładowi lub inaktywacji. Monoaminooksydaza (MAO) utlenia jej pierwszorzędową grupę aminową, układ metylujący przekształca jej grupę fenolową w ester metylowy, oksydazy rozszczepiają pierścień pirolowy lub hydroksylują fenyłowy (199).

Pomimo specyficznej łatwości przenikania przez błony plazmatyczne wielu komórek, serotonina praktycznie nie przekracza bariery krew-mózg (159, 205, 206) i nawet znaczne zmiany jej stężenia we krwi nie odbijają się na jej zawartości w mózgu. Bariera ta zdaje się nie obejmować *corpus callosum*, w którym Marazzi i Hart wykazali zmiany w przewodzeniu impulsów elektrycznych pod wpływem serotoniny wprowadzonej do tętnicy szyjnej (119). Prekursor serotoniny — 5-hydroksytryptamina przekracza natomiast tę barierę bez specjalnego trudu (20, 208). Bariera ta występuje najprawdopodobniej w ściankach naczyń krwionośnych mózgu i zawiera grupę enzymów rozkładających i inaktywujących serotoninę, głównie monoaminooksydazę i metylotransferazę (197).

W szeregu różnych schorzeń somatycznych obserwuje się odchylenia od normy w zawartości serotoniny w ustroju względnie w poszczególnych tkankach lub pewne nieprawidłowości w jej metabolizmie. Ma to miejsce np. w różnych schorzeniach alergicznych (77, 175), w schorzeniach wątroby (5), tyreotoksykozie (121), przy nadciśnieniu (204) i zawale mięśnia sercowego (125), w artretyzmie reumatycznym (84) i niektórych schorzeniach przewodzenia pokarmowego (82, 98). Są to jednak na ogół odchylenia niewielkie i mało charakterystyczne, uwarunkowane głównie zmianami w aktywności monoaminooksydazy (82).

Jedynym schorzeniem związanym z wyraźną nadprodukcją serotoniny jest zespół rakowiaka, w którym zmianom ulegają komórki srebrosłonne śluzówki jelit, będące głównym miejscem syntezy serotoniny w organizmie (76, 109). Poziom serotoniny u krwi chorych na rakowiaka jelit może osiągnąć 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wobec normalnego około 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (199). Podobnie bardzo silnie wzrasta wydzielenie z moczem kwasu 5-hydroksyindoliloctowego, dochodząc do 400 mg dziennie wobec normalnej wartości 2—5 mg (199). Rakowiaki innych narządów wywołują co najwyżej nieznaczne wahania w poziomie serotoniny (133, 134).

IV. Oznaczanie

Serotonina może być oznaczana w ekstraktach tkankowych metodami fizykochemicznymi (kolorymetrycznie lub fluorymetrycznie) albo też farmakologicznymi.

Ekstrakcję serotoniny z tkanek należy przeprowadzać w ten sposób, aby zapobiec jej rozkładowi przez enzymy uwalniane równocześnie z komórek. Zazwyczaj homogenizuje się świeżą tkankę w trzech objętościach oziębionego acetonu, oddziela roztwór i odparowuje aceton pod zmniejszonym ciśnieniem. Drugim sposobem jest homogenizacja tkanki w oziębionym rozcieńczonym (0,01—0,2 N) kwasie solnym (160) lub w roztworze wodnym inhibitora enzymów rozkładających serotoninę — najczęściej iproniazylu (marsilidu), znanego inhibitora monoaminoooksydazy (199).

Przy oznaczaniu serotoniny metodami fizykochemicznymi konieczne jest oddzielenie jej od innych mogących interferować związków, w szczególności 5-hydroksytryptofanu. Dokonuje się tego bądź na drodze chromatograficznej, przepuszczając ekstrakt przez kolumnę anionitową (np. *Dowex 50-W*), z której najpierw eluuje się 5-hydroksytryptofan 0,02 M buforem fosforanowym, a następnie serotoninę 0,01 N wodorotlenkiem sodowym, bądź drogą ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami, z których najlepszym okazał się *n*-butanol. Ekstrakcję przeprowadza się zazwyczaj jeden raz w *pH* 10, wysycając uprzednio fazę wodną chlorkiem sodu. Z wyciągu butanolowego przeprowadza się następnie serotoninę do fazy wodnej przez dodanie heptanu i 0,1 N kwasu solnego (19).

Serotonina daje wszystkie reakcje barwne charakterystyczne dla związków indolowych, większość z tych reakcji nie nadaje się jednak do oznaczania jej zawartości w wyciągach tkankowych (127, 128, 146, 147, 148). Najczęściej stosowana metoda kolorymetryczna polega na utlenianiu serotoniny w roztworze wodnym za pomocą kwasu azotowego i kwasu siarkowego i wywołaniu reakcji barwnej z α -nitrozo- β -naftolem. Powstałe czerwono zabarwione połączenie można wyekstrahować i natężenie barwy oznaczyć w zwykłym kolorymetrze (174). Reakcja ta jest dosyć specyficzna dla zasadowych połączeń 5-hydroksyindolilowych, przy czym większość dających ją związków, interferujących w oznaczaniu serotoniny, może być wyeliminowana przy oczyszczaniu *n*-butanolem. Poważną wadą tej metody jest jej mała czułość (granica wykrywalności serotoniny = 10 μ g), co w połączeniu z dużymi stratami serotoniny przy ekstrakcji i oczyszczaniu utrudnia jej stosowanie do oznaczania serotoniny w większości tkanek.

Metoda fluorescencyjna wykorzystuje fakt, że serotonina naświetlana w roztworze wodnym promieniowaniem UV o długości fali 295 $m\mu$ daje charakterystyczną fluorescencję o maksimach przy długości fali 332 $m\mu$ (silniejsza) i 550 $m\mu$ (słabsze) (19, 23, 173, 174). Spośród związków występujących razem z serotoniną tę samą reakcję daje 5-hydroksytryptofan i dlatego należy go uprzednio oddzielić na kolumnie jonitowej (194). Metoda ta pozwala na oznaczanie 1 μ g serotoniny, a więc jest około 10 razy czulsza od metody kolorymetrycznej. Jednakże podobne reakcje fluorescencyjne dają także i inne aminy biogenne, np. noradrenalina (100, 121). Histochemicznie można lokalizować rozmieszczenie monoamin, a więc

i serotoniny w tkance wykorzystując zjawisko występowania fluorescencji w czasie ogrzewania z gazowym aldehydem mrówkowym (34, 57). Różne aminy wykazują to zjawisko w różnych temperaturach, co pozwala w pewnym stopniu również i na ich identyfikację (57).

Najczulsze i wobec tego najczęściej stosowane są farmakologiczne metody ilościowego oznaczania serotoniny. Wszystkie one polegają na tym, że badana tkanka zanurzona w roztworze kurczy się po dodaniu do roztworu niewielkich ilości serotoniny. Stopień kurczenia się tkanki jest proporcjonalny do ilości serotoniny, może więc być zmierzony ilościowo i porównany z efektem wywołanym przez określoną ilość wyciągu tkankowego. Jako tkanek używa się: serca małża — jest to metoda Erspamera i Ghiretti (54) zmodyfikowana następnie przez Welsha (188), serca ślimaka winniczka (*Helix pomatia*) — metoda Salánki (152, 153), macicy szczura — metoda Erspamera (48, 50) zmodyfikowana następnie przez Gadduma i Hameeda (67) oraz Woolleya (196), jelita grubego myszy (40) oraz żołądka szczurzego — metoda Van'e'a (176). Podobny efekt na te same tkanki wywołuje również acetylocholina. W celu wyeliminowania jej działania dodaje się do badanego roztworu antagonistów acetylocholino, np. atropiny. Czułość różnych metod ilościowego oznaczania serotoniny zestawiono w tabl. 1.

Tablica 1

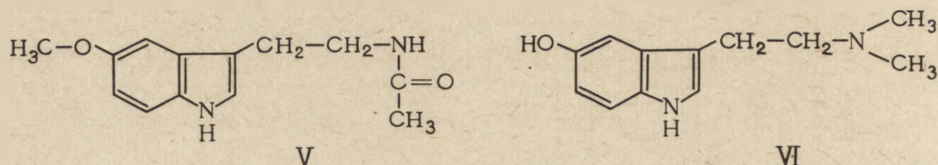
Porównanie czułości różnych metod ilościowego oznaczania serotoniny (wg 199)

Metoda	Ilość serotoniny wykrywana w próbie (ug)
Kolorymetryczna (z α -nitrozo- β -naftolem)	10
Fluorometryczna	0,5 — 2,0
Farmakologiczna (serce małża)	0,01 — 0,1
„ (macica szczura)	0,05 — 0,1
„ (żołądek szczura)	0,001 — 0,002

Zasadniczą zaletą metod farmakologicznych jest to, że mogą być stosowane przy użyciu nieoczyszczonych wyciągów tkankowych, co ma szczególnie duże znaczenie w przypadku bardzo małych stężeń serotoniny, w których straty hormonu spowodowane ekstrakcją, odparowywaniem rozpuszczalnika oraz wpływem powietrza mogą dochodzić do 90% (199). Należy jednak zwracać uwagę na możliwość wywoływania analogicznego efektu przez jony Ca^{2+} , które w większych stężeniach powodują samorzutnie skurcz tkanki. Działanie to jest szczególnie wyraźne w przypadku macicy szczura i występuje już przy stężeniu 20 mg $CaCl_2$ na litr (196). To też przy sporządzaniu roztworu, w którym zanurza się badaną tkankę, nie powinno się przekraczać tej wartości stężenia jonów Ca^{2+} .

V. Naturalne pochodne i analogi strukturalne

W organizmach zwierzęcych oprócz serotoniny występują jeszcze jej pochodne, przede wszystkim melatonina (V) i bufotenina (VI).



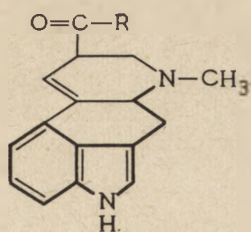
Melatoninę wyizolowano z szyszynki w 1958 roku (110, 114), a w roku następnym ustalono jej budowę jako O-metylo-N-acetyloserotoniny (N-acetylo-5-metoksytryptaminy) (111). Nie wykluczone jest również jej występowanie w nerwach obwodowych (112), nie wykryto jej natomiast w innych tkankach. Działa ona antagonistycznie do hormonu powodującego rozszerzanie melanoforów w skórze żaby (stąd nazwa), nie powoduje natomiast skurczu mięśni gładkich.

Rola melatoniny w organizmie zwierzęcym nie jest jasna. Występowanie jej wyłącznie w tkance nerwowej, w szczególności w szyszynce, sugeruje jej rolę hormonalną w działaniu układu nerwowego (9, 10, 111, 112, 113, 114, 127), aczkolwiek nie zostało to dotychczas udowodnione (199). Nie zostało też wyjaśnione, czy powstaje ona w tkance nerwowej na drodze przemian serotoniny (N-acetylowanie, O-metylowanie) (29, 127), czy też, będąc w przeciwieństwie do serotoniny rozpuszczalną w tłuszczach, przenika błony lipidowe tkanki nerwowej i ulega w niej enzymatycznemu przekształceniu w serotoninę (199).

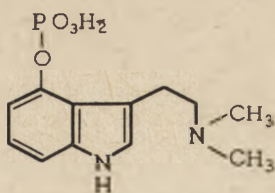
Bufotenina (N-dwumetyloserotonina) wykryta została po raz pierwszy w skórze ropuch (209), a następnie wyizolowana z trujących grzybów *Ammanita mappa* (195), z *cahobe beans* z wybrzeży morza Karaibskiego (61) oraz z moczu ludzkiego, aczkolwiek niektórzy badacze są zdania, że w normalnym moczu występuje jedynie monometyloserotonina (149). Bufotenina, jak również produkt jej dalszego metylowania — bufotenydyna (N-trójmetyloserotonina) są silnymi jadami działającymi na tkankę nerwową; wywołują również skurcz mięśni gładkich.

W tkankach roślinnych występuje cały szereg związków będących mniej lub więcej bliskimi analogami strukturalnymi serotoniny i wykazujących działanie psychomimetyczne i halucynogenne. Należą tu przede wszystkim alkaloidy sporyszu będące pochodnymi kwasu lizergowego (VII) (ergotamina, ergotoksyna i inne, R = peptyd) oraz bardzo blisko spokrewnione z nimi, nie występujące w sporyszu, dwuetyloamid kwasu lizergowego (LSD) i dwuetyloamid kwasu bromolizergowego (BOL)

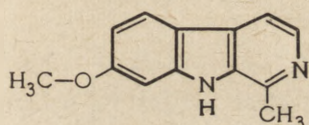
(R = $-\text{NH}/\text{C}_2\text{H}_5/2$), dalej psylocybina (VIII) i harmina (IX) oraz alkaloidy o bardziej złożonej budowie jak ibogaina (X), yohimbina (XI) i rezerpina (XII).



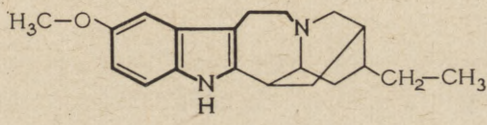
VII



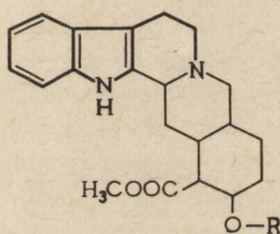
VIII



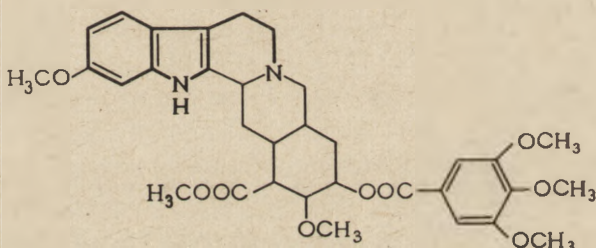
IX



X



XI



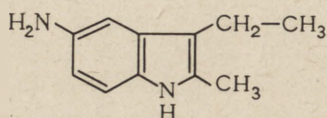
XII

Wszystkie te związki naturalne, jak również cały szereg syntetycznych analogów strukturalnych serotoniny wykazują u ludzi i zwierząt wybitne działanie psychotyczne, co pozwala wnioskować o roli jaką w zaburzeniach psychicznych może wywoływać występująca normalnie w ustroju ludzkim serotonina (199).

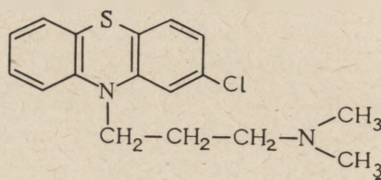
VI. Hipoteza serotoninowa chorób psychicznych

Rolę serotoniny w procesach psychicznych wykazano dzięki stwierdzeniu, że niektóre jej antymetabolity wywołują u osób zdrowych przejściowe zaburzenia psychiczne (205, 206). Pierwszym poznany związek tego typu był 2-metylo-3-etylo-5-aminoindol (XIII) (204), a w niedługim czasie otrzymano ich cały szereg.

Wśród związków występujących w naturze antymetabolitami serotoniny okazały się wymienione już alkaloidy sporyszu, yohimibina, harmina, ibogaina, rezerpina i psylocybina, będące silnymi środkami psychomimetrycznymi (11, 12, 91, 124, 137, 138, 158, 161, 183). W oporciu o ich działanie na żywy organizm Gaddum (64, 65) oraz Woolley i Shaw (205, 206) zwrócili w latach 1953—54 uwagę na możliwość istnienia związku między serotoniną i zaburzeniami psychicznymi. Woolley wysunął też tzw. hipotezę serotoninową chorób psychicznych (199). Jego zdaniem zaburzenia w metabolizmie serotoniny w tkance nerwowej są odpowiedzialne za powstawanie odchyień od normy i schorzeń psychicz-



XIII



XIV

nych, a mianowicie nadmiar serotoniny w mózgu jest przyczyną schizofrenii, a niedobór serotoniny — przyczyną stanów depresyjnych.

Jako dowody przemawiające za słusznością swojej hipotezy Woolley przytacza następujące fakty.

1. Wpływ serotoniny na hamowanie rytmicznych skurczów komórek oligodendrogleju (15, 16). Komórki te u chorych na schizofrenię i psychozę maniakalno-depresyjną wykazują wyraźne zmiany morfologiczne (47). Zaburzenie ich rytmicznej czynności i zwyrodnienie może upośledzać odżywanie sąsiadujących z nimi neuronów. Komórki oligodendrogleju zawierają ponadto szczególnie dużo pseudocholinesterazy (acylcholinoacylhydrolazy), dla której serotonina i niektóre jej pochodne są silnymi inhibitorami.

2. Pogorszenie się stanu schizofreników przy podawaniu inhibitorów monoaminooksydazy oraz prekursora serotoniny — 5-hydroksytryptofanu i na odwrót — poprawa stanu klinicznego w depresji po podawaniu inhibitorów monoaminooksydazy (59, 115, 145, 200).

3. Poprawa stanu schizofreników przy podawaniu amidu kwasu nikotynowego. Związek ten nie jest ani analogiem strukturalnym, ani antymetabolitem serotoniny, jednak w jakiś sposób znosi jej działanie, np. powodujące skurcz mięśni gładkich lub biegunkę po wstrzyknięciu 5-hydroksytryptofanu, a równocześnie blokuje działalność monoaminooksydazy (92).

4. Dodatni wpływ rezerpiny — antymetabolitu serotoniny — w schizofrenii.

5. Wpływ chlorpromazyny (XIV), jednego z najczęściej stosowanych w schorzeniach psychicznych neuroleptyków. Związek ten, podobnie jak amid kwasu nikotynowego, nie jest ani analogiem strukturalnym ani

antymetabolitem serotoniny, jednak działa silnie antyserotoninowo w sposób nieodwracalny (14). Działanie to jest niewyjaśnione; wiąże się je z oddziaływaniem na błonę komórkową (81, 101).

6. Zmiany psychiczne w galaktozemii, w której nadmiar galaktozo-1-fosforanu może powodować zahamowanie włączania galaktozy do lipidów, a więc hamować syntezę gangliozydów będących specyficznymi receptorami serotoniny w błonie komórkowej (155).

Bardzo ciekawym i niedostatecznie jeszcze wyjaśnionym zagadnieniem jest powiązanie niedorozwoju w fenyloketonurii z zaburzeniem syntezy serotoniny w mózgu (46). Fenyloalanina działa jako inhibitor przenoszenia 5-hydroksytryptofanu, prekursora serotoniny, przez barierę krew—mózg (156, 157, 164) i jej nadmiar mógłby być odpowiedzialny za bardzo znaczne obniżenie poziomu serotoniny w mózgu i związany z tym niedorozwój.

Hipoteza serotoninowa Woolleya posiada cały szereg punktów niedostatecznie wyjaśnionych lub spornych. Zagadnienie roli serotoniny w zaburzeniach psychicznych komplikuje podobna rola katecholamin, histaminy i acetylocholiny. Noradrenalina w niektórych przypadkach działa zgodnie z serotoniną, w innych antagonistycznie. Rezerpina wydaje się w tym samym stopniu usuwać z kory mózgowej serotoninę, jak i noradrenalinę i jej działanie w stosunku do obu tych hormonów do dziś dnia nie jest wyjaśnione (26). Uspokajające działanie rezerpiny jest niwelowane w tej samej mierze przez podawanie prekursora serotoniny — 5-hydroksytryptofanu, co i prekursora katecholamin — 2-hydroksyfenyloalaniny. W fenyloketonurii stwierdza się w tkankach obniżenie poziomu zarówno serotoniny, jak i adrenaliny (135). Wreszcie należy podkreślić, że silne psychomimetyki nie zawsze są antymetabolitami serotoniny, np. meskalina jest analogiem adrenaliny, a ditran — acetylocholiny. Sporo zamieszania wprowadza też ceruloplazmina, białko pełniące rolę aminooksydazy w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym (18, 52, 123, 182), niszczące działalność serotoniny (123, 213), którego zawartość w krwi schizofreników wydaje się być wyższa niż u zdrowych (3).

Nie ulega wątpliwości, że zakłócenie metabolizmu któregośkolwiek z neurohormonów musi wpłynąć na działalność kory mózgowej, a w efekcie spowodować zmiany psychiczne (46, 60). Niektórzy autorzy dopatrują się źródeł zaburzeń psychicznych w wadliwej przemianie adrenaliny (87, 88, 89, 90, 91, 93, 165), inni — acetylocholiny (1, 2), większość jednakże widzi je w wadliwej przemianie tryptofanu (29, 32, 33, 46, 199).

Postulowany dla zaburzeń psychicznych, w szczególności dla schizofrenii biochemiczny defekt metaboliczny może tkwić zarówno w psychotoksynie, jak i w substancji receptorowej (64), w każdym razie należy go szukać w przemianie materii komórek mózgowych. Całkowite wyjaśnienie zagadnienia byłoby możliwe jedynie przy przeprowadzeniu badań na świeżej tkance mózgowej zdrowych i chorych ludzi (201).

LITERATURA

1. Abood L. G., Ostfeld A. M., Biel J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **97**, 483 (1958).
2. Abood L. G., Ostfeld A. M., Biel J. H., *Mol. Mental Health, Pap. Sci. Congr.* 1958, Brain Res. Found., New York—Chicago 1959, str. 69.
3. Akerfeldt S., *Science* **125**, 117 (1957).
4. Alivisatos S. G. A., Ungar F., Callaghan O., Biava C., *Nature* **201**, 47 (1964).
5. Amann R., *Klin. Wochenschr.* **40**, 981 (1962).
6. Amin A. H., Crawford T. B. B., Gaddum J. H., *19th Intern. Physiol. Congr.* Montreal 1953, *Abstr. Comm.* 165.
7. Amin A. H., Crawford T. B. B., Gaddum J. H., *J. Physiol.* **126**, 596 (1954).
8. Asero B., Colo V., Erspamer V., Vercellone A., *Ann. Chem.* **576**, 69 (1952).
9. Axelrod J., Weissbach H., *Science* **131**, 1312 (1960).
10. Barchas J. D., Lerner A. B., *J. Neurochem.* **11**, 489 (1964).
11. Barlett M. F., Dickel D. F., Taylor W. I., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 126 (1962).
12. Barger G., *Ergot and ergotism*, Guerney—Jackson, London 1931.
13. Bartholini G., Pletscher A., Bruderer H., *Nature* **203**, 1281 (1964).
14. Benditt E. P., Rowley D. A., *Science* **123**, 24 (1956).
15. Benitez H. H., Murray M. R., Woolley D. W., *Anat. Record* **121**, 446 (1955).
16. Benitez H. H., Murray M. R., Woolley D. W., *Proc. 2nd Intern. Congr. Neuropatol.* London 1955, Exc. Med. Amsterdam 1957.
17. Biochemiczeskoje osnovy nerwnoj diejatielnosti. W: 1-wyj Wsiesojuz. *Biochim. Sjezd* 1964.
18. Blaschko H., Levine W. G., *Brit. J. Pharmacol.* **15**, 625 (1960).
19. Bogdanski D. F., Pletscher A., Brodie B. B., Udenfriend S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **117**, 82 (1956).
20. Bogdanski D. F., Weissbach H., Udenfriend S., *J. Neurochem.* **1**, 272 (1957).
21. Bogdanski D. F., Weissbach H., Udenfriend S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **122**, 182 (1958).
22. Born G. V. R., Ingram G. I. C., Stacey R. S., *Brit. J. Pharmacol.* **13**, 62 (1958).
23. Bowman R. C., Caulfield P. A., Udenfriend S., *Science* **122**, 32 (1955).
24. Breitner C., Picchioni A., Chin L., Burton L. E., *Dis. Nerv. Syst.* **22**, 93 (1961).
25. Brodie B. B., Costa E., *Psychopharm. Serv. Center Bull.* **1** (1962).
26. Bruno A., Allegranza A., Bozzi R., *J. Nerv. Ment. Dis.* **139**, 241 (1964).
27. Bumpus F. M., Page I. H., *J. Biol. Chem.* **212**, 111 (1955).
28. Buscaino G. A., *Acta Neurol.* **16**, 93 (1961).
29. Buscaino G. A., *Acta Neurol.* **19**, 1 (1964).
30. Buscaino V. M., *Riv. Pat. Nerv. Ment.* **27**, 178 (1922); **28**, 437 (1923); **29**, 501 (1924).
31. Buscaino V. M., *Acta Neurol.* **8**, 1 (1953).
32. Buscaino V. M., *Acta Neurol.* **13**, 1 (1958).

33. Buscaino V.M., *Acta Neurol.* **19**, 133 (1964).
34. Carlsson A., Falck B., Hillarp N.Å., *Acta Physiol. Scand.* **56**, Suppl. 196 (1962).
35. Correale P., *J. Neurochem.* **1**, 22 (1956).
36. Costa E., Aprison M.H., *Am. J. Physiol.* **192**, 95 (1958).
37. Costa E., Aprison M.H., *J. Nerv. Ment. Dis.* **126**, 289 (1958).
38. Costa E., Gessa G.L., Hirsch C., Kuntzmann R., Brodie B.B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **96**, 118 (1962).
39. Crawford N., *Clin. Chim. Acta* **8**, 39 (1963).
40. Dagliesch C.E., Toh C.C., Work T.S., *J. Physiol.* **120**, 298 (1953).
41. Dahl E., Falck B., Lindquist M., Mecklenburg C., *K. Fysiogr. Söllsk. Lund Förh.* **32**, 89 (1962).
42. De Ajuriaguerra J., Monoamines et système nerveux central, Georg Cie, Genève, Mason Cie, Paris, 1962.
43. De Robertis E., *Histophysiology of synapses and neurosecretion*, Pergamon Press, Oxford 1964.
44. De Robertis E., De Iraldi A.P., Rodriguez G., Gomez C.J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 229 (1961).
45. Dombro R.S., Bradham L.S., Campbell N.K., Woolley D.W., *Biochem. Biophys. Acta* **54**, 516 (1961).
46. Eidusson S., Geller E., Yuwiler A., Eidusson B.T., *Biochemistry and behavior*, Van Nostrand Co., Princeton N.J., 1964.
47. Elvidge A.R., Reed G.E., *Arch. Neurol. Psychiatr.* **40**, 227 (1938).
48. Erspamer V., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **196**, 366 (1940).
49. Erspamer V., *Nature* **170**, 281 (1952).
50. Erspamer V., *Ricerca Sci.* **22**, 694 (1952).
51. Erspamer V., *Naturwiss.* **40**, 318 (1953).
52. Erspamer V., *Progress in drug research*, Basel—Stuttgart 1961.
53. Erspamer V., Asero B., *Nature* **169**, 300 (1952).
54. Erspamer V., Ghiretti F., *J. Physiol.* **115**, 470 (1951).
55. Erspamer V., Ottolenghi A., *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **93**, 177 (1953).
56. Erspamer V., Vialli M., *Nature* **167**, 1033 (1951).
57. Falck B., *Acta Physiol. Scand.* **56**, Suppl. 197 (1962).
58. Feldberg W., *J. Pharm. Pharmacol.* **6**, 281 (1954).
59. Feildstein A., Hoagland H., Rivera M. R., Freeman H., *J. Neuropsychiatr.* **3**, 83 (1961).
60. Fiamberti A.M., Cenacchi G., *Lav. Neuropsychiatr.* **33**, 397 (1963).
61. Fisch M.S., Johnson N.M., Horning E.C., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5892 (1955).
62. Fiske V.M., *Science* **146**, 253 (1964).
63. Florey E., Florey E., *Naturwiss.* **40**, 413 (1953).
64. Freedman D.X., Giarman N.J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **96**, 98 (1962).
65. Gaddum J. H., *J. Physiol.* **119**, 363 (1953).
66. Gaddum J.H., Giarman N.J., *Brit. J. Pharmacol.* **11**, 88 (1956).
67. Gaddum J. H., Hameed K. A., *Brit. J. Pharmacol.* **9**, 240 (1954).
68. Gaddum J. H., Holzbauer M., *Vitam. Hormon.* **15**, 151 (1957).
69. Garven J. D., *Brit. J. Pharmacol.* **11**, 1 (1956).
70. Geiger R. S., *Fed. Proc.* **17**, 52 (1958).
71. Geiger R. S., *J. Neuropsychiatr.* **1**, 185 (1960).
72. Geiger R. S., w: Serological factors in schizofrenia, Commonwealth Fund. Hoeber-Harper, New York 1963.
73. Geiger R. S., Stone W. G., *Fed. Proc.* **20**, 477 (1961).

74. Gerschenfeld H. M., *Z. Zellforsch.* **60**, 258 (1963).
75. Giarmann N. J., Freedman D. X., *Nature* **186**, 480 (1960).
76. Giertz H., *Dtsch. Med. J.* **12**, 203 (1961).
77. Girard J. P., *Helv. Med. Acta* **29**, 680 (1962).
78. Gray E. G., Whittaker V. P., *J. Physiol.* **153**, 35P (1960).
79. Hamlin K. E., Fischer F. E., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 5007 (1951).
80. Harley-Mason J., Jackson A. H., *J. Chem. Soc.* 1165 (1954).
81. Harris A. F., Saifer A., Volk B. V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **104**, 542 (1960).
82. Haruna Hidehiko, *Acta Paediatr. Jap.* **66**, 176 (1962).
83. Henderson L. M., Gholson L. K., Dagliesch C. L., w. Comparative Biochemistry, red.: M. Florkin, H. S. Mason, Vol. IV, Academic Press, New York—London 1962, str. 245.
84. Highton T. C., Garrett M. H., *Lancet* 1234 (1963).
85. Hill B. R., *Biol. Bull.* **115**, 471 (1958).
86. Himwich H. E., Himwich W. A., Biogenic amines, Progress in Brain Research Vol. 8, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1964.
87. Hoffer A., w: M. Rinkel, H. C. B. Denber: Chemical Concepts of Psychosis, McDowell—Obolensky, New York 1958.
88. Hoffer A., *Dis. Nerv. Syst.* **25**, 173 (1964).
89. Hoffer A., Osmond H., The chemical basis of clinical psychiatry, C. Thomas, Springfield, Ill. 1960.
90. Hoffer A., Osmond H., *Lancet* **24**, 643 (1962).
91. Hoffer A., Osmond H., *Canad. Med. Ass. J.* **87**, 641 (1962).
92. Hoffer A., Osmond H., Callbeck M. J., Kahan I., *J. Clin. Exp. Psychopathol.* **18**, 131 (1957).
93. Hoffer A., Osmond H., Smythies J. B., *J. Ment. Sci.* **100**, 29 (1954).
94. Hofmann A., Heim R., Brack A., Kobel H., Frey A., Ott H., Petrzilka T., Troxles F., *Helv. Chim. Acta* **42**, 1557 (1959).
95. Hollander W., Michelson A. L., Wilkins R. W., *Circulation* **16**, 246 (1957).
96. Humphrey J. H., Jaques R., *J. Physiol.* **124**, 305 (1954).
97. Inouye A., Kataoka K., Shinagawa J., *Nature* **194**, 286 (1962).
98. Jakowlewa A. A., Czernow G. A., Tr. 2-j Wsjeros. Konf. Dietsk. Wraczej 1962, Medgiz 1963, str. 161.
99. Jepson J. B., Zaltman P., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Acta* **62**, 91 (1962).
100. Karki K., Kuntzman R., Brodie B. B., *J. Neurochem.* **9**, 53 (1962).
101. Karreman G., Isenberg I., Szent-Györgyi A., *Science* **130**, 1191 (1959).
102. Kataoka K., *Jap. J. Physiol.* **12**, 623 (1962).
103. Kirberger E., Braun L., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 391 (1961).
104. Kishimoto Y., Takahasi N., Egani F., *J. Biochem.* **49**, 436 (1961).
105. Koella W. P., *Praxis* **51**, 1267 (1962).
106. Kosztójanc Ch. S., *Izw. A. N. Armen. S.S.R.* **10**, 13 (1957).
107. Kosztójanc Ch. S., Rózsa S. K., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hungar.* **19**, 189 (1961).
108. Krawczyński J., *J. Neurochem.* **7**, 1 (1961).
109. Lembeck F., *Nature* **172**, 910 (1953).
110. Lerner A. B., Case J. D., *J. Invest. Derm.* **32**, 211 (1959).
111. Lerner A. B., Case J. D., Heinzelman R. V., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 6084 (1959).

112. Lerner A. B., Case J. D., Mori W., Wright M. R., *Nature* **183**, 1821 (1959).
113. Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y., *J. Biol. Chem.* **235**, 1992 (1960).
114. Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y., Lee T. H., Mori W., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2587 (1958).
115. Loomer H. P., Saunders J. C., Kline N. S., *Psychiatr. Res. Rep. Wash.* **8**, 129 (1957).
116. Lumsden C. E., Pomerat C. M., *Exptl. Cell Res.* **2**, 103 (1951).
117. Marchbanks R. M., Rosenblatt F., O'Brien R. D., *Science* **144**, 1135 (1964).
118. Marrazzi A. S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **92**, 990 (1961).
119. Marrazzi A. S., Hart E. R., *Science* **121**, 365 (1955).
120. Mc Geer E. G., Mc Geer P. L., Mc Lennan H., *J. Neurochem.* **8**, 36 (1961).
121. Mead J. A. R., Finger K., *Biochem. Pharmacol.* **6**, 52 (1961).
122. Michaelson J. A., Whittaker V. P., *Biochem. Pharmacol.* **11**, 505 (1962).
123. Nakajima H., Thuillier J., *Compt. Rend. Senn. Soc. Biol.* **152**, 270 (1958).
124. Naranjo Vargas P., *Rev. Confed. Med. Panam.* **6**, 1 (1959).
125. Navratilova A., Brftislav S., *Vnitřni lekar.* **9**, 1065 (1963).
126. Nejmark I. I., Urazajewa Z. W., *Wopr. Klin. Chir.*, Barnauli, 114 (1963).
127. Opieńska-Blauth J., Charęziński M., *Post. Biochem.* **10**, 215 (1964).
128. Opieńska-Blauth J., Cheręziński M., Berbeć H., *Anal. Biochem.* **6**, 69 (1963).
129. Paasonen M. K., Mc Lean P. D., Giarman N. J., *J. Neurochem.* **1**, 326 (1957).
130. Page I. H., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **105**, 58 (1952).
131. Page I. H., *Physiol. Revs.* **38**, 277 (1958).
132. Page I. H., Mc Cubbin J. W., *Circul. Res.* **1**, 354 (1953).
133. Parish D. J., Crawford N., Spencer A. T., *Thorax* **19**, 62 (1964).
134. Peart W. S., Porter K. A., Robertson J. I. S., Sandler M., Bal-
dook E., *Lancet* **239** (1963).
135. Perry T. L., Hansen S., Tischler B., Hestrin M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **105**, 560 (1960).
136. Petrašek J., *Českoslov. fysiolo.* **12**, 34 (1963).
137. Pletscher A., Shore P. A., Brodie B. B., *Science* **122**, 374 (1955).
138. Pletscher A., Shore P. A., Brodie B. B., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **116**, 84 (1956).
139. Potter L. T., Axelrod J., *Nature* **194**, 581 (1962).
140. Puente-Duany G. A., Riemer W. E., Miale J. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **98**, 499 (1959).
141. Quay W. B., *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 473 (1963).
142. Rapport M. M., *J. Biol. Chem.* **180**, 961 (1949).
143. Rapport M. M., Green A. A., Page I. H., *Science* **108**, 329 (1948).
144. Rapport M. M., Green A. A., Page I. H., *J. Biol. Chem.* **174**, 735 (1948).
145. Rees L., *Nature* **186**, 114 (1960).
146. Rieder H. P., Böhmer M., *Experientia* **14**, 463 (1958).
147. Rieder H. P., Böhmer M., *Helv. Chim. Acta* **42**, 1793 (1959).
148. Rieder H. P., Böhmer M., *Clin. Chim. Acta* **5**, 520 (1960).
149. Rodnight R., *Biochem. J.* **64**, 621 (1956).
150. Ryall R. W., *Nature* **196**, 680 (1962).

151. Ryall R. W., *J. Neurochem.* **11**, 131 (1964).
152. Salánki J., *Comp. Biochem. Physiol.* **8**, 163 (1963).
153. Salánki J., Balla L., *Ann. Biol. Tihany* **31**, 117 (1964).
154. Scarlato G., Manzini B., Canal N., *Riv. Sper. Freniatr.*, Suppl. **3** (1959).
155. Schwarz V., Goldberg L., Kromrower G. M., Holzel A., *Biochem. J.* **62**, 34 (1956).
156. Shanberg S., Giarman N. J., *Biochem. Biophys. Acta* **41**, 556 (1960).
157. Shanberg S., Mc Ilroy C. A., Giarman N. J., *Fed. Proc.* **20**, 144 (1961).
158. Shaw E., Woolley D. W., *J. Biol. Chem.* **203**, 979 (1953).
159. Shaw E., Woolley D. W., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* **111**, 43 (1954).
160. Shore P. A., Olin J. S., *J. Pharmacol.* **122**, 295 (1958).
161. Shore P. A., Pletscher A., Tomich E. G., Carlsson A., Kuntzmann R., Brodie B. B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **66**, 609 (1957).
162. Sirek A., *Nature* **179**, 376 (1957).
163. Sjewierin S. E., Liu Szu-seń, Popowa I. A., w: 1-wyj Wsjesoj. Biochim. Sjezd, Tezisy Dokł. Wyp. 1, 102 (1964).
164. Smith S. E., *Brit. J. Pharmacol.* **20**, 178 (1963).
165. Smythies J. B., *Lancet* 1287 (1960).
166. Speeter M. E., Anthony W. C., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 6208 (1954).
167. Speeter M. E., Heinzelmann R. V., Weisblatt D. I., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 5514 (1951).
168. Tissot R., Monoamines et système nerveux central, G. Douin Cie, Paris 1961.
169. Twarog B. M., Page I. H., *Am. J. Physiol.* **175**, 157 (1953).
170. Udenfriend S., Clarck C. T., Titus E., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 501 (1953).
171. Udenfriend S., Lovenberg W., Sjoerdsma A., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 487 (1959).
172. Udenfriend S., Weissbach H., *Fed. Proc.* **13**, 412 (1954).
173. Udenfriend S., Weissbach H., Bogdanski D. F., *Science* **122**, 972 (1955).
174. Udenfriend S., Weissbacht H., Clarck C. T., *J. Biol. Chem.* **215**, 337 (1955).
175. Vaccarezza J. R., Bochi A., *Ann. Allergy* **21**, 448 (1963).
176. Vane J. R., *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 344 (1957).
177. Varley H., Gownenloek A. H., The clinical chemistry of monoamines, Elsevier Publ. Co, Amsterdam 1963.
178. Vialli M., Erspamer V., *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **19**, 743 (1933).
179. Walaszek E. J., *World Neurol.* **2**, 602 (1961).
180. Walaszek E. J., Abood L. G., *Fed. Proc.* **16**, 133 (1957).
181. Walaszek E. J., Abood L. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **101**, 37 (1959).
182. Wald J., Murawski K., Szajbel W., *Post. Hig. Med. Dośw.* **13**, 697 (1959).
183. Wasson R. G., *Trans N. Y. Acad. Sci.* **21**, 325 (1959).
184. Way E. L., Sutherland V. C., *Anesthesiol.* **24**, 543 (1963).
185. Weissbach H., Bogdanský D. F., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **73**, 492 (1958).
186. Weissbach H., Redfield B. G., *J. Biol. Chem.* **235**, 3287 (1960).
187. Weissbach H., Redfield B. G., Titus E., *Nature* **185**, 99 (1960).
188. Welsh J. H., *Nature* **173**, 955 (1954).

189. Welsh J. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **66**, 618, (1957).
190. Welsh J. H., Moorhead M., *J. Neurochem.* **6**, 146 (1960).
191. West G. B., *J. Pharm. Pharmacol.* **10**, 589 (1958).
192. Whittaker V. P., *Biochem. Pharmacol.* **1**, 351 (1958).
193. Whittaker V. P., *Biochem. J.* **72**, 694 (1959).
194. Wiegand R. G., Scherfling E., *J. Neurochem.* **9**, 113 (1962).
195. Wieland T., Motzel W., *Ann. Chem.* **581**, 10 (1953).
196. Woolley D. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 197 (1958).
197. Woolley D. W., *Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **36**, 381 (1958).
198. Woolley D. W., *Science* **128**, 1277 (1958).
199. Woolley D. W., *The Biochemical Bases of psychoses*, J. Wiley, Sons, New York — London 1962.
200. Woolley D. W. (chairman): Amine oxidase inhibitors, Conference 1958, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **80**, 551 (1959).
201. Woolley D. W., Campbell N. K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **96**, 108 (1962).
202. Woolley D. W., Gommi B. W., *Nature* **202**, 1074 (1964).
203. Woolley D. W., Gommi B. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **52**, 14 (1964).
204. Woolley D. W., Shaw E., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2948 (1952).
205. Woolley D. W., Shaw E., *Brit. Med. J.* **2**, 122, (1954).
206. Woolley D. W., Shaw E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **40**, 228, 289 (1954).
207. Woolley D. W., Shaw E., *Science* **124**, 34 (1956).
208. Woolley D. W., Van Winkle E., Shaw E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **43**, 128 (1957).
209. Zettler G., Schlosser L., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **222**, 345 (1953).
210. Zieher L. M., De Robertis E., *Biochem. Pharmacol.* **12**, 596 (1963).
211. ZS-Nagy I., S-Rözsa K., Salánki J., Földes I., Perényi L., Demeter M., *J. Neurochem.* **12**, 245 (1965).
212. Zucker M. B., Rappaport M. N., *Fed. Proc.* **13**, 170 (1954).
213. Zaráfontis Ch., Kalas J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **105**, 560 (1960).

RECENZJE

Recenzja książki *Pteridine Chemistry*

Pteridine Chemistry, red. Wolfgang Pfleiderer, Edward C. Taylor, Pergamon Press, Symposium Publications Division, Oxford, England, XIX + 535 str., 1964, cena 5 funtów.

Z tytułu sądząc *Chemia Pterydyn* jest podręcznikiem dotyczącym wąskiej, ściśle ograniczonej dziedziny; okazuje się jednak, że jest czymś więcej. Pozycja ta zawiera materiały 3 Międzynarodowego Sympozjum poświęconego chemii pterydyn, które odbyło się we wrześniu 1962 roku. w NRF w Stuttgarcie.

Już z pobieżnego zapoznania się z treścią widać, że jest to na pewno pożyteczne dla specjalistów podsumowanie problematyki z zakresu pterydyn, będące zarazem dla niespecjalistów lekturą wręcz fascynującą. Różnorodne opracowania, obejmujące wszystkie szczegółowe aspekty chemii pterydyn, stanowią równocześnie bogatą ilustrację ścisłej więzi między chemią a biologią tych związków datującej się od czasów, kiedy ponad 75 lat temu Hopkins wyekstrahował barwnik pterydynowy ze skrzydeł motyla.

Niespecjalista znajdzie bardzo interesujący wykład wprowadzający Schopfa, który rozwijając wstępne odkrycia Hopkinsa zapoczątkował w 1924 roku systematyczne badania nad chemią pterydyn. Wykład ten jest krótkim przeglądem rozwoju chemii pterydyn zaczynającym się od omówienia prac Hopkinsa nad wyodrębnieniem ze skrzydeł motyli białego i żółtego barwnika a kończącym się sformułowaniem szeregu aktualnych zagadnień czekających na rozwiązanie. Opracowane zostały praktycznie wszystkie działy chemii pterydyn i ich pochodnych z uwzględnieniem biologii i enzymologii. Znaleźć tu można prace wszystkich chyba znanych specjalistów i pionierów tej dziedziny.

Nie brakuje nawet krótkiego rozdziału o rozwoju właściwej techniki mikroanalizy elementarnej, napisanego przez J. Fildesa, znanego australijskiego specjalisty w tym zakresie.

Dla specjalistów, a także tych, którzy pracują w dziedzinach zbliżonych, szczególnie cenne są obszernie, dosłowne sprawozdania z dyskusji prowadzonych po każdym doniesieniu. W niektórych przypadkach część dyskusyjna jest tak rozbudowana, że nawet przekracza objętością doniesienia oryginalne. Sprawozdania z dyskusji podnoszą wartość całej książki. Czytelnik zainteresowany tematem znajdzie tu wiele pożytecznych informacji — np. nie opublikowane dane Wooda dotyczące nieenzymatycznego termicznego przekształcenia 8-rybitylo-6,7-dwumetylo-lumazyny w ryboflawinę w środowisku wodnym (str. 460—461) oraz podobne dane Plauta dla tej samej reakcji katalizowanej enzymatycznie.

Warto chyba zacytować wyjątek z końcowego przemówienia przewodniczącego Sympozjum E. C. Taylora, który przypomniał, że w pierwszym Sym-

pozjum (Paryż, 1952) wzięło udział tylko 18 uczestników. Drugie Sympozjum, zorganizowane w Ciba Foundation w Londynie w 1954 r. objęło już szeroki wachlarz zagadnień z zakresu chemii, biochemii, biologii, mikrobiologii i medycznych zastosowań pterydyn. Ale nawet w tym okresie „...kwas foliowy był jedyną znaną występującą w przyrodzie pochodną pterydynową mającą znaczenie w metabolizmie, a prawdę mówiąc niezbyt wiele wiedziano o jego metabolicznej roli. W czasie następnych ośmiu lat zyskaliśmy znaczną wiedzę o tych problemach. Wraz z poznaniem innych występujących w przyrodzie pterydyn o aktywności koenzymatycznej stanęliśmy na progu nowego okresu rozwoju w tej dziedzinie”.

Organizatorom ostatniego Sympozjum i redaktorom omawianej książki należy się szczególne uznanie za znakomitą treść i umiejętny sposób jej przedstawienia. Wydaje się, że powinna ona trafić do szerokich kręgów naukowych odbiorców. Wydawcy, z kolei zasługują na uznanie ze względu na świetny papier i czcionkę drukarską, które jeszcze bardziej zachęcają do lektury. Jest to jedna z tych książek, które zasługują na poczesne miejsce na półce pracownika naukowego zainteresowanego chemią oraz biologią związków heterocyklicznych.

D. Shugar

Recenzja książki R. W. Bailey — *Oligosaccharides*

R. W. Bailey *Oligosaccharides*, wyd. Pergamon Press, 1965 VII + 178 str.

Książka Bailey'a ukazała się jako czwarty tom sekcji biochemicznej międzynarodowej serii monografii z zakresu biologii czystej i stosowanej. Podaje ona przegląd poznanych dotychczas kilkocukrowców występujących w stanie wolnym oraz otrzymanych w wyniku syntezy i degradacji wielocukrowców zarówno na drodze chemicznej jak i enzymatycznej. Autor przyjmuje, że kilkocukrowce są to związki zbudowane z 10 lub mniej reszt cukrowych, i stosuje dla nich nazwy zgodne skróconą nomenklaturą Whelana, pozwalającą na względnie proste i jednoznaczne określenie związków wieloskładnikowych z grupy cukrowców. Cztery pierwsze rozdziały autor poświęca zagadnieniom ogólnym omawiając w nich zasady nomenklatury kilkocukrowców, ich syntezy i hydrolizę, wydzielanie, oczyszczanie i ustalanie struktury. W krótkim tym omówieniu autor uwzględnił przede wszystkim metody nowe podając dosyć obszerną bibliografię. Dalsze 7 rozdziałów zawiera kompletny spis znanych kilkocukrowców podzielonych na kilka grup z podaniem ich charakterystyki i bibliografią. Charakterystyka zawiera: nazwę skróconą wg Whelana, nazwę zwyczajową, ścisłą nazwę chemiczną zgodną z regułami podanymi przez towarzystwa chemiczne amerykańskie i brytyjskie, skręcalności właściwe związków oraz ich octanów i innych pochodnych, temperatury topnienia, charakterystykę znanych pochodnych, sposób otrzymywania, jeżeli związek otrzymano w wyniku syntezy chemicznej lub enzymatycznej ewentualnie degradacji wielocukrowców i wreszcie występowanie w przyrodzie z dokładnym podaniem wszystkich źródeł, z których dany związek wyizolowano. W rozdziałach 4, 5 i 6 — omówiono kilkocukrowce homogenne pod względem składników cukrowych, w rozdziałach 7, 8 i 9 — heterogenne, w rozdziale 10 — zawierające aminocukry a w 11 — kwasy uronowe. Książka zaopatrzona jest w trzy indeksy. Pierwszy z nich to indeks kla-

syfikacyjny ułożony według składników cukrowych uszeregowanych w porządku alfabetycznym (np. D-altroza, 1-amino-1-deoksy-D-glukoza itp.) na grupy. W każdej grupie stosuje się dalszy podział ze względu na: homogenność lub heterogenność, redukcyjność lub nieredukcyjność, zawartość aminocukrów i kwasów uronowych. Drugi indeks obejmuje nazwy zwyczajowe a trzeci to indeks ogólny. W sumie książka Beileya jest podręczną encyklopedią wiadomości o kilkocukrowcach.

Z. Kasprzyk

Autoreferaty prac habilitacyjnych i doktorskich

Rola estrogenów w procesie wydalania i przemiany kwasu cytrynowego

LEON ŻELEWSKI

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii Biologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Recenzenci: Prof. dr. S. BYCZKOWSKI, prof. dr. M. GÓRSKI,
prof. dr. I. MOCHNACKA

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego AM w Gdańsku z dnia 8. X. 1964 nadająca stopień naukowy *docenta biochemii*

Stwierdzono, że estrogeny powodują kilkudniowe obniżenie wydalania kwasu cytrynowego w moczu samic normalnych i po owariektomii, jednodniowe obniżenie u samców normalnych i po kastracji. U samic po obustronnej adenalektomii nie wystąpił istotny spadek wydalania kwasu cytrynowego po podaniu 17- β -estradiolu.

Wykazano, że estrogeny wywołują spadek wydalania chlorku sodowego w moczu, który jednak nie zawsze jest równoległy do spadku wydalania kwasu cytrynowego u szczurów z zachowanymi nadnerczami. Brak natomiast istotnego spadku wydalania sodu i chlorków po podaniu 17- β -estradiolu u samic po obustronnej adenalektomii.

Estrogeny powodują zmniejszenie wydalania potasu. Efekt ten jest wywołany zmniejszoną ilością przyjętego pokarmu, gdyż stosunek wydalonego potasu do azotu całkowitego wydalonego z moczem pozostaje nie zmieniony.

Stężenie sodu, potasu i chlorków osocza pozostaje nie zmienione w dniach wywołanego estrogenami maksymalnego spadku wydalania kwasu cytrynowego moczu.

Skojarzone podanie estrogeny i amidu kwasu nikotynowego wywołuje wzrost wydalania kwasu cytrynowego i α -ketokwasów w pierwszym dniu po iniekcji. W drugim i trzecim dniu obserwowano spadek wydalania kwasu cytrynowego u samic (normalnych i po owariektomii), podczas gdy samce (normalne i po kastracji) reagują spadkiem tylko w trzecim dniu.

Synteza kwasu cytrynowego z kwasu pirogronowego i szczawiooctowego przez homogenaty nerkowe i wątrobowe szczurów po iniekcji benzoesanu estradiolu i amidu kwasu nikotynowego jest zwiększona niezależnie od tego czy zwierzęta zabijano w okresie wzrostu, czy spadku wydalania kwasu cytrynowego *in vivo*. Za

wzrost syntetyzowanego kwasu cytrynowego odpowiedzialny jest amid kwasu nikotynowego.

Najmniejsze stężenie estrogenów dodane *in vitro*, zdolne istotnie hamować utlenianie kwasu cytrynowego do kwasu α -ketoglutazarowego, wynosi dla mitochondriów 10^{-5} M. Utlenianie kwasu cytrynowego do kwasu α -ketoglutazarowego przez homogenaty i mitochondria otrzymane z wątroby i nerki szczurów po podaniu estrogenów *in vivo* nie różni się istotnie od wartości uzyskanych dla szczurów grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że działanie estrogenów w procesie zmniejszonego wydalania kwasu cytrynowego w moczu jest związane ze zwiększoną reabsorpcją sodu i chlorków przez nerki. Zmniejszone wydalanie kwasu cytrynowego, sodu i chlorków po podaniu estrogenów jest uzależnione od obecności nadnerczy, a nie gruczołów płciowych.

Dyskutowano, czy zmiany wywołane przez estrogeny są wynikiem wtórnego zwiększonego działania hormonów kory nadnerczy.

Rozprawę wydrukowano w *Acta Biologica et Medica Societatis Scientiarum Gedanensis* 8, 325 (1964).

Przemiany grupy 6-aminowej kwasu adenylowego w mięśniach różnych zwierząt

JERZY UMIASTOWSKI

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku

Promotor: docent dr MARIUSZ ŻYDOWO

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego AM w Gdańsku nadająca stopień naukowy doktora medycyny z dnia 26 listopada 1964 roku

Badano rozpowszechnienie procesów dezaminacji AMP oraz aminacji IMP w mięśniach kręgowców i bezkręgowców.

Aktywność AMP-aminohydrolazy wykazano w mięśniach dżdżownicy, ślimaka winniczka, raka, kraba, minoga, karpia, węgorza, pstrąga, certy, żaby, żółwia, jaszczurki, żmii, gołębia, szczura, świnki morskiej i człowieka. Aktywność mięśni dżdżownicy, raka, kraba, minoga, żółwia, jaszczurki i człowieka jest niższa od aktywności mięśni pozostałych zwierząt. Nie udało się wykazać aktywności badanego enzymu w mięśniach zwierząt szczeżui.

Proces aminacji IMP do AMP wykazano w mięśniach człowieka, gołębia, żółwia i żaby, natomiast nie stwierdzono go w mięśniach raka i krewetek. Wykazano, że produktem pośrednim aminacji w mięśniach żaby i gołębia jest kwas adenilobursztynowy.

Stwierdzono, że mięśnie zwierząt szczeżui (które nie wykazują aktywności AMP-aminohydrolazy) wykazują aktywność ATP-azy.

W mięśniach odwłoka raka wykazano obecność endogennego kwasu 5'-adenylowego, dającego się ekstrahować buforem bursztynianowym o pH 6,0 w ilości około 4 μ moli na gram tkanki.

Praca była opublikowana w *Acta Biochim.Polon.* 11, 459 (1964).

Lipidy cholinowe nerwów obwodowych ze szczególnym uwzględnieniem lizolecytyny

JAN PRZYJEMSKI

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor: prof. dr WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku z dnia 23 kwietnia 1964 roku nadająca stopień naukowy doktora medycyny

Celem pracy było: a) porównanie zawartości lipidów cholinowych ze szczególnym uwzględnieniem lizolecytyny w nerwie kulszowym, istocie białej i szarej u królika; b) ocena stopnia zależności poziomu lizolecytyny w tkance nerwowej od zawartości fosfolipidów; nerwu kulszowego człowieka cytowanych w piśmiennictwie.

Materiałem doświadczalnym były poszczególne części układu nerwowego królików domowych, oraz ludzki nerw kulszowy uzyskany ze zwłok względnie podczas operacji. Lipidy ekstrahowano układem chloroform—metanol 2:1 (v:v), a rozdzielane na kolumnie z mieszaniną kwas krzemowy — Hyflo Super Cel 2:1 (w:w), oraz na bibule impregnowanej kwasem krzemowym.

Zawartość fosfolipidów w nerwie kulszowym królika, w istocie białej i rdzeniu przedłużonym jest bardzo podobna i odpowiednio wynosi 105,0; 101,0; 109,0 μ moli/gram tkanki. W istocie szarej mózgu natomiast jest znacznie niższa i wynosi 58,6 μ moli/gram tkanki. We wszystkich częściach układu nerwowego królika lipidy cholinowe reprezentują około 50% fosforu lipidowego. Nerw kulszowy, istota biała, rdzeń przedłużony, istota szara zawierają odpowiednio 0,46; 0,36; 0,33; 0,18 μ moli lizolecytyny na gram tkanki. Udział procentowy lizolecytyny fosfolipidów całkowitych nie wykazuje natomiast istotnych różnic w poszczególnych częściach układu nerwowego. Wydaje się być uzasadniony pogląd, że zawartość lizolecytyny w tkance nerwowej jest uzależniony od poziomu fosfolipidów.

Poziom fosfolipidów w ludzkim nerwie kulszowym, oczyszczonym jedynie z otaczających go tkanek, jest niski i wynosi 14,0—20,0 μ moli/gram tkanki. Podobne dane cytuje G. R. Webster i R. H. S. Thompson. Według Longa poziom ten jest znacznie wyższy i sięga 100 μ moli/gram tkanki. Ilość fosfolipidów bliską wartościom podanym przez Longa wykazują izolowane pęczki włókien nerwowych. Nerwy kulszowe z dwóch osobników zawierały 70,0 i 83,0 μ moli fosforu lipidowego/gram tkanki. Zawartość lizolecytyny we włóknach tych nerwów wynosiła odpowiednio 0,31 i 0,33 μ moli na gram tkanki. Wartości te są blisko ośmiokrotnie wyższe od cytowanych przez G. R. Webstera i R. H. S. Thompsona.

**Kwasy rybonukleinowe i rybonukleazy *Paramecium caudatum*
i *Paramecium aurelia***

MARIA GROSS

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Akademii Medycznej
w Łodzi

Promotor: Prof. dr BRONISŁAW FILIPOWICZ

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego, Akademii Medycznej w Łodzi nadająca
stopień doktora medycyny z dnia 24 października 1964 r.

W pierwszym etapie pracy, ustalono warunki masowej hodowli pierwotniaków i otrzymywania ich w ilościach umożliwiającym prowadzenie badań biochemicznych. Masowe kultury prowadzono wspólnie z lek. Bogną Skoczylas w Zakładzie Biologii Doświadczalnej Instytutu im. M. Nenckiego w Warszawie.

Do izolowania kwasów rybonukleinowych (RNA) zastosowano modyfikację podanych w literaturze metod fenolowych. Otrzymany RNA frakcjonowano siarczanem streptomycyny. Obok zwykle otrzymywanych tą metodą frakcji wysokopolimeryzowanego RNA (h-RNA) rozpuszczalnego w 1 M NaCl i frakcji RNA tworzącego rozpuszczalny kompleks ze streptomycyną (s-RNA), otrzymano jeszcze frakcję RNA tworzącego nierozpuszczalny kompleks ze streptomycyną, ale rozpuszczalnego w 1 M NaCl. Po wykluczeniu możliwości depolimeryzującego działania rybonukleaz (RN-az) w czasie trwania preparatyki, oraz na podstawie stałego występowania tej frakcji stwierdzono, że nie jest ona artefaktem, lecz występującą stale u tych pierwotniaków frakcją RNA. Ustalono, że zawartość RNA oraz stosunek wzajemny poszczególnych frakcji do siebie, waha się znacznie w zależności od stanu odżywienia i rozwoju hodowli. h-RNA oraz otrzymana trzecia frakcja mają podobne własności i zbliżony skład nukleotydowy, co pozwala przypuszczać, że obie te frakcje pochodzą z jednego gródka — z rybosomów komórkowych. W składzie nukleotydowym RNA obu gatunków pierwotniaków, a szczególnie w *Paramecium aurelia* stwierdzono wysoki stosunek puryn do pirymidyn.

Homogenaty *Paramecium caudatum* i *Paramecium aurelia* mają wysoką aktywność rybonukleazy kwaśnej z optimum działania w pH między 5 a 6. RN-azę *Paramecium aurelia* oczyszczano 20-krotnie stosując strącanie białek balastowych siarczanem protaminy i wysalanie siarczanem amonowym. Tak oczyszczony enzym frakcjonowano na kolumnie z CM-celulozy i otrzymano dwie aktywne frakcje. Preparaty te były całkowicie wolne od enzymów towarzyszących: dezoksyrybonukleazy, niespecyficznej fosfodwuesterazy i niespecyficznej nukleotydyazy. Badane RN-azy są termolabilne, jednak w miarę oczyszczania stają się coraz bardziej odporne na działanie podwyższonej temperatury. Hamujący wpływ jonów metali jest stosunkowo niewielki za wyjątkiem rtęci inaktywującej całkowicie, oraz jonów cynku, kobaltu i kadmu inaktywujących w około 50%. EDTA, heparyna i streptomycyna nie wpływają na ich aktywność.

Stwierdzono niską specyficzność badanych rybonukleaz. Rozkładają one zarówno polinukleotydy, poli U, jak i poli A, oraz nukleotyd graniczny. Wykazują wyższą aktywność w stosunku do substratu otrzymanego z tego samego materiału, co stwierdzono szczególnie w stosunku do wysokopolimeryzowanych frakcji RNA z *Paramecium*.

Estry fosforanowe krwinek czerwonych w gościecu przewlekłym postępującym

JÓZEFA LORENC

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Akademii Medycznej
w Łodzi

Promotor: Prof. dr BRONISŁAW FILIPOWICZ

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Łodzi nadająca stopień
naukowy doktora medycyny z dnia 30 marca 1965 r.

Na zaburzenia przemiany węglowodanowej u chorych na gościec przewlekły postępujący zwrócił uwagę już Pemberton w 1920 roku. W latach 1949—50 Haydu wysunął sugestię, że zaburzenia te uwarunkowane są brakiem odpowiedniej ilości związków wysokoenergetycznych — szczególnie ATP. Jednakże badania poziomu ATP we krwi pełnej u chorych z chorobami kolagenowymi, które przeprowadzili Györki i Sandell stosując metodę chromatografii bibułowej, nie wykazały wyraźnych różnic w zawartości tych związków u ludzi zdrowych i chorych.

Założeniem pracy było ponowne sprawdzenie czy ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne u chorych na gościec przewlekły postępujący mają wpływ na metabolizm krwinki czerwonej. W tym celu przebadano zawartość nukleotydów adeninowych i innych estrów fosforanowych krwinek czerwonych ludzi chorych i porównano je z zawartością tych metabolitów w krwinkach ludzi zdrowych. Pierwszy etap polegał na oznaczeniu sumy adeniny pochodzącej ze wszystkich związków adeninowych, zawartych we frakcji kwasorozpuszczalnej krwi żyłnej. W badaniu stosowano metodę Leyko, która polega na ekstrakowaniu adeniny kwasem solnym z osadu srebrowego puryn i spektrofotometrycznym lub polarograficznym jej oznaczeniu. Przebadano 90 osób chorych na gościec przewlekły postępujący. Średnie wartości adeniny wyrażone w mM/litr erytrocytów są następujące: u chorych — 1,35, u zdrowych — 1,68. Po opracowaniu statystycznym okazało się, że u chorych poziom adeniny jest obniżony o około 19%. Nie stwierdzono zależności zawartości adeniny we krwi od okresu chorobowego ani od otrzymywanego leku; jedynie leczenie solganalem wywiera minimalny wpływ w kierunku normalizacji poziomu badanych związków.

Drugi etap pracy polegał na rozfrakcjonowaniu estrów fosforanowych krwinek czerwonych na kolumnie chromatograficznej wypełnionej anionitem *Dowex* i według metody Bartletta. Stwierdzono następujące różnice u ludzi chorych na gościec przewlekły postępujący w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych: 1) obniżenie poziomu ATP o około 32% — średnia wartość u zdrowych 0,92 μM /ml erytrocytów, u chorych — 0,63 μM /ml erytrocytów; 2) podwyższenie poziomu ADP o około 30% — średnia wartość u zdrowych 0,21 μM /ml erytrocytów, u chorych 0,28 μM /ml erytrocytów; 3) obniżenie zawartości 2,3-DPG o około 37% — u zdrowych 5,03 μM P/ml erytrocytów, u chorych 3,18 μM P/ml erytrocytów; 4) zwiększenie zawartości heksozodwufosforanów — u zdrowych 0,57 μM P/ml erytrocytów, u chorych 0,74 μM P/ml erytrocytów.

Jak wykazali liczni autorzy, m.in. Buell (1930—35), później Bishop, Jorgensen i Rohdewald, nukleotydy adeninowe zawarte są tylko w krwinkach czerwonych, nie występują zupełnie w osoczu. W związku z tym wszystkie zmiany

ich stężenia są odbiciem procesów toczących się we wnętrzu krwinki, a nie wskazują na wymianę związków adeninowych między krwią a tkankami otaczającymi. Otrzymane wyniki wskazują więc na daleko posunięte zaburzenia metabolizmu w krwinkach czerwonych u chorych na gościec przewlekły postępujący — przede wszystkim glikolizy. Wyniki te mogłyby sugerować istnienie jakiejś przeszkody metabolicznej, która hamowałaby proces glikolizy przed powstaniem aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Mogłyby to być zaburzenia w aktywności enzymatycznej aldolazy lub izomezazy fosfotriozy. Wskazuje na to nagromadzenie się heksozodwufosforanów przy równoczesnym niedoborze 2,3-DPG. Z kolei zmniejszona zawartość 2,3-DPG warunkuje niski poziom ATP w krwinkach i być może zaburzenia w cyklu fosfoglicerynianowym, wykrytym przez Rapoportą w erytrocytach ssaków.

Część wyników została opublikowana: 1) J. Loren c, I Krajowy Kongres Biochemii Łódź 1963. Streszczenie prac, str. 104; 2) J. Loren c, W. Leyko, *Clinica Chimica Acta* 9, 585 (1964).

Sprawozdania i komunikaty

Sprawozdanie z Międzynarodowego Sympozjum na temat regulacji metabolizmu w mitochondriach, Bari (Włochy) 26 kwietnia — 1 maja 1965 r.

Metabolizm mitochondriów stanowi przedmiot żywego zainteresowania biochemików. Organelle te są, jak wiadomo, miejscem, gdzie zlokalizowana jest większość wewnątrzkomórkowych procesów oddechowych i sprzężonej z utlenianiem syntezy ATP. Badania ostatnich lat wykazują ścisłą zależność między metabolizmem mitochondriów a ich strukturą, a ponadto coraz wyraźniej uwidocznia się wzajemne powiązanie i współzależność różnych procesów przemiany materii zachodzących w mitochondriach.

Regulacji procesów metabolicznych w mitochondriach i ich zależności od struktury poświęcone było międzynarodowe sympozjum, jakie odbyło się w Bari we Włoszech w końcu kwietnia 1965 r. Organizatorami sympozjum byli: prof. E. C. Slater i dr J. M. Tager z Laboratorium Biochemii Uniwersytetu Amsterdamskiego oraz prof. E. Quagliariello i dr S. Papa z Instytutu Chemii Biologicznej Uniwersytetu w Bari. Sympozjum miało charakter zamknięty. Wzięło w nim udział około 60 zaproszonych biochemików europejskich i dwóch amerykańskich. Sympozjum trwało 6 dni. Przedstawiono 34 referaty dotyczące następujących zagadnień: 1) morfologicznej i biochemicznej organizacji mitochondriów; 2) regulacji wykorzystywania substratów, 3) regulacji transportu wodoru i przemian energetycznych, 4) aktywności syntetycznej mitochondriów i 5) wpływu hormonów i innych substancji.

Strukturę mitochondriów omówił V. P. Whittaker. Główną uwagę zwrócił on na zmiany zachodzące w mitochondriach w czasie ich izolacji oraz na znaczenie tzw. „podjednostek błon wewnętrznych”, które zostały wykryte kilka lat temu (H. Fernandez-Morán, D. F. Parsons) i którym niektórzy biochemicy (D. E. Green, G. Chance, E. Racker) przypisują istotną rolę w transporcie elektronów lub w sprzężonej z nim fosforylacji. Whittaker jest jednak zdania, że „podjednostki” te są artefaktami wynikłymi ze zmian zachodzących w czasie izolowania, a następnie utrwalania i barwienia mitochondriów. Natomiast część dyskutantów podtrzymywała pogląd, że „podjednostki” są strukturami realnie istniejącymi w mitochondriach.

Następne referaty (D. Pette, H. W. Heldt i M. Klingenberg) dotyczyły przestrzeni wewnątrzmitochondrialnych i lokalizacji w nich enzymów i innych substancji. Jak się wydaje, enzymy łańcucha oddechowego zlokalizowane są w wewnętrznych błonach mitochondrialnych, większość dehydrogenaz cyklu kwasów trójkarboksylowych w błonie zewnętrznej, natomiast nukleotydy adeninowe (ADP i ATP) w *matrix*.

E. C. Slater przedstawił przegląd obecnych teorii oksydacyjnej fosforylacji. Wszystkie one, prócz teorii chemiosmotycznej Mitchella, przyjmują występowanie wysokoenergetycznych nieufosforylowanych i ufosforylowanych intermedia-

tów o nieznaną na razie budowę. Istnieje obecnie coraz więcej danych wskazujących, że pewne endoergiczne procesy zachodzące w mitochondriach mogą wykorzystywać te właśnie intermedyaty jako źródło energii. Ilustracją tego były następne referaty, w których wykazywano, że transport jonów przez błony mitochondrialne (J. B. Chappell, C. S. Rossi) i reakcja transhydrogenacji z NADH na NADP (C. P. Lee) mogą czerpać energię zawartą w intermediatach fosforylacji. Przedstawiono również dane sugerujące, że synteza białek (A. M. Kroon) i aktywacja kwasów tłuszczowych w mitochondriach (L. Wojteczak) mogą zachodzić kosztem wysokoenergetycznych intermediatów.

Zupełnie inaczej tłumaczy mechanizm oksydacyjnej fosforylacji teoria chemiosmotyczna P. Mitchella. Odrzuca ona istnienie substancji pośredniczących między transportem elektronów a syntezą ATP, jak również powstawanie wysokoenergetycznych intermediatów. Przyjmuje natomiast anizotropowość błon mitochondrialnych, która sprawia, że jony H^+ mogą przenikać przez błony tylko w jednym kierunku. Jony H^+ powstające w wyniku transportu elektronów są również wydzielane tylko na jednej stronie błony mitochondrialnej. W wyniku tego w odpowiednich miejscach błon mitochondrialnych powstają warunki sprzyjające łączeniu się ADP z ortofosforanem z wytworzeniem ATP.

Zagadnieniom transportu jonów w mitochondriach oraz pęcznienia i skurczu mitochondriów poświęcona była odrębna grupa referatów. Wiadomo, że izolowane mitochondria utleniające substraty oddechowe w obecności fosforanu i ADP, tzn. w warunkach, kiedy możliwa jest synteza ATP, nie wykazują większych zmian morfologicznych. Błona mitochondrialna ma wówczas ograniczoną przepuszczalność wobec kationów. J. B. Chappell stwierdził, że antybiotyk gramicydyna znosi tę zdolność kontrolowania przepuszczalności. W obecności jonów potasowych i fosforanowych następuje wówczas akumulacja pierwszych z nich w mitochondriach, czemu towarzyszy pęcznienie mitochondriów. Akumulacja jonów potasowych zachodzi przeciw gradientowi stężeń i wymaga dostarczenia energii; w danym przypadku jest to energia utleniania substratów oddechowych. Pęcznienie mitochondriów jest według Chappella zjawiskiem wtórnym, związanym ze wzrostem ciśnienia osmotycznego wewnątrz mitochondriów. Zarówno akumulacja jonów potasowych jak i pęcznienie jest hamowane przez inhibitory oddechowe i przez substancje rozkładające związki wysokoenergetyczne (np. 2,4-dwunitrofenol).

Akumulacja wapnia w mitochondriach omawiana była przez C. S. Rossi'ego. Proces ten, podobnie jak gromadzenie jonów potasowych, wymaga dostarczenia energii, której źródłem może być albo utlenianie substratów, albo dodany ATP. Szczególnie pod wpływem ATP obserwuje się intensywne gromadzenie wapnia, który następnie może odkładać się w mitochondriach pod postacią widocznych w mikroskopie elektronowym ziarnistości zasadowego fosforanu wapnia. Nie tylko gromadzenie, ale i utrzymanie zakumulowanego wapnia we wnętrzu mitochondriów wymaga nakładu energii.

Dyskutowano „fizjologiczność” opisanych tu zjawisk. Wydaje się, że akumulacja jonów i pęcznienie mitochondriów na małą skalę są odwracalne i są zależne od stanu funkcjonalnego łańcucha oddechowego. Natomiast pęcznienie na dużą skalę wywołane np. działaniem kwasów tłuszczowych, tyroksyny, glutationu lub ortofosforanu w nieobecności substratów oddechowych prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia błon mitochondrialnych. Mitochondria takie mogą się wprawdzie „kurczyć” pod wpływem ATP, lecz — jak to podkreślano — skurcz ten nie jest powrotem do formy wyjściowej. W pewnych warunkach spęczniałe mitochondria nie kurczą się po dodaniu ATP (oraz Mg^{++} i albuminy surowiczej); konieczne jest wówczas dodanie jeszcze pewnych substancji nazwanych czynnikami skurczu. Nie-

które z tych czynników zostały zidentyfikowane jako katalaza i peroksydaza glutationowa (D. Neubert i A. Wojtczak) oraz jako fosfolipidy inozitolowe i aktywne kwasy tłuszczowe (P. V. Vignais).

Niniejsze sprawozdanie zawiera jedynie krótki przegląd niektórych referowanych na sympozjum zagadnień. Pełny tekst wszystkich referatów i dyskusji będzie opublikowany nakładem firmy wydawniczej Elsevier (Amsterdam).

A. Wojtczak i L. Wojtczak

Sprawozdanie z sympozjum na temat flawin i flawoprotein, 10—15 czerwca 1965 r., Amsterdam

Na wzór sympozjum na temat enzymów hematynowych, które odbyło się w 1959 r. Canberra (Australia), w dniach 10—15 czerwca 1965 r. odbyło się w Amsterdamie (Holandia) sympozjum na temat flawin i flawoprotein. Protektorat nad sympozjum objęły: Międzynarodowa Unia Biochemiczna (IUB) oraz Królewska Akademia Nauk Holandii, które pokryły — pierwsza koszty podróży, druga — koszt pobytu uczestników sympozjum.

Organizatorami sympozjum byli prof. E. C. Slater z Uniwersytetu w Amsterdamie oraz prof. C. Veeger z Uniwersytetu Rolniczego w Wageningen, przy współpracy Komitetu Doradczego w osobach: H. Beinert, B. Chance, P. Handler, P. Hemmerich, V. Massey i **R. K. Morton**. I Sympozjum miało charakter zamknięty i wzięło w nim udział 51 uczestników z następujących krajów: USA — 26, Holandia — 12, Wielka Brytania — 2, Norwegia — 2, NRF — 2, Szwecja — 2, Włochy — 2, Japonia — 1, Polska — 1, Szwajcaria — 1, oraz 8 obserwatorów m.in. M. Kamen, N. O. Kaplan, L. S. Merriwetter, B. L. Valle.

W ciągu pięciu dni obrad wygłoszono 25 referatów 30 minutowych i przeznaczono 30 min. na dyskusję po każdym referacie. Tematykę sympozjum można podzielić na trzy grupy: 1) Fizykochemia flawin i flawoprotein, 2) Charakterystyka i mechanizm działania szeregu flawoprotein oraz 3) zreferowane przez B. Chance'a spektrofotometryczne, fluorymetryczne i kinetyczne badania flawin w tkankach, zawieszinach komórek, mitochondriach i ich fragmentach.

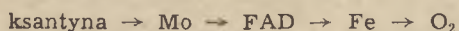
Obrady sympozjum wykazały, że flawoproteiny — pozornie mało zróżnicowana grupa enzymów oksydoredukcyjnych — wykazują wielką różnorodność mechanizmów działania. Warunkuje ją zarówno występowanie w cząsteczce enzymu jednego lub dwu nukleotydów flawinowych oraz możliwość udziału flawin w różnym stopniu utleniania (chinon, semichinon, hydrochinon) jak i to, że większość enzymów tej grupy zawiera szereg dodatkowych składników takich jak Fe, Mo, grupy SH lub S-S, biorących udział w katalizowanych reakcjach. Z tych względów wiele uwagi poświęcono w czasie sympozjum fizykochemii flawin i flawoprotein. Złożoność działania metaloflawoprotein badanych przy użyciu techniki rezonansu paramagnetycznego (EPR, ESR) przedstawił H. Beinert, pionier badań w tej dziedzinie. Sprawom metodycznym techniki ESR w zastosowaniu do badania flawin poświęcony był również referat A. Ehrenberga. Rolę kompleksów flawinowych przenoszących ładunek i ich znaczenie w biochemii omówił E. M. Kossower. G. R. Drysdale przedstawił wyniki trzech zastosowań izotopów wodoru do badań reakcji katalizowanych przez flawiny: 1) stereospecyficzności flawin w odniesieniu do substratu, 2) mechanizmu działania flawin i 3) pomiarów różnej siły wiązań kowalencyjnych ciężkich izotopów wodoru w porównaniu z wodorem.

Przeważająca część obrad sympozjum koncentrowała się nad mechanizmem działania szeregu flawoprotein uprzednio wyizolowanych i oczyszczonych. W ba-

daniach tych bardzo często korzystano z najnowszych technik jak ESR i pomiarów kinetycznych dokonywanych w czasie krótszym niż sekunda przy użyciu techniki *stopflow*.

Porównawcze badania nad rolą aktywnych składników w cząsteczce oksydazy aldehydów (2 FAD, 2 UQ₁₀, 2 Mo, 8 Fe, 8 labilnych grup SH), oksydazy ksantynowej (2 FAD, 2 Mo, 8 Fe, 8 labilnych grup SH), i w dehydrogenazie dwuhydroortotanu (1 FAD, 1 FMN, 2 Fe, 2 labilne grupy SH) zreferował P. Handler. Dwa pierwsze enzymy są typowymi hydroksylazami, ponieważ atom tlenu wprowadzony przez te enzymy do cząsteczki substratu pochodzi z wody. Występujący w nich Mo jest kowalencyjnie związany z atomem siarki i to wiązanie jest akceptorem jonu wodorkowego (H⁻) z cząsteczki substratu.

Z badań R. C. Braya nad składem i mechanizmem działania oksydazy ksantynowej z mleka wynika, następująca sekwencja transportu elektronów:



Techniką ESR stwierdzono, że mechanizm redukcji enzymu zależy od czynnika redukującego. Jeśli jest nim podsiarczyn (Na₂S₂O₄) FAD jest redukowany wcześniej niż Mo. Grupy SH biorą udział w transporcie elektronów i w natywnym enzymie wydają się być ściśle związane z Mo.

Od pionierskich prac Beinerta (1956) nad udziałem semichinonów flawin (maksimum absorpcji przy długości fali około 570 mμ) w reakcjach katalizowanych przez flawoproteiny, analiza widma absorpcyjnego flawoprotein stała się częstą metodą badań. (np. dehydrogenazy lipoamidu, oksydazy D-aminokwasowej). Okazało się jednak, że nie zawsze prążek ten odpowiada semichinonowej formie enzymu. W przypadku peroksydazy NADH, referowanym przez Dolina, tworzeniu kompleksu między enzymem a substratem towarzyszą charakterystyczne zmiany widma — wygaszanie absorpcji przy długości fali 450 mμ (typowe dla większości flawin) i wzrost absorpcji przy długości fali 540 mμ. Kompleks ten, aktywny kinetycznie, jest w przeciwieństwie do semichinonu, stabilny zarówno w obecności nadmiaru substratu jak i substratu i podsiarczynu. Badania V. Massey'a i współpracowników poświęcone były zagadnieniu czy zmiany widma absorpcyjnego flawoprotein (dehydrogenazy lipoamidu, reduktazy glutationu, oksydazy D-aminokwasowej, oksydazy glukozy) po redukcji substratem są wynikiem powstawania kompleksów przenoszących ładunek czy powstawaniu semichinonowej formy flawin.

Obserwowane przez wielu badaczy nieznaczny spadek (15—18%) absorpcji przy długości fali 460 mμ w wyniku redukcji substratem dehydrogenazy bursztynianowej, zdaje się znalazł wytłumaczenie w sugestii D. Der Vartiana. Potrójny kompleks żelazo-flawina-siarka w dehydrogenazie bursztynianowej przyjmuje dwa równoważniki redukcyjne (jako jon wodorkowy lub w dwu jednoelektronowych etapach). Jednym z nich zostaje zredukowana flawina, drugim połączenie żelaza z siarką. W wyniku tego przy pomiarach ESR obserwuje się sygnał $g = 2.01$ charakterystyczny dla semichinonowej formy flawiny oraz niesymetryczny sygnał $g = 1.94$ dla połączenia żelaza z siarką.

C. Veeger przedstawił dane wykazujące, że współzawodnicze inhibitory dehydrogenazy bursztynianowej, oksydazy D-aminokwasowej, oksydazy L-aminokwasowej, tworzą kompleksy, które przesuwają odpowiednie prążki widma w kierunku długich lub krótkich fal analogicznie do przesunięć obserwowanych w przypadku wiązania się wolnych flawin z apoenzymem. Ponieważ inhibitory współzawodnicze tych enzymów posiadają zdolność oddawania elektronów, przypuszcza się, że obserwowane prążki są wynikiem tworzenia się kompleksów przenoszących ładunek między inhibitorem a flawiną.

K. Yagi mówił o sposobach otrzymywania w formie kryształicznej kilku po-

średników w reakcji katalizowanej przez oksydazę L-aminokwasową oraz podał ich charakterystykę spektralną.

Interesujące dane odnośnie mechanizmu działania mikrosomalnej oksydoreduktazy NADPH: cytochrom c w przenoszeniu elektronów z substratu na akceptory przyjmujące 1 elektron (cytochrom c, żelazicyjanek) i 2 elektrony np. 2,6-dwuchlorofenolindofenol (DCIP) przedstawił H. Kamin. W obu typach reakcji bierze udział bądź flawina zredukowana całkowicie ($FADH_2$) bądź zredukowana tylko w połowie ($FADH$). Nie bierze natomiast udziału forma utleniona flawiny (FAD). Dla porównania należy tu wspomnieć o przedstawionych przez A. Meistersa i D. Wellnera badaniach nad własnościami i mechanizmem działania oksydazy L-aminokwasowej z jadu węża (*Crotalus adamantus*). W cyklu katalitycznym tego enzymu całkowita redukcja enzymu nie ma miejsca gdyż w połowie zredukowany enzym ($FADH$) reaguje z tlenem szybciej niż całkowicie zredukowany. Obserwowana inhibicja substratowa jest spowodowana tworzeniem całkowicie zredukowanej formy, która wolno reagując z tlenem hamuje reakcję.

Ph. Strittmatter, który od szeregu lat prowadzi badania nad mikrosomalną oksydoreduktazą NADH: cytochrom b_5 referował wyniki doświadczeń, których celem była próba wyjaśnienia jaka jest sekwencja przeniesienia elektronów przez flawoproteinę z substratu oddającego 2 elektrony na akceptor przyjmujący 1 elektron jakim jest hem. Badania dotyczyły głównie sposobu powiązania hemu ze specyficznym białkiem oraz substratu z flawoproteiną a także współdziałania tych dwu białek — flawoproteiny z cytochromem b_5 . Sekwencja przeniesienia elektronów z substratu na akceptor została przedstawiona w interesujący sposób schematycznie w pięciu reakcjach cząstkowych.

Pokrewnym zagadnieniem były badania nad mechanizmem działania cytochromu b_2 tj. dehydrogenazy L (+) mleczanowej z tlenowych drożdży piekarskich. Cechą charakterystyczną tego enzymu jest występowanie w nim 2 cząsteczek FMN i 2 cząsteczek protohemu. Badania kinetyczne wykazały, że elektrony są przenoszone na obie grupy prostetyczne a z nich na szereg sztucznych akceptorów. Do całkowitej redukcji utlenionej formy enzymu potrzebne są trzy elektrony (w przeliczeniu na jedną cząsteczkę hemu), przy czym redukcja flawin, prawdopodobnie poprzez pośrednik semichinonowy, poprzedza wewnątrz cząstkowe przeniesienie elektronów na hem. Redukcja DCIP lub żelazicyjanku wydaje się przebiegać tylko przy udziale flawiny.

Podsumowaniem kilkuletnich badań był referat W.R. Frisella nad flawiną przenoszącą elektrony (ETF). Enzym ten bierze udział w reakcji:

sarkozyna \rightarrow dehydrogenaza sarkozyny (flawina) \rightarrow flawina przenosząca elektrony

(ETF) \rightarrow układ cytochromowy

Obie flawoproteiny są zlokalizowane w rozpuszczalnej frakcji mitochondrialnej. ETF przekazuje elektrony na łańcuch po stronie substratowej miejsca wrażliwego na antymycynę. Stosując dehydrogenazę sarkozyny, ETF i preparat mitochondrialny pozbawiony tych enzymów zrekonstruowano układ pierwotny utleniający sarkozynę. Stwierdzono również, że ETF może redukować NAD w reakcji wymagającej energii ATP dostarczanej przez fosforylujące cząstki mitochondriów wątroby szczura oraz w obecności sarkozyny i dehydrogenazy sarkozynowej. Autorzy przyjmują, że funkcja ETF jest analogiczna do funkcji dehydrogenazy np. bursztynianu, NADH lub α -glicerofosforanu przenoszących elektrony z substratów na łańcuch oddechow. Zasadnicza różnica polega na lokalizacji ETF w rozpuszczalnej frakcji mitochondriów.

Znana od dwudziestu lat oksydaza glukozy okazała się enzymem, który jak wykazali P.E.P. Swoboda i V. Massey zawiera dwie reszty fosforanowe

(nienależące do nukleotydów), 16% wagowo cukrowców oraz składnik o niebieskiej fluorescencji i silnej absorpcji przy długości fali 340 m μ . Uważa się, że składnik o podobnej fluorescencji może występować w wielu innych flawoproteinach ponieważ znaleziono go również w oksydazie ksantynowej z mleka.

Na temat dehydrogenazy NADH łańcucha oddechowego wyizolowanych i oczyszczonych w trzech laboratoriach: T. E. Kinga, B. Macklera i T. P. Singera zostały ogłoszone przez tych badaczy trzy referaty. Wspólna dyskusja nad tymi referatami w zasadzie nie wniosła więcej faktów niż to zostało przedstawione przez autora niniejszego sprawozdania (*Postępy Biochemii* 10, 7 (1964)). Zgodnie stwierdzono natomiast, że mechanizm przekształcenia cząsteczki dehydrogenazy o dużej masie, jaka prawdopodobnie występuje w mitochondriach, w dehydrogenazę NADH o masie cząsteczki około 100 000 i zmienionych własnościach nie jest właściwie znany i wymaga dalszych badań.

Materiały sympozjum zostaną opublikowane w formie książkowej przez wydawnictwo *Elsevier* (Holandia).

Z. Kaniuga

SPIS TREŚCI

J. Bryła i A. Gardas — Czynniki sprzęgające i wysokoenergetyczne przenośniki oksydacyjnej fosforylacji	395
W. Ardelt — Biochemia latyryzmu	413
J. Billewicz-Stankiewicz — Enzymy metabolizmu amin katecholowych	427
A. M. Dancewicz — Katabolizm hemoglobiny i przemiana barwników żółciowych	445
P. Szafranski i S. Klita — Kwasy nukleinowe i biosynteza białka	459
K. Kleczkowski — Drogi syntezy i rola metaboliczna karbamoilofosforanu	485
G. Raczyński i B. Żbikowski — Lipoaminokwasy i lipopeptydy	499
T. Gołaszewski — Związki białkowo-cukrowcowe moczu ludzkiego	509
R. W. Schramm i H. Schrammowa — Serotonina	521
Recenzja książki <i>Pteridine Chemistry</i> (D. Shugar)	541
Recenzja książki <i>Oligosaccharides</i> (Z. Kasprzyk)	542
Rola estrogenów w procesie wydalania i przemiany kwasu cytrynowego (L. Zelewski)	545
Przemiany grupy 6-aminowej kwasu adenyłowego w mięśniach różnych zwierząt (J. Umiastowski)	546
Lipidy cholinowe nerwów obwodowych ze szczególnym uwzględnieniem lizolecyliny (J. Przyjemski)	547
Kwasy rybonukleinowe i rybonukleazy <i>Paramecium caudatum</i> i <i>Paramecium aurelia</i> (M. Gross)	548
Estry fosforanowe krwinek w gościecu przewlekłym postępującym (J. Lorenc)	549
Sprawozdanie z Międzynarodowego Sympozjum na temat regulacji metabolizmu w mitochondriach, Bari (Włochy) 26 kwietnia—1 maja 1965 r. (A. Wojtczak i L. Wojtczak)	551
Sprawozdanie z sympozjum na temat flawin i flawoprotein, 10—15 czerwca 1965 r., Amsterdam (Z. Kaniuga)	553

POSTĘPY BIOCHEMII

November 1965

ARTICLES IN POLISH

Volume 11

Number 4

J. Bryła and A. Gardas — Coupling Factors and High-Energy Intermediates of Oxidative Phosphorylation (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	395
W. Ardel — Biochemistry of Lathyrism (Inst. Rheumatol. Diseases, Warszawa)	413
J. Billewicz-Stankiewicz — Enzymes of Catecholamine Metabolism (Dep. Gen. Exptl. Pathol. School Med., Lublin)	427
A. M. Dancewicz — The Catabolism of Haemoglobin and Bile Pigments Metabolism (Inst. Nuclear Res. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	445
P. Szafranski and S. Klita — Nucleic Acids and Protein Biosynthesis (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	459
K. Kleczkowski — Synthesis and Metabolic Role of Carbamoylphosphate (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	485
G. Raczyński and B. Żbikowski — Lipo-amino Acids and Lipo-peptides (Dep. Gen. Chem. School Med., Warszawa)	499
T. Gołaszewski — The Glycoproteines of Human Urine (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	509
R. W. Schramm and H. Schramm — Serotonine (Dep. Biochem. Univ., Poznań and Psych. Clin. School Med., Poznań)	521
Chronicle	541

ERRATA

do zeszytu 3 tomu 11/1965 *Postępów Biochemii*

str.	wiersz	jest	powinno być
311	Schemat 4	UDP-N-acetyloglukozamina	N-acetyloglukozamina
319	16 od dołu	łańcuchy	łańcuchy β
321	13 od góry	wiązania operatorowych	wiązania genów operatorowych
330	Tablica 1	Kwas glutaminowy Kwas asparaginowy	Kwas asparaginowy Kwas glutaminowy

INFORMACJE I WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

2. Prace należy przysyłać do Redakcji w 2 egzemplarzach maszynopisu i wszelkich załączników. Powinny one odpowiadać podanym dalej wskazówkom.

Nieodpowiednio przygotowane maszynopisy lub załączniki nie będą rozpatrywane przez Redakcję i będą odsyłane Autorom.

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

4. Na pierwszej stronie maszynopisu należy zamieścić tylko informacje w następującej kolejności: imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy (w języku polskim i angielskim), omówienie tematu pracy (w języku angielskim), stopnie i tytuły naukowe autorów wraz z nazwami placówek naukowych.

Imiona należy podawać w pełnym brzmieniu. Przy każdym nazwisku powinien znajdować się odsyłacz gwiazdkowy do notki, tj. *, ** itd. (bez nawiasu).

Omówienie tematu pracy może obejmować najwyżej 5 wierszy maszynopisu. Przekład na język angielski może być dokonany w redakcji i w tym przypadku należy pozostawić wolne miejsce w maszynopisie, zaś na oddzielnej kartce dołączyć polski tekst omówienia.

Na dole pierwszej strony maszynopisu należy zamieścić notki oznaczone odsyłaczami gwiazdkowymi (jak przy nazwiskach). Tekst notki powinien być podany następująco: * Dr, adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w ...

5. Właściwy tekst pracy rozpoczyna się od drugiej strony maszynopisu. W przypadku podziału tekstu na rozdziały i podrozdziały należy ich tytuły oznaczyć odpowiednio numeracją rzymską I, II. itd. oraz arabską 1., 2. itd. Tekstowe tytuły (tj. nie wydzielone z tekstu) nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków ani schematów. W tych przypadkach należy pozostawić wolny wiersz maszynopisu w żądanym miejscu i odpowiednio oznaczyć, Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1.

Ta sama wskazówka odnosi się do pojedynczych wzorów chemicznych i innych. Żądane miejsce w wolnym wierszu zaznacza się wówczas odpowiednim numerem w nawiasach, do którego należy odwołać się po odpowiednim słowie tekstu, np. kwas glutaminowy (I).

Odwoływanie się w tekście do notek wyjaśniających może być stosowane tylko w wyjątkowych przypadkach.

6. Cytowaną literaturę należy wypisać oddzielnie na ostatniej stronie (stronach) maszynopisu, wymieniając pozycje w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopism, tom (podkreślony), stronica i rok wydania (w nawiasach), np. 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). Należy wymienić nazwiska wszystkich współautorów w kolejności podanej w oryginalnej pracy.

Wykaz stosowanych skrótów czasopism podają *Post. Biochem.* 7 601 (1961).

Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora, tytuł dzieła, miejsce i rok wydania, np. Przyłęcki S. J., Podręcznik chemii fizjologicznej, Łódź 1947. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tom i nazwiska wydawców (redaktorów) dzieła po tytule oraz na końcu — stronicę, np. Schneider W. C., *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1957, str. 680.

Powolywanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej pozycji w nawiasach, np. (10).

7. Załączniki do pracy obejmują tablice, rysunki, schematy, wzory itp. Wszystkie powinny być oznaczone u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablice należy dołączyć na oddzielnych kartkach. Każda z nich powinna być oznaczona z prawej strony u góry kolejnym numerem arabskim, np. Tablica 1, oraz posiadać nagłówek opisujący jej treść, sens tablic powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu pracy, a każda rubryka — zaopatrzona w odpowiedni tytuł.

8. Wszelkie rysunki, wykresy i fotografie należy dołączyć do maszynopisu w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Wszystkie te załączniki należy oznaczyć jako rysunki i zaopatrzyć u dołu kolejnym numerem arabskim z podaniem właściwego ustawienia, np. Rys. 1 (dół).

Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać odpowiednio objaśnienia lub uwagę (objaśnienia w tekście).

9. Schematy reakcji i pojedyncze wzory należy zamieścić na oddzielnej kartce (kartkach). Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, powinny być bardzo wyraźnie naniesione czarnym tuszem.

Schematy należy oznaczyć u dołu kolejnym numerem arabskim, np. Schemat 1, oraz właściwym podpisem (tytuł i objaśnienia).

Pojedyncze wzory powinny posiadać numery rzymskie zgodne z numeracją w tekście.

10. Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się Autorowi egzemplarz pracy dla dokonania poprawek; drugi — pozostaje w aktach redakcji.

11. Autora obowiązuje korekta autorska, którą należy zwracać redakcji w ciągu 3 dni. Korektę należy wykonać kolorowym (nie czerwonym) ołówkiem.

Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor.

12. Artykuły są honorowane według ustalonych stawek. Autorzy otrzymują 25 bezpłatnych odbitek pracy. Żądanie większej ilości odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie przy zwrocie korekty autorskiej.