

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1970
tom 16
nr 1

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zaopatrzone w odpowiedni tytuł.

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Johns

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1970
tom XVI
zeszyt 1

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poz-
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki
Warszawa 12 ul. Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1969

Nakład 2080 (1934+146)	Oddano do składania 29.X.1969 r.
Ark. wyd. 11,5 ark. druk. 9,5 + 0,5 wkł.	Podpisano do druku w styczniu 1969
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w lutym 1969 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 2013/69 P-95.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JAN GEISLER *

Kalcytonina, jej własności i rola w homeostazie wapnia

Calcitonin, its Properties and the Role in Calcium Homeostasis

The source, physiological action, chemical structure and properties, as well as clinical uses of calcitonin are reviewed.

I. Dotychczasowe poglądy na homeostazę wapnia w ustroju

Stężenie wapnia w krwi podlega bardzo precyzyjnej regulacji. Normalne stężenie u człowieka wynosi 9,5—11 mg⁰/_o, czyli 4,75—5,5 mili-równoważników wapnia na litr. Już niewielkie odchylenia od normy powodują poważne zakłócenia, objawiające się przede wszystkim skurczem tężcowym lub tężyczką przy hipokalcemii, a zaburzeniami funkcji serca i jelit, oraz uszkodzeniami nerek przy hiperkalcemii. Poziom wapnia w krwi jest wypadkową procesów zachodzących w jelitach, nerkach i kościu. Jelito jest tym miejscem, gdzie wapń z pożywienia wnika do ustroju w ilości równej różnicy pomiędzy wchłanianiem jelitowym a wydzieleniem wapnia do światła jelit. Wapń opuszcza organizm poprzez nerki, a ilość wydalana określona jest bilansem funkcji wydzielniczej i wchłaniania zwrotnego kanalików nerkowych. Kość gra w ustroju rolę magazynu wapnia, a jego wpływ na regulację poziomu wapnia w krwi może realizować się zarówno poprzez resorpcję (rozpuszczenie), jak i poprzez depozycję (akrecję) świeżej substancji mineralnej, a także dzięki adsorpcji i desorpcji wapnia na powierzchni fazy mineralnej kości (55, 63).

Do wczesnych lat sześćdziesiątych obecnego stulecia sądzono (55, 63), że poziom wapnia w krwi regulowany jest wyłącznie poprzez gruczoły przytarczowe, które wytwarzają hormon zwany paratyreoidyną, hormonem przytarczyc, lub potocznie parathormonem. Jest to nierozgałęziony polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym około 8 600, składający się z 84 aminokwasów o niecałkowicie jeszcze wyjaśnionej sekwencji (4). Fizjologiczne działanie hormonu przytarczyc (4) polega na:

1. nasileniu procesu resorpcji kości,

* Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, Warszawa.

2. zwiększeniu wchłaniania wapnia z przewodu pokarmowego,
3. zwiększeniu wydalania fosforanów w moczu,
4. wzmożonej reabsorpcji wapnia w nerkach.

W wyniku każdego z tych procesów następuje podwyższenie poziomu wapnia w krwi. Wydzielanie parathormonu i poziom wapnia w krwi związane są ujemnym sprzężeniem zwrotnym.

Początkowo przyjmowano, że pierwotnym efektem jest zwiększenie wydalania fosforanów przez nerki (2). Na skutek wzmożonej fosfaturii maleje stężenie jonów fosforanowych w krwi, a iloczyn jonowy Ca^{2+} i HPO_4^{2-} (I) w krwi i w płynie pozakomórkowym omywającym kryształ hydroksyapatytu kości spada do wartości niższej od iloczynu rozpuszczalności (S) tego związku. Wówczas następuje rozpuszczanie hydroksyapatytu — jony wapniowe i fosforanowe przechodzą do płynu pozakomórkowego i do krwi, dzięki czemu I staje się znowu równe S, ale już przy innym, wyższym stężeniu jonów Ca^{2+} , a niższym stężeniu jonów HPO_4^{2-} .

Obecnie decydującą rolę w podwyższaniu stężenia wapnia w krwi przypisuje się raczej bezpośredniemu działaniu parathormonu na kość poprzez pobudzenie resorpcji kości. Stwierdzono bowiem, że:

1. nefrektomia nie ma wpływu na poziom wapnia w krwi, ani u zwierząt z nietkniętymi przystawkami ani u zwierząt po paratyreoidektomii (85),
2. przeszczepienie gruczołu przystawkowego wywołuje osteolizę w pobliżu miejsca przeszczepu (6),
3. dodatek parathormonu do hodowli tkanki kostnej *in vitro* powoduje wyraźny wzrost resorpcji kości (34, 71),
4. parathormon powoduje zwiększenie liczby osteoklastów (34, 85) — komórek kostnych, którym przypisuje się zdolność resorpcji kości. Wątpliwość budził jedynie fakt, że efekt parathormonu ujawniał się dopiero po dłuższym okresie czasu. Stwierdzono, że chociaż bodziec w postaci hipokalcemii wywołuje bardzo szybko zwiększone wydzielanie hormonu, to jednak resorpcję kości spostrzega się dopiero po kilku godzinach, a efekt maksymalny występuje po siedemnastu godzinach od zadziałania bodźca (19). Znana zdolność ustroju ssaków do szybkiej normalizacji poziomu wapnia po wywołaniu hipokalcemii nie mogła zatem być tłumaczona wyłącznie działaniem parathormonu na kość.

Dla rozwikłania tej sprzeczności Rasmussen (72) postulował, że parathormon wpływa bezpośrednio również i na nerkę. Działanie na nerki jest szybkie, lecz ograniczone, nie są one w stanie opanować skutków silnych lub długotrwanie działających bodźców hipokalcemicznych. Natomiast działanie na kość jest powolne ale kość jest praktycznie niewyczerpanym magazynem wapnia i zapewnia możliwość uzupełnienia poważniejszych jego ubytków. Według Rasmussena parathormon działa na nerki wywołując wzmożoną fosfaturię. W wyniku ubytku fosforanu do krwi przechodzą jony fosforanowe i wapniowe, które były zaadsorbo-

wane na powierzchni kości w tak zwanej wymiennej puli mineralnej. Jest to pierwszy, szybki proces zwiększający poziom wapnia w krwi. Jednocześnie nasila się resorpcja kości, dostarczając dalszych jonów Ca^{2+} i HPO_4^{2-} z rozpuszczonego hydroksyapatytu. W miarę jak krew, omywając kość, staje się nasycona względem wapnia i fosforanu, w kości spowrotem odkłada się pula wymiennego wapnia.

Hipoteza Rasmussena nie tłumaczyła jednak zadowalająco regulacji poziomu wapnia w krwi w przypadkach działania czynnika hiperkalcemicznego, a poza tym efekt nerkowy okazał się bardzo słaby, na co wskazuje nieznaczny tylko spadek stężenia wapnia w krwi mimo dużych nawet zmian poziomu fosforanu (4).

II. Historia odkrycia kalcytoniny

Od wielu lat w literaturze naukowej pojawiały się sugestie, że istnieje jeszcze jeden hormon regulujący homeostazę wapnia. W 1951 roku R u c a r t (80) wyróżnił dwie populacje komórkowe przytarczyc, z których każdej przypisał wydzielanie odmiennej substancji. Komórki populacji jasnej, chromofobowej, miałyby wydzielać wywołujący hiperkalcemię parathormon, a komórki populacji ciemnej, chromofilnej — czynnik „antyhiperkalcemiczny”. W tejże publikacji (80) R u c a r t cytuje prace wcześniejsze, z których wynikają pewne przesłanki do postulowania obecności drugiego hormonu kontrolującego gospodarkę wapniową organizmu. Przesłanki te, jak również sugestie z prac późniejszych (22, 81) opierają się w zasadzie na dwu spostrzeżeniach:

1. u zwierząt z usuniętymi przytarczycami wpływ egzogenego parathormonu na podwyższenie poziomu wapnia w krwi jest wyraźniejszy, a opanowanie wynikłej hiperkalcemii trudniejsze, niż u zwierząt kontrolnych, nie operowanych,
2. istnieją dwie postacie nadczynności przytarczyc, jedna przebiegająca ze zmianami w kościach (*osteitis fibrosa*) i druga, w której obserwuje się jedynie hiperkalcemię i hiperfosfaturię, ale nie występuje rentgenologicznie wykrywalne uszkodzenie kości. Nasuwało się podejrzenie, że różnice w wydzielaniu lub w aktywności tego drugiego hormonu warunkują istnienie tych dwóch odmian nadczynności.

W roku 1961 C o p p i C a m e r o n (16) wykazali wreszcie obecność tego czynnika hipokalcemicznego w wyciągu z gruczołów przytarczycowych. Dożylnie wstrzyknięcie handlowego preparatu tego wyciągu wywołało u psów przejściową hipokalcemię. W ciągu pierwszych dwudziestu minut po wstrzyknięciu poziom wapnia w osoczu obniżył się o około 0,5 mg^{0/0}, a następnie począł wzrastać w sposób charakterystyczny dla odpowiedzi na parathormon. Autorzy wyciągnęli ze swego doświadczenia wnioszek, że

zastosowany wyciąg przytarczyc zawierał poza parathormonem także czynnik hipokalcemiczny o działaniu szybkim, ujawniającym się wcześniej niż działanie parathormonu. Copp i Cameron nazwali ten czynnik kalcytoniną (ang. *calcitonin*).

Następnie Copp i wsp. zaobserwowali, że perfuzja przytarczyc psa *in situ* krwią o wysokiej zawartości jonów wapnia wywołuje spadek stężenia jonów wapnia w krwi obwodowej i to spadek znaczniejszy niż obserwowany po usunięciu przytarczyc. Doświadczenie to nie pozostawiało już wątpliwości co do istnienia czynnika hormonalnego, regulującego stężenie wapnia w krwi i wykazującego własności przeciwstawne w tym względzie do parathormonu. Czynniki ten działając wcześniej niż parathormon spełniał postulat szybkiej regulacji kalcemii.

Wkrótce po odkryciu przez Coppę kalcytoniny rozgorzał spór na temat tego, jaki gruczoł produkuje ten hormon. Zagadnienie to było kontrowersyjne, gdyż u psów (zwierzęciem doświadczalnym Coppę był pies) przytarczycy i tarczycy wzajemnie się przerastają i są zaopatrywane przez wspólne naczynia krwionośne. Copp (15) podtrzymywał pogląd, że źródłem kalcytoniny są przytarczycy, natomiast inni badacze (30, 46, 47) wskazywali na tarczycę i dla odróżnienia od kalcytoniny Coppę, Hirsch i wsp. (46) czynnik hipokalcemiczny otrzymany z gruczołu tarczowego szczura nazwali tyrokalcytoniną (ang. *thyrocalcitonin*). Stanowiska te starali się pogodzić: Care (12), który twierdził, że każdy z tych gruczołów wytwarza hormon obniżający stężenie wapnia we krwi, oraz Gittes i Irvin (39), którzy postulowali, że przytarczycy wydzielają czynnik humoralny, konieczny dla uwolnienia tyrokalcytoniny z tarczycy do krwi.

Rozstrzygnęły tę sprawę prace Fostera i wsp. (25, 27). Zwierzętami doświadczalnymi były w tych pracach kozy. U zwierząt tych jeden z gruczołów przytarczycowych, tzw. zewnętrzny, znajduje się z dala od tarczycy i zaopatrywany jest w krew przez oddzielne naczynie krwionośne, co umożliwia perfuzję jednej z przytarczyc przy jednoczesnym usunięciu gruczołu tarczowego. Perfuzja krwią o wysokim stężeniu wapnia u zwierzęcia z nietkniętą tarczycą i przytarczycami powodowała obniżenie poziomu wapnia w krwi obwodowej, natomiast po wycięciu tarczycy, gdy przemywany był jedynie gruczoł przytarczycowy, hipokalcemii nie obserwowano (27). Foster (25) wykazał również, że tarczycy wydziela tyrokalcytoninę po usunięciu przytarczyc i tym samym obalił hipotezę Gittesa i Irvina (39) o czynniku przytarczycowym warunkującym wydzielanie tyrokalcytoniny z tarczycy. Otrzymano (5, 27, 47) także ekstrakty o działaniu hipokalcemicznym z tarczycy po starannym oddzieleniu i usunięciu z niej komórek przytarczyc. W wyniku tych eksperymentów można było położyć znak równości pomiędzy kalcytoniną Coppę a tyrokalcytoniną Hirscha (59).

III. Występowanie kalcytoniny w ustroju

Kalcytonina występuje nie tylko u ssaków. Wykryto ją u wszystkich badanych gatunków kręgowców (18, 58). U niższych kręgowców hormon ten produkowany jest przede wszystkim przez tak zwane ciała pozaskrzelowe (*corpora ultimobranchiales*), choć niewielkie ilości wykryto także w tarczycy ptaków i gadów. U ssaków wyłącznym źródłem kalcytoniny jest tarczyca, a jedynym znanym wyjątkiem jest człowiek, u którego źródłem kalcytoniny są również przytarczycy i grasica (36). Tablica 1 przedstawia przykładowo nieco danych o zawartości kalcytoniny w różnych tkankach zwierząt.

Tablica 1

Zawartość kalcytoniny u różnych kręgowców

Zwierzę	Tkanka	Zawartość Jedn. MRC* /g tkanki	Pozycja literatury
Rekin	ciałka pozaskrzelowe	15	18
Rekin	tarczyca	0	18
Jaszczurka	ciałka pozaskrzelowe	2,4—4,2	58
Jaszczurka	tarczyca	1,0	58
Kura	ciałka pozaskrzelowe	130	18
Kura	ciałka pozaskrzelowe	28,8—54,6	58
Kura	tarczyca	0	18
Kura	tarczyca	0,7—1,2	58
Świnia	tarczyca	2,6—4,3	18
Człowiek	tarczyca	0,03—0,5	36
Człowiek	przytarczycy	0,11—2,4	36
Człowiek	grasica**	0,04—0,18	36
Człowiek	mięsień szkieletowy	< 0,005	36

* jednostka MRC wg (50). Definicję podano na stronie 12.

** Kalcytoninę wykryto w czterech przypadkach na 16 badanych, stosując metodę, dla której granica wykrywalności wynosiła 0,005 jednostek MRC na 1 gram tkanki.

Stosunkowo bardzo wysokie stężenie kalcytoniny w ciałkach pozaskrzelowych kury wskazuje, być może, na pewien związek tych tworów z funkcją składania jaj (35, 57, 58), kiedy następuje przemieszczenie wielkich ilości wapnia w ptasim organizmie.

Prace Pearse'a i wsp. (11, 31, 66) wniknęły w zagadnienie wydzielania kalcytoniny od strony cytologicznej. Badacze ci stwierdzili, że kalcytoninę produkuje pewien tylko rodzaj komórek tarczycy, które Pearse nazwał komórkami C (ang. *C-cells*) (66). Tarczyca zbudowana jest w zasadzie z dwu rodzajów komórek. Są to komórki główne czyli pęcherzykowe (komórki A), oraz komórki okołopęcherzykowe (parafolikularne, komórki C) określane też jako komórki bogate w mitochondria. Komórki

główne tworzą wyściółkę pęcherzyków tarczycy, natomiast komórki C znajdują się pomiędzy pęcherzykami. Po wybarwieniu hematoksyliną i eozyną komórki C wydają się większe niż komórki główne i posiadają jaśniejsze jądra, jak również odmienny układ chromatyny jądrowej. Mitochondria w komórkach C są liczniejsze (stąd jedno z wyżej podanych określeń tych komórek) i rozłożone bardziej równomiernie w całej cytoplazmie — w komórkach głównych mitochondria skupione są od strony światła pęcherzyków. Cytoplazma komórek C zawiera liczne ziarnistości (11, 57, 74) otoczone pojedynczą błoną wewnątrzkomórkową. Te organelle komórkowe wypełnia wydzielina wykazująca dużą gęstość optyczną w mikroskopie elektronowym (11, 54). Również po utrwaleniu preparatu aldehydem glutarowym i czterotlenkiem osmu ziarnistości te można łatwo odróżnić w mikroskopie elektronowym od elementów aparatu Golgy'ego, reticulum endoplazmatycznego i pęcherzyków pinocytarnych (54). Jak wykazano metodą immunofluorescencji (44), właśnie w ziarnistościach o dużej gęstości optycznej skupia się kalcytonina. W jądrze komórkowym obecności kalcytoniny nie stwierdzono.

Komórki C różnią się od komórek głównych także bogatszym zestawem enzymów. W komórkach C Foster i wsp. (31) stwierdzili obecność fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, dehydrogenazy α -glicerofosforanowej, diaforazy zred. NAD i niespecyficznych esteraz (α -naftyłowej i indoksyłowej). Badacze ci (31) zaobserwowali, że perfundowanie tarczycy psa krwią o nadmiernie wysokim poziomie wapnia powoduje w komórkach C znaczny wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy, niewielki spadek aktywności dehydrogenazy α -glicerofosforanowej i wyraźny spadek poziomu esteraz. Perfuzja krwią hipokalcemiczną lub normalną nie wywoływała zmian aktywności wymienionych wyżej enzymów.

Wydaje się jednak, że podwyższone stężenie wapnia w krwi wpływa na wydzielanie kalcytoniny nie poprzez działanie na metabolizm komórek C i syntezę kalcytoniny, lecz dzięki zmianom przepuszczalności błony komórkowej i uwalnianiu gotowej kalcytoniny. Są dane (40, 54, 84) wskazujące, że kalcytonina jest stale produkowana przez komórki C, bez względu na stężenie wapnia w krwi przepływającej przez tarczycę, natomiast zmiany stężenia wapnia powodują różnice w uwalnianiu kalcytoniny z tarczycy do krwi.

Komórki C mają zdolność wybiórczego gromadzenia fluoryzujących amin (65, 77). 5-Hydryksytryptofan i L-dwuhydroksyfenyloalanina przenikają przez łożysko i odkładają się w komórkach C embriona, gdzie są metabolizowane do 5-hydroksytryptaminy i L-dopaminy. Fluorescencja tych związków pozwala zlokalizować położenie komórek C u embriona. Pearse i Carvalheira (67), posługując się tą metodą, stwierdzili, że w miarę rozwoju embriona szurzego komórki C początkowo spostrzegają się w czwartej kieszonce krtaniowej, następnie wchodzą w skład ciała

pozaskrzelowego i wreszcie wrastają w tarczycę. Z obserwacji tych C o p p i wsp. (18) zakładając analogię rozwoju ontogenetycznego i filogenetycznego, wyciągnęli wniosek, że w systemie regulacji gospodarki wapniowej ustroju ciała pozaskrzelowe i kalcytonina wyprzedzają ewolucyjnie zarówno kościec, jak i przytarczycę oraz parathormon.

IV. Fizjologiczne działanie kalcytoniny

Fizjologiczne działanie kalcytoniny polega przede wszystkim na obniżeniu poziomu wapnia w krwi (26, 27, 41, 47, 50, 51, 57). Jest to działanie szybkie, gdyż maksymalny skutek obserwuje się po około 50—60-ciu minutach po dożylnym wstrzyknięciu kalcytoniny (47, 56). Podobnie jak w przypadku parathormonu wydzielanie kalcytoniny związane jest ujemnym sprzężeniem zwrotnym ze stężeniem wapnia w krwi (13, 17, 20, 26, 51), z tą oczywiście różnicą, że bodźcem powodującym zwiększanie wydzielania kalcytoniny jest nie obniżony, lecz podwyższony poziom wapnia. Po podaniu kalcytoniny obserwujemy oprócz hipokalcemii również hipofosfatemię (26, 29, 41, 47, 51). Nie wchodzi tu w grę nieswoisty wpływ hormonu na elektrolity krwi, gdyż poziomy sodu, potasu i magnezu w krwi nie ulegają zmianom (26, 27, 29, 49). Obniżenie stężenia wapnia i fosforanów w krwi nie jest wywołane wpływem kalcytoniny na wydalanie przez nerki, gdyż po nefrektomii kalcytonina obniża poziom wapnia (41, 47, 79) i fosforanów (79) w krwi co najmniej równie efektywnie jak u zwierząt kontrolnych nieoperowanych. Co więcej, kalcytonina nie tylko nie zwiększa wydalania wapnia z moczem (26, 57), lecz raczej działa w kierunku przeciwnym (1).

Efekty działania kalcytoniny na kalcemię są tym znaczniejsze, im wyższy był początkowy poziom wapnia w krwi (26) i mogą być zredukowane do zera u zwierząt, które w wyniku wycięcia przytarczyc wykazują bardzo wyraźną hipokalcemię (79). Pełny efekt hipokalcemiczny kalcytoniny można natomiast wywołać u zwierząt, którym po usunięciu przytarczyc przywrócono prawidłowy poziom wapnia dzięki diecie wysokowapniowej a niskofosforanowej (26). Wycięcie przytarczyc wyłącza wówczas możliwość zmniejszania przez parathormon efektu działania kalcytoniny.

Ponieważ spadkowi zawartości wapnia w krwi, wywołanemu kalcytoniną, nie towarzyszy ani zwiększone wydalanie wapnia z moczem i z kałem (26, 57), ani akumulacja wapnia w tkankach miękkich (26), ani zmniejszone wchłanianie jelitowe (57), ani wreszcie spadku tego nie można tłumaczyć wpływem kalcytoniny na przytarczycę (47), przyjąć należy, że przyczyną obniżania poziomu wapnia w krwi jest działanie kalcytoniny na kości. Są zresztą na to dowody bezpośrednie:

1. Mierzono stężenie wapnia w krwi z tętnicy doprowadzającej i w krwi

żyły odprowadzającej krew z kości piszczelowej kota. Okazało się, że wprowadzenie kalcytoniny do krwi tętniczej powoduje niewielkie, lecz statystycznie znamienne zmniejszenie zawartości wapnia w krwi żyłnej. Ilość wapnia zatrzymana przez kość była zależna od stężenia hormonu (53).

2. W hodowli tkanki kostnej płodów szczurzych, znakowanej ^{45}Ca stwierdzono w obecności kalcytoniny zmniejszone wydzielanie wapnia-45 do środowiska inkubacyjnego (33, 74).

3. Badania radiologiczne wskazują, że kości zwierząt, które przez dłuższy czas otrzymywały podskórną kalcytoninę, posiadają mniejszą przepuszczalność dla promieni X i zwiększone uwapnienie (28).

4. Badania mikroskopowe kości zwierząt, które otrzymywały kalcytoninę przez dłuższy okres czasu (28), a także kości hodowanych *in vitro* w środowisku zawierającym kalcytoninę (74), wykazały znaczne zmniejszenie liczby osteoklastów w stosunku do kontroli bez kalcytoniny.

5. Kalcytonina wywołuje spadek wydalania hydroksyproliny z moczem (1, 37) przy niezmienionym współczynniku oczyszczania kreatyniny (73, 78). Obecność hydroksyproliny w moczu jest świadectwem rozpadu kolagenu, podstawowego białka kości.

Fakty przytoczone w punktach 2, 4 i 5 świadczą o tym, że kalcytonina hamuje resorpcję kości. Istnieją również dowody (33, 64), że hormon ten nie wpływa na proces tworzenia się świeżej tkanki kostnej, ani na depozycję hydroksyapatytu w kościach. Trzeba jednak zaznaczyć, że Gaillard (35) opierając się na wynikach własnych badań twierdzi, że kalcytonina ma wpływ również na proces tworzenia się kości. Istnieją przesłanki, że hormon ten działa hamująco na rozpuszczanie minerału kostnego, natomiast zmniejszanie rozpadu kolagenu kości jest już skutkiem pośrednim (10). Do podobnego wniosku doszedł również Gaillard (35), opierając się na dawno już znanym fakcie, że resorpcja kolagenu jest możliwa dopiero po demineralizacji jego włókien (23, 63). Heersche (45) przedstawił wyniki doświadczeń, które świadczą, że kalcytonina nie ma wpływu na spowodowaną przez parathormon resorpcję świeżo zsyntetyzowanego kolagenu.

Działanie kalcytoniny na nerki ujawnia się fosfaturią (78). Efekt ten obserwowano u zwierząt z wyciętymi przytarczycami, a więc w warunkach wykluczających analogiczne działanie parathormonu. Nie zmienia się natomiast, jak już wspomniano, wydalanie wapnia w moczu ani wydalanie kreatyniny (73, 78). Ponieważ szybkość sączenia kłębkowego nie ulega zmianie, istnieją dwie możliwości wytłumaczenia zwiększonego wydalania fosforanów:

1. bezpośrednie działanie kalcytoniny na kanaliki nerkowe (zmniejszona reabsorpcja) lub
2. pośredni efekt działania kalcytoniny na kość.

Poglądy na to zagadnienie są podzielone. Robinson, Foster, MacIntyre i inni (26, 51, 78, 79) sądzą, że istnieje bezpośredni wpływ kalcytoniny na nerki. Można go zauważyć jedynie u zwierząt pozbawionych przytarczyc, z bardzo znaczną hipokalcemią. U takich zwierząt kalcytonina nie wywołuje już dalszego spadku stężenia wapnia w krwi, gdyż resorpcja kości praktycznie zupełnie nie zachodzi. Obserwuje się natomiast wyraźny jeszcze spadek poziomu fosforanów w krwi (79). Spadek ten nie występuje u zwierząt, którym usunięto nerki. Rasmussen i jego grupa (73) negują istnienie bezpośredniego efektu nerkowego kalcytoniny i twierdzą, że fosfaturia jest wynikiem procesów zachodzących w kości, bowiem kalcytonina, hamując resorpcję i zmniejszając stężenie jonów wapniowych w krwi, pośrednio wywołuje fosfaturię. Na poparcie swych poglądów autorzy ci (73) przytaczają fakt, że dożylny wlew środka chelatującego wapń również powoduje wzmożone wydalanie fosforanów z moczem, prawdopodobnie jako skutek powstałej hipokalcemii. Działanie kalcytoniny byłoby więc analogiczne, z tym, że w odróżnieniu od środków chelatujących, hamuje ona resorpcję kości. Mimo stałego podawania tego hormonu wywołana przezeń fosfaturia jest tylko zjawiskiem przejściowym i po pewnym czasie przestaje się ujawniać ze względu na wstrzymanie dopływu jonów fosforanowych z kości. Natomiast fosfaturia spowodowana przez środki chelatujące ma charakter trwały i utrzymuje się przez cały czas ich działania, gdyż proces resorpcji kości dostarcza wciąż nowych jonów fosforanowych.

Praktycznie biorąc nic nie wiadomo na temat działania kalcytoniny na poziomie subkomórkowym. Jedyną hipotezę na ten temat wysunął DeLuca (21) opierając się na danych ze swych prac nad witaminą D i jej oddziaływaniem z parathormonem i kalcytoniną. Zgodnie z tą hipotezą witamina D jest konieczna do wytworzenia systemu transportującego, który umożliwi ruch wapnia i fosforanu z substancji mineralnej kości do krwi za pośrednictwem komórek kostnych — osteocytów. Parathormon i kalcytonina konkurują do miejsc na błonie komórkowej osteocytów i tym sposobem kontrolują szybkość wydzielania wapnia i fosforanu do płynu pozakomórkowego.

V. Otrzymywanie, budowa i własności chemiczne kalcytoniny

Do niedawna kalcytoninę otrzymywano wyłącznie z materiału biologicznego, najczęściej z gruczołów tarczowych świni. Otrzymywanie jest stosunkowo proste i zasadnicze etapy preparatyki są następujące (5, 52, 58, 83):

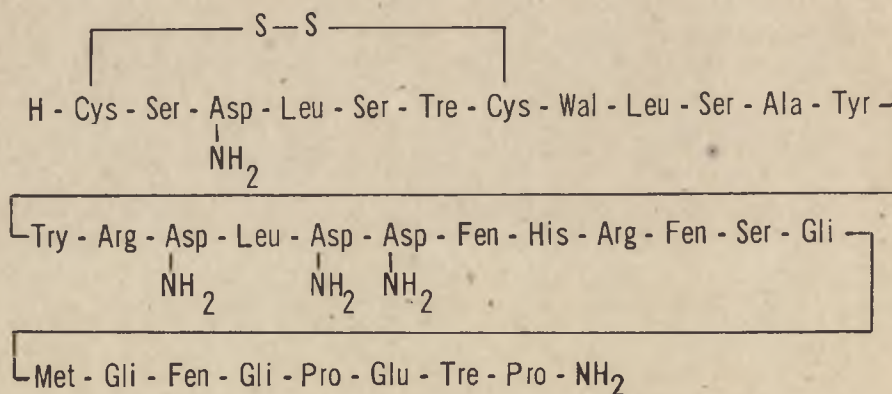
1. ekstrakcja kwasem solnym lub mieszaniną n-butanolu, kwasu octowego i wody,

2. frakcjonowane strącanie chlorkiem sodowym,
3. rozdzielanie na *Sephadex*'ie.

Otrzymywane preparaty mają aktywność hipokalcemiczną około 50 tysięcy razy wyższą niż wyjściowa tkanka tarczycy (68). Jako jednostkę aktywności przyjęto tak zwaną jednostkę MRC (*Medical Research Council*). Jest to ilość kalcytoniny 100 razy większa od dawki, która wstrzyknięta dożylnie szczurowi o ciężarze 150 g powoduje 10-procentowy spadek poziomu wapnia w krwi po 50 minutach (50). Otrzymano preparaty o aktywności sięgającej ponad 250 jednostek MRC na 1 mg (32, 48, 69, 70).

Preparaty kalcytoniny świni są trwałe w zakresie *pH* od 2 do 6 przez okres co najmniej dwutygodniowy. W optymalnym *pH* 4,6 ogrzewanie w 100°C w ciągu 15 minut obniża aktywność preparatów kalcytoniny zaledwie o 15%. Trawienie pepsyną, trypsyną lub chymotrypsyną całkowicie niszczy aktywność hormonu (32, 48, 87). Chromatograficznie i elektroforetycznie udało się rozdzielić preparaty kalcytoniny na dwie frakcje, nazwane kalcytoniną α i kalcytoniną β , każda o aktywności około 200 jednostek MRC na mg.

Budowa kalcytoniny świni jest dokładnie znana dzięki pracom kilku grup badaczy (7, 32, 62). Jest to polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 3 604, składający się z 32 aminokwasów, o sekwencji przedstawionej we wzorze I.



I

Jest to odmiana α , odmiana β różni się jedynie tym, że siarka metioniny jest utleniona (32, 62). Peptyd α , który jest produktem naturalnym, wytwarzanym w tarczycy, łatwo ulega utlenieniu, przechodząc w odmianę β , nie tracąc przy tym aktywności hipokalcemicznej.

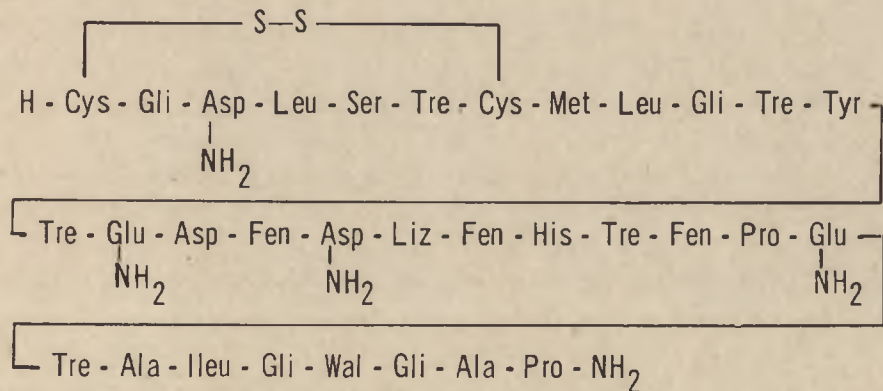
W roku 1968 w laboratoriach *Ciba* (76) i *Sandoz* (42) niezależnie od siebie przeprowadzono syntezę kalcytoniny α wychodząc z pojedynczych

aminokwasów. Otrzymany produkt był identyczny z preparatem otrzymanym z tarczycy świni pod względem własności chromatograficznych i elektroforetycznych, dawał identyczne produkty degradacji po trawieniu enzymami proteolitycznymi i nie różnił się własnościami biologicznymi. Nadtlenek wodoru utleniał go do produktu identycznego z kalcytoniną β (76).

Dzięki syntezie biologicznie czynnej kalcytoniny udowodniono, że substancja ta nie zawiera jodu. W sprawie tej istniały bowiem wątpliwości, gdyż niektórzy badacze (9) wykazywali obecność jodu w oczyszczonych preparatach kalcytoniny.

VI. Kalcytonina ludzka

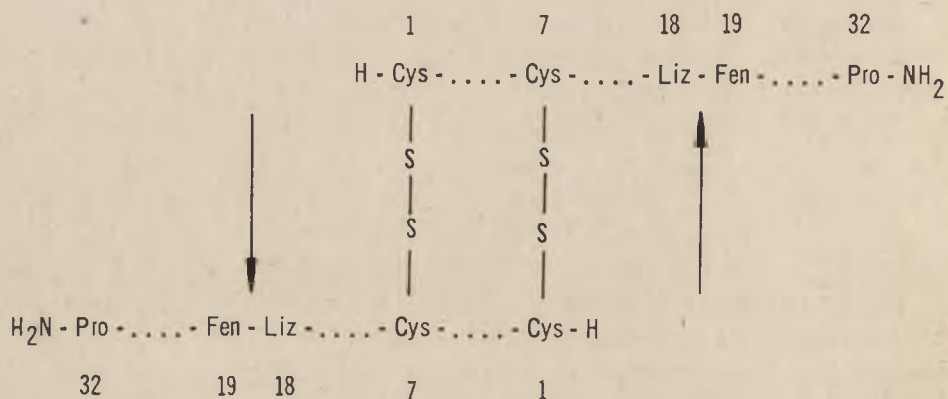
Czyste preparaty kalcytoniny ludzkiej otrzymano w 1968 roku (75) z guza śródpiersia zbudowanego z komórek C. Okazało się (75), że ludzka kalcytonina jest wprawdzie również nierozgałęzionym polipeptydem składającym się z 32 aminokwasów, ale budowa tego peptydu jest odmienna niż w przypadku kalcytoniny świni. Sekwencję aminokwasową kalcytoniny człowieka przedstawia wzór II (61).



II

Z porównania tego wzoru ze wzorem kalcytoniny świni (kalcytonina α) wynika, że oba polipeptydy różnią się aż 18-oma resztami aminokwasowymi. W kalcytoninie ludzkiej nie występują arginina i tryptofan, natomiast pojawiają się lizyna i izoleucyna. Metionina przesunięta jest z 25-go na 8-e miejsce licząc od końca N (cystyny) (61). Ciężar cząsteczkowy kalcytoniny ludzkiej wynosi 3419. Trypsyna trawi kalcytoninę ludzką na dwa fragmenty, składające się z 18-stu i 14-stu aminokwasów

(75), podczas gdy z kalcytoniny α otrzymuje się trzy fragmenty, zawierające 14, 7 i 11 reszt aminokwasowych (32). Kalcytonina ludzka znana jest jako monomer (kalcytonina M) i jako zawierający 64 reszty aminokwasowe dimer (kalcytonina D) (75). Budowę odmiany D przedstawia schemat 1 (61). Zarówno monomer jak i dimer są biologicznie aktywne.



Schemat 1. Schematyczne przedstawienie budowy kalcytoniny D jako antyrównoległego dimeru kalcytoniny M

Strzałki wskazują miejsce ataku trypsyny

Czyste preparaty posiadają aktywność rzędu 120 jednostek MRC na 1 mg suchej masy (75). Oba polipeptydy M i D można przeprowadzić w formy utlenione — odpowiedniki kalcytoniny β świni, ich aktywność biologiczna jest jednak, w odróżnieniu od kalcytoniny β , znikoma (75).

Kalcytoninę ludzką otrzymano syntetycznie w postaci monomeru o identycznych z preparatem naturalnym własnościach chemicznych i biologicznych (82).

Bardzo istotne różnice w chemicznej strukturze kalcytoniny ludzkiej i kalcytoniny świni są tym bardziej zaskakujące, że jak wykazano (8, 29, 43, 56), preparaty otrzymane z tarczycy świni wywołują efekt hipokalcemiczny także u człowieka. Ponieważ kalcytoninę ludzką M otrzymano preparatywnie z tkanki nowotworu złośliwego, nasuwało się przypuszczenie, że może to być patologiczna odmiana hormonu, produkowana przez guz. Wydaje się jednak, że kalcytonina M jest prawidłową kalcytoniną ludzką. Przemawiają za tym badania *Nehera* i wsp. (60). Wykryli oni kalcytoninę M w pierwotnych guzach tarczycy i w ich przerzutach u dalszych czterech osobników. U jednego z nich kalcytoninę M otrzymano, choć w bardzo małych ilościach, także z normalnej, nowotworowo niezmienionej tkanki tarczycy. W niektórych przypadkach stwierdzono także istnienie odmiany D, na ogół w ilościach kilkakrotnie mniejszych niż ilość odmiany M (60). Jak dotąd, nigdy nie znaleziono u człowieka kalcytoniny α .

VII. Znaczenie kalcytoniny w medycynie

W następstwie odkrycia kalcytoniny medycyna zainteresowała się możliwościami leczenia kalcytoniną niektórych chorób kości lub stanów patologicznych, którym towarzyszy hiperkalcemia a także związkami przyczynowym między wydzielaniem tego hormonu a niektórymi schorzeniami o nieznanej dotąd etiologii.

Informacje na te tematy są jeszcze nieliczne. Obniżenie poziomu wapnia w krwi po podaniu kalcytoniny zaobserwowano w przypadku łagodnej hiperkalcemii u dzieci wywołanej przedawkowaniem witaminy D₂ (56) a także w hiperkalcemii towarzyszącej rozsianej chorobie nowotworowej (29) w uogólnionej chorobie Pageta i w przypadkach wola toksycznego (8). Haas i Dambacher (43) donieśli, że obniżenie stężenia wapnia w krwi w przypadkach hiperkalcemii wywołanej różnymi przyczynami jest tym znaczniejsze, im wyższa była hiperkalcemia. Natomiast Bijvoet i wsp. (8) doszli do wniosku, że skuteczność kalcytoniny zależy nie tyle od stopnia hiperkalcemii, ile od szybkości obrotu wapnia w kości.

Obraz radiologiczny zmian kostnych u szczurów po długotrwałym podawaniu kalcytoniny (28) pozwala przypuszczać, że u podłoża osteopetrozy ludzkiej, choroby powodowanej upośledzoną resorpcją kości, leży nadmierne wydzielanie kalcytoniny. Są też obserwacje wskazujące, że hiperkalcemie w przypadku wola obojętnego (54a) i guzów tarczycy (14) a także w pseudohipoparatyroidyzmie (3, 24, 86) mogą być wywołane nadmierną sekrecją kalcytoniny przez tarczycę.

Gershberg i Hecht (38) jednak nie zaobserwowali różnicy w odpowiedzi ustroju na dożylny wlew wapnia u pacjentów z pseudohipoparatyroidyzmem i u osób zdrowych.

Trzeba zaznaczyć, że opisane tu fakty dotyczą działania kalcytoniny otrzymanej ze świni. Możliwość stosowania syntetycznej kalcytoniny ludzkiej powinna w najbliższej przyszłości radykalnie wyjaśnić sprawę terapeutycznej wartości preparatów tego hormonu.

VIII. Podsumowanie

Kalcytonina jest jeszcze jednym hormonem wpływającym na proces resorpcji kości, lecz działającym w sposób całkowicie przeciwstawny i prawdopodobnie niezależny od parathormonu. Hamując resorpcję, lecz nie zmniejszając procesu tworzenia się nowej kości, kalcytonina może obniżać stężenie wapnia w krwi. Podobnie jak w przypadku parathormonu wydzielanie kalcytoniny jest regulowane w sprzężeniu zwrotnym przez poziom jonów wapniowych w krwi przepływającej przez produkującą ją gruczoł.

Pomimo dokładnego poznania budowy kalcytoniny brak jest dostatecznej wiedzy o mechanizmie działania tego hormonu na poziomie molekularnym, a sprawą całkowicie niejasną jest podobieństwo działania kalcytoniny świni i człowieka mimo tak znacznych różnic w sekwencji aminokwasowej. Odkrycie, że u człowieka kalcytoninę produkują oprócz tarczycy także inne gruczoły, wyjaśniło dlaczego usunięcie tarczycy u ludzi nie powoduje wyraźnych zaburzeń przemiany wapniowej ustroju.

W medycynie klinicznej poznanie kalcytoniny pozwoli prawdopodobnie w najbliższym czasie ustalić, że przyczyną niektórych chorób są zaburzenia wydzielania tego hormonu. Można spodziewać się zastosowania kalcytoniny w praktyce leczniczej tak w przypadkach niedostatecznej produkcji kalcytoniny, jak i dla przeciwdziałania skutkom nadmiernego wydzielania parathormonu. Krótkotrwałość efektu hipokalcemicznego kalcytoniny może budzić pewne wątpliwości co do perspektyw skutecznego jej stosowania.

Powyższy przegląd pokrywa literaturę przedmiotu do końca 1968 r.

LITERATURA

1. Aar J., *Endocrinology* **82**, 379 (1968).
2. Albright F., Ellsworth R., *J. Clin. Invest.* **7**, 183 (1929).
3. Aliapoulios M. A., Voelkel E. F., Munson P. L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 897 (1966).
4. Aurbach G. D., Potts J. T. Jr., *Am. J. Med.* **42**, 1 (1967).
5. Baghdiantz A., Foster G. V., Edwards A., Kumar M. A., Slack E., Soliman H. A., Mac Intyre I., *Nature* **203**, 1027 (1964).
6. Barnicot N. A., *J. Anat. (London)* **82**, 233 (1948).
7. Beesley T. E., Harman R. E., Jacob T. A., Hommick C. F., Vitali A. R., Vebër D. F., Wolf F. J., Hirschmann R., Denkwalte R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3255 (1968).
8. Bijvoet O. L. M., van der Sluys Veer J., Jansen A. P., *Lancet-I*, 876 (1968).
9. Blanquet P., Croizet M., Moura A. M., Baghdiantz A., *Science* **158**, 381 (1967).
10. Brand J. S. (doniesienie osobiste) (1968).
11. Bussolati G., Pearse A. G. E., *J. Endocrinol.* **37**, 205 (1967).
12. Care A. D., *Nature* **205**, 1289 (1965).
13. Care A. D., Duncan T., Webster D., *J. Endocrinol.* **37**, 155 (1967).
14. Chimenes H., Klotz H. P., *Lancet-I*, 111 (1967).
15. Copp D. H., w *The Parathyroid Glands*, red. P. J. Gaillard, R. V. Talmage i A. M. Budy. The University of Chicago Press, Chicago 1965, str. 73.
16. Copp D. H., Cameron E. C., *Science* **134**, 2038 (1961).
17. Copp D. H., Cameron E. C., Cheney B. A., Davidson A. G. F., Henze K. G., *Endocrinology* **70**, 638 (1962).
18. Copp D. H., Cockcroft D. W., Kueh Y., *Science* **158**, 924 (1967).

19. Copp D. H., Moghadam H., Mensen E. D., Mc Pherson G. D., w *The Parathyroids*, red. R. O. Greep i R. V. Talmage, Charles C. Thomas Publ., Springfield 1961, str. 203.
20. Deftos L. J., Lee M. R., Potts J. T. Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 293 (1968).
21. De Luca H. F., Progress Report COO-1668-3 (1967), cyt. wg *Nucl. Sci. Abstr.* **22**, 6200 (1968).
22. Dent C. E., *Brit. Med. J.* **2**, 1419 (1962).
23. Firschein H. E., Neuman W. F., Martin G. R., Mulryan B. J., *Recent Progr. Hormone Res.* **15**, 427 (1959).
24. Fischer J. A., Binswanger U., Frey-Wettstein M., *Acta Endocr. (Kbh.)* **55**, 562 (1967).
25. Foster G. V., *Nature* **211**, 1319 (1966).
26. Foster G. V., *Israel J. Med. Sci.* **3**, 765 (1967).
27. Foster G. V., Baghdiantz A., Kumar M. A., Slack E., Soliman H. A., Mac Intyre I., *Nature* **202**, 1303 (1964).
28. Foster G. V., Doyle F. H., Bordier P., Matrajt H., *Lancet-II*, 1428 (1968).
29. Foster G. V., Joplin G. F., Mac Intyre I., Melvin K. E. W., Slack E., *Lancet-I*, 107 (1966).
30. Foster G. V., Kumar M. A., Baghdiantz A., Soliman H., Slack E., De Bats A., Mac Intyre I., w *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle i M. J. Dallemagne, Collection des Colloques de l'Université de Liège 1965, str. 401.
31. Foster G. V., Mac Intyre I., Pearse A. G. E., *Nature* **203**, 1029 (1964).
32. Frantz J., Rosenthaler J., Zehnder K., Doepfner W., Hugu-ein R., Guttman S., *Helv. Chim. Acta* **51**, 218 (1968).
33. Friedman J., Raisz L. G., *Science* **150**, 1465 (1965).
34. Gaillard P. J., w *The Parathyroids*, red. R. O. Greep i V. R. Talmage, Charles C. Thomas Publ., Springfield 1961, str. 20.
35. Gaillard P. J., Sprawozdanie wewnętrzne, University of Leiden, Leiden 1968.
36. Galante L., Gudmundsson T. V., Matthews E. W., Tse A., Williams E. D., Woodhouse N. J. Y., Mac Intyre I., *Lancet-II*, 537 (1968).
37. Gennari C., Bencini M., Palazzuoli V., Borello G., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **44**, 463 (1968).
38. Gershberg H., Hecht A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **128**, 9 (1968).
39. Gittes R. F., Irvin G. L., *Science* **148**, 1737 (1965).
40. Gittes R. F., Munson P. L., Toverud S. U., *Federation Proc.* **25**, 496 (1966).
41. Gudmundsson T. V., Mac Intyre I., Soliman H. A., *Proc. Roy. Soc. B* **164**, 460 (1966).
42. Guttman S., Pless J., Sandrin E., Jaquenoud P. A., Bossert H., Willems H., *Helv. Chim. Acta* **51**, 1156 (1968).
43. Haas H. G., Dambacher M. A., *Helv. Med. Acta* **34**, 327 (1968).
44. Hargis G. H., Williams G. A., Tennenhouse A., Arnaud C. D., *Science* **152**, 73 (1966).
45. Heersche J. N. M., *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. Ser. C* **71**, 80 (1968).
46. Hirsch P. F., Gauthier G. F., Munson P. L., *Endocrinology* **73**, 244 (1963).

47. Hirsch P. F., Voelkel E. F., Munson P. L., *Science* **146**, 412 (1964).
48. Kahnt F. W., Riniker B., Mac Intyre I., Neher R., *Helv. Chim. Acta* **51**, 214 (1968).
49. Klein D. C., Morii H., Talmage R. V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **124**, 627 (1967).
50. Kumar M. A., Slack E., Edwards A., Soliman H. A., Baghdiantz A., Foster G. V., Mac Intyre I., *J. Endocrinol.* **33**, 469 (1965).
51. Mac Intyre I., *Calc. Tiss. Res.* **1**, 173 (1967).
52. Mac Intyre I., Foster G. V., Kumar M. A., w The Parathyroid Glands, red. P. J. Gaillard, R. V. Talmage i A. M. Budy, The University of Chicago Press, Chicago 1965, str. 85.
53. Mac Intyre I., Parsons J. A., Robinson C. J., *J. Physiol.* (London) **191**, 393 (1967).
54. Matsuzawa T., Kurosumi K., *Nature* **213**, 927 (1967).
- 54a. Mazzuoli G. F., Coen G., Baschieri L., *Lancet-II*, 1192 (1966).
55. McLean F. C., Urist M. R., Bone, Chicago University Press, Chicago 1961.
56. Milhaud G., Job J. C., *Science* **154**, 794 (1966).
57. Milhaud G., Moukhtar M. S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **123**, 207 (1966).
58. Moseley J. M., Matthews E. W., Breed R. H., Galante L., Tse A., Mac Intyre I., *Lancet-I*, 108 (1968).
59. Munson P. L., Hirsch P. F., *Clin. Orthop.* **49**, 269 (1966).
60. Neher R., Riniker B., Maier R., Byfield P. G. H., Gudmundsson T. V., Mac Intyre I., *Nature* **220**, 984 (1968).
61. Neher R., Riniker B., Rittel W., Zuber H., *Helv. Chim. Acta* **51**, 1900 (1968).
62. Neher R., Riniker B., Zuber H., Rittel W., Kahnt F. W., *Helv. Chim. Acta* **51**, 917 (1968).
63. Neuman W. F., Neuman M. W., The Chemical Dynamics of Bone Mineral. The University of Chicago Press, Chicago 1958.
64. O'Riordan J. L. H., Aurbach G. D., *Endocrinology* **82**, 377 (1968).
65. Pearse A. G. E., *Nature* **211**, 598 (1966).
66. Pearse A. G. E., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **164**, 478 (1966).
67. Pearse A. G. E., Carvalheira A. F., *Nature* **214**, 929 (1967).
68. Potts J. T. Jr., Reisfeld R. A., Hirsch P. F., Munson P. L., *Am. J. Med.* **43**, 662 (1967).
69. Potts J. T. Jr., Reisfeld R. A., Hirsch P. F., Washed A. B., Voelkel E. F., Munson P. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 328 (1967).
70. Putter I., Kaczka E. A., Harman R. E., Rickes E. L., Kempf A. J., Chaiet L., Pothrock J. W., Wase A. W., Wolf F. J., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 20 (1967).
71. Raisz L. G., *Nature* **197**, 1015 (1963).
72. Rasmussen H., *Am. J. Med.* **30**, 112 (1961).
73. Rasmussen H., Anast C., Arnaud C., *J. Clin. Invest.* **46**, 746 (1967).
74. Reynolds J. J., Dingle J. T., *Nature* **218**, 1178 (1968).
75. Riniker B., Neher R., Maier R., Kahnt F. W., Byfield P. G. H., Gudmundsson T. V., Galante L., Mac Intyre I., *Helv. Chim. Acta* **51**, 1738 (1968).
76. Rittel W., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Sieber P., *Helv. Chim. Acta* **51**, 924 (1968).
77. Ritzen M., Hammarstrom L., Ulberg S., *Biochem. Pharmacol.* **14**, 313 (1965).

78. Robinson C. J., Martin T. J., Mac Intyre I., *Lancet-II*, 83 (1966).
79. Robinson C. J., Martin T. J., Matthews E. W., Mac Intyre I., *J. Endocrinol.* **39**, 71 (1967).
80. Rucart G., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **145**, 342 (1951).
81. Sanderson P. T., Marschall F., Wilson R. E., *J. Clin. Invest* **39**, 662 (1960).
82. Sieber P., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Rittel W., *Helv. Chim. Acta* **51**, 2057 (1968).
83. Soerensen O. H., Hellesen C., *Acta Med. Scand.* **183**, 257 (1968).
84. Studridge W. C., Kumar M. A., *Lancet-I*, 725 (1968).
85. Talmage R. V., Toft R. J., w The Parathyroids, red. R. O. Greep i R. V. Talmage, Charles C. Thomas Publ., Springfield 1961, str. 224.
86. Tashjian A. H. Jr., Frantz A. G., Lee J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1138 (1966).
87. Tashjian A. H. Jr., Warnock D. R., *Endocrinology* **81**, 306 (1967).

JEREMIASZ TOMASZEWSKI *, KRYSZYNA WOŹNIAK **

Renina i angiotensyna

Renin and Angiotensin

Biochemical properties and some factors influencing on the renin-angiotensin system are presented.

Rola oraz znaczenie reniny i angiotensyny w fizjopatologii jest od wielu lat przedmiotem licznych badań doświadczalnych i klinicznych. Wiadomo, że układ ten jest jednym z czynników hormonalnej regulacji hemodynamiki ustroju i jako taki jest w wielu punktach sprzężony z przemianami zachodzącymi w obrębie nerki, łożyska naczyniowego i niektórych gruczołów wewnętrznego wydzielania (61).

Zgromadzono również wiele danych doświadczalnych dotyczących metabolizmu reniny i angiotensyny. Dotychczasowe badania nie wyjaśniają wprawdzie wszystkich problemów, pozwalają jednak na stworzenie pewnego ogólnego obrazu metabolizmu reniny i angiotensyny oraz przedstawienie biochemicznych aspektów tego układu.

I. Renina

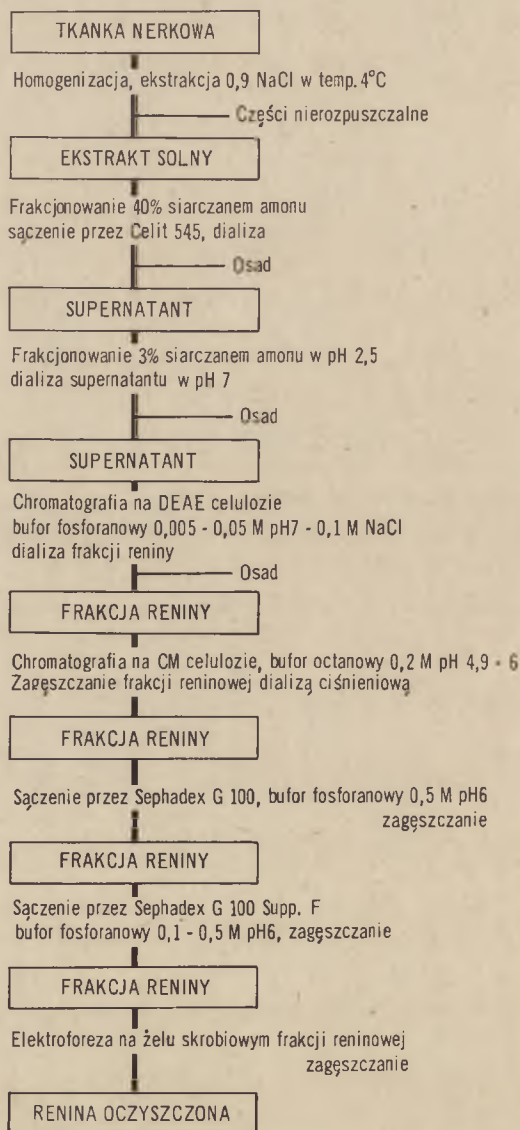
Renina jest enzymem proteolitycznym, katalizującym hydrolizę wiązania peptydowego w angiotensynogenie z uwolnieniem deka-peptydu — angiotensyny I.

Jak wynika z badań Tobiana (59), Hartrofta i wsp. (18), Cooka i Pickeringa (8), Binga i wsp. (3) i innych, miejscem syntezy reniny są głównie komórki JG (ang. *juxtaglomerular*) aparatu przykłębkowego nefronu. Jej synteza i sekrecja jest regulowana na zasadzie wrażliwości komórek JG na rozciąganie spowodowane zmianą napięcia ściany w następstwie zmian ciśnienia lub objętości krwi w tętnicy doprowadzającej (34, 59). Nie wydaje się jednak, aby wyłącznie lokalne stosunki hemodynamiczne i stan ściany tętniczek nerkowych

* Dr, Ośrodek Naukowo-Badawczy, Akademia Medyczna, Lublin.

** Lek. med., Ośrodek Naukowo-Badawczy, Akademia Medyczna, Lublin.

warunkowały wydzielanie reniny. Komórki JG mogą być również pobudzane za pośrednictwem nerwów sympatycznych poprzez receptory *sinus carotis* (60), lub ośrodki mózgowce (20), a Gross i wsp. (15) oraz Skinner i wsp. (57) zwrócili uwagę na znaczenie osmolarności moczu w kanalikach dystalnych i na udział mineralokortykoidów w sekrecji reniny.



Schemat 1. Otrzymywanie i oczyszczanie reniny z nerki wieprzowej według Pearta i wsp. (41)

W ekstrakcie NaCl około 840 g białka, po elektroforezie skrobiowej — 1,8 mg. Aktywność specyficzna materiału wyjściowego 8 j/mg, preparatu oczyszczonego — 110 000 j/mg białka

Wydaje się, że renina uwalniana jest do krwi w formie czynnej. Przemawia za tym aktywność enzymatyczna oczyszczonych różnymi metodami preparatów reniny w układach modelowych i *in vivo*.

Dotychczas nie ma danych o składzie i sekwencji aminokwasowej reniny. Jakkolwiek już w latach trzydziestych próbowano wyekstrahować reninę z homogenatów tkankowych nerek, uzyskanie czystego enzymu napotyka nadal na szereg trudności. Za pomocą frakcjonowania ekstraktów solnych rozpuszczalnikami organicznymi lub siarczanem amonu przy różnych *pH* i w różnej temperaturze oraz chromatografii na *DEAE* i *CM-celulozie* nie udało się uzyskać czystej reniny ludzkiej (10, 19), wieprza i z nerki psa. Stosunkowo najczystszy preparat enzymu, homogeny w immunoelektroforezie i ultrawiwaniu, otrzymali Peart i wsp. (41) drogą wielokrotnego oczyszczania (schemat 1).

Renina jest białkiem ciepłochwiejnym. Masa cząsteczkowa reniny ludzkiej oznaczona przez Warrena i Dolinsky'ego (62) metodą sączenia molekularnego na żelu *Sephadex G 200* wynosi 42 300. Podobne wartości uzyskano dla reniny zwierzęcej (41, 45) za pomocą sączenia na żelu i ultrawiwiania.

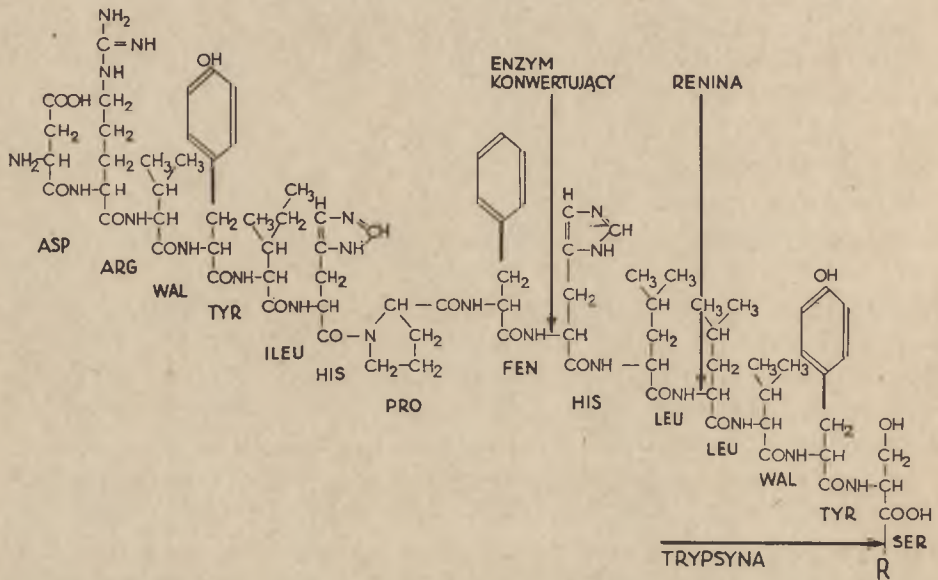
O ile surowe preparaty reniny są stabilne w zakresie *pH* od 2 do 10, nie tracą aktywności ogrzane do 60°C, a w -10° mogą być przechowywane nawet 2 lata, to enzym wysoko oczyszczony jest bardzo labilny już w temperaturze pokojowej, a pieniecie, adsorbcja na powierzchni szkła, zamrażanie i topnienie oraz liofilizacja jego roztworów prowadzą do nieodwracalnej straty aktywności (40). Aktywność enzymatyczną zachowują roztwory reniny przechowywane w 0°C, a także roztwory z dodatkiem albuminy (7), tiomersalu lub siarczanu neomycyny (41).

Podczas elektroforezy na podłożu skrobiowym renina wieprza wędruje z szybkością właściwą prealbuminom (42), a renina ludzka wolniej (40). Przy podobnej wielkości cząsteczek może to być uwarunkowane różnicami gatunkowymi w sekwencji aminokwasowej i związaną z tym zmianą ładunku. Wydaje się jednak, że centra aktywne enzymów ssaków różnych gatunków są ukształtowane podobnie. Wprawdzie z badań Schaffenburga i wsp. (46) oraz Lubasha i Pearta (32) wynika, że renina ludzka nie działa na angiotensynogen wieprza, a enzym z wieprza na substrat ludzki, jednak angiotensynogen z krwi wołu jest rozkładany przez reninę człowieka, psa, królika i szczura (27), a renina wieprza działa na substrat ze szczura i kota (2, 43, 44). Munoz i wsp. (35) oraz Poulsen (44) badali działanie reniny ludzkiej na oczyszczony angiotensynogen człowieka, wołu oraz kota i nie stwierdzili zmian aktywności enzymu, zależnych od rodzaju użytego substratu. Większą swoistość zaobserwowano w badaniach immunologicznych. Immunizację psów lub królików można wywołać jedynie reniną obcogatunkową, a wytworzone przeciwciała reagują głównie z antygenem gatunkowym (17, 41, 47). Jednak Deodhar

i wsp. (9) wykazali, że wytworzone pod wpływem acetylowanej reniny psa przeciwciała w surowicy psa reagują w znacznym stopniu także z reniną ludzką, a przeciwciała surowicy królika immunizowanego acetylowaną reniną wieprza wiążą antygeny wieprza, psa i królika.

II. Angiotensynogen

Green i Bumpus (14) wyodrębnili z krwi końskiej białko z grupy α -2 globulin, z którego pod wpływem reniny powstaje angiotensyna. Skeggs i wsp. (54) badając naturalne i syntetyczne polipeptydy ustalili, że najmniejszą jednostką odszczepiającą pod działaniem reniny angiotensynę jest tetradekapeptyd o budowie przedstawionej na schemacie 2.



Schemat 2. Struktura N-końcowego fragmentu angiotensynogenu według Skeggsa i wsp. (55)

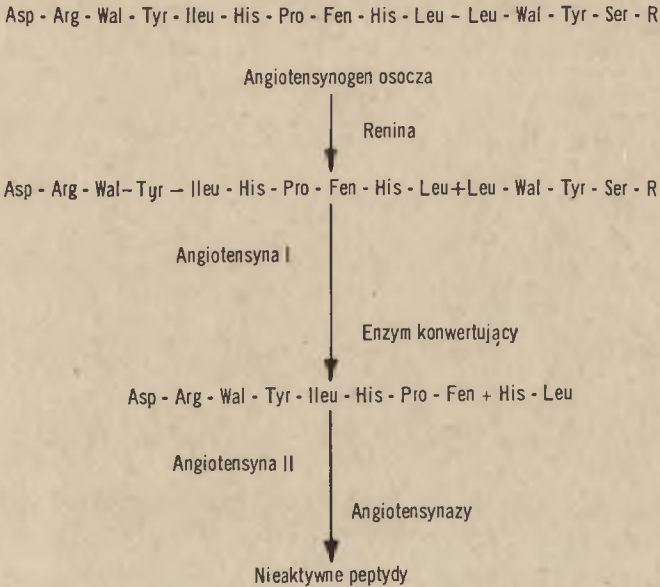
Ponieważ autorzy otrzymali tetradekapeptyd z surowicy krwi poddanej działaniu trypsyny, można przypuszczać, że jest on N-końcowym fragmentem łańcucha większej cząsteczki białkowej. Czy fragment taki jest składnikiem jednego określonego białka zawartego w osoczu, czy też może być produktem rozpadu różnych białek obecnych w frakcji α -2 globulin, pozostaje sprawą otwartą. Za pomocą rozdzielania chromatograficznego na *DEAE-celulozie*, w gradiencie pH od 5,6 do 4, Skeggs i wsp. (55) uzyskali z oczyszczonego substratu wieprza aż pięć aktywnych frakcji. Zawierają one glikoproteidy o masie cząsteczkowej rzędu 57 000 i podobnym składzie aminokwasowym, różniące się nieco komponentą węglowodanową. Nie wiadomo, czy są to różne substraty ulegające działaniu

reniny, czy też produkty depolimeryzacji jednej większej cząsteczki specyficznego angiotensynogenu.

Miejszem syntezy angiotensynogenu jest prawdopodobnie wątroba (2). Mechanizm regulacji syntezy nie jest znany. Można przypuszczać, że nie ma sprzężenia między zużyciem a sekrecją, gdyż w 24 godziny po nefrektomii stężenie angiotensynogenu w osoczu wzrasta nawet 10-krotnie (2).

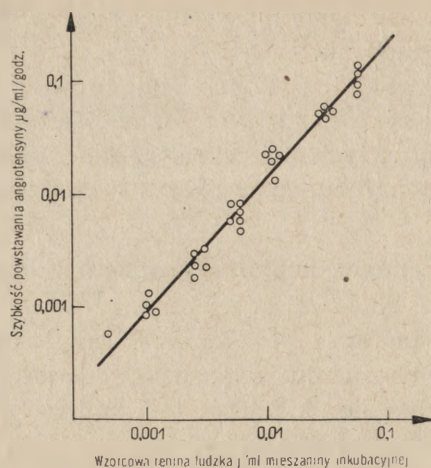
III. Przemiana angiotensynogenu w angiotensyn

Brak danych o budowie przestrzennej angiotensynogenu i reniny oraz trudności w otrzymaniu wysoko oczyszczonych preparatów, nie pozwalają na jednoznaczne określenie mechanizmu i kinetyki przemiany angiotensynogenu (schemat 3).

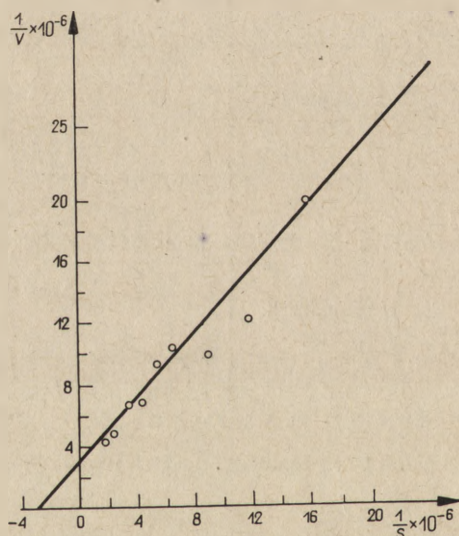


Schemat 3. Przemiana angiotensynogenu

Renina hydrolizuje wiązanie leucylo-leucylowe angiotensynogenu przy czym, jak wykazano stosując syntetyczne polipeptydy (55), jej działanie jest uwarunkowane sekwencją najwyższej ośmiu aminokwasów w otoczeniu tego wiązania. Wskazuje to na ograniczoną swoistość wobec substratu białkowego, a ponadto na prawdopodobieństwo kompetywnego hamowania prawidłowego przebiegu reakcji przez mniejsze polipeptydy. W układach: renina ludzka — substrat z wołu, zależność szybkości powstawania angiotensyny od stężenia enzymu, a właściwie od zwiększającej się jego aktywności, jest według Levera i wsp. (27) prostoliniowa (rysunek 1).



Rys. 1. Zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu według Levera i wsp. (27)
Mieszanina inkubacyjna 4 ml roztworu substratu wołowego 30 j/ml z wzrastającą ilością reniny ludzkiej o aktywności 0,6 jG/ml. pH-5,7, temperatura 37°, biologiczny pomiar stężenia utworzonej angiotensyny



Rys. 2. Wykres Lineweavera-Burka zależności odwrotności szybkości reakcji od odwrotności stężenia substratu według Sealey i wsp. (50)
Stężenie reniny 0,0034 jG/ml, pH 7,4

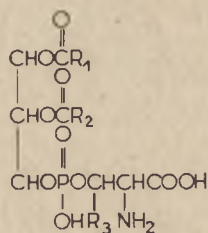
Podobne wyniki uzyskał Poulsen (44) działając reniną ludzką na angiotensynogen z kota. Według Browna i wsp. (5) *in vitro* reakcja zachodzi w szerokim zakresie pH 5,5—8 (optimum pH 6,4) i temperatury: 20°—56°, przy czym jej szybkość jest wprost proporcjonalna do temperatury.

Stosując oczyszczoną według Hassa i wsp. (19) reninę ludzką, Sealey i wsp. (50) badali kinetykę reakcji enzymatycznej. Surowicę, po dodaniu dwuizopropylofluorofosforanu (DFP) w celu unieczynnienia angiotensynazy, dializowano wobec EDTA i wody a następnie inkubowano w odpowiednich rozcieńczeniach z stałą ilością reniny. Ilość utworzonej angiotensyny oznaczano biologicznie. Stężenie molowe substratu wyliczono przy założeniu, że mol angiotensyny o masie równej 1 000 powstaje z jednego mola angiotensynogenu. Z analizy zależności między odwrotnością stężenia substratu i szybkości reakcji według Lineweawera-Burka wynika, że stała K_m wynosi $3,0 \times 10^{-7}$ (rysunek 2). Należy jednak wspomnieć, że w doświadczeniach tych nie wykluczono działania endogennych inhibitorów i aktywatorów reniny.

Można przypuszczać, że aktywność reniny, wyrażona jako stężenie rozłożonego substratu lub utworzonej angiotensyny, w optymalnych warunkach modelowych nie przekracza $5-10 \mu\text{M}/\mu\text{M}$ enzymu na godzinę. Jeśli się zważy, że *in vivo* mogą działać różne inhibitory, jest to aktywność bardzo niska. Z drugiej strony, duża aktywność biologiczna angiotensyny uzasadnia minimalną szybkość jej powstawania.

Różnice w aktywności reniny inkubowanej z różnymi próbkami inaktywowanego osocza (4, 6) nasuwały przypuszczenie o obecności endogennych aktywatorów lub inhibitorów. Dotychczas niewiele wiadomo o występowaniu aktywatorów reniny. Jak wynika z badań Skeggsa i wsp. (55) oraz innych autorów (21, 25) inhibitorami reniny mogą być niższe polipeptydy, zawierające wiązanie leucylo-leucynowe obok C-końcowej walilo-tyrozyny lub walilo-feniloalaniny. Wzrost aktywności reniny dodanej do osocza zwierząt po nefrektomii (2, 21) wskazuje na dodatkowy udział nerki w regulacji szybkości tworzenia angiotensyny. Wprawdzie wiadomo było, że tkanka nerkowa jest również źródłem substancji depresorycznych, działających na drodze hormonalnej (26, 58), jednak dopiero Sen i wsp. (51) wykazali w tkance nerkowej obecność inhibitora hamującego tworzenie angiotensyny. Za pomocą frakcjonowania i chromatografii na żelu krzemionkowym wyodrębnili oni z acetonowego ekstraktu tkanki nerkowej fosfolipid obniżający aktywność reniny *in vivo* i *in vitro*. Na podstawie badań analitycznych i w podczerwieni autorzy przypisują mu budowę zbliżoną do fosfatydyloseryny (I). Mechanizm hamowania reakcji przez ten związek nie jest znany.

W celu wyjaśnienia różnic między aktywnością reniny w surowicy i w osoczu, do którego dodano heparyny, Sealey i wsp. (50) badali wpływ heparyny na kinetykę reakcji enzymatycznej. Po wykluczeniu wpływu heparyny na fizjologiczne działanie angiotensyny, autorzy stwierdzili, że heparyna już w stężeniu $2,6 \times 10^{-6} \text{ M}/10 \text{ j}$ na 1 ml hamuje powstawanie angiotensyny w około 17%. Wpływ heparyny na szybkość reakcji nie zależy od stężenia reniny, natomiast zależy od stosunku stężeń inhibitora do substratu.



I

Wyniki badań kinetycznych, w których ustalono wartość stałej inhibitorowej heparyny $K_i = 4 \times 10^{-6}$ M, a więc wartość o jeden rząd wyższą od stałej Michaelisa, wskazują na możliwość kompetytywnego hamowania przez heparynę reakcji substratu z reniną. Wobec zasadniczych różnic strukturalnych między substratem i polisacharydem ten typ inhibicji jest trudny do wyjaśnienia. Nie wiadomo, czy heparyna, występując w ustroju w znacznie niższych stężeniach niż stosowane w doświadczeniach *in vitro*, hamuje działanie reniny również *in vivo*.

Powstający z angiotensynogenu pod wpływem reniny, dekapeptyd angiotensyna I, wykazuje tylko niską aktywność hormonalną (52). Dopiero powstający z dekapeptydu w następnym etapie oktapeptyd, angiotensyna II, jest substancją w pełni biologicznie czynną (36, 53). Enzym konwertujący, który katalizuje odszczepienie histydyloleucyny od dekapeptydu nie jest zidentyfikowany i nie wiadomo czy jest to jedna, specyficznie działająca peptydaza. Ponieważ obniżenie ciśnienia krwi przy nadciśnieniach powikłanych uszkodzeniem wątroby kojarzono z brakiem enzymu konwertującego (29), L o y k e (30) w celu wyjaśnienia tego zagadnienia przeprowadził badania na zwierzętach, na które działano czterochlorkiem węgla. W surowicy tych zwierząt znaleziono prawie wyłącznie angiotensynę I, która jednak nawet po dodaniu surowicy bogatej w enzym konwertujący nie przechodziła w angiotensynę II. Można zatem przypuszczać, że uszkodzenie wątroby nie prowadzi do niedoboru enzymu konwertującego, a raczej powoduje uwalnianie czynników hamujących przemianę angiotensyny I w angiotensynę II.

Nowe poglądy na reakcję konwersji przedstawili N g i V a n e (37). Stwierdzili oni, że angiotensyna I powstająca w układzie żylnym ulega przemianie w angiotensynę II w krążeniu płucnym, natomiast angiotensyna I powstająca w układzie tętniczym ulega częściowo rozkładowi, a konwersji dopiero po przejściu przez układ żylny i krążenie płucne. Wyjaśnienie, czy enzym konwertujący (endo lub karboksypeptydaza?) jest zlokalizowany w obszarze krążenia płucnego czy jest tam jedynie aktywowany, wymaga dalszych badań.

IV. Angiotensyna

Ostateczny produkt przemiany katalizowanej przez reninę i enzym konwertujący, angiotensyna II, jest jedną z najsilniej działających substancji presorycznych. Sekwencję aminokwasową naturalnego oktapeptydu otrzymanego z krwi końskiej określili Skeggs i wsp. (56), a angiotensyny z wołu Elliott i Peart (11). Wielu badaczy otrzymało syntetyczne analogi angiotensyny o równoważnym działaniu biologicznym.

Angiotensyna:

Wołu	Asp - Arg - Val - Tyr - Ileu - His - Pro - Fen
Konia	Asp - Arg - Val - Tyr - Val - His - Pro - Fen
Syntetyczna	NH ₂ - Asp - Arg - Val - Tyr - Val - His - Pro - Fen

Schemat 4. Sekwencja aminokwasowa angiotensyn wołu, konia i syntetycznej

Gatunkowe różnice składu aminokwasowego angiotensyny (schemat 4) dotyczą jedynie waliny lub izoleucyny w pozycji 5. Amidacja kwasu asparaginowego na N-końcu łańcucha nie znosi hormonalnego działania angiotensyny. Przypuszcza się, że jej działanie uwarunkowane jest obecnością wolnej grupy karboksylowej na C-końcu łańcucha, rodnikami aromatycznymi w pozycji 4 i 8, heterocyklicznymi pierścieniami histydyny i proliny, a także strukturą α -spirali. W rozcieńczonych roztworach angiotensyna jest szybko inaktywowana przez adsorbcję na powierzchni naczyń i utlenianie (1, 40). Obecność ugrupowań silnie polarnych ułatwia adsorbcję na wielu nośnikach, co wykorzystano w metodach otrzymywania, izolowania i oznaczania agiotensyny. Między innymi Boucher i wsp. (4) wyodrębnili angiotensynę z ludzkiego osocza stosując adsorbcję na kolumnie *Dowex 50 W* $\times 2$ i elucję N dwuetyloaminą, a następnie rozdział eluatu na impregnowanej 1 N HCl bibule, za pomocą fazy ruchomej: butanol, kwas octowy, woda w stosunku 54 : 10 : 50. Page i Bumpus (38) oraz Peart (39) do oczyszczania angiotensyny z materiału biologicznego i do badań porównawczych oktapeptydów syntetycznych i ze ssaków różnych gatunków wykorzystali chromatografię rozdzielczą w systemach przeciuprądowych.

Stężenie angiotensyny w osoczu, według różnych autorów (4, 48) wynosi od 0 do 35 ng/100 ml i ma niewątpliwie ważny udział w regulacji stosunków hemodynamicznych ustroju. Podobnie jak większość hormonów, angiotensyna działa wielokierunkowo. Wyniki doświadczeń wskazują, że presoryczna aktywność angiotensyny może wynikać z: 1. bezpośredniego działania na naczynia obwodowe powodującego ich zwężenie (16, 63), 2. pobudzania przez ośrodki mózgowe układu neurowegetatyw-

nego lub aktywowania neurohormonów (28, 33, 49), 3. ingerencji w gospodarkę wodno-elektrolitową na zasadzie regulacji resorpcji i wydalania sodu w kanalikach nerkowych (12), 4. adrenotropowego działania na korę nadnerczy i udziału w regulacji ciśnienia krwi za pośrednictwem aldosteronu (13, 18).

Wydaje się, że obok sprzężonych procesów anabolicznych fizjologicznym regulatorem aktywności angiotensyny jest jej enzymatyczna inaktywacja. Określona mianem angiotensynazy (38), liczna zapewne grupa enzymów proteolitycznych powoduje szybki rozkład oktapeptydu do nieczynnych związków. Stwierdzono, że degradację angiotensyny powodują trypsyna, chymotrypsyna, leucyloaminopeptydaza, karboksypeptydaza, pepsyna, katepsyny tkankowe i inne peptydazy. Największa aktywność angiotensynaz w surowicy krwi przypada na frakcje α -globulinowe (24), a Kharirallah i wsp. (23) wykazali, że ich działanie o optimum pH w granicach 7,4—8,6 uwarunkowane jest obecnością jonów wapnia. Na tej zasadzie EDTA zabezpiecza częściowo angiotensynę osocza przed inaktywacją.

Jakkolwiek pochodzenie angiotensynaz obecnych w osoczu nie zostało ustalone, można przypuszczać, że mogą to być zarówno peptydazy pochodzenia wątrobowego (40), jak i inne enzymy tkankowe uwalniane, a być może i działające miejscowo w obrębie poszczególnych narządów. Wyniki oznaczeń angiotensynaz, oparte na biologicznym teście spadku aktywności egzogennej angiotensyny (22), lub na badaniu szybkości hydrolizy α -L-asparagino- β -naftyloamidu (31), jak dotąd nie wykazały zależności między aktywnością presoryczną angiotensyny a aktywnością działających na nią enzymów. Z drugiej strony wydaje się, że przypuszczenia, wiążące stany nadciśnienia przy normalnym poziomie reniny ze spadkiem aktywności enzymów rozkładających angiotensynę są uzasadnione.

LITERATURA

1. Barbour B. H., Bartter F. C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **23**, 313 (1963).
2. Bing J., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **60**, 311 (1964).
3. Bing J., Eskildsen P. C., Faarup P., Frederiksen O., *Circulation. Res.* **21**, Suppl. 2, 3 (1967).
4. Boucher R., Veyrat R., de Champlain J., Genest J., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 194 (1964).
5. Brown J. J., Davies D. L., Lever A. F., Robertson J. I. S., Tree M., *Biochem. J.* **93**, 594 (1964).
6. Bumpus F. M., *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **27**, 455 (1965).
7. Cook W. F., Lee M. R., *Biochem. J.* **96**, 413 (1965).
8. Cook W. F., Pickering G. W., *Biochem. Pharm.* **9—10**, 165 (1962).
9. Deodhar S. D., Hass E., Goldblatt H., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 236 (1964).
10. Dexter L., Hayness F. W., Bridgs W. G., *J. Clin. Invest.* **24**, 62 (1945).
11. Elliott D. F., Peart W. S., *Biochem. J.* **65**, 246 (1957).

12. Finnerty F. A., *Circulation* **25**, 255 (1962).
13. Genest J., Biron P., Koiw E., Nowaczyński W., Boucher R., Chretien M., *Ann. Intern. Med.* **54**, 1634 (1961).
14. Green A. A., Bumpus F. M., *J. Biol. Chem.* **210**, 281 (1954).
15. Gross F., Schachtelin C., Ziegler M., Berger M., *Lancet* **1**, 914 (1964).
16. Haddy F. Y., *Circulation* **25**, 239 (1962).
17. Hartroft P. M., *Circulation Res.* **12**, 525 (1963).
18. Hartroft P. M., Sutherland L. E., Hartroft W. S., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 163 (1964).
19. Hass E. M., Goldblatt H., Gipson E. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 534 (1965).
20. Hodge R. L., Lowe R. D., Vane J. R., *J. Physiol.* **185**, 613 (1966).
21. Hoobler S., Schroeder J., Blaquier P., Demerjian Y., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 227 (1964).
22. Itskovitz H. D., Dudrick S. J., Dyrde I., Murphy J. J., *Arch. Intern. Med.* **119**, 241 (1967).
23. Khairallah P. A., Bumpus F. M., Page I. H., Smeby R. R., *Science* **140**, 672 (1963).
24. Klaus D., Biron P., *Nature* **204**, 381 (1964).
25. Tokubu T., Ueda E., Fujimoto S., Hiwada K., Kato A., Akutsu H., Yamamura Y., *Nature* **217**, 456 (1968).
26. Lee J. B., Covino B. G., Tahman B. G., Smith E. R., *Circulation Res.* **17**, 57 (1965).
27. Lever A. F., Robertson J. I., Tree M., *Biochem. J.*, **91**, 346 (1964).
28. Lewis G. P., Reit E., *J. Physiol.* (London) **176**, 28P (1965).
29. Loyke H. F., *Arch. Intern. Med.* **110**, 45 (1962).
30. Loyke H. F., *J. Lab. Clin. Med.* **69**, 1013 (1967).
31. Lubash G. D., Peart W. S., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 289 (1966).
32. Lubash G. D., Peart W. S., *Clin. Chim. Acta* **17**, 445 (1967).
33. Mc Cubbin J. W., Page I. H., *Circulation Res.* **12**, 553 (1963).
34. Meyer P., Menard J., Alexandre J. M., Milliez P., *J. Urol. Nephrol.* **72**, 619 (1966).
35. Munoz J. M., Taquini A. C., Braun-Menendez E., Fasciolo J. C., Leloir L. F., *Rev. Soc. Argent. Biol.* **19**, 321 (1943).
36. Ng K. F., Vane J. R., *Nature* **216**, 762 (1967).
37. Ng K. F., Vane J. R., *Nature* **218**, 144 (1968).
38. Page I. H., Bumpus F. M., *Physiol. Rev.* **41**, 331 (1961).
39. Peart W. S., *Pharmac. Rev.* **17**, 143 (1965).
40. Peart W. S., *Hormones in Blood*, Academic Press, New York 1967, str. 489.
41. Peart W. S., Lloyd A. M., Thatcher G. N., Lever A. F., Payne, N., Stone N., *Biochem. J.* **99**, 708 (1966).
42. Peart W. S., Lubash G. D., Thatcher G. N., Muiesan G., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 640 (1966).
43. Poulsen K., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **69**, 19 (1967).
44. Poulsen K., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, 49 (1968).
45. Rubin I., Olsen H., Kemp E., *Acta Chim. Scand.* **20**, 2747 (1966).
46. Schaffenburg C. A., Haas E., Goldblatt H., *Am. J. Physiol.* **199**, 788 (1960).
47. Schmid H. E., Graham L. A., *Circulation Res.* **11**, 853 (1962).
48. Scornik O. R., Paladini A. C., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 269 (1964).
49. Scroop G. C., Whelan R. F., *Clin. Sci.* **30**, 79 (1966).

50. Sealey J. E., Gerten J. N., Ledingham J. G., Laragh J. H., *J. Clin. Endocrinol.* **27**, 699 (1967).
51. Sen S., Smeby R. R., Bumpus F. M., *Biochemistry* **6**, 572 (1967).
52. Skeggs L. T., Kahn J. R., *Circulation* **17**, 658 (1958).
53. Skeggs L. T., Kahn J. R., Shumway N. P., *J. Exptl. Med.* **103**, 295 (1956).
54. Skeggs L. T., Lentz K. E., Hochstrasser H., Kahn J. R., *J. Exptl. Med.* **118**, 73 (1963).
55. Skeggs L. T., Lentz K. E., Hochstrasser H., Kahn J. R., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 185 (1964).
56. Skeggs L. T., Lentz K. E., Kahn J. R., Shumway N. P., Wooda K. R., *J. Exptl. Med.* **104**, 193 (1956).
57. Skinner S. L., McCubbin J. W., Page I. H., *Circulation Res.* **13**, 336 (1963).
58. Świdarska-Kulikowa B., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **37**, 5 (1966).
59. Tobian L., *Ann. Int. Med.* **52**, 395 (1960).
60. Tobian L., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 160 (1964).
61. Tomaszewski J., Woźniak K. (w druku).
62. Warren B., Dolinsky M., *Proc. Soc. Exptl. Med.* **123**, 911 (1966).
63. Yu P. N., *Circulation* **24**, 1325 (1961).

KONSTANTY WIŚNIEWSKI *

Działanie „transportowe” insuliny a synteza białek

The „Transport” Effect of Insulin and Protein synthesis

The effect of insulin on the protein synthesis with particular consideration of the “transport” effect of this hormon is reviewed.

W ciągu 46 lat jakie upłynęły od odkrycia Bantinga i Besta (2) nagromadził się bogaty materiał doświadczalny wskazujący na różnorodne i wielokierunkowe działanie insuliny. Jedną z podstawowych grup przemian aktywowanych przez insulinę jest synteza białka.

W roku 1928 Luck i wsp. (26) pierwsi zaobserwowali, że podanie insuliny obniża poziom aminokwasów w krwi zarówno u ludzi jak też u zwierząt doświadczalnych. Obserwacje te dały początek badaniom nad wpływem tego hormonu zarówno na transport aminokwasów przez błony komórkowe jak i syntezę białek. Prawie 20 lat później Ingle i wsp. (16) w doświadczeniach na zwierzętach pozbawionych trzew stwierdzili, że insulina również w tych warunkach obniża poziom aminokwasów w krwi. Pozwoliło to jednak zaledwie na wyciągnięcie wniosku, że hormon ten zmienia poziom aminokwasów w krwi.

Bardziej szczegółowe badania przeprowadzili Riggs i wsp. (42, 45). W doświadczeniach *in vivo* oznaczali oni poziom niektórych aminokwasów w surowicy i w tkankach i stwierdzili, że insulina obniża poziom badanych aminokwasów w surowicy, natomiast podwyższa ich zawartość w tkankach. Wskazywało to, że insulina ułatwia przenikanie aminokwasów przez ściany naczyń.

Doświadczenia przeprowadzone *in vivo* dostarczały jednak zbyt skąpych i ogólnikowych danych. Nie można było na ich podstawie rozstrzygać, czy obserwowane skutki zależą od bezpośredniego działania insuliny, czy też są wynikiem jej wpływu na dość odległe procesy metaboliczne, które z kolei aktywują proces przenikania aminokwasów z krwi do tkanek.

Znaczny postęp w tej dziedzinie badań datuje się od wprowadzenia techniki badań na izolowanych narządach oraz zastosowania znakowanych

* Doc. dr med., Katedra Farmakologii, Akademia Medyczna, Białystok.

aminokwasów. Stwierdzono w licznych doświadczeniach *in vitro*, że insulina przyspiesza transport badanych aminokwasów z buforu do izolowanej przepony (1, 3, 5, 8, 10, 17, 28, 29, 30, 48, 56, 60, 63), skrawków wątroby (35, 36, 37) i perfundowanego serca (33, 62). Wykazano zatem, że insulina bezpośrednio aktywuje proces transportu aminokwasów przez błony komórkowe, jednakże problem mechanizmu tego działania pozostał otwarty.

Levine (22) postawił hipotezę, że insulina działając na błony komórkowe tkanek wrażliwych na ten hormon zwiększa szybkość transportu cukrów i w ten sposób zmienia metabolizm komórki, a wszelkie inne efekty biologiczne obserwowane po podaniu insuliny są efektami wtórnymi uzależnionymi od zmienionego transportu cukrów. Należało zatem wyjaśnić doświadczalnie, czy i jaka jest zależność działania insuliny na transport aminokwasów i syntezę białek od wpływu tego hormonu na transport glukozy.

Dobrym modelem doświadczalnym do rozwiązania tego zagadnienia okazała się izolowana przepona szczura. Inkubując tę tkankę w obecności znakowanego aminokwasu można obserwować jego transport i wbudowywanie do białek tkanki. Szybkość wbudowywania aminokwasów do białek przepony *in vitro* jest odzwierciedleniem procesu syntezy białek (30).

Zależność wpływu insuliny na transport aminokwasów i syntezę białek od działania tego hormonu na penetrację glukozy do komórek badano w szeregu doświadczeń wychodząc z różnych założeń teoretycznych. Wool i Krahl (60) inkubowali przeponę szczura ze znakowanymi aminokwasami, zmieniając tylko stężenie glukozy w buforze w granicach od 0 do 600 mg $\%$. Przy wzroście stężenia glukozy wzrastała również szybkość jej przenikania do wnętrza komórki, podobnie jak po podaniu insuliny, jednakże nie stwierdzono zmian we wbudowywaniu aminokwasów przy różnych stężeniach glukozy w buforze. Wielu badaczy natomiast (18, 19, 60, 61) obserwowało aktywujące działanie insuliny na transport aminokwasów do izolowanej przepony inkubowanej w środowisku bez glukozy. Przytoczone dane wskazują, że wpływ insuliny na syntezę białek nie zależy od transportu glukozy. Wniosek ten potwierdzili Battaglia i wsp. (3) wykazując, że swoisty inhibitor transportu cukru, florydzyna, eliminuje tylko aktywujące działanie insuliny na transport cukru, nie hamuje natomiast pobudzającego wpływu hormonu na wbudowywanie aminokwasów do białek.

Omówione wyżej badania wskazujące na udział insuliny w transporcie aminokwasów i syntezie białek nie przesądzały jednak czy wzrost syntezy białka obserwowany po podaniu insuliny jest następstwem zwiększonego transportu aminokwasów do komórki, czy też przyspieszone przenikanie aminokwasów jest wywołane zwiększonym zapotrzebowaniem komórki, w której insulina aktywuje proces syntezy białka.

Celem oddzielenia tych dwóch procesów, transportu i zużytkowywania w syntezie białek badanego aminokwasu, Kipnis i Noall (17) wprowadzili do badań kwas α -aminoizomasłowy, który nie jest wykorzystywany w syntezie białek mięśnia przepony. Stwierdzili oni, że aminokwas ten nagromadzał się w tkance, przy czym jego stężenie wewnątrzkomórkowe było większe niż zewnątrzkomórkowe. Insulina, nawet w środowisku bez glukozy, podwyższała szybkość transportu i końcowe stężenie kwasu α -aminoizomasłowego w płynie komórkowym. Doświadczenia Kipnisa i Noalla powtórzyli inni autorzy (1, 5, 10, 29, 33) stwierdzając również pobudzający wpływ insuliny na transport kwasu α -aminoizomasłowego.

Trudno jednakże było na podstawie tych obserwacji przyjąć, że insulina w równym stopniu zwiększa transport różnych aminokwasów biorących udział w syntezie białek. Manchester i Young (29) w doświadczeniach na izolowanej przeponie stwierdzili, że insulina stymulowała nagromadzanie nie tylko kwasu α -aminoizomasłowego ale i glicyny, natomiast nie wywierała wpływu na transport alaniny, fenyloalaniny, lizyny, argininy czy ornityny. Akedo i Christensen (1) pracując na tym samym modelu stwierdzili, że insulina aktywuje przenikanie do tkanki L-proliny, L-metioniny, glicyny, sarkozyny i D,L-izoleucyny. Przedstawione dane wskazywałyby, że to działanie insuliny nie odnosi się do wszystkich aminokwasów biorących udział w syntezie białek.

Bardziej istotnymi dowodami wskazującymi na bezpośredni wpływ insuliny na transport aminokwasów były doświadczenia przeprowadzone w warunkach zupełnego zahamowania syntezy białek. Zastosowano puromycynę, która podana w odpowiedniej dawce hamuje syntezę białka (36), lecz nie zmienia transportu aminokwasów do tkanki (10). Carlin i Hechter (5) oraz Fritz i Kobil (10) stwierdzili, że insulina aktywuje transport proliny i kwasu α -aminoizomasłowego do mięśnia przepony w obecności puromycyny podanej w dawce, która zupełnie hamowała wbudowywanie aminokwasów do białek. Antybiotyk ten nie eliminuje wpływu insuliny na transport cukru do izolowanej przepony (5, 8). Castles i Wool (6) w doświadczeniach *in vitro* wykazali, że insulina w obecności puromycyny zwiększa nagromadzanie się w inkubowanej tkance histydyny, leucyny, fenyloalaniny, tyrozyny i alaniny — aminokwasów, na których nagromadzanie normalnie (bez puromycyny) insulina nie wpływa. Podobne wyniki uzyskali Scharff i Wool (46, 47) w doświadczeniach na izolowanym sercu szczura. Na podstawie tych danych Wool (58) sugeruje, że insulina zwiększa transport wielu, jeśli nie wszystkich, aminokwasów niezależnie od syntezy białek. Puromycyna natomiast, blokując syntezę białka, ujawnia tylko to działanie insuliny, które przy normalnej przemianie nie jest dostrzegalne.

Nie wszystkie jednak obserwacje można wytłumaczyć wpływem insuliny na transport aminokwasów do wnętrza komórek. Manchester i Krahl (27) inkubowali przeponę ze znakowanymi prekursorami aminokwasów. W tych warunkach pojawianie się piętna w białkach było miernikiem wewnątrzkomórkowego procesu syntezy. Okazało się, że insulina przyspiesza również ten proces, co wskazywałoby, że istotnie aktywuje ona wewnątrzkomórkową syntezę białka. Z kolei podjęto próby wyjaśnienia, w którym etapie tej syntezy działa insulina. Jako układy modelowe w badaniu biosyntezy białka posłużyły izolowane rybosomy mięśni, tj. na aktywację aminokwasów, wiązania zaktywowanych aminokwasów do białek w obecności rozpuszczalnej frakcji mięśni szkieletowych. Badając taki układ nie stwierdzono jednak różnic szybkości syntezy białka, kiedy użyto rozpuszczalną frakcję z mięśni zwierząt cukrzycowych, zdrowych, czy zwierząt otrzymujących insulinę (59). Można zatem przypuszczać, że insulina nie działa na komponenty rozpuszczalnej frakcji mięśni tj. na aktywację aminokwasów, wiązania zaktywowanych aminokwasów z sRNA i na przenoszenie kompleksu sRNA-aminokwas do rybosomów. Natomiast rybosomy izolowane z mięśnia sercowego szczurów cukrzycowych wykazywały mniejszą efektywność w stymulowaniu wbudowywania ^{14}C -fenyloalaniny do białek (38). Insulina podana *in vitro* nie miała wpływu na ten proces. Natomiast rybosomy pobrane z mięśnia sercowego zwierząt, którym uprzednio podano insulinę wykazywały znacznie większą aktywność. Trudno jest w tej chwili wytłumaczyć dlaczego insulina podana *in vitro* nie wykazuje działania. Niemniej jednak powyższe wyniki wskazywałyby, że rybosomy albo systemy związane z rybosomami są istotnym miejscem działania insuliny w wewnątrzkomórkowym procesie syntezy białka.

Pozostaje jednak nadal nierozwiązany problem mechanizmu tego działania. Wiele danych wskazuje (21, 55, 64), że insulina pobudza syntezę i zwiększa poziom RNA w badanych tkankach. Wool i Munro (64) frakcjonując RNA mięśnia przepony inkubowanej ze znakowaną adeniną stwierdzili, że insulina zwiększa poziom mRNA i aktywność rybosomowego RNA. Według Woola (59) insulina albo produkt jej przemiany mógłby wiązać się z represorem komórki inicjując w ten sposób powstawanie wielu cząsteczek mRNA, które włączałyby się w proces biosyntezy białek na rybosomach.

Jednak doświadczenia z aktynomycyną nie potwierdziły w pełni tej sugestii. Wiadomo (40, 44), że antybiotyk ten hamuje syntezę mRNA wiążąc się z resztą guanidynową DNA. Stwierdzono (63), że aktynomycyna hamowała wbudowywanie znakowanej adeniny do RNA izolowanej przepony, przy czym stopień zahamowania syntezy mRNA i białek był różny. W doświadczeniach, w których antybiotyk ten wywoływał znaczne zahamowanie syntezy mRNA obserwowano zahamowanie procesu syntezy

białek zaledwie w 50%. Jeśliby więc insulina pobudzała syntezę białek poprzez stymulację syntezy mRNA to aktynomycyna powinna eliminować to działanie. Jednakże okazało się, że stymulacja syntezy białek mięśnia przepony przez insulinę w obecności i nieobecności aktynomycyny była podobna (63). Antybiotyk ten nie eliminował też aktywującego wpływu insuliny na transport glukozy, czy kwasu α -aminoizomasłowego (8, 63). Trudno zatem wiązać aktywację syntezy białek po podaniu insuliny z działaniem tego hormonu tylko na syntezę mRNA.

Głównym miejscem biosyntezy RNA i DNA jest jądro komórkowe. Liczne dane wskazują, że błona otaczająca jądro mimo odmienności budowy wykazuje podobne właściwości transportowe jak błona komórkowa (9, 11, 31, 49). Przez błonę jądra mogą przenikać nie tylko związki o małej cząsteczce lecz również substancje wielkocząsteczkowe jak RNA lub białka (4, 12, 13, 14). Nasilenie biosyntezy białka po podaniu insuliny mogło zależeć od wpływu tego hormonu na transport mRNA z miejsca jego syntezy — jądra, do miejsca syntezy białka — cytoplazmy (59). Obserwowana aktywacja syntezy RNA po podaniu insuliny mogłaby być następstwem jego znikania z jąder. Hipoteza ta tłumaczyłaby fakt przyspieszonej syntezy białek po podaniu insuliny nawet przy znacznym zahamowaniu tworzenia się nowego RNA przez aktynomycynę, jak również obserwowane pobudzenie procesu syntezy białek już w 5-tej minucie po podaniu insuliny (56), podczas gdy odnowa mRNA w komórce wątroby następuje w ciągu 40 godzin (41).

Wprawdzie obecnie nie ma dostatecznych dowodów doświadczalnych wskazujących na wpływ insuliny na przepuszczalność błony jądra, biorąc jednak pod uwagę działanie „transportowe” tego hormonu na błony komórkowe wielu tkanek, hipoteza ta wydaje się prawdopodobna.

W ciągu wieloletnich badań wykazano bowiem, że insulina stymuluje transport przez błony komórkowe takich substratów, jak aminokwasy (1, 3, 19, 29, 30, 56, 60, 63), węglowodany (15, 20, 23, 24, 25, 32, 34, 39, 43) a także substancji obcych komórce jakimi są leki (7, 50, 51, 52, 53, 54). Hormon ten (lub powstała pod wpływem insuliny w błonie komórki substancja) mógłby również zwiększać przepuszczalność błon wewnątrzkomórkowych, ułatwiając między innymi transport mRNA z jądra do cytoplazmy oraz kontakt substratów z enzymami, co mogłoby mieć istotne znaczenie w procesach syntezy i metabolizmu komórki.

LITERATURA

1. Akedo H., Christensen H. N., *J. Biol. Chem.* **237**, 118 (1962).
2. Banting F. G., Best G. H., *J. Clin. Med.* **7**, 251 (1922).
3. Battaglia F. C., Manchester K. L., Randle F. J., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 50 (1960).
4. Byers T. J., Platt D. B., Goldstein L. J., *J. Cell. Biol.* **19**, 453 (1963).

5. Carlin H., Hechter O., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **115**, 127 (1964).
6. Castles J. J., Wool J. G., *Biochem. J.* **91**, 11c (1964).
7. Danysz A., Wiśniewski K., *Arch. Int. Pharmacol. Ther.* **158**, 10 (1965).
8. Ebou'e-Bonis D., Chambant A. M., Volfin P., Clauser H., *Nature* **199**, 1183 (1963).
9. Feldherr C. M., Harding C. V., *Protoplasmatologia* red. M. Alfert, Wien Springer Verlag, 1964, t. 5, cz. 2, str. 35.
10. Fritz G. R., Knobil E., *Nature* **200**, 682 (1963).
11. Gall J. G., *Protoplasmatologia* red. M. Alfert, Wien Springer Verlag, 1964, t. 5, cz. 2, str. 4.
12. Goldstein L., Plant W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **41**, 874 (1955).
13. Goldstein L., *Exptl. Cell. Res.* **15**, 635 (1958).
14. Goldstein L., *Protoplasmatologia* red. M. Alfert, Wien Springer Verlag, 1964, t. 5, cz. 2, str. 51.
15. Goldstein M. S., Henry W. L., Huddlestun B., Levine R., *Am. J. Physiol.* **173**, 207 (1953).
16. Ingle D. J., Prestrid M. C., Nezamis J. E., *Am. J. Physiol.* **150**, 682 (1947).
17. Kipnis D. M., Noall M. W., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 226 (1958).
18. Krahl M. E., *Science* **116**, 524 (1952).
19. Krahl M. E., *J. Biol. Chem.* **200**, 99 (1953).
20. Krahl M. E., *The Action of Insulin on Cells*, Academic Press, New York 1961.
21. Leslie J., *Biochem. J.* **52**, 215 (1952).
22. Levine R., *Am. J. Med.* **40**, 691 (1966).
23. Levine R., Goldstein M. S., *Recent. Progr. Hormone Res.* **2**, 343 (1955).
24. Levine R., Goldstein M. S., Huddlestun B., *J. Biol. Chem.* **179**, 985 (1949).
25. Levine R., Goldstein M. S., Huddlestun B., Klein P. S., *Am. J. Physiol.* **163**, 70 (1950).
26. Luck M. J., Morrison G., Wilbur L. F., *J. Biol. Chem.* **77**, 151 (1928).
27. Manchester K. L., Krahl M. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 2938 (1959).
28. Manchester K. L., Young F. G., *Biochem. J.* **12**, 136 (1958).
29. Manchester K. L., Young F. G., *Biochem. J.* **75**, 487 (1960).
30. Manchester K. L., Young F. G., *Vitamins Hormones* **19**, 95 (1961).
31. Mirsky A. E., *Protoplasmatologia* red. M. Alfert, Wien Springer Verlag, 1964, t. 5, cz. 2, str. 1.
32. Morgan H. E., Henderson M. J., Regen D. M., Park C. R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **82**, 387 (1959).
33. Park C. R., w *The Action of Insulin in Cells*, red. M. E. Krahl, Academic Press, New York 1961, str. 99.
34. Park C. R., Johnson L. H., *Am. J. Physiol.* **182**, 17 (1955).
35. Penhos J. C., *Program Endocrine Society Meet.* **33**, 43 (1961).
36. Penhos J. C., Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **202**, 349 (1962).
37. Penhos J. C., Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **203**, 687 (1962).
38. Rampersad O., Wool I. G., *Federation Proc.* **24**, 511 (1958).
39. Randle P. J., Smith G. H., *Biochem. J.* **70**, 501 (1958).
40. Reich E., Franklin R. M., Tatum A. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1238 (1962).
41. Revel M., Hiatt H. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 810 (1964).
42. Riggs T. R., Walker L. M., *Federation Proc.* **17**, 297 (1958).
43. Ross E., *J. Physiol.* **116**, 414 (1952).
44. Samuels L. D., *N. Engl. J. Med.* **271**, 1952 (1964).

45. Sanders R. B., Riggs T. R., *Federation Proc.* **22**, 417 (1963).
46. Scharff R., Wool I. G., *Biochem. J.* **97**, 257 (1965).
47. Scharff R., Wool I. G., *Biochem. J.* **97**, 272 (1965).
48. Sinex F. M., Macmulleu J., Hastings H. B., *J. Biol. Chem.* **198**, 615 (1952).
49. Watson M. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 257 (1955).
50. Wiśniewski K., *Acta Physiol. Polon.* **15**, 113 (1964).
51. Wiśniewski K., *Biochem. Pharmacol.* **17**, 2127 (1968).
52. Wiśniewski K., Buczko Wł., *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2227 (1967).
53. Wiśniewski K., Danysz A., *Biochem. Pharmacol.* **15**, 669 (1965).
54. Wiśniewski K., Małyszko E., *Acta Physiol. Polon.* **7**, 321 (1966).
55. Wool I. G., *Am. J. Physiol.* **199**, 719 (1960).
56. Wool I. G., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 574 (1961).
57. Wool I. G., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 411 (1963).
58. Wool I. G., *Federation Proc.* **24**, 1060 (1965).
59. Wool I. G., Mechanism of Hormone Action red. P. Karlson, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, 1965, str. 98.
60. Wool I. G., Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **196**, 961 (1959).
61. Wool I. G., Krahl M. E., *Nature* **183**, 1399 (1959).
62. Wool I. G., Manchester K. L., *Nature* **193**, 345 (1962).
63. Wool I. G., Moyer A. N., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 248 (1964).
64. Wool I. G., Munre A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 918 (1963).

EDWARD BAŃKOWSKI *, WŁADYSŁAW GAŁASIŃSKI **

Tkankowe enzymy kolagenolityczne

Tissue Collagenolytic Enzymes

The review of literature connected with tissue collagenolytic enzymes is presented.

Spośród wielu swoistych właściwości kolagenu odróżniających go od innych białek na szczególną uwagę zasługuje jego oporność na trawienie nieswoistymi enzymami proteolitycznymi. Niektóre z nich, zależnie od warunków, powodują odwracalną depolimeryzację włókien kolagenowych do monomeru — tropokolagenu (21, 42, 43, 44), bądź odszczepiają końcowe fragmenty łańcuchów peptydowych zwane telopeptydami (6, 16). Enzymy te nie rozbijają jednak zasadniczych łańcuchów peptydowych tropokolagenu.

Proteazy zdolne w fizjologicznych warunkach pH i temperatury do trawienia kolagenu noszą nazwę kolagenaz (24). Do niedawna jedyną znaną kolagenazą był enzym wyodrębniony z hodowli bakterii beztlenowych należących do rodzaju *Clostridia* (*Cl. histolyticum*, *Cl. perfringens*, *Cl. capitovale* (24) i *Cl. welchi* (3)). Jest to proteaza o wysokiej specyficzności. Nie działa ona na kazeinę, hemoglobinę i elastynę, a wykazuje aktywność proteolityczną tylko wobec natywnego kolagenu i jego pochodnych, jak żelatyna i azokol (25). Enzym ten jest endopeptydazą i powoduje rozpad kolagenu na peptydy (26, 27, 30, 39, 40, 57). Badania końcowych grup produktów degradacji kolagenu wykazały, że w 97% peptydów aminokwasem N-końcowym jest glicyna, w pozostałych kwas asparaginowy, a w sporadycznych przypadkach seryna lub walina. Aminokwasem C-końcowym w 55—70% jest hydroksyprolina, a w 16—18% alanina. Z danych tych wynika, że kolagenaza rozkłada wybiórczo wiązania peptydowe utworzone przez grupę aminową glicyny i grupę karbonylową hydroksyproliny lub alaniny. Rozdział chromatograficzny produktów degradacji kolagenu wykazał obecność około 30 frakcji. Spośród uwolnionych peptydów 25% stanowią trójpeptydy: glicyloprolilohydroksyprolina i glicyloproliloalanina. Pozostałe produkty kolagenolizy sta-

* Dr med., Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Białystok.

** Dr farm., Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Białystok.

nowią peptydy o masie cząsteczkowej wahającej się w granicach od 500 do 700 (26, 27). Kolagenaza otrzymana z bakterii beztlenowych jest enzymem niejednorodnym. Mandl i wsp. (25) oraz Schaub i Strauch (36) wyodrębnili z surowego preparatu tego enzymu dwie frakcje: klostridiopeptydazę A i kolagenazę 2. Pierwsza z nich działa na natywny kolagen i sztuczne substraty, nie wykazuje natomiast aktywności wobec zdenaturowanych pochodnych kolagenu jak żelatyna i azokol. Kolagenaza 2 działa silnie na żelatynę i azokol, a słabo na natywny kolagen i sztuczne substraty. Kolagenazę o podobnych właściwościach wykryto również w hodowlach bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (37) i *Mycobacterium tuberculosis* (48).

Liczni autorzy (1, 12, 17, 50, 51, 54, 55, 56) stwierdzili aktywność kolagenolityczną wyciągów z wątroby, kości, trzustki i skóry, o optimum działania pomiędzy pH 3,5 a 5,8. Fizjologiczne znaczenie wykrytego enzymu jest niejasne, gdyż wiadomo, że kolagen ssaków ulega denaturacji w środowisku kwaśnym, w temperaturze ponad $32^{\circ}C$ (5).

Mechanizm rozkładu kolagenu nie jest jeszcze ostatecznie wyjaśniony. Aktywność metaboliczna kolagenu jest wielokrotnie mniejsza niż innych białek. Biologiczny okres półtrwania kolagenu tkankowego wynosi ponad 100 dni (45). W niektórych stanach fizjologicznych, na przykład w okresie wzrostu młodego organizmu, w czasie metamorfozy kijanek żaby, w okresie poporodowej involucji macicy, a także w przebiegu pewnych schorzeń, jak nadczynność przedniego płata przysadki mózgowej, tarczycy, przystarczyc lub chorób nowotworowych obserwuje się wzmożony katabolizm kolagenu tkankowego (22, 38). Przejawia się to między innymi zwiększonym wydalaniem w moczu produktów degradacji kolagenu (38). W skrajnych przypadkach biologiczny okres półtrwania tego białka skraca się do kilku dni (45). Powyższe spostrzeżenia nasunęły przypuszczenie o istnieniu swoistego enzymu rozkładającego kolagen tkankowy. Wiele prób otrzymania z tkanek zwierzęcych enzymu zdolnego do rozkładu kolagenu w fizjologicznych warunkach pH i temperatury skończyło się jednak niepowodzeniem.

Dogodnym modelem doświadczalnym do badań nad kolagenazą tkankową okazała się kijanka żaby *Rana catesbiana*, u której w okresie metamorfozy dochodzi do szybkiego zaniku ogona — narządu szczególnie bogatego w kolagen. W tym okresie tkanki żaby mają szczególnie silną aktywność kolagenolityczną (7, 14, 22, 28, 35), zlokalizowaną prawie wyłącznie w tkance nabłonkowej (tablica 1).

Wycinki tkankowe inkubowane na żelu kolagenowym wykazywały wyraźną aktywność kolagenolityczną. W tych samych wycinkach poddanych wielokrotnemu zamrażaniu i odmrażaniu aktywność enzymu wybitnie spadała na skutek zniszczenia struktury komórkowej (7). Można było z tego wnosić, że kolagenaza tkankowa może być wytwarzana de

Tablica 1

Aktywność kolagenolityczna hodowli tkankowych określana wizualnie poprzez lizę żelu kolagenowego (7)

Tkanka	Ilość hodowli ^a	Liza ^b				
		0	1+	2+	3+	4+
Cała płetwa	46	3	1	5	5	32
Nabłonek	38	4	3	9	11	14
Mezenchyma	38	33	4	1	0	0

^a Wszystkie hodowle były inkubowane przez 48 godzin w temperaturze 37°C.

^b 0— brak lizy; 4+ — całkowita liza żelu.

novoo w zetknięciu się z substratem lub że jest ona magazynowana w formie nieczynnej, a następnie uaktywniana w kontakcie z kolagenem. Po dodaniu puromycyny do hodowli tkankowej wycinki tkankowe nie wykazywały prawie wcale aktywności kolagenolitycznej (tablica 2). Ten fakt oraz wzrost aktywności kolagenolitycznej u żaby w okresie metamorfozy przemawiają raczej za indukcją syntezy *de novo* kolagenazy tkankowej. Za tą hipotezą przemawia również fakt, że tyroksyna przyspiesza pojawienie się tego enzymu w komórkach nabłonka, natomiast nie wpływa na jego aktywność (22, 28).

Tablica 2

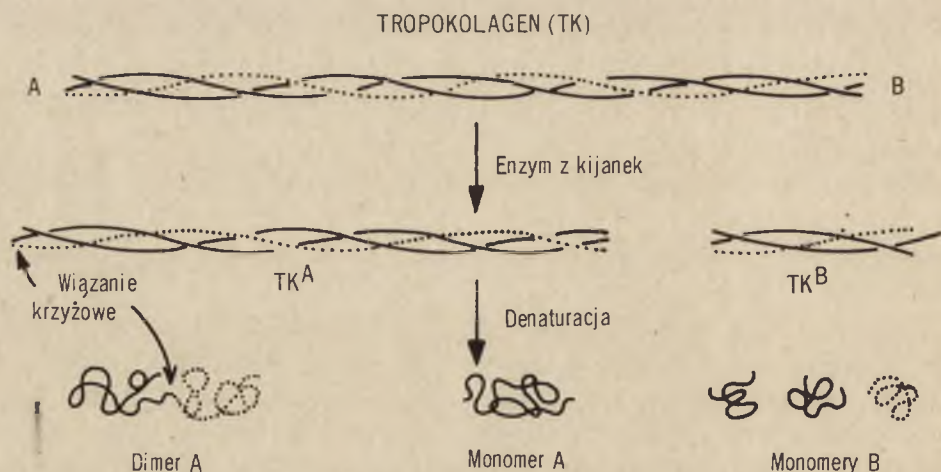
Wpływ puromycyny na aktywność kolagenazy określaną przez pomiar ilości uwolnionego ¹⁴C z żelu kolagenowego (7)

Tkanka	Ilość hodowli	Czas inkubacji (godziny)	Puromycyna 100 µg/ml	% lizy powyżej kontroli	% zahamowania
Kolagenaza w wycinku płetwy	5	24	0	39,3 ± 4,6	91,1 ± 2,4
	9	24	+	3,5 ± 3,0	
	3	48	0	75,1 ± 2,6	
	4	48	+	6,8 ± 3,5	
	3	72	0	74,4 ± 3,7	
	3	72	+	4,0 ± 2,9	94,7 ± 4,0
Trypsyna 0,01%	4	72	0	2,4 ± 0,3	

Nagai i wsp. (28) wyosobnili kolagenazę z tkanki nabłonkowej kijanki żaby i określili jej właściwości. Uzyskany przez nich enzym był około 300 razy oczyszczony w stosunku do surowego preparatu. Optimum pH tego enzymu waha się od 8 do 9, optimum temperatury wynosi około 20°C. Oczyszczony enzym w stężeniu 10 µg/ml w temperaturze 20°C,

w pH 7,6, zmniejsza lepkość 0,05% roztworu kolagenu do 50—60% wartości wyjściowej. Obok aktywności kolagenolitycznej enzym ten wykazuje również aktywność kazeinolityczną. Aktywność enzymatyczna jest hamowana odwracalnie przez EDTA w stężeniu 2×10^{-3} M i większym oraz nieodwracalnie przez cysteinę w stężeniu 5×10^{-3} M, a także przez zakwaszenie do pH 3,5.

Kolagenaza tkankowa rozbija wiązanie peptydowe utworzone przez grupę karboksylową glicyny i grupę aminową leucyny lub izoleucyny (74). Pod jej działaniem cząsteczka tropokolagenu rozpada się na dwie nierówne części, z których każda zachowuje strukturę potrójnego heliksu. Większa część cząsteczki, tropokolagen A (TK^A), odpowiada 75%, a mniejsza, tropokolagen B (TK^B), 25% długości wyjściowej cząsteczki tropokolagenu. Pomiar mas cząsteczkowych produktów kolagenolizy wykazuje, że wszystkie trzy łańcuchy tropokolagenu przecinane są w tej samej proporcji. W zdenaturowanej mieszaninie produktów kolagenolizy stwierdzono obecność cząstek odpowiadających dimerom łańcuchów peptydowych tropokolagenu A, nie stwierdzono natomiast dimerów łańcuchów pochodzących z tropokolagenu B. Spostrzeżenie to może być dowodem nierównomiernego rozmieszczenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych w obrębie cząsteczki tropokolagenu (14, 19) i przemawia za hipotezą Bornsteina i Pieza (4) o usytuowaniu wiązań krzyżowych sprzęgających łańcuchy i cząsteczki tropokolagenu od strony aminokwasu N-końcowego. Być może znajdują się one na końcu tropokolagenu A (TK^A) (Schemat 1). Wprawdzie kolagenaza tkankowa powoduje jedynie wstępną degradację, jednak przypisuje się jej istotną rolę w procesie katabolizmu kolagenu tkankowego. Wielkocząsteczkowe produkty kolagenolizy charakteryzują się obniżoną temperaturą denaturacji cieplnej; mogą one ulegać denaturacji już w temperaturze organizmu. Zdenaturowane pro-



Schemat 1. Degradacja tropokolagenu pod wpływem enzymu z kijanki żaby (19)

dukty enzymatycznej degradacji kolagenu stają się podatne na działanie nieswoistych proteaz tkankowych, powodujących dalszą destrukcję tego białka (14).

Doświadczenia Lapiere'a i Grossa (22) nad metabolizmem kolagenu w tkankach kijanki żaby w okresie jej metamorfozy wykazały, że kolagenaza tkankowa atakuje wybiórczo stare włókna kolagenowe. Nowo powstały kolagen jest oporny na działanie tego enzymu. Autorzy tłumaczą to zjawisko ochronnym działaniem substancji podstawowej tkanki łącznej na nowo utworzone włókna kolagenowe (retikulinę).

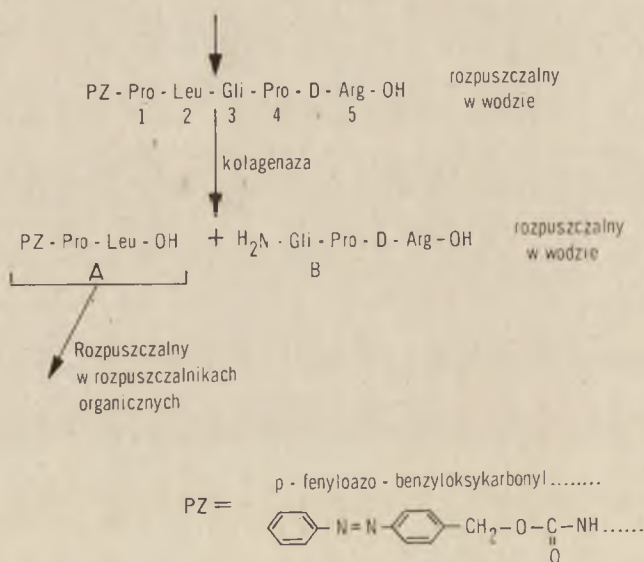
W ślad za wykryciem enzymu kolagenolitycznego w tkance żaby poszły intensywne poszukiwania podobnego enzymu w tkankach ludzkich i zwierząt wyższych.

Badania Sterna i wsp. (41) oraz Walkera i wsp. (49) wykazały aktywność kolagenolityczną w tkance kostnej, co potwierdzili Fullmer i Lazarus (10). Podanie szczurom wyciągu z przytarczyc powodowało kilkakrotny wzrost aktywności kolagenolitycznej w kościach tych zwierząt (49).

Grillo i Gross (13) wykazali, że wycinki tkankowe z brzegu gojącej się rany świnki morskiej mają zdolność rozpuszczania żelu kolagenowego; ich aktywność kolagenolityczna była kilkakrotnie wyższa niż w skórze niezranionej. Liza żelu rozpoczynała się wokół nabłonkowej części wycinka tkankowego. Porównanie części nabłonkowej i mezenchymalnej wykazuje, że aktywność kolagenolityczna umiejscowiona jest głównie w komórkach nabłonka. Tkanka mezenchymalna, a szczególnie jej głębokie warstwy, wykazuje wielokrotnie mniejszą aktywność od tkanki nabłonkowej. Wprawdzie aktywność kolagenolityczna zlokalizowana jest głównie w warstwie nabłonkowej, jednak usunięcie warstwy mezenchymalnej zmniejsza jej aktywność kolagenolityczną. Rekombinacja obydwu warstw przywraca aktywność zbliżoną do wyjściowej. Przy wielokrotnym przenoszeniu wycinka tkankowego w odstępach 24-godzinnych na coraz to nowe żele kolagenowe, aktywność kolagenolityczna zanika po trzech kolejnych transplantacjach (po upływie 72 godzin). W trakcie tego doświadczenia zaobserwowano, że aktywność kolagenolityczna znika z warstwy nabłonkowej już po 14 godzinach, narastając równocześnie w warstwie mezenchymalnej. Podobne zjawisko stwierdzono w czasie przechowywania wycinka tkankowego w płynie Tyrode'a przed implantacją na żel kolagenowy. Nawet głębokie warstwy mezenchymy preinkubowane z nabłonkiem uzyskują aktywność kolagenolityczną. Dane te przemawiają za przechodzeniem kolagenazy z nabłonka do tkanki łącznej. Autorzy nie stwierdzili obecności kolagenazy w ekstraktach i homogenatach tkankowych. Upośledzenie biosyntezy kolagenu poprzez wywołanie awitaminozy C nie zmieniało kolagenolitycznej aktywności badanej tkanki.

Ostatnio Eisen i wsp. (8) wykazali, że wycinki skóry ludzkiej hodowane na sztucznym podłożu wydzielają do otaczającego środowiska enzym o właściwościach analogicznych do kolagenazy z nabłonka kijanki żaby. Podobną kolagenazę z granulocytów ludzkich wyodrębnili Lazarus i wsp. (23).

Niewątpliwym postępem w badaniach nad kolagenazami było zastosowanie sztucznego substratu (52, 53). Peptyd złożony z pięciu aminokwasów o składzie: Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Pz=p-fenyloazobenzoksykarbonyl-) jest rozbijany przez kolagenazę w miejscu wiązania peptydowego pomiędzy leucyną a glicyną. D-arginina zawarta w tym peptydzie chroni go przed działaniem nieswoistych proteaz jak tripsyna, karboksypeptydazy i proteazy komórkowe. Uwolniony dwupeptyd proliloleucyna z rodnikiem p-fenyloazobenzoksykarbonylowym o charakterystycznym żółtym zabarwieniu można wyekstrahować z badanego układu rozpuszczalnikiem organicznym i oznaczyć spektrofotometrycznie (schemat 2). Zastosowanie tego substratu umożliwia wykrywanie i ilościowe oznaczanie kolagenazy w układach wieloenzymatycznych.



Schemat 2. Działanie kolagenazy tkankowej na sztuczny substrat Wünscha (45)

Strauch i wsp. (45, 46, 47) wykazali obecność kolagenazy w komórkach nabłonkowych człowieka oraz w fibroblastach myszy i zarodków kurzych. Stwierdzili oni, że najwyższą aktywność kolagenolityczną mają hodowle tkankowe w okresie logarytmicznej fazy wzrostu. Aktywność ta jest kilkakrotnie wyższa w porównaniu z fazą stacjonarną. Pomimo aktywnej biosyntezy białka, zachodzącej na początku fazy logarytmicznej, zawartość kolagenu w tym okresie wykazuje wartości najniższe. Może to być wynikiem trawienia własnego kolagenu przez kolagenazę tkankową.

Witamina C stymuluje biosyntezę kolagenu, przy czym aktywność kolagenolityczna wobec sztucznego substratu ulega obniżeniu (47).

Jednakże ocena aktywności kolagenolitycznej hodowli tkankowych na podstawie rozkładu sztucznego, egzogenego substratu nie daje pełnego obrazu aktywności tego enzymu. Obserwowany w fazie stacjonarnej spadek jego aktywności idzie w parze ze wzrostem zawartości kolagenu. Białko to, będące naturalnym substratem dla kolagenazy tkankowej, może skutecznie współzawodniczyć w tym oznaczeniu z egzogenym peptydem (46).

Riley i Peacock (33, 34) poszukując kolagenazy w tkankach ludzkich stwierdzili jej obecność prawie wyłącznie w tkankach pochodzenia nabłonkowego. Spośród 130 wycinków pobranych z tkanek nabłonkowych 81 wykazywało obecność kolagenazy, natomiast wśród 108 wycinków z tkanek pochodzących z innych listków zarodkowych tylko 2 wykazywały obecność tego enzymu. Również nowotwory pochodzenia nabłonkowego zachowywały się pod tym względem jak tkanka macierzysta. Nie stwierdzono natomiast aktywności kolagenolitycznej w nowotworach pochodzenia łącznotkankowego (włókniak, mięsak). Strauch (45) badając rozmieszczenie aktywności kolagenolitycznej w tkance raka sutka stwierdził największą aktywność w obwodowych, inwazyjnych częściach rozrastającego się guza. Obecność kolagenazy ułatwia rozkład kolagenu tkanek otaczających i dalszy rozrost nowotworu.

Wzrost aktywności kolagenolitycznej tkanek obserwowano w przebiegu niektórych schorzeń. Dotyczy to między innymi dziąseł w przebiegu chorób przyzębia (2, 9) oraz skóry w przypadkach schorzeń układu nerwo-mięśniowego (11). Podwyższoną aktywność kolagenolityczną wykazują również blizny skórne, w których wysoki poziom tego enzymu utrzymuje się przez okres około 30 lat od chwili zranienia (33).

Z powyższych doniesień wynika, że kolagenaza tkankowa jest ściśle związana ze strukturą komórki. Poza kijankami w okresie metamorfozy oraz granulocytami nie udało się wykazać obecności tego enzymu w ekstraktach i homogenatach tkankowych. Brak również danych o jej obecności w płynach biologicznych. Być może, zapotrzebowanie organizmu na ten enzym jest niewielkie ze względu na wyjątkowo niską aktywność metaboliczną kolagenu.

Lapierre i Gross (22) oraz Walker i wsp. (49) wykazali, że hormony tarczycy i przytarczyc wzmagają aktywność kolagenolityczną tkanek. Z danych klinicznych wiadomo, że przy nadczynności tych gruczołów obserwuje się wzmożony katabolizm kolagenu (15, 18, 20, 29), przejawiający się wzmożonym wydalaniem w moczu produktów degradacji tego białka. Fakt ten pozwala przypuszczać, że hormony te oddziałują na metabolizm kolagenu poprzez kolagenazę tkankową. Obserwacje różnych badaczy, przeprowadzone w różnych układach doświad-

czalnych, prowadzą do zgodnego wniosku, że głównym źródłem kolagenazy jest tkanka nabłonkowa, jakkolwiek są również dane przemawiające za biosyntezą tego enzymu w fibroblastach — komórkach produkujących kolagen.

Postęp w zakresie metod wyodrębniania enzymów, lokalizacji i w określaniu roli biologicznej tego enzymu mógłby umożliwić wytłumaczenie szeregu niejasnych jeszcze problemów związanych z metabolizmem kolagenu. Trudno bowiem wyobrazić sobie proces degradacji kolagenu, stanowiącego 30% białek ustrojowych, bez udziału swoistego mechanizmu enzymatycznego, chociaż Nordwig i Jahn (31) przedstawiają odrębny swą oryginalnością pogląd. Uważają oni, że łączne działanie szeregu nieswoistych proteaz może prowadzić do degradacji kolagenu do trójpeptydów (Gly-Pro-X). Uwolnione trójpeptydy byłyby rozszczepiane przez inne enzymy proteolityczne, obecne w różnych narządach (32).

LITERATURA

1. Bazin S., Delaunay A., Briquetet N., Allain J. C., *Ann. Inst. Pasteur* **110**, 192 (1966).
2. Beutner E. H., Triftshouser C., Hansen S. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **121**, 1082 (1966).
3. Bidwel E., van Heyningen W. F., *Biochem. J.* **42**, 140 (1948).
4. Bornstein P., Piez K. A., *Biochemistry* **5**, 3460 (1966).
5. Dick Y. P., Nordwig A., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 446 (1966).
6. Drake M. P., Davison P. F., Bump S., Schmitt F. O., *Biochemistry* **5**, 301 (1966).
7. Eisen A. Z., Gross J., *Develop. Biol.* **12**, 468 (1965).
8. Eisen A. Z., Jeffrey J. J., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 637 (1968).
9. Fullmer H. M., Gibson W., *Nature* **209**, 728 (1967).
10. Fullmer H. M., Lazarus G., *Israel J. Med. Sci.* **3**, 758 (1967).
11. Fullmer H. M., Lazarus G., Gibson W. A., Stam A. C., *Lancet* **1**, 1007 (1967).
12. Goldstein E. R., Patel Y. M., Houck J. C., *Science* **146**, 942 (1964).
13. Grillo H., Gross J., *Develop. Biol.* **15**, 300 (1967).
14. Gross J. J., Nagai Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1197 (1965).
15. Harris E. D., Sjoerdsma A., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 358 (1966).
16. Hodge J. A., Highberger J. H., Deffner G. G., Schmitt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **46**, 197 (1960).
17. Houck J. C., Patel Y. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **116**, 382 (1964).
18. Kalima T., Kivirikko K. J., Laitinen O., Uitto J., *Clin. Chim. Acta* **19**, 443 (1968).
19. Kang A. H., Nagai Y., Piez K. A., Gross J., *Biochemistry* **5**, 509 (1966).
20. Kivirikko K. J., Laitinen O., Lamberg B. A., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **25**, 1347 (1965).
21. Kühn K., Fietzek P., Kühn J., *Biochem. Z.* **344**, 418 (1966).
22. Lapiere Ch. M., Gross J., Mechanism of Hard Tissue Destruction, Publication of the American Association for Advancement of Sciences, Washington DC, **75**, 663 (1963).

23. Lazarus G. S., Daniels J. R., Brown R. S., Bladen H. A., Fullmer H. M., *J. Clin. Invest.* **47**, 2622 (1968).
24. Mandl J., *Advan. Enzymol.* **23**, 163 (1961).
25. Mandl J., Keller S., Manahan J., *Biochemistry* **3**, 1737 (1964).
26. Nagai Y., *J. Biochem.* **50**, 486 (1961).
27. Nagai Y., *J. Biochem.* **50**, 493 (1961).
28. Nagai Y., Lapiere Ch. M., Gross J., *Biochemistry* **5**, 3123 (1966).
29. Ney R. L., Gill J. R., Keiser H. R., Bartter F. C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 815 (1966).
30. Nishigai M., Nagai Y., Noda H., *J. Biochem.* **48**, 152 (1960).
31. Nordwig A., Jahn W. F., *Eur. J. Biochem.* **3**, 519 (1968).
32. Nordwig A., Mitsui E., Third FEBS Meeting, Abstracts str. 297 (1966).
33. Riley W. B., Peacock E. E., *Surg. Forum* **17**, 90 (1966).
34. Riley W. B., Peacock E. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **124**, 207 (1967).
35. Sakai T., Gross J., *Biochemistry* **6**, 518 (1967).
36. Schaub M. C., Strauch L., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **349**, 809 (1968).
37. Schollmann G., Fisher E., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 557 (1966).
38. Sjoerdsma A., Udenfriend S., Keiser H., Le Roy E. C., *Ann. Intern. Med.* **63**, 672 (1965).
39. Stark M., Kühn K., *Eur. J. Biochem.* **6**, 534 (1968).
40. Stark M., Kühn K., *Eur. J. Biochem.* **6**, 542 (1968).
41. Stern B., Glimcher M. J., Mechanic G. L., Goldhaber P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **119**, 557 (1965).
42. Steven F. S., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 190 (1966).
43. Steven F. S., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 196 (1966).
44. Steven F. S., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 202 (1966).
45. Strauch L., *Mitt. Max-Planck-Gesell.* **1**, 40 (1968).
46. Strauch L., Venceli H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 465 (1967).
47. Strauch L., Venceli H., Hannig K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **349**, 171 (1968).
48. Takahashi S., *J. Biochem.* **61**, 258 (1967).
49. Walker D. G., Lapiere Ch. M., Gross J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 397 (1964).
50. Woods J. F., Nichols G. Jr., *Science* **142**, 386 (1963).
51. Woods J. F., Nichols G. Jr., *J. Cell. Biol.* **26**, 747 (1966).
52. Wünsch E., Heidrich H. G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **332**, 300 (1963).
53. Wünsch E., Heidrich H. G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **333**, 149 (1963).
54. Wynn G. H., *Nature* **215**, 5106 (1967).
55. Wynn G. H., *Nature* **215**, 5106 (1967).
56. Wynn G. H., Wahid M. A., *Biochem. J.* **98**, 10 P (1966).
57. Yagisawa S., Morita F., Nagai Y., Noda H., Ogura Y., *J. Biochem.* **58**, 407 (1965).

KRZYSZTOF WOROWSKI *, RYSZARD FARBISZEWSKI *

Udział lipidów i lipoproteidów w procesie hemostazy

The Role of Lipids and Lipoproteins in Hemostatic Processes

The structure and properties of lipids and lipoproteins, their influence upon the platelet haemostatic function, and their role in blood coagulation and fibrynolysis has been discussed.

Zagadnieniem interesującym od dawna wielu badaczy są powiązania między lipidami i lipoproteidami surowicy krwi a krzepnięciem krwi, funkcjami hemostatycznymi płytek i fibrynolizą oraz rola związków lipidowych w powstawaniu zakrzepów i miażdżycy naczyń krwionośnych.

Lipidy występują w krwi krążącej głównie w połączeniu z białkami jako lipoproteidy. Struktura chemiczna, przemiany, funkcje fizjologiczne i rola lipoproteidów w patologii są przedmiotem szeregu opracowań poglądowych (57, 125, 150, 194). Lipoproteidy są nie tylko zasadniczym elementem struktury błon komórkowych, lecz także spełniają szereg funkcji jak transport z krwią tłuszczów, cholesterolu, wolnych kwasów tłuszczowych, hormonów sterydowych i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, a także biorą udział w mechanizmie przechodzenia substancji przez błony komórkowe i w reakcjach odpornościowych. Lipoproteidami są niektóre enzymy: ATP-aza (96) oraz oksydaza cytochromowa i bursztynianowa (46). Z frakcjami lipoproteidowymi związana jest aktywność esterazowa surowicy (188).

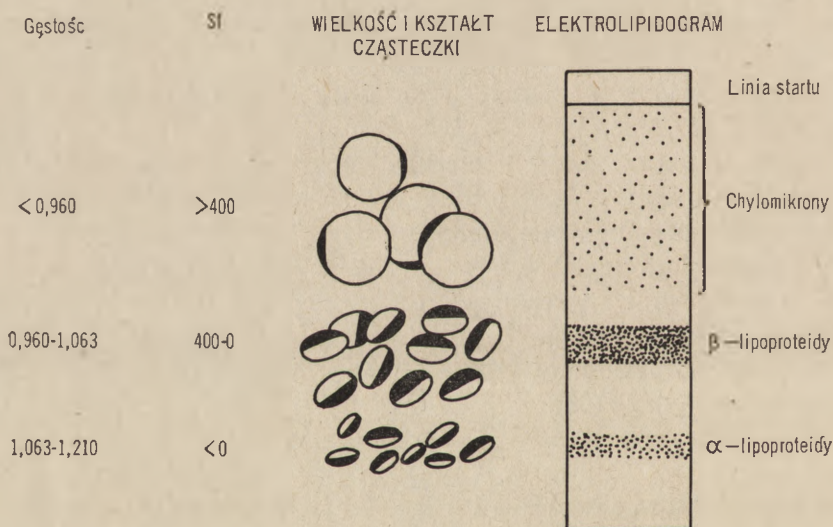
I. Podział, struktura chemiczna i własności fizykochemiczne lipoproteidów

Charakterystykę lipoproteidów surowicy krwi przeprowadza się za pomocą elektroforezy (89, 109, 143, 153), ultrawirówki (67, 79, 111, 114, 162) i metodami analizy chemicznej. W elektroforezie bibułowej uzyskuje się trzy frakcje lipoproteidowe: α -lipoproteidy o ruchliwości nieco większej niż α_1 -globuliny, β -lipoproteidy wędrujące razem z β -globulinami i frakcję chylomikronów zajmującą obszar od linii startu do frakcji β -globulinowej. Gęstość lipoproteidów jest niższa niż pozostałych białek surowicy

* Dr, Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Białystok.

i zawiera się w szerokich granicach od 0,93 do 1,21 g/ml. Pozwala to na rozdzielenie ich w ultrawirówce przez flotację w roztworach soli o odpowiednio dobranej gęstości. Poddane wirowaniu w roztworze soli o gęstości 1,063 g/ml wędrują one w kierunku dośrodkowym. Im mniejsza jest gęstość lipoproteidu, tym większa jest jego stała flotacji (Sf). W zależności od gęstości dzieli się je na: chylomikrony o gęstości poniżej 0,96 g/ml, lipoproteidy LDL o małej gęstości (ang. *low density lipoproteins*), niższej niż 1,068 g/ml, ulegające rozdzieleniu na trzy frakcje podczas ultrawirowania, oraz lipoproteidy HDL o dużej gęstości (ang. *high density lipoproteins*), wyższej od 1,068 g/ml. W warunkach stosowanych do rozdziału LDL cząsteczki HDL nie flotują i aby je rozdzielić za pomocą ultrawirowania trzeba stosować stężenie soli 1,21 g/ml (113). Frakcja LDL uzyskana w ultrawirówce odpowiada mniej więcej β -lipoproteidom elektroforezy bibułowej a frakcja HDL α_1 -lipoproteidom.

Ze wzrostem ciężaru właściwego lipoproteidów obniża się stopniowo zawartość lipidów, a zwiększa ilość białka w cząsteczce, zwiększa się ruchliwość elektroforetyczna, wielkość cząsteczki maleje, a kształt jej staje się coraz bardziej elipsoidalny (schemat 1).



Schemat 1. Współzależności między niektórymi własnościami fizykochemicznymi lipoproteidów surowicy

Pola czarne — część białkowa, pola białe — część lipidowa

Rozdziału lipoproteidów surowicy dokonać można również metodą C o h n a i wsp. (28), chromatograficznie (24, 35, 82), drogą elektroforezy na żelu skrobiowym i immunoelektroforezy (112). Frakcje lipoproteidowe surowicy są wytrącane selektywnie przez niektóre polisacharydy: heparynę (22), siarczan dextranu (151), agar (93), co wykorzystano do celów

preparatywnych i analitycznych. Opracowano metody otrzymywania α -lipoproteidów (21), β -lipoproteidów (23) i chylomikronów (23), a także ich ilościowego oznaczania w surowicy (23). Zawartość chylomikronów ocenia się liczbowo w ciemnym polu widzenia w mikroskopie. Oceny odsetkowej zawartości lipoproteidów dokonuje się najczęściej za pomocą elektroforezy bibułowej. Składniki lipidowe wybarwia się różnymi metodami (11, 55, 124, 152, 183). α -Lipoproteidy stanowią 31,2, β -lipoproteidy 52,7, a chylomikrony 16,4% lipoproteidów surowicy.

Lipoproteidy są kompleksami białkowo-lipidowymi. Część lipidową α -lipoproteidów można oddzielić od części białkowej działając etanolem i eterem w niskich temperaturach (74). Delipidację β -lipoproteidów przeprowadza się działając mocznikiem lub solą sodową siarczanu dodecyłu (70). Natywne cząsteczki lipoproteidów oraz ich wyosobnione składniki białkowe wykazują właściwości antygenowe. Składnikami lipidowymi są: glicerydy, fosfatydy, wolny i zestryfikowany cholesterol i wolne kwasy tłuszczowe. Znacznie gorzej, mimo licznych badań (69, 113, 114, 120, 176, 177), poznana jest struktura części białkowej, zwłaszcza β -lipoproteidów. W skład lipoproteidów wchodzi także niewielkie ilości węglowodanów (47, 122). Skład chemiczny lipoproteidów podali Olson i Vester (150). W niektórych stanach patologicznych w surowicy pojawiają się lipoproteidy nietypowe, o zmienionej budowie, zmienionym składzie chemicznym i sposobie powiązania części białkowej z lipidową, zmniejszonej trwałości i zwiększonej podatności na wytrącanie (5, 33, 40, 108, 146, 159, 197).

Sposób połączenia części białkowej z lipidową w lipoproteidach nie jest znany. Najprawdopodobniej te dwie komponenty wiążą się dość luźno siłami Van der Waalsa. Wskazuje na to nietrwałość cząsteczek lipoproteidów i łatwość rekombinacji rozszczepionych fragmentów białkowych i lipidowych. Możliwe są także wiązania elektrostatyczne typu soli i kowalencyjne pomiędzy grupami polarnymi aminokwasów, fosfatydów i cholesterolu. Różna odporność poszczególnych rodzajów lipoproteidów na działanie różnych czynników wskazuje na inny typ wiązań między składnikami lipoproteidów różnych frakcji. β -Lipoproteidy są wrażliwsze na działanie eteru niż α -lipoproteidy, natomiast bardziej odporne na działanie mocznika. Rozpuszczalność w wodzie i nierozpuszczalność w rozpuszczalnikach apolarnych wskazuje, że część białkowa i hydrofilne ugrupowania na końcach łańcuchów lipidów znajdują się na powierzchni cząsteczki.

Frakcja α -lipoproteidowa stanowi około 3% białek surowicy (200 mg%). Ciężar cząsteczkowy lipoproteidów tej frakcji wynosi od 165 000 do 400 000. Około 45% masy cząsteczki jest natury białkowej, a 55% lipidowej z przewagą fosfolipidów nad cholesterolem. Z pomiarów rozproszenia światła i wiskozymetrycznych wynika, że cząsteczki α -lipoproteidów mają kształt elipsoidalny o wymiarach 300×50 Å. β -Lipo-

proteidy stanowią ponad 5% białek surowicy (400 mg%). Ich ciężar cząsteczkowy zawiera się w granicach $1,3-3,2 \times 10^6$. Część białkowa stanowi 13% masy cząsteczki, a część lipidowa 87% z przewagą cholesterolu nad fosfolipidami. Pomiary rozproszenia światła wskazują na prawie kulisty kształt cząsteczki o wymiarach $350 \times 150 \text{ \AA}$.

Zawartość chylomikronów w surowicy krwi jest zmienna. Najwyższe wartości osiąga przejściowo po obfitych posiłkach tłuszczowych. Chylomikrony zbudowane są głównie z tłuszczów (99%) z przewagą trójglicerydów (88%). Tylko 1% masy cząsteczki przypada na białko. Cząsteczki chylomikronów posiadają kształt kulisty.

Wiele danych wskazuje na możliwość wzajemnej przemiany cząsteczek lipoproteidów, czemu towarzyszy zmiana ich gęstości (32, 139, 163, 191).

II. Niektóre zagadnienia biochemii hemostazy

Hemostaza jest zespołem mechanizmów utrzymujących w warunkach fizjologicznych krew krążącą w stanie płynnym oraz prowadzących do zatrzymania krwawienia po przerwaniu ciągłości ściany naczynia krwionośnego. W hemostazie odgrywają rolę trzy podstawowe elementy: naczynia krwionośne, płytki krwi i osoczowe składniki krzepnięcia i fibrynolizy.

Ostatnio omówiono szczegółowo w wielu pracach poglądowych biochemię i fizjologię płytek krwi (7, 103, 119, 123, 155, 161), krzepnięcia krwi (48, 140) i układu fibrynolitycznego (97, 101, 156, 165, 195). W związku z powyższym ograniczymy się jedynie do podania ogólnego schematu hemostazy podkreślając te zagadnienia, które mogą mieć powiązania z lipoproteidami. Wydaje się bowiem, że lipoproteidy mogą przyspieszać lub też hamować niektóre reakcje enzymatyczne w hemostazie.

1. Naczynia krwionośne

Prawidłowy stan naczyń krwionośnych jest jednym z warunków utrzymania krwi krążącej w stanie płynnym. Zmiany anatomiczne w ścianie naczyń, na przykład w miażdżycy, sprzyjają powstawaniu zakrzepów, zaś zmiany spowodowane urazem powodują lokalną aktywację krzepnięcia krwi i powstanie czopu hemostatycznego tamującego krwawienie. Z uszkodzonej ściany naczynia uwalniają się tromboplastyny tkankowe aktywujące protrombinę. Następuje przyleganie płytek krwi do śródbłonna (92), błony podstawowej naczynia (186) i kolagenu (16). Uwolnione z rozpadających się płytek substancje jak serotoninina i adrenalina powodują lokalny skurcz naczyń. Ściana naczyń krwionośnych zawiera waskulokinazę, enzym zamieniający fibrynogen na fibrynę, różny od trombin (132).

2. Płytki krwi

Płytki krwi pełnią różne funkcje w hemostazie: aktywują krzepnięcie krwi przez uwolnienie tromboplastyny płytkowej, ulegają adhezji i agregacji, warunkują retrakcję skrzepu, a niektóre substancje uwolnione z płytek wywierają działanie na naczynia. Płytki krwi zawierają płytkowe czynniki krzepnięcia: 1, 2, 3, 4, (44, 45, 50, 119), trombosteninę (6, 8) antyplazminy płytkowe (91), płytkowy stabilizator włókniaka (20) i adsorbują na swej powierzchni szereg osoczowych czynników krzepnięcia (88).

Ważnym składnikiem płytek są lipidy, stanowiące 12% masy płytek (78). Odsetkowy skład lipidów płytkowych jest następujący: cholesterol — 19, fosfatydyloetanolamina — 17, fosfatydyloseryna — 6, lecytyny — 32, sfingomieliny — 13, fosfatydyloinozytol — 5, pozostałe lipidy — 8% (187).

We frakcji lipidowej płytek zawarta jest aktywność tromboplastyczna czynnika płytkowego 3 (2). Tromboplastyczne działanie tego czynnika uwarunkowane jest obecnością fosfatydyloetanolaminy. Natomiast fosfatydyloseryna hamuje krzepnięcie krwi. Silver i wsp. (178) wykazali, że kierunek działania fosfolipidów płytkowych w procesie krzepnięcia zależy od wzajemnego stosunku fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy.

Podstawową rolą płytek krwi w hemostazie jest, jak się wydaje, ich adhezja i agregacja. Adhezja polega na przyleganiu płytek do różnych powierzchni, na przykład do ściany uszkodzonego naczynia. Agregacja jest to proces wzajemnego przylegania płytek, prowadzący do utworzenia ich agregatów. Mechanizm agregacji płytek próbują tłumaczyć różne teorie, ale żadna z nich nie jest poparta dostatecznymi dowodami doświadczalnymi. Wydaje się, że do agregacji mogą doprowadzić różne czynniki powodujące zmiany na powierzchni błon komórkowych płytek. Wiadomo, że kofaktorem agregacji jest fibrynogen (37, 117). W czasie agregacji uwalnia się z płytek szereg substancji, między innymi czynnik płytkowy 3 (75, 84) i 4 (141). Substancje zwiększające adhezję płytek zwiększają również i agregację. Nie zawsze istnieje jednak korelacja między szybkością agregacji a liczbą płytek adhezywnych (168).

Do substancji wywołujących agregację należy ADP (60), trombina (56), adrenalina (129), noradrenalina (129), serotonina (129), kolagen (198), oligomery fibryny (182), rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny i fibrynogenu (104). Wykazano synergistyczne działanie ADP i trombiny na agregację płytek (142).

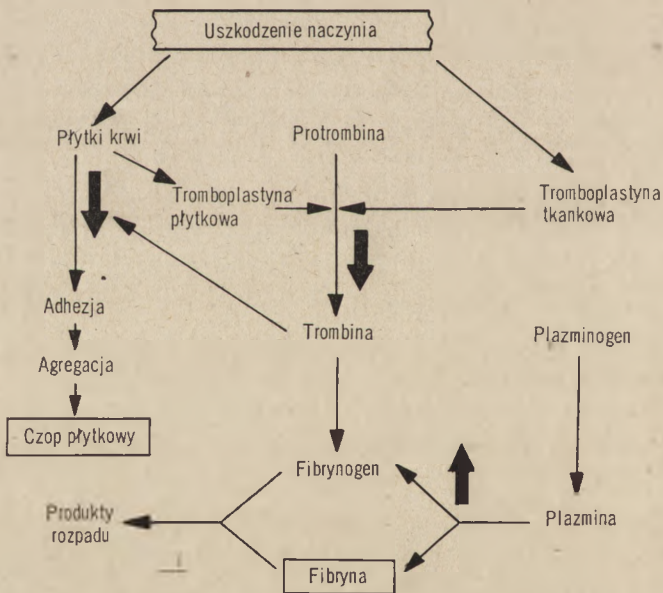
Inhibitorami agregacji są: 2-chloroadenozyna (14), adenozyna (14, 15), AMP (14, 15), cysteina (170), ester metylowy *p*-tolueno-sulfonyl-L-argininy (170), heparyna (26), hirudyna (121), produkty degradacji fibrynogenu i fibryny (102, 105, 106), fentolamina (148), imipramina (169) i butapirazol (134). Szczegółowe omówienie wpływu różnych substancji na funkcje

hemostatyczne płytek krwi znajduje się w pracy Farbiszewskiego (49).

3. Osoczowe składniki krzepnięcia i fibrynolizy

Aktywację krzepnięcia krwi tłumaczy teorię Macfarlane (116), Davie i Ratnoffa (42) oraz Seegers (172). Proces krzepnięcia krwi przebiega w czterech etapach. W pierwszym z nich następuje uwolnienie tromboplastyny płytkowej lub tkankowej. Równocześnie zachodzi adhezja i agregacja płytek. Etap drugi polega na przemianie protrombiny w trombinę pod wpływem tromboplastyny z udziałem kationu wapniowego i szeregu czynników osoczowych krzepnięcia. W trzecim etapie następuje zamiana fibrynogenu na fibrynę, stabilizacja i retrakcja skrzepu. Czwarty etap polega na proteolizie wytworzonego skrzepu przez plazminę. Na schemacie 2 przedstawiono krzepnięcie, fibrynolizę i funkcje hemostatyczne płytek krwi. Podstawowe enzymy układu krzepnięcia i fibrynolizy, trombina i plazmina, mają działanie przeciwstawne na wspólny substrat białkowy — fibrynogen. Trombina powoduje wytworzenie się skrzepu, natomiast plazmina powoduje rozpad skrzepu lub, rozkładając fibrynogen, uniemożliwia jego powstanie.

Według Astrupa (3), Copleya (30) i Jensena (90) w krwi w warunkach fizjologicznych zachodzą w sposób ciągły procesy krzep-



Schemat 2. Uproszczony schemat hemostazy z uwzględnieniem miejsca działania lipoproteidów

(↓ — aktywacja, ↑ — hamowanie)

nięcia i fibrynolizy, znajdujące się w stanie równowagi dynamicznej. W myśl tej teorii protrombina ulega ciągłej przemianie w trombinę. Trombina zamienia pewną ilość fibrynogenu w rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny i fibrynę (31, 115). Powstająca fibryna odkładana jest w postaci cienkich błon na śródbłónkach naczyń krwionośnych, stanowiąc ich fizjologiczną wyściółkę. Nadmiar odkładanego włókniaka jest rozkładany przez plazminę. Plazmina wytwarza się pod wpływem aktywatorów wydzielanych stale z tkanek do krwi krążącej. Trombina i plazmina są inaktywowane przez obecne w osoczu inhibitory. Zachwianie dynamicznego stanu równowagi krzepnięcia i fibrynolizy prowadzi do stanów patologicznych. Czynniki, które wywołują krzepnięcie lub hamują fibrynolizę prowadzą do powstania zakrzepów. Natomiast czynniki hamujące krzepnięcie lub aktywujące fibrynolizę powodują skazę krwotoczną. Teoria dynamicznego stanu równowagi krzepnięcia i fibrynolizy nie jest ostatecznie udowodniona. Dyskusję na jej temat przedstawiają Hjort i Hasselbach (81) oraz Hjort (80).

Istotną rolę w utrzymaniu dynamicznego stanu równowagi krzepnięcia i fibrynolizy odgrywiają inhibitory tych procesów. W osoczu krwi zawarte są inhibitory krzepnięcia — antytromboplastyny i antytrombiny oraz inhibitory fibrynolizy przeciwdziałające aktywacji plazminogenu i antyplazminy.

III. Wpływ lipoproteidów na niektóre funkcje hemostatyczne płytek krwi

Z doniesień literaturowych wynika, że zaburzenia przemiany tłuszczów wywierają wpływ na niektóre funkcje płytek, głównie na ich agregację i adhezję. Znany jest fakt, że wolne kwasy tłuszczowe wywołują agregację płytek krwi i zwiększają ich adhezję (76). Kerr i wsp. (94) wykazali, że nasycone kwasy tłuszczowe tym bardziej przyspieszają agregację, im dłuższy jest ich łańcuch węglowy. W czasie lipemii pokarmowej płytki wykazują zwiększone zdolności do adhezji i do agregacji (66, 135). Wykazano prostą zależność między podwyższonym poziomem glicerydów w hyperlipemii samoistnej a zwiększoną skłonnością do agregacji płytek (158, 164, 189). Większa zdolność płytek do adhezji ma miejsce także w miażdżycy (17, 64). Z badań Farbiszewskiego i wsp. (51, 52) nad wpływem frakcji lipoproteidowych surowicy krwi wynika, że β -lipoproteidy przyspieszają agregację płytek krwi pod wpływem ADP i trombiny i zwiększają zdolność płytek do adhezji. Chylomikrony w dużych stężeniach zwiększają jedynie liczbę płytek adhezywnych, a nie mają wpływu na agregację. Natomiast α -lipoproteidy nie wywierają wpływu na żaden z tych procesów.

Ostatnio wykazano (53) zmiany w składzie chemicznym β -lipoproteidów w osoczu królików znajdujących się na diecie cholesterolowej.

Zmiany te polegają na zwiększeniu procentowej zawartości lipidów w cząsteczce. β -Lipoproteidy takie powodują silniejszą agregację i adhezję niż β -lipoproteidy zwierząt hodowanych na normalnej diecie. Wydaje się, że zwiększenie zawartości lipidów w cząsteczce lipoproteidu może powodować zmiany oddziaływań sił elektrostatycznych tych cząsteczek z receptorami powierzchni płytek. Za taką hipotezą przemawia zmieniona ruchliwość elektroforetyczna β -lipoproteidów o zmodyfikowanym składzie chemicznym (53).

Mechanizm działania lipoproteidów na płytki krwi nie jest znany. Być może, lipoproteidy, podobnie jak inne obdarzone ładunkiem elektrycznym wysokocząsteczkowe substancje białkowe, mogą dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym tworzyć warstwę na powierzchni płytek. Taki płaszcz mógłby zwiększać podatność płytek na działanie czynników powodujących agregację. Możliwe jest również, że β -lipoproteidy tworzą połączenia z monomerami fibryny lub z rozpuszczalnymi kompleksami monomerów fibryny i fibrynogenu zwiększając w ten sposób ich wpływ na adhezję i agregację płytek.

Bolton i wsp. (13) wyodrębnili frakcję lipoproteidową, która zmienia ruchliwość elektroforetyczną płytek, co wskazywałoby na oddziaływanie lipoproteidów z receptorami znajdującymi się na powierzchni płytek. Przypuszczeniu takiemu przeczy jednak fakt hamowania agregacji płytek przez makroglobuliny, które także mogą opłaszczać powierzchnię płytek (167).

IV. Udział lipoproteidów w krzepnięciu krwi

Udział lipidów i lipoproteidów w krzepnięciu krwi jest znaczny. Zagadnieniu temu poświęcono prace pogładowe (118, 201). Przede wszystkim lipidowy charakter wykazują tromboplastyny płytkowe i tkankowe (2, 25), które aktywują protrombinę z udziałem kationów wapniowych i niektórych czynników osoczowych zapoczątkowując w ten sposób krzepnięcie krwi. Lipoproteidem jest także antytrombina II i III (41).

Liczne dane przemawiają za tym, że krzepliwość krwi zwiększają tłuszcze dostarczane w pokarmie oraz niektóre frakcje lipoproteidowe osocza. Fullerton i wsp. (58) wykazali zwiększoną krzepliwość krwi w czasie lipemii pokarmowej. Podobne obserwacje poczynili także inni autorzy (61, 98, 147). Lipemia pokarmowa skraca czas krzepnięcia krwi w naczyńsiłkach silikonowych (58), czas krzepnięcia osocza po rekalcynacji (98) i czas stypvenowy osocza (147) oraz przyspiesza wytwarzanie tromboplastyny (192). Na zwiększenie krzepliwości krwi wpływa przede wszystkim rodzaj spożytych tłuszczów a nie stopień lipemii (98, 135, 147). Spożycie tłuszczów nasyconych wyraźnie przyspiesza krzepnięcie, natomiast tłuszcze nienasycone w pokarmie nie wywierają wpływu lub tylko

nieznaczny (61, 135). Również *in vitro* nasycone kwasy tłuszczowe o długich łańcuchach węglowych bardziej skracają czas krzepnięcia krwi niż kwasy tłuszczowe nienasycone (29). Okazało się, że zwiększeniu zawartości β -lipoproteidów i cholesterolu w osoczu towarzyszy skrócenie czasu krzepnięcia krwi (68, 83, 107, 145, 199), podwyższony poziom α -lipoproteidów wydłuża ten czas (68, 83), zaś ilość chylomikronów nie ma wpływu (199). Omówione dotychczas wyniki wskazują, że niektóre lipidy są substancjami zwiększającymi krzepnięcie krwi. Jednakże wielu badaczy, stosując podobne układy doświadczeń nie stwierdzało żadnych zmian krzepliwości krwi lub tylko zmiany nieznaczne (144, 175, 200).

V. Lipoproteidy a fibrynoliza

Wiele dowodów świadczy o hamującym wpływie lipidów i lipoproteidów na fibrynolizę. Z badań przeprowadzonych na osobnikach należących do różnych grup rasowych (18, 43, 65, 72, 87, 126, 138, 174, 193) i u osób z niektórymi schorzeniami układu krążenia jak miażdżycy i choroba wieńcowa (10, 36, 39, 130, 133, 136, 137, 181, 184) oraz z badań wykonanych w czasie lipemii pokarmowej (9, 27, 34, 54, 61, 65, 71, 110, 127, 131) wynika, że wysokim zawartościom lipidów i lipoproteidów w osoczu towarzyszy niska aktywność fibrynolityczna i podwyższenie aktywności antyplazminowej. Stwierdzono (4, 27), że rozpuszczanie zakrzepu, wywołanego sztucznie u zwierząt doświadczalnych w czasie lipemii pokarmowej lub przebywających na diecie cholesterolowej, trwa dłużej niż u zwierząt kontrolnych. Jednak niektóre badania (85, 149, 157) przeprowadzone w podobny sposób i za pomocą podobnych metod dały wyniki odmienne. Wydaje się, że działanie lipidów i lipoproteidów na fibrynolizę jest różne. Według jednych autorów (19, 27, 59, 62, 73, 99, 100, 185) fibrynolizę mają hamować tylko tłuszcze nasycone, według innych (54) również i tłuszcze nienasycone.

Fosfatydyloinozytol i fosfatydyloseryna zwiększają aktywność plazminy i skracają czas fibrynolizy skrzepu (63, 154). Dane o wpływie lecytyn na fibrynolizę są rozbieżne (149, 154). Olejan cholesterolu prawdopodobnie hamuje fibrynolizę, natomiast wolny cholesterol, octan i stearynian cholesterolu nie mają wpływu (128). Niektórzy autorzy (4, 54, 154) donoszą o hamowaniu fibrynolizy przez chylomikrony, spostrzeżenia tego nie potwierdzają jednak inni badacze. Wyodrębnione chylomikrony (86, 179) i α -lipoproteidy (171, 179) nie hamują aktywności plazminy ani innych enzymów proteolitycznych.

Hamujący wpływ wyodrębnionych z osocza β -lipoproteidów na aktywność fibrynolityczną euglobulin i plazminę obserwowało wielu badaczy (154, 166, 179). Aktywność antyplazminową wykazuje również

frakcja Cohna III₀ zawierająca w swym składzie β -lipoproteidy (166, 173). Wzrost aktywności fibrynolitycznej osocza można także uzyskać działając na nie rozpuszczalnikami organicznymi powodującymi usunięcie lipoproteidów (73).

Antyfibrynolityczna aktywność β -lipoproteidów stanowi około 10% całkowitej aktywności antyfibrynolitycznej osocza (180). Udział tych białek w hamowaniu fibrynolizy zwiększa się w przypadku podwyższenia ich poziomu w osoczu (171, 179). Wyodrębnione β -lipoproteidy hamują także aktywność trypsyny i α -chymotrypsyny (179). Jednak (196) wysokoczyszczzone frakcje β -lipoproteidowe obniżają tylko nieznacznie aktywność plazminy i innych enzymów proteolitycznych. Przedstawionym powyżej danym przeczą prace Howell (86) i Cucuianu (38), z których wynika, że β -lipoproteidy nie wykazują działania antyplazminowego. O antyplazminowych właściwościach β -lipoproteidów dyskutowało wielu autorów (77, 86, 154, 166).

VI. Uwagi końcowe

Z dotychczasowych danych można wnosić, że lipidy i lipoproteidy biorą udział w zwiększaniu krzepliwości krwi, adhezywności i agregacji płytek oraz w obniżaniu aktywności fibrynolitycznej osocza. Najsilniejsze działanie wykazują tłuszcze nasycone, cholesterol i β -lipoproteidy. Zaburzenia w krzepnięciu krwi, funkcji płytek i fibrynolizie mogą wynikać zarówno z ilościowych zmian zawartości tych substancji w osoczu, jak i ze zmian w składzie chemicznym cząsteczki β -lipoproteidów, powstających wskutek zaburzeń przemiany lipidowej lub białkowej. Według wielu autorów zmiany te mają duże znaczenie w patogenezie choroby zakrzepowej i miażdżycy, a ich stwierdzenie — w diagnostyce tych schorzeń. Mimo intensywnych badań zagadnienia te kryją wiele niejasności, a między wynikami badań przeprowadzanych w różnych ośrodkach istnieją duże rozbieżności. Dotyczą one zarówno stwierdzania zmian w składnikach lipidowych osocza, jak i ich roli w powstawaniu zakrzepów i miażdżycy (1, 12, 95, 160). Wielu tych sprzeczności nie wyjaśniły także badania, w których używano wyodrębnionych frakcji lipidowych i lipoproteidowych. Podstawową trudnością w badaniach nad wpływem lipoproteidów jest ich nietrwałość, kompleksy lipoproteidowe ulegają bowiem zmianom lub rozpadają się już w czasie preparatyki. Dializa, ślady metali ciężkich, zamrażanie, mocznik i rozpuszczalniki organiczne powodują rozkład ich cząsteczek, przy czym szczególnie labilne są β -lipoproteidy. Z tego względu wyniki badań, w których stosowano wyodrębnione lipoproteidy są prawdopodobnie obciążone znacznym błędem i mogą nie odzwierciedlać zjawisk zachodzących w żywym ustroju.

LITERATURA

1. Aleksandrow D., Michajlik A., Miazdzyca, red. A. Biernacki i J. Szejewski, PZWL, Warszawa, 1956, str. 5.
2. Alkjaersig N., Abe T., Seegers W. H., *Am. J. Physiol.* **181**, 304 (1955).
3. Astrup T., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **2**, 347 (1958).
4. Bang N. U., Cliffton E. E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **4**, 149 (1960).
5. Barclay M., Barclay R. K., Terebus-Kekish O., Shah E. B., Skipski V. P., *Clin. Chim. Acta* **8**, 721 (1963).
6. Bettex-Galand M., Luscher E. F., *Advan. Protein Chem.* **20**, 1 (1965).
7. Bettex-Galand M., Maupin B., *Hemostase* **1**, 375 (1961).
8. Bettex-Galand M., Portzehl H., Luscher E. F., *Helv. Clin. Acta* **46**, 1595 (1963).
9. Bilimoria J. D., Drysdale J., James D. C. D., Maclagen N. F., *Lancet* **2**, 471 (1959).
10. Blatny J., Kojecky Z., Podivinsky R., Matlocha Z., Benysek L., Czechoslovak-Polish hematological Meeting, Novy Smokovec, 1966, str. 3.
11. Block R. J., Durrum E. L., Zwieg G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press Inc., New York 1958.
12. Bogdanikowa B., Murawski K., *Rozpoznawanie zmian w białkach krwi*, PZWL, Warszawa, 1968, str. 248.
13. Bolton C. H., Hampton J. R., Mitchell J. R. A., *Lancet* **2**, 1101 (1967).
14. Born G. V. R., *Nature* **202**, 95 (1964).
15. Born G. V. R., Cross M. J., *J. Physiol.* **168**, 178 (1963).
16. Bounameaux Y., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 504 (1961).
17. Breddin K., Bauke J., *Blut* **11**, 144 (1965).
18. Bronte-Stewart B., Keys A., Brock J. F., Keys M. H., *Lancet* **2**, 1103 (1955).
19. Buckell M., Elliot F. A., *Lancet* **1**, 662 (1959).
20. Buluk K., *Pol. Tyg. Lek.* **10**, 1 (1955).
21. Burstein M., Fine J. M., *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.* **9**, 1964 (1964).
22. Burstein M., Praverman A., *Rev. Med. Chir. des Mal. du Foie, de la Rate et du Pancreas*, **33**, 21, 1958.
23. Burstein M., Samaille J., *Ann. Biol. Clin.* **17**, 23 (1959).
24. Carlson L. A., *Clin. Chim. Acta* **5**, 528 (1960).
25. Chargaff E., *Advan. Enzymol.* **5**, 31 (1945).
26. Clayton S., Cross M. J., *J. Physiol.* **169**, 82P (1963).
27. Cliffton E. E., Burchell A. R., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **5**, 463 (1961).
28. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derouaux G., Gillespie S. M., Kahnt F. W., Lever W. F., Lin C., Mittelman D., Moutou R. F., Schmid K., Urana E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 465 (1950).
29. Connor W., Poole J., *Quart. J. Exptl. Physiol.* **47**, 1 (1961).
30. Copley A. L., *Lancet* **1**, 162 (1957).
31. Copley A. L., *Post. Biochem.* **14**, 343 (1968).
32. Cornwell D. G., Kruger F. A., *J. Lipid. Res.* **2**, 110 (1961).
33. Cornwell D. G., Kruger F. A., Hamwi G. J., Brown J. B., *Metab. Clin. Exptl.* **11**, 480 (1962).
34. Correl J. T., Sjoerdsma A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **111**, 274 (1962)

35. Cramer K., *Acta Med. Scand.* **171**, 413 (1962).
36. Cramer K., *Acta Med. Scand.* **174**, 421 (1963).
37. Cross M. J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 524 (1964).
38. Cucuianu M., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **16**, 687 (1966).
39. Czarniecki W., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **30**, 487 (1960).
40. Dangerfield W. C., Hurworth E., *Clin. Chim. Acta* **7**, 292 (1962).
41. Davie E. W., Ratnoff O. D., *The Proteins, Compositions, Structure and Function*, red. H. Neurath, New York 1965, t. 3, str. 359.
42. Davie W., Ratnoff O. D., *Science* **145**, 1310 (1964).
43. Dawber T. R., Kannel W. B., Revotskie N., Kagan A., *Proc. Roy. Soc. Med.* **55**, 265 (1962).
44. Deutsch E., Irsigler K., Lechner K., Schmer G., XI-th Congress of the Intern. Society of Haematology, Sydney, 1966, str. 281.
45. Deutsch E., Lechner K., *Biochemistry of Blood Platelets*, red. E. Kowalski i S. Niewiarowski, Academic Press-PWN, Londyn-Warszawa 1967, str. 23.
46. Edwards S. W., Ball E. G., *J. Biol. Chem.* **209**, 619 (1954).
47. Epstein F. M., Block W. D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **101**, 740 (1959).
48. Farbiszewski R., *Problemy Lek.* **7**, 277 (1968).
49. Farbiszewski R., *Problemy Lek.* (w druku).
50. Farbiszewski R., Niewiarowski S., Popławski A., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 397 (1966).
51. Farbiszewski R., Skrzydlewski Z., Worowski K., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **21**, 89 (1969).
52. Farbiszewski R., Worowski K., *J. Atherosclerosis Res.* **8**, 988 (1968).
53. Farbiszewski R., Worowski K., *J. Atherosclerosis Res.* **9**, 339 (1969).
54. Farquhar J. W., Merigan T. C., Sokolow M., *J. Exptl. Med.* **113**, 587 (1961).
55. Fasoli A., *Acta Med. Scand.* **145**, 233 (1953).
56. Fonio A., *Schweiz. Med. Wochschr.* **69**, 952 (1939).
57. Fridrickson D. S., Levy R. S., Lees R. S., *New Engl. J. Med.* **276**, 1 (1967).
58. Fullerton H. W., Davie W. J. A., Anastaspoulos G., *Brit. Med. J.* **11**, 250 (1953).
59. Furuta S., *Japan. Circulation J.* **26**, 169 (1952).
60. Gaarder A., Jonsen J., Laland S., Hellem A., Owren P. A., *Nature* **192**, 531 (1961).
61. Gajewski J., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **29**, 5 (1959).
62. Gajewski J., *J. Atherosclerosis Res.* **1**, 222 (1961).
63. Gerbeck C., Koppel J. L., Olwin J. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **7**, 16 (1962).
64. Gibiński K., Walendowska J., Zagórnik J., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **34**, 1306 (1965).
65. Gillman T., Naidoo S. S., Hathorn S., *Lancet* **2**, 696 (1957).
66. Goccheri S., D'Antouno G., Alessandri M., Garcja Conde-Bru J., *Hemostase* **6**, 339 (1966).
67. Gofman J. W., Lindgren F. T., Elliot H., *J. Biol. Chem.* **179**, 973 (1949).
68. Goldrick R., Whyte M., *Nature* **182**, 1743 (1958).
69. Gotto A. M., Levy R. J., Rosenthal A. S., Bimbaumer M. E., Fredrickson D. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 699 (1968).

70. Grando J. L., Scanu A., *Federation Proc.* **24**, 224 (1965).
71. Greig H. B. W., *Lancet* **2**, 16 (1956).
72. Greig H. B. W., Cornelius E. M., *Brit. J. Exptl. Path.* **42**, 568 (1961).
73. Greig H. B. W., Runde I. A., *Lancet* **2**, 461 (1957).
74. Gustafson A., *J. Lipid. Res.* **6**, 512 (1965).
75. Hardisty R. M., Hutton R. A., *Brit. J. Haematol.* **11**, 258 (1965).
76. Haslam R. J., *Nature* **202**, 765 (1964).
77. Hathorn M., Gillman T., Campbell G. D., *Lancet* **1**, 1314 (1961).
78. Haurowitz F., Sladek J., *Z. Physiol. Chem.* **173**, 233 (1928).
79. Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H., *J. Clin. Invest.* **34**, 1345 (1955).
80. Hjort P. F., Diffuse Intravascular Clotting. F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1966, str. 15.
81. Hjort P. F., Hasselbach R., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 580 (1961).
82. Hjerten A., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 216 (1959).
83. Hołobut W., Kollątaj A., Strobiel T., *Post. Hig. Med. Dośw.* **18**, 657 (1964).
84. Horowitz H. I., Papayoanou M. F., *J. Lab. Clin. Med.* **69**, 1003 (1967).
85. Hougie C., Ayers F., *Lancet* **1**, 186 (1960).
86. Howell M., *Brit. Med. Bull.* **20**, 200 (1964).
87. Howell M., *J. Atherosclerosis Res.* **5**, 80 (1965).
88. Iatridis P. G., Ferguson J. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**, 114 (1965).
89. Jencks W. P., Hyatt M. R., Jetton M. R., Mattingly T. W., Durrum E. L., *J. Clin. Invest.* **35**, 980 (1956).
90. Jensen H., *Exptl. Med. Surg.* **14**, 189 (1956).
91. Johnson S. A., Smathers W. M., Schneider C. L., *Am. J. Physiol.* **170**, 631 (1952).
92. Jorgensen L., Borchgrevink C. F., *Acta Path. Microb. Scand.* **57**, 427 (1963).
93. Kellen J., *Z. Ges. Inn. Med.* **16**, 812 (1962).
94. Kerr J. W., Pirrie R., MacAulay I., Bronte Stewart B., *Lancet* **2**, 1296 (1965).
95. Keys A., *Bull. J. Hopkins Hosp.* **88**, 473 (1951).
96. Kielley W. W., Meyerhof O., *J. Biol. Chem.* **183**, 391 (1950).
97. Kline D. L., *Federation Proc.* **25**, 31 (1966).
98. Kommerel B., *Helv. Med. Acta* **30**, 177 (1963).
99. Kommerell B., Berger H. D., *Klin. Wochschr.* **37**, 1029 (1959).
100. Konttinen Y., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **14**, 87 (1961).
101. Kopeć M., Fibrynoliza utajona i jej znaczenie w patologii i klinice, PWN, Warszawa 1963.
102. Kopeć M., Budzyński A., Stachurska J., Węgrzynowicz Z., Kowalski E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 476 (1966).
103. Kopeć M., Kowalski E., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **37**, 482 (1966).
104. Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Budzyński A., Latało Z., Lipiński B., Kowalski E., *Exp. Biol. Med.* **3**, 73 (1968).
105. Kowalski E., Budzyński A., Kopeć M., Latało Z., Lipiński B., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 69 (1964).
106. Kowalski E., Kopeć M., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 406 (1954).
107. Król W., Konturek S., *Pol. Med. J.* **2**, 355 (1956).

108. Kunkel H. G., Slater R. J., *J. Clin. Invest.* **31**, 677 (1952).
109. Kunkel H. G., Trautman K., *J. Clin. Invest.* **35**, 641 (1956).
110. Kwaan H. C., MacFadzean A. J. S., *Nature* **179**, 260 (1957).
111. deLalla O. F., Gofman J. W., *Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoproteins. Methods of Biochemical Analysis.* red. w D. Glick, Interscience, 1954, str. 459.
112. Lawrence S. M., Shean F. C., *Science* **137**, 227 (1962).
113. Levy R. I., Fridrickson D. S., *J. Clin. Invest.* **44**, 426 (1965).
114. Lingrem F. T., Nichols A. V., *The Plasma Proteins*, red. F. W. Putnam, Academic Press, New York-Londyn 1960, t. 2, str. 1.
115. Lipiński B., *Post. Biochem.* **14**, 373 (1968).
116. Macfarlane R. G., *Nature* **202**, 498 (1964).
117. McLean J. R., Maxwell R. E., Hertler D., *Nature* **202**, 605 (1964).
118. Marcus A. J., *Advan. Lipid Res.* **4**, 1 (1966).
119. Marcus A. J., Zucker M. B., *The Physiology of Blood Platelets.* Grune and Stratton, New York-Londyn 1965.
120. Margolis S., Langdon R. G., *J. Biol. Chem.* **24**, 469 (1966).
121. Markwardt F., *Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus Blutsaugenden Tieren*, VEB Gustaw Fischer Verlag, Jena 1963.
122. Marschall W. W., Kummerow F. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 271 (1962).
123. Maupin B., *Hemostase* **1**, 29 (1961).
124. Maw W., *Science* **118**, 86 (1953).
125. Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Miażdżycza*, red. A. Biernacki i J. Szajewski, PZWL, Warszawa 1960, str. 78.
126. Merskey C., Gordon H., Lackner H., *Brit. Med. J.* **1**, 219 (1960).
127. Merskey C., Wohl H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 295 (1964).
128. Mitchell J. R. A., Bries S. M., *Lancet* **2**, 435 (1959).
129. Mitchell J. R. A., Sharp A. A., *Brit. J. Haematol.* **10**, 78 (1964).
130. Moga A., Baciú I., Pitea P., Cucucianu M., Suciú A., *Stud. Cecet. Med. Cluj* **11**, 97 (1960).
131. Moser K. M., Hajjar G. C., *Am. J. Med. Sci.* **251**, 536 (1966).
132. Murray M., Chadwick M., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 338 (1962).
133. Musiatowicz J., Skrzydlewski Z., Obrzut A., *Pol. Tyg. Lek.* **22**, 1760 (1967).
134. Mustard J. F., Glynn M. F., Murphy E. A., Packham M. A., Nishizawa E., Hirsh J., Hovig T., Jorgenson L., *Biochemistry of Blood Platelets*, red. E. Kowalski i S. Niewiarowski, Academic Press-PWN, Londyn-Warszawa 1967, str. 133.
135. Mustard J., Murphy E., *Brit. Med. J.* **16**, 51 (1962).
136. Myasnikow A., Chazow E., *Am. Heart J.* **67**, 18 (1964).
137. Naimi S., Goldstein R., Proger Š., *Circulation* **27**, 904 (1963).
138. Nestel P. J., *Circulation* **21**, 522 (1960).
139. Nichols A. V., Smith L., *J. Lipid Res.* **6**, 206 (1965).
140. Niewiarowski S., *Post. Biochem.* **14**, 349 (1968).
141. Niewiarowski S., Lipiński B., Farbiszewski R., Popławski A., *Experientia* **24**, 343 (1968).
142. Niewiarowski S., Thomas D., *Nature* **212**, 1544 (1966).
143. Nikkila E., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5**, (suppl. 8) (1958).
144. Nitzberg S., *Bull. Tufts New Engl. Med. Cent.* **4**, 13 (1958).
145. Nordoy A., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 244 (1965).
146. Nys A., Vandeenbroucke J., *Acta Gastroent. Belg.* **19**, 142 (1956).

147. O'Brien J., *Lancet* 2, 232 (1956).
148. O'Brien J. R., *Nature* 200, 763 (1963).
149. Ogston D., Fullerton H. W., *Brit. Med. J.* 2, 1288 (1962).
150. Olson R. E., Vester J., *Physiol. Rev.* 40, 677 (1960).
151. Oncley J. L., Walton K. W., Cornwell D. G., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4666 (1957).
152. Ott H., Roth E., *Klin. Wochschr.* 32, 1099 (1954).
153. Owen J. A., *Advan. Clin. Chem.* 1, 237 (1958).
154. Pappemhagen A. R., Koppal J. L., Olin J. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 9, 164 (1963).
155. Pazdur J., *Post. Hig. Med. Dośw.* 20, 173 (1966).
156. Pechet L., *New Engl. J. Med.* 273, 966 i 1024 (1965).
157. Peyman M. A., Nitzberg S. I., Goldstein R., Nothman M., Proger S., *Am. J. Med.* 28, 884 (1960).
158. Philip R. B., Wright H. P., *Lancet* 2, 208 (1965).
159. Phillips G. B., *J. Clin. Invest.* 39, 1639 (1960).
160. Polanowski M., Boulanger P., Macheboeuf M., Roche J., *Biochimie Medicale*, Paryż 1961, t. 3, str. 777.
161. Popławski A., *Post. Biochem.* 11, 47 (1965).
162. Price F. T., Gofman J. W., *Circulation* 4, 25 (1951).
163. Rehnberg C. S., Nichols A. V., *Biochim. Biophys. Acta* 84, 595 (1964).
164. Renzenbrink J., Holzknecht F., Braunsteiner H., *Acta Haematol.* (Basel) 38, 95 (1967).
165. Rickli E. E., *Aniologica* (Basel) 5, 66 (1968).
166. Riding I. M., Ellis D., *J. Atherosclerosis Res.* 4, 189 (1964).
167. Rosenberg M. C., Dintenfass L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 14, 202 (1965).
168. Rosenberg M. C., Stormorken H., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 19, 82 (1967).
169. Rysanek K., Svehla C., Spankova H., Mjemkova M., *Experientia* 22, 320 (1966).
170. Salzman E. W., Chambers D. A., *Nature* 204, 698 (1964).
171. Sarkar N., *Nature* 189, 929 (1961).
172. Seegers W. H., *Federation Proc.* 23, 749 (1964).
173. Shamash Y., Rimon A., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 12, 119 (1964).
174. Shaper A. G., Jones K. W., Kyobe J., Jones M., *J. Atherosclerosis Res.* 6, 313 (1966).
175. Sheehy T., Richelbelger J., *Circulation* 17, 927 (1958).
176. Shore B., *Arch. Biochem.* 71, 1 (1957).
177. Shore V., Shore B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9, 455 (1962).
178. Silver M. J., Turner D. L., Rodalewicz I., Giordano N., Holburu R., Herb S. F., Luddy F. E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 10, 164 (1963).
179. Skrzydlewski Z., Niewiarowski S., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 17, 482 (1967).
180. Skrzydlewski Z., Niewiarowski S., Skrzydewska J., *J. Atherosclerosis Res.* 6, 273 (1966).
181. Sobański A., *Pol. Tyg. Lek.* 12, 1144 (1957).
182. Solum N. O., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18, 577 (1966).
183. Swahn B. A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 4, 98 (1952).
184. Szczeklik E., Janiakowa A., Orłowski M., *Pol. Tyg. Lek.* 14, 417 (1959).

185. Tillman R. L., O'Ned R. M., Thomas W. A., Hixon B. B., *Circulation Res.* **8**, 423 (1960).
186. Trauzer J. P., Baumgartner H. R., Studer A., *Exptl. Biol. Med.* **3**, 80 (1968).
187. Troup S. B., Reed C. F., Marinetti G. V., Swisher S. N., Henry Ford Hospital Intern. Symp. Blood Platelets, red. S.A. Johnson, W. R. Monto, J. W. Rebeck, R. C. Horn, Boston 1960, str. 265.
188. Uriel J., *Ann. Inst. Pasteur* **101**, 104 (1961).
189. Vainer H., Caen J., *Nouvelle Rev. Franc. Hematol.* **3**, 149 (1963).
190. Van Creveld S., Paulssen M. M. P., *Lancet* **2**, 242 (1951).
191. Vandenheuvel F. A., *Can J. Biochem. Physiol.* **179**, 1299 (1962).
192. Vavrick N., *Lancet* **1**, 241 (1963).
193. Walker A. R. P., Arvidsson U. B., *J. Clin. Invest.* **33**, 1358 (1954).
194. Wehr H., *Post. Biochem.* **12**, 383 (1966).
195. Wołosowicz N., Jaroszewicz L., Niewiarowski S., *Post. Biochem.* **14**, 3 (1968).
196. Worowski K., Niewiarowski S., Skrzydlewska Z., Farbiszewski R., *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.* **15**, 733 (1967).
197. Zollner N., Wolfram G., Amin G., *Klin. Wochschr.* **40**, 273 (1962).
198. Zucker M. B., Borrelli J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **109**, 779 (1962).
199. Żoła-Ślęczek E., *Pol. Tyg. Lek.* **21**, 321 (1966).
200. Żoła-Ślęczek E., *Pol. Tyg. Lek.* **21** 429 (1966).
201. Żoła-Ślęczek E., *Pol. Tyg. Lek.* **23**, 197 (1968).

GRAŻYNA MUSZYŃSKA *

Jony w katalizie enzymatycznej

Ions in the Enzymatic Catalysis

Some factors determining the affinity of enzymes to the metal ions were described, and hypothetical models of enzyme-metal-substrate interreactions were discussed. An effort was made to elucidate the mechanism of the reaction.

Funkcje wielu metali, wykrytych w różnych organizmach, nie są jeszcze wyjaśnione. Nie wiadomo na przykład, w jaki sposób i dlaczego widłaki gromadzą złoto, mrówki — mangan, a w ciele szklistym oka ludzkiego gromadzi się bar (45). Działanie jonów metali jest różnorakie (45). Działają one stabilizująco na struktury cząsteczek. Zmieniając swą wartośćowości, metale zapoczątkowują reakcje łańcuchowe z udziałem wolnych rodników. Jony metali są także aktywatorami i warunkują różnorodne efekty polaryzacyjne, powodując rozluźnienie siatki elektronowej oraz obniżenie bariery aktywacyjnej. Ponadto metale tworzą „jednostki katalityczne” o nowych jakościowo funkcjach, które różnią się znacznie od działania jonu swobodnego. Do tej grupy zaliczyć można kompleksy typu metaloenzymów. Jony metali mogą tworzyć związki o ściśle określonym działaniu. Można do nich zaliczyć związki kompleksowe, na przykład katalazę, peroksydazę i inne enzymy hemowe. Jon metalu jest specyficzny dla danej jednostki katalitycznej i nie jest możliwa jego zamiana na inny jon. Właściwości tego typu związków kompleksowych są dobrze poznane.

Znacznie mniej poznana jest rola metalu jako aktywatora. Określony jon metalu może być zwykle zastąpiony innym metalem: oksydazę o-dwufenolową aktywują jony Fe^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} ; aminopeptydazę leucynową — Mn^{2+} i Mg^{2+} ; arginazę — Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Fe^{2+} , natomiast karboksypeptydazę — Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} i Cu^{2+} . Ze zjawiskiem małej specyficzności działania jonów metali jako aktywatorów związane jest prawdopodobnie nadmierne gromadzenie w organizmach żywych pewnych jonów w przypadkach niedoboru innych jonów metali. H e w i t t (18) zaobserwował, że w komórkach roślinnych możliwe

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

jest całkowite lub częściowe zastąpienie wapnia przez stront, molibdenu przez wolfram lub wanad, zaś potasu przez rubid.

Dwyer (12) wymienia następujące funkcje, jakie jon metalu może spełniać w katalizie enzymatycznej:

tworzenie kompleksu z donatorem atomów, enzymem lub substratem, co zwiększa powinowactwo w kierunku określonej reakcji;

tworzenie mostku pomiędzy enzymem a substratem;

aktywowanie chemiczne;

orientowanie pewnych grup podczas reakcji.

W celu zrozumienia roli jonu metalu, należy zbadać czy tworzy on kompleks z białkami, które z grup czynnych cząsteczki białka łączą się z jonami metalu i które z połączeń metal-białko biorą udział w katalizie enzymatycznej.

Na enzymy najsilniej działają dwuwartościowe jony metali, tworzące czworo- i ośmiościenne struktury, posiadające określoną siłę polaryzacji względem ligandów. Orgel (46), omawiając udział metali w systemach biologicznych, stwierdza, że Mn^{2+} i Mg^{2+} tworzą struktury ośmiościenne w większości przypadków, natomiast Ca^{2+} tylko w pewnych układach. Jony Mn^{2+} , Mg^{2+} i Ca^{2+} wykazują zbliżone powinowactwo i stechiometrię. Jon cynku tworzy zwykle struktury ośmiościenne (wyjątkiem są połączenia z innymi metalami, gdzie występuje w strukturach czworosściennych).

Jedną z ważniejszych cech, warunkującą udział danego jonu w katalizie enzymatycznej, jest trwałość tworzonych kompleksów. Cecha ta wyrażona jest przez stałą równowagi kompleksu K (tablica 1).

Kompleksy jonów Pd^{2+} i Cu^{2+} , posiadających charakterystyczny układ elektronów na zewnętrznej powłoce, wykazują najwyższe stałe równowagi K (36, 37). Tego typu kompleksy mają niewielkie znaczenie w ka-

Tablica 1

Stałe równowagi dla kompleksu metal-aldehyd salicylowy (K_{sal}) oraz metal-etylenodwuamina (K_{en}) (według 37)

Kation	$\log K_{sal}$	$\log K_{en}$
Pd^{2+}	14,8	26,9
Cu^{2+}	13,3	19,6
Ni^{2+}	9,2	18,6
Co^{2+}	8,3	13,8
Zn^{2+}	8,1	12,9
Cd^{2+}	7,8	12,3
Fe^{2+}	7,6	9,5
Mn^{2+}	6,8	5,7
Mg^{2+}	6,5	—

talizie enzymatycznej, co świadczyć może o odwrotnej zależności między zdolnością metali do chelatowania a ich udziałem w reakcjach enzymatycznych. Jony Mn^{2+} i Mg^{2+} , tworzące kompleksy o najniższych stałych równowagi są najbardziej powszechnymi aktywatorami enzymów (29). Ich połączenia metal-enzym lub metal-substrat są nietrwałe, co umożliwia zmianę konfiguracji cząsteczek enzymu i substratu podczas katalizy enzymatycznej.

Rosenberg (53) badając działanie jonów metali na aktywność karnozynazy (hydrolaza aminoacylo-L-histydyny EC. 3.4.3.3.) stwierdził, że tendencja do zwiększania aktywności enzymu (zmniejszania jego inhibicji) związana jest z wartością stałej równowagi kompleksu. Wykazano także (27) zależność między stałą równowagi i liczbą koordynacyjną a hamowaniem karbamoiltransferazy asparaginianowej (karbamoiltransferaza karbamoilofosforan: L-asparaginian EC. 2.1.3.2) przez metale. Jony metali (z wyjątkiem miedzi), mające wysokie liczby koordynacyjne i tworzące najbardziej stabilne kompleksy o dużych stałych równowagi, najbardziej zmniejszają szybkość reakcji (tablica 2). Hamowanie przez jony metali może być całkowicie zniesione nadmiarem asparaginianu. Kleppe i Spaeren (27) przypuszczają, że hamujące działanie jonów metali polega na tworzeniu kompleksu z substratem. Jon metalu może być połączony z ujemnie naładowaną grupą karboksylową i niezjonizowaną grupą aminową asparaginianu (17). W tym przypadku aktywność enzymu

Tablica 2

Hamowanie karbamoiltransferazy asparaginianowej przez nieorganiczne kationy (według 27)

Kation	log K	% hamowania	
		natywny enzym	podjednostki enzymu
Li^+	•	0	0
Na^+		0	0
K^+		0	0
NH_4^+		0	0
Mg^{2+}	2,3	13	0
Ca^{2+}		16	0
Sr^{2+}		9	0
Mn^{2+}	4,0	20	0
Cu^{2+}	15,7	65	45
Zn^{2+}	10,4	55	23
Cd^{2+}		76	16
Co^{2+}	10,7	77	28
Ni^{2+}	12,7	81	32

K — stała równowagi dla kompleksów kation-asparaginian

może być pośrednio regulowana rodzajem i stężeniem jonu metalu, który łącząc się z substratem uniemożliwia jego rozkład.

Poszczególne kationy biorą udział w specyficznym dla danego jonu typie katalizy. *V a l l e e* (71) uważa, że jony magnezowe odgrywają rolę w aktywacji tych enzymów, które działają na ufosforylowany substrat, ponieważ jony Mg^{2+} silnie kompleksują z tlenem. W tym przypadku możliwa jest interakcja między metalem a tlenem grupy fosforanowej substratu (12).

Ponieważ jony Ca^{2+} podobnie jak jony Mg^{2+} silnie kompleksują z tlenem, teoretycznie możliwe jest współzawodnictwo między tymi jonami. Na przykład wyodrębniona z drożdży fosfataza (fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych EC. 3.1.3.1), jest aktywowana przez Mg^{2+} , a hamowana kompetycyjnie przez Ca^{2+} (71). Jony Ca^{2+} i Mn^{2+} aktywują dehydrogenazę glutaminianową (oksydoreduktaza L-glutaminian: NAD EC. 1.4.1.2), otrzymaną z jednokomórkowych form *Bacillus emersonii* (31). Według *K l o t z a* (28), jony wapnia nie są specyficznymi aktywatorami reakcji enzymatycznych, ponieważ tworzą rozpuszczalne kompleksy z małymi cząsteczkami związków organicznych, posiadają małe powinowactwo do białek, a duże do kwasów organicznych i innych wysokocząsteczkowych związków o specyficznym właściwościach elektrostatycznych.

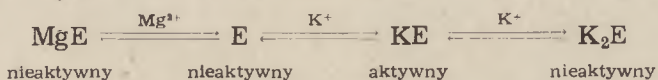
Jony Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} łatwo koordynują z parą elektronów atomów azotu (12), dlatego też są powszechnie znane jako aktywatory peptydaz. Najbardziej charakterystyczna jest aktywacja hydrolaz w obecności Mn^{2+} i rola Zn^{2+} w metaloenzymach, co zostanie omówione szczegółowo w dalszej części artykułu.

Jony Cu^{2+} są słabymi aktywatorami i mogą działać jako inhibitory. *D w y e r* (12) podaje, że Cu^{2+} w małych stężeniach jest aktywatorem dekarboksylazy szczawianowej (karboksyliaza szczawianu EC. 4.1.1.2) a w wyższych jej inhibitorem. *K l o t z* (29) wykazał, że Cu^{2+} w $pH < 7$ łączy się z białkiem poprzez tlen grup karboksylowych, natomiast w $pH > 7$ poprzez grupy aminowe. Ponadto stwierdzono, że Cu^{2+} może być przyłączony do rybonukleazy z trzustki wołu poprzez conajmniej dwie grupy ligandów (54).

Metale posiadają określoną zdolność do łączenia się z pewnymi białkami. Na przykład konalbumina (stanowiąca 16% frakcji białkowej jaja kurzego), podobnie jak białka hemowe, wykazuje malejące powinowactwo do Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (75). Spostrzeżenie to jest interesujące w powiązaniu z faktem, że analogiczne jest powinowactwo wyżej wymienionych metali do grup hydroksylowych. Doświadczenia *W a r n e r a* i *W e b e r a* (75) wykazały, że miejscem przyczepienia jonów Fe^{3+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} do białka jest fenolowy jon tyrozyny.

I. Kationy jednowartościowe

W 1965 roku Melchior (35) stwierdził, że Mg-ADP jest specyficznym substratem dla kinazy pirogronianowej (fosfotransferaza ATP: pirogronian EC. 2.7.1.40), zaś potas pełni funkcję aktywatora tego enzymu. Jony NH_4^+ i Rb^+ mogą zastępować K^+ w aktywacji enzymu, natomiast jon sodu nie wykazuje tego działania. Możliwe jest istnienie dwu miejsc przyłączania kationów w centrum aktywnym enzymu. Jeśli jedno miejsce jest zajęte przez K^+ , to enzym jest aktywny, natomiast gdy oba miejsca są zajęte przez dwa jony potasu lub przez jon magnezu, to enzym jest mniej lub nieaktywny.



MacLeod i Snell (32, 33) wykazali, że wzrost *Streptococcus faecalis* może się odbywać jedynie w obecności jonów K^+ i Rb^+ , natomiast jony Na^+ i Cs^+ są antagonistami wzrostu. Autorzy ci postulują powstawanie aktywnego kompleksu enzym-metal w obecności potasu i rubidu, oraz nieaktywnego w obecności sodu i cezu.

ATP-aza (fosfohydrolaza ATP EC. 3.6.1.3) z mięśni szkieletowych królika jest aktywowana przez Ca^{2+} i Mg^{2+} w pH 7,6—7,8, a przez Na^+ i K^+ w pH 8,5 (13). Preparat tego enzymu hydrolizuje karbamoilofosforan przy współdziałaniu jonów K^+ (5,80). Jony potasu mogą być zastępowane innymi jednowartościowymi jonami metali, jak Rb^+ , Cs^+ , Li^- , a także NH_4^+ , ale nie jonami sodu (5). Yoshida i wsp. (80) wykazali duże podobieństwo między aktywnością ATP-azy zależnej od Na^+ i K^+ i fosfatazy aktywowanej jonami potasu. Autorzy ci przypuszczają, że hydroliza ATP i karbamoilofosforanu może być spowodowana przez tę samą cząsteczkę enzymu lub przez część kompleksu enzymatycznego.

Potas działa hamująco na acetylocholinoesterazę (hydrolaza acetylocholino EC. 3.1.1.7) a wzmacnia aktywność acetylotransferazy cholinowej (O-acetylotransferaza acetyloCoA:cholina EC. 2.3.1.6). W tym przypadku jony metalu odgrywają rolę w regulacji przemian, bowiem działanie K^+ jest przeciwstawne w reakcji anabolicznej i katabolicznej.

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (oksydoreduktaza D-glukozy-6-fosforan:NADP EC. 1.1.1.49) z erytrocytów ludzkich jest tetramerem o ciężarze cząsteczkowym 210 000 (8). Enzym ten jest aktywowany jonami Mg^{2+} i Ca^{2+} jak również jonami jednowartościowymi. Aktywację enzymu powodują następujące sole: NH_4Cl , Tris-Cl , MgCl_2 , NaCl i KCl (7).

Syntetaza formylotetrahydrofolianowa (ligaza mrówczan:tetrahydrofolian EC. 6.3.4.1) z *Clostridium cylindrosporium* jest enzymem nietrwałym. Welch i wsp. (76) stwierdzili, że enzym ten jest aktywowany jonami amonowymi, a w stanie równowagi istnieją dwie formy enzymu: jedna o niższej K_m w obecności NH_4^+ i druga o wyższej K_m w nieobecności

NH_4^+ dla tego samego substratu. Wynika z tego, że jony amonowe zwiększają powinowactwo enzymu do substratu.

Działanie hamujące jonów srebra na α -amylazę wykrył Myrbäck (43). Wyjaśnił on to zjawisko współzawodnictwem jonów srebra z jonami wodorowymi, gdyż Ag^+ łączy się z grupami karboksylowymi enzymu, tworząc słabo dysocjującą sól.

$$\frac{[\text{Ag}^+][\text{E}^-]}{\text{AgE}} = K_{\text{AgE}} = 10^{-7,4}$$

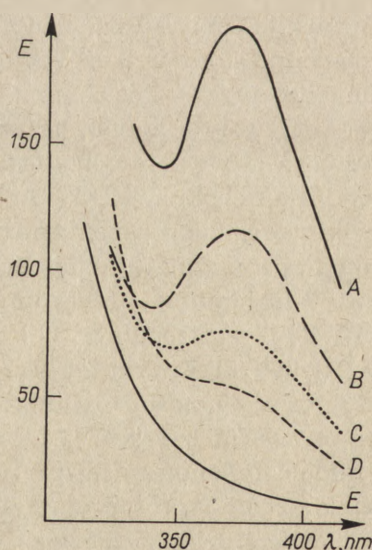
Inaktywacja α -amylazy była niezależna od stężenia substratu i odwracalna dodatkiem H_2S .

Rola jonów jednowartościowych w katalizie enzymatycznej prawdopodobnie polega jedynie na zmianie dysocjacji białka, gdyż nie są one zdolne do tworzenia kompleksów z białkiem ani też z substratem reakcji enzymatycznej (28).

II. Kationy dwuwartościowe

Według Klotza (29), wolne aminokwasy tworzą kompleksy z jonami dwuwartościowymi poprzez wiązanie koordynacyjne z grupą aminową i karboksylową. Jednak powinowactwo metali do białek jest silniejsze aniżeli metali do aminokwasów.

Przyłączenie jonu metalu do białka może zmieniać konfigurację białka. Widmo kompleksu Cu^{2+} -albumina w pewnych warunkach ma szczyt



Rys. 1. Wpływ jonów metali na widma absorpcji kompleksu Cu-albumina
 A = 0,003 M Cu^{2+} ; B = 0,003 M Zn^{2+} ; C = 0,003 M Cd^{2+} ; D = 0,003 M Pb^{2+} ; E = 0,0003 M Hg^{2+} (30)

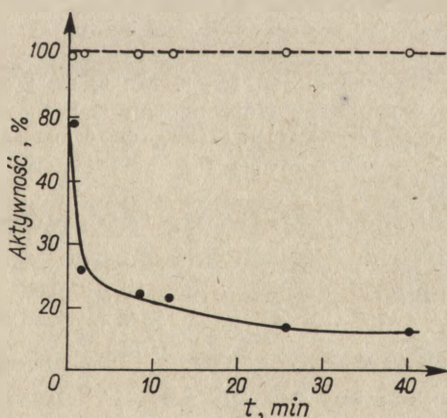
absorpcji przy 375,0 nm (rysunek 1), który zanika po dodaniu ekwimolarnej ilości jonów Hg^{2+} . Benesch i Benesch (3, 4) wykazali, że z jonami rtęci reaguje jedna grupa $-SH$ albuminy i dlatego jon Cu^{2+} jest wypierany z połączeń metal-białko, co powoduje zanik absorpcji przy 375,0 nm.

Wiązanie metalu z białkiem zależy również od stężenia jonów wodorowych. Ładunek elektrostatyczny większości białek waha się od dodatniego do ujemnego w zakresie pH 5—7. Im większy jest ładunek ujemny białka, tym więcej jonów metali może ono wiązać. Wiązanie Cu^{2+} z białkiem w pH 9,6 powoduje pojawienie się maksimum absorpcji przy 600 nm, a zatem zachodzi poprzez grupy aminowe, natomiast w niższych pH metal łączy się z grupami karboksylowymi białka, gdyż kompleks ten ma szczyt absorpcji przy 700 nm. Wykazano bowiem, że wiązanie

—C—O
 —C—O
 Cu^{2+} warunkuje powstawanie szczytu absorpcji przy 700 nm, natomiast wiązanie N... Cu^{2+} przy 600 nm (29).

Podczas łączenia się metalu z białkiem ulega zmianie rozmieszczenie ładunku w cząsteczce białka, co może powodować zmiany powinowactwa enzymu do substratu, optymalnego pH reakcji oraz krzywych dysocjacji. Gdy suma ładunków danego białka jest ujemna, może powstać dimer poprzez kation metalu.

Syntetaza glutaminowa (ligaza L-glutaminian:amoniak (ADP) EC. 6.3.1.2) z *Escherichia coli* występuje jako agregat z dwunastu identycznych podjednostek (70) i zawiera znaczne ilości jonów Mn^{2+} (78). Enzym natywny nie jest wrażliwy na denaturację 1M mocznikiem w pH 8 (79), na czynniki alkilujące i związki organiczne rtęci (58). Dodatek Mn^{2+} do

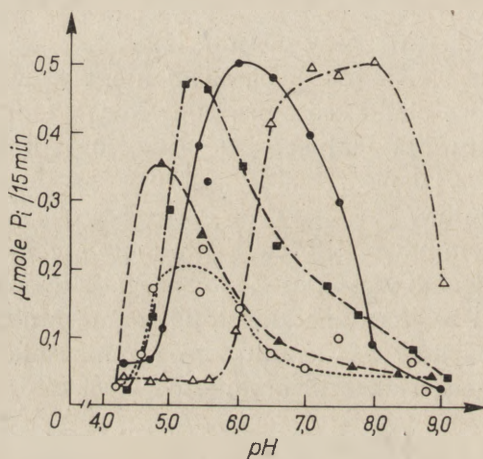


Rys. 2. Inaktywacja dwu różnych preparatów syntetazy glutaminowej przez 1% sól sodową siarczanu dodecylu (57)

○ -- ○ enzym natywny, zawierający 40 moli Mn^{2+} na mol enzymu, ● — ● enzym „wolny od jonów metalu”, zawierający 2 mole Mn^{2+} na mol enzymu

całkowicie zdysocjowanego pod wpływem 1M mocznika enzymu powoduje odtworzenie pierwotnej struktury podwójnego sześciokąta (70). Obecność jonów Mn^{2+} zwiększa trwałość enzymu; na przykład dodatek 1% soli sodowej siarczanu dodecyłu nie zmienia aktywności enzymu zawierającego 40 moli Mn /mol białka, natomiast „wolny od jonów metalu” enzym jest gwałtownie inaktywowany (57) (rysunek 2).

Shapiro i Ginsburg (57) zaobserwowali również zmiany fizykochemiczne i zmiany w widmie UV natywnej i wolnej od jonów metalu syntetazy glutaminowej. Konformacja natywnego i wolnego od jonów metalu enzymu nie wykazuje istotnych różnic (26, 70). Jednakże badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że wolny od jonów metalu enzym, poddany działaniu dwuwartościowych kationów zaczyna tworzyć wydłużone agregaty o malejącej rozpuszczalności (70). Monder (39) wykazał, że zmiana stężenia jonów metalu, jak również rodzaj użytego kationu może powodować duże różnice optimum pH (rysunek 3).



Rys. 3. Wpływ pH i zmiennych stężeń Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} i Fe^{2+} na aktywację syntetazy glutaminowej (39)

■---■ 2,5 mM Mn^{2+} ; ▲---▲ 5,0 mM Mn^{2+} ; ○---○ 5,0 mM Fe^{2+} ; ●---● 5,0 mM Co^{2+} ; △---△ 5,0 mM Mg^{2+}

Zwiększanie stężenia jonów Mn^{2+} i Mg^{2+} , jak również Co^{2+} , powoduje obniżenie optymalnych wartości pH . Zaskakujące jest, że jony Ni^{2+} nie aktywują syntetazy glutaminowej, ale w pewnych warunkach mogą hamować jej aktywność. Interpretacja tego zjawiska jest trudna, albowiem większość enzymów aktywowanych jonami kobaltu jest również aktywowana jonami niklu, które mają podobny kształt, ładunek, promień jonowy i liczbę koordynacyjną. Jony Fe^{2+} aktywują syntetazę L-glutaminy, jednak znacznie słabiej aniżeli mangan, magnez i kobalt. Jony wapniowe natomiast hamują aktywność enzymu, przy czym nie jest to hamowanie kompetycyjne względem jonów Mg^{2+} (25).

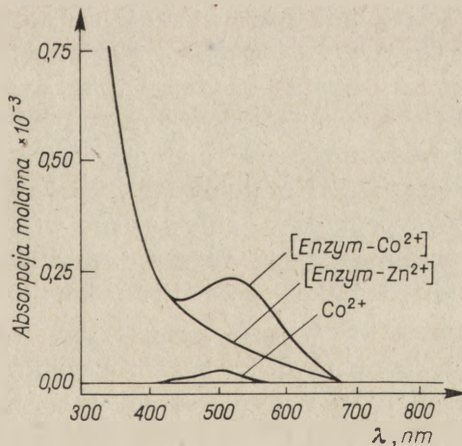
Syntetaza glutaminowa jest enzymem bardzo wrażliwym na dwuwartościowe jony metali, dlatego M o n d e r (39) uważa, że poziom aktywności tego enzymu może być regulowany rodzajem, stężeniem i rozmieszczeniem jonów metali w komórce.

III. Metale jako koenzymy

Związany koordynacyjnie metal stanowi część lub całą grupę prostetyczną enzymu. Według V a l l e e (71), metaloenzymy charakteryzują się silnym wiązaniem metal-enzym, podczas gdy w kompleksie, gdzie metal nie jest częścią składową białka natywnego, wiązanie to jest słabe.

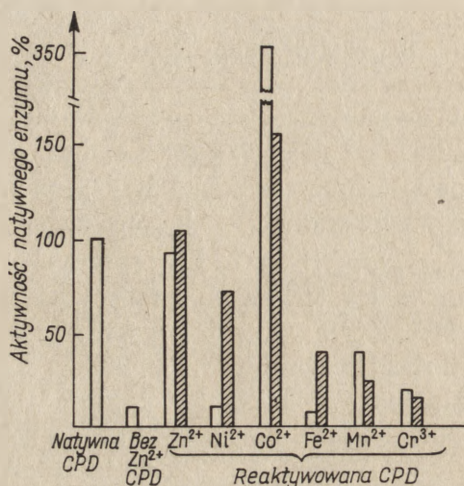
Metalokarboksypeptydaza (hydrolaza peptydylo-L-aminokwasu EC. 3.4.2.1), wyodrębniona z trzustki wołu, jest metaloenzymem o ciężarze cząsteczkowym 34 000. Enzym natywny zawiera 1 gramorównoważnik Zn^{2+} na gramcząsteczkę enzymu (67, 72, 73). V a l l e e i w s p. (74) stwierdzili, że podczas dializy w buforze wolnym od jonów metali enzym traci aktywność. Wolny od Zn^{2+} enzym, dializowany w buforze, zawierający Zn^{2+} lub Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} zostaje częściowo lub całkowicie reaktywowany.

Ekwiwalentny dodatek jonów Zn^{2+} reaktywuje w pełni enzym. Innymi aktywatorami są: Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , przy czym Zn^{2+} i Co^{2+} zajmują identyczne miejsce na powierzchni enzymu, co zostało stwierdzone za pomocą izotopów promieniotwórczych, jednak w przypadku kobaltu w widmie kompleksu występuje maksimum absorpcji przy 530 nm, którego nie ma w widmie kompleksu z Zn^{2+} (rysunek 4). Enzym aktywowany jonami kobaltu ma wyższą specyficzną aktywność peptydazową



Rys. 4. Widma absorpcji kompleksu karboksypeptydaza- Co^{2+} , karboksypeptydaza- Zn^{2+} oraz jonów Co^{2+} (10)

aniżeli aktywowany Zn^{2+} (rysunek 5). Obniżenie stężenia metalu w buforze w przypadku Co^{2+} powoduje znaczny spadek specyficznej aktywności w przeciwieństwie do Zn^{2+} , gdzie przy mniejszych stężeniach metalu aktywność enzymu pozostawała niezmienna.



Rys. 5. Reaktywacja karboksypeptydazy (CPD), wolnej od Zn^{2+} , przy pomocy jonów metali: (74)

□ aktywność peptydazowa po dializie w buforze zawierającym jony metali w stężeniu $1 : 10^{-4}$ M;
 ■ aktywność peptydazowa po następnej dializie w buforze wolnym od jonów metali

Przypuszcza się, że w centrum apoenzymu metal wiązany jest poprzez azot i siarkę. Coleman i Vallee (11) wykazali, że gdy metal przyłącza się do karboksypeptydazy, uwalniają się dwa jony H^+ , co świadczy o obecności w centrum aktywnym enzymu grup sulfhydrylowych i aminowych reszt aminokwasowych, które w pH 7 są donatorami wodoru. Porównanie stałych równowagi różnych metalokarboksypeptydaz, ich zdolności do kompleksowania i badania widma w podczerwieni wykazują, że Zn^{2+} jak i Co^{2+} mogą być związane z grupą α -aminową asparaginy (stanowiącej końcową resztę aminokwasową niektórych karboksypeptydaz) oraz z grupą $-SH$ cysteiny (72). Większa aktywność peptydazowa metalokarboksypeptydazy aktywowanej Co^{2+} w porównaniu z natywną Zn -karboksypeptydazą sugeruje możliwość tworzenia dla określonych substratów dodatkowego centrum katalitycznego (tablica 3).

Aktywność peptydazowa wzrasta prawie dwukrotnie w obecności Co^{2+} , gdy substratem jest peptyd, karbобензоксыglycylo L -fenyloalanina. Natomiast w obecności Ni^{2+} i znacznie silniej w obecności Mn^{2+} zmniejsza się aktywność peptydazowa i esterazowa. Gdy Zn^{2+} zastąpi się pierwiastkami z grupy II B: Cd^{2+} i Hg^{2+} lub przez Pb^{2+} (IV grupa), karboksypeptydaza wykazuje jedynie aktywność esterazową, natomiast nie

Tablica 3

Peptydazowa i esterazowa aktywność metalokarboksypeptydazy (według 11)

Metalokarboksy- peptydaza (CPD) 1 mol metalu na 1 mol apoenzymu	Aktywność peptydazowa ^a			Aktywność esterazowa ^b
	karbobenzoksy- glicylo-L-fenilo- alanina	karbobenzoksy- glicylo-L-tryp- tofan	benzoilo- glicylo-L-fe- nylo-alanina	hipurylo-DL-β- fenylo-mleczan
CPD-Zn ²⁺	7,5	2,8	5,5	1,15
CPD-Co ²⁺	12,0	2,7	5,2	1,10
CPD-Ni ²⁺	8,0	2,0	2,0	1,00
CPD-Mn ²⁺	0,6	0,6	0,6	0,40
CPD-Hg ²⁺	0,0	0,0	0,0	1,34
CPD-Cd ²⁺	0,0	0,0	0,0	1,75
CPD-Pb ²⁺	0,0	0,0	0,0	0,60
CPD-Cu ²⁺	0,0	0,0	0,0	0,00

^a próby inkubowano w pH 7,5, 0°C z 0,02M substratem w 0,02M buforze Na-Weronal zawierającym 0,1M NaCl^b próby inkubowano w pH 7,5 25°C z 0,01M substratem w 0,005 M buforze Tris zawierającym 0,1M NaCl
Współczynnik wariancji 4%

hydrolizuje wiązań peptydowych. Godny uwagi jest fakt, że w obecności pierwiastków grupy II metalokarboksypeptydaza wykazuje znacznie silniejsze działanie esterazy niż natywna Zn-karboksypeptydaza. Vallee i wsp. (74) stwierdzili, że 0,96 gramoatomów Cd²⁺ łączy się z jednym molem karboksypeptydazy, a Coleman i Vallee (11), że radioaktywny Cd²⁺ zajmuje to samo miejsce na powierzchni enzymu, co Zn²⁺.

Wyjaśnienie tego zaskakującego zjawiska, że nienatywne jony metali aktywują enzym znacznie silniej aniżeli natywny cynk oraz że niektóre z metali pobudzają aktywność esterazową a równocześnie całkowicie hamują aktywność proteolityczną, wymaga szerszego omówienia mechanizmu działania centrum aktywnego metalokarboksypeptydazy. Vallee (72), acylując natywną karboksypeptydazę bezwodnikami kwasów: izo-masłowego, n-masłowego oraz n-walerianowego, uzyskał zwiększenie aktywności esterazowej enzymu i znaczne zmniejszenie aktywności peptydazowej (tablica 4).

Jodowanie karboksypeptydazy powodowało 5-krotny wzrost aktywności esterazowej i zupełny zanik aktywności peptydazowej. Dołączanie reszt kwasu bursztynowego powodowało 50% zwiększenie aktywności zarówno esterazowej jak i proteolitycznej. Najwyższą aktywność esterazową przy pełnym zaniku aktywności proteolitycznej uzyskano po zastosowaniu acetylacji bezwodnikiem octowym i acetyloimidazolem, acetylację sukcylokarboksypeptydazy oraz jodowanie sukcylo-karboksypeptydazy i acetylokarboksypeptydazy.

Tablica 4

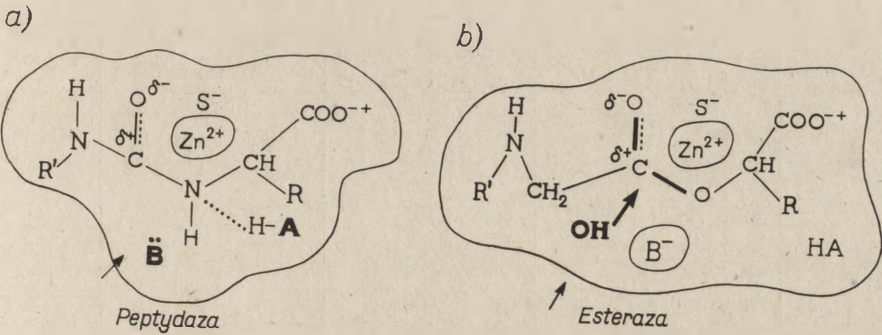
Aktywność esterazowa i peptydazowa metalokarboksypeptydazy modyfikowana jonami metali i związkami organicznymi (według 72)

Metalokarboksypeptydaza	Aktywność w %	
	Esterazowa	Peptydazowa
Natywna	100	100
Hg ²⁺	116	0
Cd ²⁺	152	0
J ⁺	500	0
Cu ²⁺	0	0
Acetyl-Hg ²⁺	0	0
Jodo-Hg ²⁺	0	0
Jodobursztynian	520	0
Jodoacetyl	530	0
Acetylobursztynian	780	0
Acetyl-Cu ²⁺	215	0
Jodo-Cu ²⁺	105	0
Acetyl A *	610	0
Acetyl I *	700	0
Bursztynian	150	154
Kwas izo-masłowy	134	83
Kwas n-walerianowy	162	80
Kwas n-masłowy	191	64
Kwas propionowy	342	49
Fotoutlenianie	198	36

* AcA i AcJ karboksypeptydaza acylowana bezwodnikiem octowym a w drugim przypadku acetylo-imidazolem

Zmiany w widmach absorpcji wskazują, że acetylacji ulegają reszty tyrozynowe w aktywnym centrum enzymu. Świadczy to, że zwiększenie aktywności esterazowej warunkuje tyrozyna acetylowana, a aktywność peptydazową — nieacetylowana. Valle e (72) zaproponował schemat działania centrum aktywnego karboksypeptydazy (schemat 1 a, b), według którego hydrolizę peptydu zapoczątkowują grupy B centrum aktywnego karboksypeptydazy jako donatory par elektronów dla węgla karbonylowych, przy czym powstaje produkt pośredni: acyloenzym. Reakcję tę może ułatwiać jon metalu, odciągając elektrony z węgla do tlenu karbonylowego. R a b i n (48) sugeruje możliwość przyłączenia cząsteczki wody między grupę B a atom węgla karbonylowego. Ponadto kwasowe grupy w centrum katalitycznym enzymu mogą być donatorami protonów dla atomu azotu wiązania peptydowego. Koordynacyjne związanie metalu z tym azotem może dodatkowo ułatwiać odciążenie elektronów z połączenia C:N. Biorąc pod uwagę, że grupy A i B w centrum katalitycznym

enzymu są prawdopodobnie resztami tyrozyny, można wyjaśnić, dlaczego acetylacja, jak również acetylo-sukcynyłacja tych grup powoduje całkowity zanik aktywności peptydazowej.



Schemat 1a, b. Hipotetyczny schemat centrum aktywnego karboksypeptydazy z uwzględnieniem mechanizmu hydrolizy peptydazowej i esterazowej (72)

Acetylo-, jodo- i acetylosukcynylo-karboksypeptydazy, mając zahamowaną aktywność peptydazową, wykazują znacznie zwiększoną aktywność esterazową. Kiedy grupa B jest zablokowana przez wymienione ugrupowania, jedyną grupą reagującą jest jon hydroksylový, co wyjaśnia zależność aktywności esterazowej od pH . Hg^{2+} i Cd^{2+} również zwiększają aktywność esterazową enzymu i powodują zanik aktywności peptydazowej. Pauling (47) oznaczył długość promieni jonowych niektórych pierwiastków (dla Zn^{2+} — 0,74 Å, dla Cd^{2+} — 0,97 Å, dla Hg^{2+} — 1,10 Å). Dłuższe promienie jonowe kadmu i rtęci niż cynku umożliwiają silniejsze oddziaływanie z grupą B, dzięki czemu następuje jej zablokowanie.

Zastąpienie zatem metalu natywnego w centrum aktywnym enzymu innym metalem powoduje zmianę specyficznej aktywności i specyficzności substratowej. Dlatego to wpływ jonów metali może być wysoce selektywnym i specyficznym środkiem do badania centrum aktywnego enzymu.

Zbliżone do karboksypeptydazy działanie wykazuje anhidraza węglowa (hydro-liaza węglanu EC. 4.2.1.1), która również jest metaloenzymem, zawierającym Zn^{2+} ; wolny od jonów metalu enzym jest w pełni reaktywowany dodatkiem jonów Zn^{2+} (tablica 5).

Aktywowany jonami Co^{2+} enzym posiada wysoką aktywność specyficzną. Widmo absorpcyjne natywnej Zn-anhidrazy węglowej nie posiada maksimum absorpcji w zakresie 450—700 nm, natomiast podstawienie kobaltem w centrum aktywnym powoduje pojawienie się maksimum absorpcji w zakresie 500—600 nm (9). Świadczy to o powstaniu zmodyfikowanego centrum aktywnego anhidrazy węglowej, w którym zasadniczą rolę odgrywają dwuwartościowe jony kobaltu.

Tablica 5

Aktywność anhidrazy węglowej i zawartość cynku w apoenzymie (według 9)

Enzym	Aktywność enzymu (w jednostkach)	Zawartość Zn^{2+} w gramoatomach/mol enzymu
Enzym natywny	10 200	1,0
Enzym natywny + amid acetoazolu ($1 \times 10^{-5}M$)	187	
Enzym natywny pH 1,9—7,5	0	
Apoenzym	400	0,03
Apoenzym- Zn^{2+}	9 500	1,00
Apoenzym- Co^{2+}	5 700	0,05
Apoenzym- Ni^{2+}	500	0,05
Apoenzym- Cu^{2+}	127	<0,01
Apoenzym- Cd^{2+}	430	<0,01
Apoenzym- Hg^{2+}	5	<0,01

IV. Połączenia enzym-substrat poprzez jony metali

Bardzo istotną rolę pełnią metale jako mostki, łączące enzymy z substratami. W tym przypadku metal nie musi być częścią składową enzymu. Jony metali wpływają w tym wypadku na jonizację substratu, ułatwiając tym tworzenie kompleksu enzym-substrat. Powstanie połączenia chelatowego między jonem metalu a substratem umożliwia zwiększenie lokalnego stężenia jonów OH^- , ułatwiającego hydrolizę enzymatyczną oraz stabilizację stanu zjonizowania substratu czy enzymu podczas trwania kompleksu. Jonami metali, które odgrywają zasadniczą rolę w aktywacji enzymów i jonizacji substratów, są Mg^{2+} i Mn^{2+} .

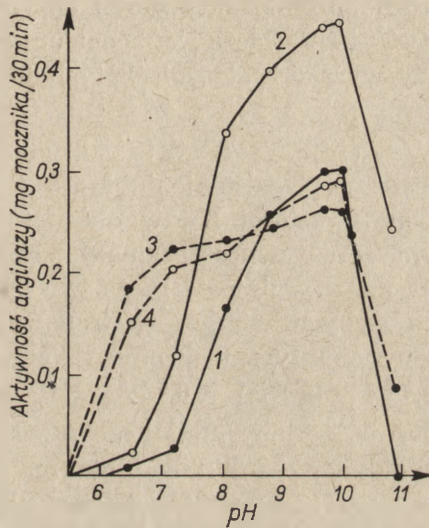
Poniżej omówionych zostanie kilka połączeń E-S poprzez jony metali.

1) Karbamoiltransferaza ornitynowa (karbamoiltransferaza karbamoilofosforan:L-ornityna EC. 2.1.3.3) katalizuje syntezę oraz arsenolityczną (49) i fosforolityczną degradację cytruliny (26). Kleczkowski i wsp. (26) badali wpływ niektórych jonów metali na anabolizm i katabolizm cytruliny. Okazało się, że Mg^{2+} nie wywiera żadnego wpływu na syntezę oraz arsenolityczną degradację cytruliny, natomiast fosforoliza jest silnie aktywowana przez wyższe stężenia tych jonów. Powodowane jest to prawdopodobnie dużym powinowactwem Mg^{2+} do tlenu związanego z fosforem, możliwa jest więc jonizacja połączenia enzym-substrat-metal-

-fosforan. W przeciwieństwie do magnezu, mangan jest silnym inhibitorem syntezy cytruliny i jej degradacji arsenolitycznej, natomiast w mniejszych stężeniach nie wywiera wpływu na degradację fosforolityczną; dopiero dodatek 40 mM Mn^{2+} powodował 48% inhibicję.

Hamowanie przez jony metali ma charakter kompetycyjny — jest zależne wyłącznie od stężenia cytruliny, lecz nie zależy od stężenia karbamoilofosforanu (CP). Można zatem przypuszczać, że karbamoilotransferaza ornitynowa ma dwa niezależne centra substratowe o specyficznej konfiguracji (24).

2) Arginaza (amidnohydrolaza L-argininy EC. 3.5.3.1) jest enzymem o wysokiej specyficzności substratowej (15, 40, 56), aktywowana jest jonami Mn^{2+} i nieco słabiej Co^{2+} oraz Ni^{2+} (15, 42, 50) (rysunek 6).



Rys. 6. Wpływ jonów Mn^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} na aktywność arginazy z wątroby wołu w różnych pH (16)

1. enzym oczyszczony, wolny od jonów metali (dializowany w wodzie destylowanej); 2. arginaza preinkubowana z jonami Mn^{2+} ; 3. arginaza preinkubowana z jonami Co^{2+} ; 4. arginaza preinkubowana z jonami Ni^{2+}

Greenberg i wsp. (16) stwierdzili, że arginaza może być aktywowana przez kompleks Fe^{2+} -cysteina, jony Cd^{2+} nie wywierają żadnego wpływu, natomiast Zn^{2+} w stężeniu 0,025 M hamuje enzym w 70%.

Wydaje się, że metaliczne komponenty odgrywają rolę w orientacji substratu względem odpowiednich grup w centrum aktywnym enzymu (41, 44) a analogi strukturalne L-argininy, D-arginina i homoarginina, współzawodniczą o arginazę z metalicznym aktywatorem (52).

Roche i wsp. (51) stwierdzili, że zwiększenie stężenia jonów Mn^{2+} powyżej pewnej wartości nie wpływa na aktywność arginazy, natomiast

Tablica 6

Wartości K_m dla arginazy z łubinu w obecności Mn^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} w różnych pH (według 42)

pH	K_m w mM		
	1,6 mM Mn^{2+}	1,6 mM Co^{2+}	3,2 mM Ni^{2+}
8,75	41	59	151
9,40	32	71	—
9,95	36	—	—
10,40	40	83	—

Co^{2+} i Ni^{2+} powoduje obniżenie aktywności enzymu. Nasuwa to przypuszczenie, że jony Co^{2+} i Ni^{2+} łączą się z centrum aktywnym w określonym stosunku, a przy wyższych stężeniach tych jonów tworzy się inny, nieaktywny kompleks.

Muszyńska i Reifer (42) stwierdzili zmniejszone powinowactwo enzymu do substratu po zastąpieniu Mn^{2+} jonami Co^{2+} lub Ni^{2+} (tablica 6). Zwiększanie wartości K_m w obecności tych jonów metali można tłumaczyć tym, że aktywność arginazy jest zależna od tworzenia kompleksów arginaza-metal-arginina i może być ona różna przy innych kątach i długościach słabych wiązań elektronowych. Pauling (47) podaje, że wyznaczony empirycznie promień jonowy dla Mn^{2+} wynosi 0,80 Å, dla Co^{2+} — 0,74 Å, dla Ni^{2+} — 0,72 Å.

Klotz (29) sugeruje, że jony metali mogą zniszczyć stabilizację rezonansową grupy guanidynowej argininy. Metal ma działanie stabilizujące na pośredni kompleks enzym-substrat, ponieważ ułatwia on rozerwanie wiązania $C=NH$ z jednoczesnym przyłączeniem jonów hydroksylowych. Prawdopodobnie przed utworzeniem kompleksu, jon metalu, mający zdolność do kompleksowania z grupami funkcyjnymi zawierającymi azot, powoduje usunięcie jonu wodoru z amidynowej grupy $=NH_2^+$. Z drugiej jednak strony zbyt silne powinowactwo metalu do grup hydroksylowych może zahamować przemieszczenie tego jonu. Zrozumiałe jest zatem, że Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Fe^{2+} mogą być aktywatorami arginazy, a Mg^{2+} nie aktywuje jej ze względu na niskie powinowactwo do azotu, podobnie jak Cu^{2+} , Hg^{2+} i Fe^{2+} , wykazujące bardzo silne powinowactwo do jonów hydroksylowych.

3) Iminodipeptydaza (hydrolaza L-prolinoaminokwasu EC. 3.4.3.6) hydrolyzuje niespecyficznie dla białek wiązanie imidazolowe, glicylo-L-proliny (64). Iminodipeptydazę aktywują jedynie jony Mn^{2+} , a stabilizują Mg^{2+} i glutation, co wskazuje na obecność grup sulfhydrylowych w enzymie. Adams i Smith (1) stwierdzili, że hamowanie przez jodoaceto-

amid zachodzi jedynie w nieobecności Mn^{2+} , gdy natomiast ilość Mn^{2+} jest wystarczająca, inhibicja jest nieznaczna. Prawdopodobnie zatem Mn^{2+} jest związany z grupą $-SH$ enzymu i to wiązanie ochrania grupę $-SH$ przed utlenieniem jodoacetoamidem. Jony manganawe nie spełniają jednak tej roli jeśli na iminodipeptydazę działano *p*-chlorortęciobenzoesanem (PCMB). Ponadto iminodipeptydaza jest całkowicie hamowana nawet przez niskie stężenia jonów cynku, ołowiu, rtęci i kadmu, ponieważ jony te reagują z grupami sulfhydrylowymi enzymu (1).

Mn^{2+} związany jest bezpośrednio z białkiem; ruchliwość elektroforetyczna iminodipeptydazy nerkowej zmniejsza się w obecności Mn^{2+} , co wskazuje na mniejszy ładunek ujemny w usieciowaniu białka (61).

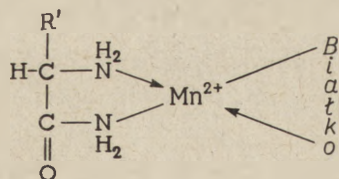
Malmström (34) wykazał, że połączenie koordynacyjne enzym-metal-substrat jest znacznie silniejsze, aniżeli oddziaływanie jonów metali z aminokwasami lub prostymi peptydami. Podczas katalizy enzymatycznej najpierw obojętna grupa aminowa oraz zjonizowana grupa karboksylowa substratu łączą się z metalem, który następnie ulega związaniu z enzymem (62, 66).

W kompleksie substrat-mangan możliwe jest utworzenie dwu pierścieni pięcioczłonowych przy założeniu, że jon manganawy będzie związany z azotem imidowym pierścienia proliny. Jeśli natomiast metal wiązałby się z grupą karbonylową substratu, powstałyby pierścienie pięcio- i siedmio-członowe, lecz alternatywa ta jest mało prawdopodobna (65).

Z białkiem Mn^{2+} łączy się poprzez grupy $-SH$ tworząc związki o liczbie koordynacyjnej sześć. Jednak nie ma bezpośrednich dowodów dotyczących charakteru połączeń pozostałych wiązań metalu. Stężenie jonów wodorowych, niezbędne dla optymalnego działania iminodipeptydazy, wynosi około 8 (64), co wskazuje, że miejsca nie zajęte przez substrat i enzym najprawdopodobniej zajęte są przez jony hydroksylowe.

4) Aminopeptydaza leucynowa (hydrolaza L-leucylopeptydu EC. 3.4.1.1) powoduje hydrolizę amidu L-leucyny. Enzym jest aktywowany przez Mn^{2+} i Mg^{2+} (23, 62), przy czym wpływ Mg^{2+} jest bardzo słaby. Inne jony metali nie aktywują, a mogą nawet hamować ten enzym (64). Trwałość oczyszczonych i nieoczyszczonych preparatów enzymu obniżają jony Mn^{2+} (56, 63) a zwiększają jony Mg^{2+} .

Jon metalu może być związany koordynacyjnie z dwoma miejscami na powierzchni substratu i z dwoma na białku enzymatycznym (sche-



Schemat 2. Hipotetyczne oddziaływanie L-leucynoamidu z aminopeptydazą leucynową (65)

mat 2). Ponieważ pH optymalne dla tego enzymu wynosi 8, prawdopodobnie dwa dalsze wiązania koordynacyjne zajęte są przez grupy $-OH$.

W odróżnieniu od iminodipeptydazy, jodoacetoamid nie hamuje aminopeptydazy leucynowej (64); brak jest też bezpośrednich danych o grupach białka wiążących metal. Można jedynie przypuszczać, że łączy się on z niezjonizowaną grupą imidazolową i α -aminową w wiązaniu peptydowym lub z dwiema grupami imidazolowymi o różnych wartościach pK (66).

5) W reakcjach hydrolizy innych peptydów bierze udział również Mn^{2+} jako jon chelatujący. Można naszkicować pewien wspólny typ przemian dla większości peptydaz. Zakładając, że punkt przyłączenia jonu metalu znajduje się przy azocie wiązania peptydowego, uwzględnic należy przemieszczenie elektronów z grupy karbonylowej do azotu peptydowego. W wyniku tego przesunięcia węgiel karbonylowy stałby się bardziej elektronododatni i silniej przyciągałby jony hydroksylowe. Ten etap działania jonów metalu zbadano na prostych modelach nieenzymatycznych (68).

Jony wapnia są znacznie mniej specyficznymi aktywatorami enzymów (20, 28), jednakże odgrywają istotną rolę w enzymatycznej hydrolizie wielu połączeń organicznych. Wapń może być aktywatorem peptydaz (60), α -amylaz (2, 20) i fosfataz (19, 38, 55, 77). Rolę jonów Ca^{2+} jako kofaktorów niezbędnych do utrzymania drugo- i trzeciorzędowej struktury oraz związaną z tym aktywację α -amylaz omówiono niedawno w *Postęпах Biochemii* (2).

Imanishi (20), po zastosowaniu techniki elektrodializy według Steina i wsp. (69), uzyskał preparat α -amylazy z *Bacillus subtilis* nie zawierający jonów wapnia. Badania widma w podczerwieni i pomiar optycznej dyspersji rotacyjnej nie wykazały różnic między enzymem natywnym a pozbawionym jonów Ca^{2+} . Świadczy to, że zmiany nie dotyczą reszt chromoforowych enzymu. Jednakże α -amylaza „wolna od jonów metalu” wykazuje większą podatność na strącanie niektórymi rozpuszczalnikami organicznymi i mniejszą odporność termiczną. Podobnie jak w przypadku syntetazy glutaminowej, mocznik, praktycznie nie wywierając wpływu na natywną cząsteczkę α -amylazy, zmienia konformację α -amylazy pozbawionej jonów metalu. Stabilność właściwą enzymowi natywnemu można przywrócić dodając 4—5 gramoatomów Ca^{2+} na gramoatom cząsteczkę enzymu. Imanishi (20) wykazał, że na powierzchni α -amylazy znajdują się trzy równoważnościowe i elektrostatycznie niezależne miejsca wiążące jony Ca^{2+} ; można przypuszczać, że każde z nich składa się z dwu różnych grup: prawdopodobnie z grupy karboksylowej i atomu azotu.

Jony wapnia biorą również udział w enzymatycznej hydrolizie reszt fosforanowych. Zależna od Mg^{2+} ATP-aza jest aktywowana przez jony Ca^{2+} . Jony Ca^{2+} i Mg^{2+} tworzą kompleks z substratem, przy czym roz-

szczepienie kompleksu Mg-ATP jest przeszło dwukrotnie szybsze aniżeli Ca-ATP (77). Natomiast stała Michaelisa wskazuje na wyższe powinowactwo kompleksu Ca-ATP ($K_m = 1,3 \cdot 10^{-5}M$) enzymu niż kompleksu Mg-ATP ($K_m = 3,6 \cdot 10^{-5}M$) (77). Schaub i Ermini (55) wykazali, że ATP-azę mogą aktywować dwuwartościowe kationy posiadające promień jonowy od 0,65 do 0,99 Å (tablica 7), przy czym jedynie Ca^{2+} o promieniu jonowym 0,99 Å silnie aktywuje ATP-azę z miozynu.

Podobnie kinazę fosforylazową (fosfotransferaza ATP:fosforylaza EC. 2.7.1.38) z mięśni szkieletowych królika silnie aktywują jony Ca^{2+} i Mg^{2+} (19), przy czym nie działają one antagonistycznie (38). Meyer i wsp. (38) uważają, że jony Ca^{2+} mogą odgrywać rolę w mechanizmie kontroli komórkowej procesu glikogenezy.

Tablica 7

Wpływ kationów i ich promieni jonowych na aktywację ATP-azy
(według 55)

Kation	Promień jonowy w Å	Optymalne stężenie kationu w mM
Be^{2+}	0,31	nie aktywuje, > 0,8—inhibicja
Mg^{2+}	0,65	2—3
Co^{2+}	0,72	0,5—1
Zn^{2+}	0,74	0,2—0,5
Mn^{2+}	0,80	1,5—3,0
Cd^{2+}	0,97	0,2—0,5
Ca^{2+}	0,99	> 20 (na miofibryle i natywny aktomiozyn) > 2,5 (na odwrażliwiony aktomiozyn)
Sr^{2+}	1,13	nie aktywuje
Ba^{2+}	1,35	nie aktywuje

Reasumując, można stwierdzić, że jon metalu może działać jako ligand w tworzeniu kompleksu koordynacyjnego, zarówno z enzymem jak i substratem, ułatwiając jonizację tego ostatniego. Ten sposób wyjaśnienia aktywności enzymów przez jony metali jest najprostszy.

Na zakończenie warto wspomnieć o innej, równie istotnej roli, jaką mogą spełniać kationy, zarówno w syntezie RNA jak i w utrzymaniu odpowiedniej struktury DNA i rybosomów.

Fusch i wsp. (14) stwierdzili, że nukleotydylotransferaza RNA (nukleotydylotransferaza nukleozydylotrójfosforan:RNA EC. 2.7.7.6) z *Escherichia coli* jest aktywowana przez Mg^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} , natomiast nienatywny enzym mogą reaktywować tylko Mg^{2+} i spermidyna.

Iwanow (21) wykazał, że natywny DNA zawiera duże ilości żelaza. Przypuszcza on, że Fe^{2+} może być połączony z podwójną nicią DNA,

poprzez 6-amino i 6-keto grupy puryn, co nie narusza wiązań wodorowych między parami zasad. Natywny i zdenaturowany DNA może kompleksować z jonami Cu^{2+} i Ag^{2+} , przy czym badanie efektu Cottona wykazało, że oba te kompleksy różnią się znacznie między sobą (22). Podwójna nić DNA ulega zniszczeniu podczas ogrzewania w roztworze Cu^{2+} o małej sile jonowej, natomiast w roztworze o dużej sile jonowej zostaje zrekonstruowana. Podobne działanie wykazuje Zn^{2+} , co można tłumaczyć (59) jego zdolnością utrzymywania obydwu nici DNA w prawidłowych odległościach od siebie.

Stopniowe zmniejszanie zawartości Mg^{2+} w rybosomach powoduje zmiany w strukturze podjednostek i rozluźnienie wiązań między nimi. Bielka i wsp. (6) stwierdzili, że podjednostki 49S i 29S rozdzielają się gdy Mg^{2+} jest usunięty całkowicie z rybosomów.

LITERATURA

1. Adams E., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **198**, 671 (1952).
2. Andrzejczuk-Hybel J., *Post. Biochem.* **15**, 49 (1969).
3. Benesch R., Benesch R. E., *Arch. Biochem.* **19**, 35 (1948).
4. Benesch R., Benesch R. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 425 (1952).
5. Bader H., Sen A. K., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 116 (1966).
6. Bielka H., Welfle H., Böttger M., Förster W., *Eur. J. Biochem.* **5**, 183 (1968).
7. Cohen P., Rosemeyer M. A., *Eur. J. Biochem.* **8**, 1 (1969).
8. Cohen P., Rosemeyer M. A., *Eur. J. Biochem.* **8**, 8 (1969).
9. Coleman J. E., *Biochemistry* **4**, 2644 (1965).
10. Coleman J. E., Vallee B. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 390 (1960).
11. Coleman J. E., Vallee B. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2244 (1961).
12. Dwyer F. P., *Chelating Agents and Metal Chelates*, red. Dwyer F. P. i Mellor D. P., Academic Press, New York-Londyn 1964, str. 335.
13. Ferdman D. L., Gimmelreleh N. G., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **179**, 979 (1968).
14. Fusch E., Millette R. L., Zilling W., Walter G., *Eur. J. Biochem.* **3**, 183 (1967).
15. Greenberg D. M., *The Enzymes*, red. J. B. Summner i K. Myrbäck, Academic Press, New York 1951, t. 1, str. 893.
16. Greenberg D. M., Bagot A. E., Rohold O. A. Jr., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 446 (1956).
17. Greenstein J. P., Winitz M., *Chemistry of the Amino Acids*, J. Wiley, New York 1961, str. 569.
18. Hewitt E. J., *Nature* **180**, 1020 (1957).
19. Huston R. B., Krebs E. G., *Biochemistry* **7**, 2117 (1968).
20. Imanishi A., *J. Biochem.* **60**, 381 (1966).
21. Ivanov V. I., *Federation Proc.* **24**, 1041 (1965).
22. Ivanov V. I., Miechenkova L. E., Timofew V. P., *Mol. Biol.* **1**, 682 (1967).
23. Johnson M. J., Berger J., *Advan. Enzymol.* **2**, 69 (1942).
24. Joseph R. L., Baldwin E., Watts D. C., *Biochem. J.* **87**, 409 (1963).

25. Kingdon H. S., Hubbard H. S., Stadtman E. S., *Biochemistry* **7**, 2136 (1968).
26. Kleczkowski K., Jasiorska B., Reifer I., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 89 (1968).
27. Kleppe K., Spaeren U., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 199 (1966).
28. Klotz I. M., *Modern Trends in Physiology and Biochemistry* red. E. S. G. Barron, Academic Press, New York 1952, str. 427.
29. Klotz I. M., *Mechanism of Enzyme Action*, red. W. D. McElroy i B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore, Maryland 1954, str. 257.
30. Klotz I. M., Urquhart J. M., Fiess H. A., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5537 (1952).
31. LeJohn H. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 278 (1968).
32. MacLeod R. A., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **176**, 39 (1948).
33. MacLeod R. A., Snell E. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **52**, 1249 (1950).
34. Malmström B. G., *Nature* **171**, 392 (1953).
35. Melchior J. B., *Biochemistry* **4**, 1518 (1965).
36. Mellor D. P., Maley L., *Nature* **159**, 370 (1947).
37. Mellor D. P., Maley L., *Nature* **161**, 436 (1948).
38. Meyer W. L., Fischer E. H., Krebs E. G., *Biochemistry* **3**, 1033 (1964).
39. Monder C., *Biochemistry* **4**, 2677 (1965).
40. Mora J., Martuscelli J., Oritz-Pineda J., Soberon G., *Biochem. J.* **96**, 28 (1965).
41. Morque M., Baret R., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **150**, 550 (1956).
42. Muszyńska G., Reifer I., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 55 (1968).
43. Myrbäck K. Z., *Z. Physiol. Chem.* **158**, 4 (1926).
44. Nguyen-van-Thoai, Roche J., Verrier J. M., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **236**, 2008 (1953).
45. Nikolajew L. A., *Biokatalizatory i ich Modeli*, Wysszaja Szkoła, Moskwa 1968, wyd. 2.
46. Orgel L. E. w *Metals and Enzymes Activity*, Biochem. Soc. Symp. Cambridge **15**, 8 (1958).
47. Pauling L., *Nature of Chemical Bond*, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York 1960.
48. Rabin R. B., *Biochem. Soc. Symp. Cambridge* **15**, 21 (1958).
49. Reichard P., *Acta Chem. Scand.* **11**, 523 (1957).
50. Robbins K. C., Shields J., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 55 (1956).
51. Roche J., Nguyen-van-Thoai, Verrier J., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **236**, 1435 (1953).
52. Roche J., Nguyen-van-Thoai, Verrier J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **148**, 782 (1954).
53. Rosenberg A., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 297 (1960).
54. Saundry R. H., Stein W. D., *Biochem. J.* **105**, 107 (1967).
55. Schaub M. C., Ermini M., *Biochem. J.* **111**, 777 (1969).
56. Schwimmer S., *J. Biol. Chem.* **154**, 361 (1944).
57. Shapiro B. M., Ginsburg A., *Biochemistry* **7**, 2153 (1968).
58. Shapiro B. M., Stadtman E. R., *J. Biol. Chem.* **242**, 5069 (1967).
59. Shin Y. A., Eichhorn G. L., *Biochemistry* **7**, 1026 (1968).
60. Sipos T., Merkel J. R., *Federation Proc.* **27**, 1705, Abst. 52, Ann. Meeting Atlantic City, New Jersey, 15—20.IV.(1968).
61. Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **163**, 15 (1946).
62. Smith E. L., *Advan. Enzymol.* **12**, 191 (1951).

63. Smith E. L., Bregmann M., *J. Biol. Chem.* **153**, 627 (1944).
64. Smith E. L., Davis N. C., Adams E., Spackman D. H., w *Mechanism of Enzyme Action*, red. W. D. McElroy, B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore, Maryland 1954, str. 291.
65. Smith E. L., Polglase W. J., *J. Biol. Chem.* **180**, 1209 (1949).
66. Smith E. L., Spackman D. H., Polglase W. J., *J. Biol. Chem.* **199**, 801 (1952).
67. Smith E. L., Stockell A., *J. Biol. Chem.* **207**, 501 (1954).
68. Spiro Th. G., Kjellstrom W. A., Zeydel M., Butow R. A., *Biochemistry* **7**, 859 (1968).
69. Stein E. A., Hsiu J., Fischer E. H., *Biochemistry* **3**, 56 (1964).
70. Valentine R. C., Shapiro B. M., Stadtman E. R., *Biochemistry* **7**, 2143 (1968).
71. Vallee B. L., w *The Enzymes* red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York 1960, t. 3, str. 225.
72. Vallee B. L., *Federation Proc.* **23**, 8 (1964).
73. Vallee B. L., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **217**, 253 (1955).
74. Vallee B. L., Rupley J. A., Coombs T. L., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **235**, 64 (1960).
75. Warner R. C., Weber I., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5094 (1953).
76. Welch W. H., Irwin C. L., Himes R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 255 (1968).
77. Wolf H. U., Adolph L., *Eur. J. Biochem.* **8**, 68 (1969).
78. Woolfolk C. A., Shapiro B. M., Stadtman E. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 177 (1966).
79. Woolfolk C. A., Stadtman E. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 736 (1967).
80. Yoshida H., Izumi K., Kagai K., *Biochim. Biophys. Acta* **120**, 183 (1966).

ELŻBIETA DZIEMBOR *

Fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych

Orthophosphoric Monoester Phosphohydrolases

The data concerning the alkaline and acid phosphatases are reviewed. The possible biological and catalytic function of these enzymes are presented.

Fosfatazy kwaśne i alkaliczne to zwyczajowe nazwy dwu grup enzymów, należących do fosfohydrolaz monoestrów ortofosforanowych (EC. 3.1.3.1 i EC. 3.1.3.2). Pierwsze doniesienia o istnieniu enzymów, odszczepiających resztę fosforanową, pochodzą z 1907 roku (60). Nasilenie badań nad właściwościami fizykochemicznymi fosfataz przypada na lata 1930—1950 (1, 2, 3, 4, 5, 9). W ostatnich latach znowu obserwuje się wzrost zainteresowania tymi enzymami, szczególnie ich rolą biologiczną i mechanizmem katalizy (14, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 43, 46, 58, 59).

Fosfatazy kwaśne i alkaliczne są rozpowszechnione w świecie zwierzęcym i roślinnym. Fosfatazy alkaliczne występują w błonach śluzowych jelita (29), tkance kostnej (63), nerce i wątrobie (48) oraz łożysku (26). Enzym z błony śluzowej jelita jest zlokalizowany w mikrosomach i prawdopodobnie bierze udział w resorpcji cukrów (48). Fosfataza alkaliczna jest wydzielana z żółcią do przewodu pokarmowego. W surowicy występuje fosfataza alkaliczna o własnościach zbliżonych do enzymu wyodrębnionego z kości. Chromatograficznie rozdzielono ją na kilka aktywnych frakcji (48), których stosunek ilościowy zmienia się w chorobach układu wątrobowo-żółciowego. Fosfatazy kwaśne w dużych ilościach występują w gruczole krokowym (55), wątrobie (6), łożysku (16), śledzionie, nerce, surowicy (48). Ponadto otrzymano kwaśne i alkaliczne fosfatazy z *E. coli* (50), *Neurospora crassa* (36, 37), oraz fosfatazę alkaliczną z mleka (41), a kwaśne z marchwi (62) i słodu (11, 12).

Kwaśne i alkaliczne fosfatazy należą do enzymów o zróżnicowanym ciężarze cząsteczkowym (kwaśne fosfatazy z łożyska: 35 000, 105 000, > 200 000 (16), alkaliczne z *E. coli* — 75 000 (25), z marchwi — 45 000 (14)).

* Mgr, Międzywydziałowa Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Kraków.

Doświadczenia z użyciem wody znakowanej ^{18}O wykazały, że enzymy te katalizują reakcje $\text{R-O-P} + \text{H}_2^{18}\text{O} = \text{R-O-H} + \text{H-}^{18}\text{O-P}$, powodując rozzerwanie wiązania pomiędzy fosforem a tlenem i przeniesienie reszty fosforanowej na wodę (reakcja hydrolizy). Fosfatazy mogą również katalizować reakcje przeniesienia reszt fosforanowych na alkohol z utworzeniem nowego estru (reakcja transfosforylacji) (7).

Na aktywność kwaśnych i alkalicznych fosfataz wpływają odmiennie różne czynniki (52) (tablica 1). Różne są również prawdopodobnie mechanizmy reakcji katalizowanych przez fosfatazy kwaśne i alkaliczne (10, 43). Obydwie grupy enzymów są mało specyficzne, hydrolizują estry fosforanowe lipidów, peptydów, mono- i oligonukleotydów itp. Jony fosforanowe silnie hamują aktywność wobec wszystkich substratów.

Tablica 1

Wpływ różnych czynników na aktywność fosfataz

Czynnik	Fosfatazy kwaśne	Fosfatazy alkaliczne
Jony metali dwuwartościowych (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+})	bez wpływu	aktywatory
Substancje silnie wiążące metale	bez wpływu	inhibitory
Jony F^-	inhibitory	bez wpływu
pH środowiska > 9	gwałtowna inaktywacja	bez wpływu
pH środowiska < 5	bez wpływu	gwałtowna inaktywacja
$\text{R-S-PO}_3\text{H}_2$ jako substraty (43)	nieaktywne	aktywne

Wyodrębnianie fosfataz i ich oczyszczanie jest procesem wielostopniowym. Najczęściej stosuje się następujące etapy postępowania (7, 14, 17, 25, 31, 49, 53):

etap I — otrzymywanie ekstraktu tkankowego

etap II — wytrącanie innych białek

etap III — wysalanie enzymu siarczanem amonu

etap IV — oczyszczanie enzymu od zanieczyszczeń innymi białkami za pomocą chromatografii na *DEAE*-celulozie, *CM*-celulozie (19)

etap V — oczyszczanie enzymu na kolumnach *Sephadex G 100* i *G 200*.

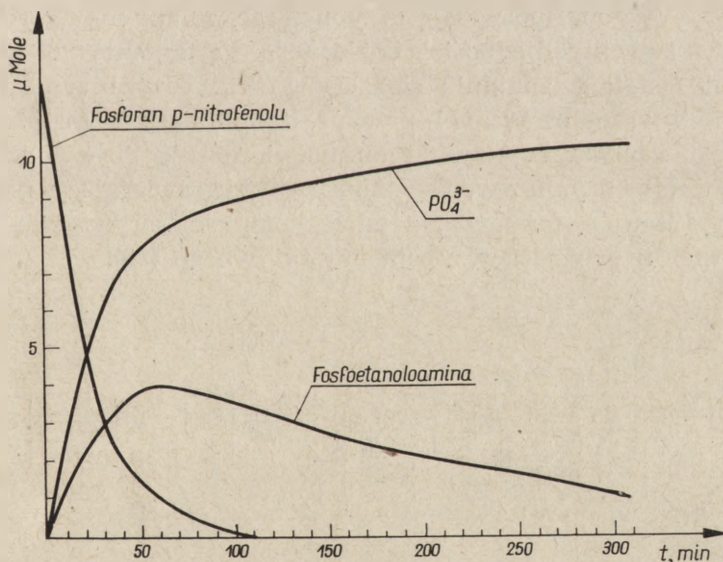
Kryteriami pozwalającymi wnioskować o czystości enzymu są: kształt szczytów, otrzymanych po ponownym rozdziale na *Sephadex G 100* i *G 200*, wyniki elektroforezy na żelu skrobiowym i poliakrylamidowym, immunoelektroforezy, badania szybkości sedymentacji, obraz w mikro-

skopie elektronowym (25) i krystalizacja. Do jednorodnych, całkowicie oczyszczonych enzymów, należą między innymi kwaśna fosfataza z prostaty ludzkiej (49), alkaliczne z *E. coli* (25) i łożyska (26, 27).

I. Charakterystyka kilku fosfataz i mechanizm ich działania

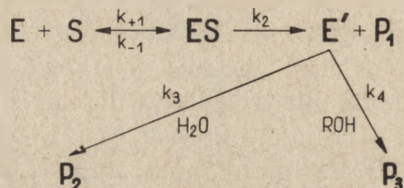
1. Fosfatazy alkaliczne

Najdokładniej poznaną fosfatazą alkaliczną jest enzym z *E. coli* o optymalnym pH 8,0 (25). Fosfataza ta jest wyjątkowo termostabilna, ogrzewana do 85°C przez 30 min. nie traci aktywności. Należy ona do enzymów mających jednocześnie własności pirofosfataz (21, 30). Enzym ten hydrolyzuje mono-, dwu- i trójfosforany nukleotydów, etanoloaminofosforan, nieorganiczne pirofosforany itd. Oprócz aktywności hydrolitycznej wykazuje on własności fosfotransferazy (68). Donatorami grup fosforanowych mogą być fosforan *p*-nitrofenolu i nukleotydy, a akceptorami — glukoza, alkohole i aminoalkohole. Fosforylacji ulegają alkoholowe grupy w związkach zawierających drugą grupę alkoholową lub aminową, najdalej w położeniu 3' w stosunku do grupy ulegającej fosforylacji. Równowagę między dawcą (fosforan *p*-nitrofenolu), biorcą (etanoloamina) i uwolnionym fosforanem przedstawia rysunek 1. Dodatek NaCl zwiększa aktywność hydrolityczną i transferazową enzymu.



Rys. 1. Zmiany stężeń fosforanu, fosforanu *p*-nitrofenolu i utworzonego w wyniku reakcji transfosforylacji nowego estru fosforanowego, fosfoetanoloaminy, w czasie działania alkalicznej fosfatazy z *E. coli* (68)

Kolejne etapy reakcji katalizowanych przez fosfatazę z *E. coli* podano na schemacie 1. Przedstawiony przebieg reakcji jest możliwy, gdy stężenia uwolnionego w czasie reakcji *p*-nitrofenolu, kwasu ortofosforowego i powstającego estru fosforanowego są małe, a akceptor obecny w dużym nadmiarze nie wiąże się bezpośrednio z enzymem. Zaobserwowano, że szybkość reakcji uwalniania fosforu wzrasta w obecności akceptora grupy fosforanowej. Potwierdza to sugestię, że defosforylacja jest dwustopniowa.

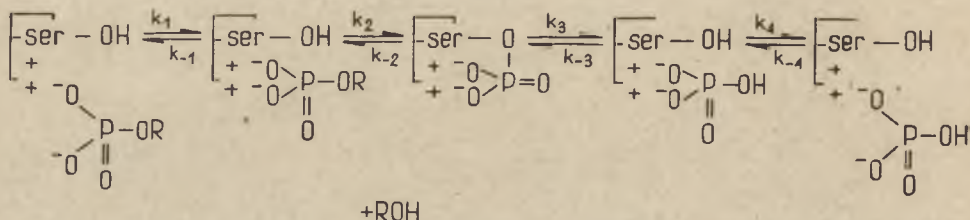


Schemat 1. Kolejne etapy reakcji odszczepienia reszty fosforanowej przez alkaliczną fosfatazę z *E. coli* (68)

E — enzym, E' — kompleks enzym-grupa fosforanowa, ES — kompleks enzym-substrat, S — substrat (fosforan *p*-nitrofenolu), P₁ — produkt reakcji defosforylacji, *p*-nitrofenol, P₂ — produkt reakcji hydrolizy, kwas ortofosforowy, P₃ — produkt reakcji transfosforylacji, fosfoetanolamina, ROH — biorca reszty fosforanowej, etanolamina

Alkaliczna fosfataza z *E. coli* jest cynkoproteidem, zbudowanym z dwu nieaktywnych podjednostek (54). Badania wpływu niektórych analogów aminokwasowych na szybkość reakcji uwalniania fosforu (zamiast histydyny 1,2,4-trójazolo-3-alanina, fenyloalaniny — *p*-fluorofenyloalanina, metioniny — etionina) pozwalają przypuszczać, że aminokwasy te są niezbędne do asocjacji podjednostek w aktywną cząstkę enzymu. W centrum aktywnym fosfatazy znajduje się seryna (32). Przypuszczalny mechanizm reakcji przeprowadzanej przez fosfohydrolazy i fosfotransferazy przedstawia schemat 2. Uzyskał on potwierdzenie doświadczalne, gdy po inaktywacji enzymu wyodrębniono peptyd, zawierający przyłączoną do seryny resztę fosforanową, a także kompleks seryna-dwu-izopropylodifluorofosforan pochodzący z centrum aktywnego (35).

+ HOH



Schemat 2. Udział seryny w mechanizmie odszczepiania reszty fosforanowej przez alkaliczne fosfatazy (32)

Alkaliczna fosfataza z jelita należy do stosunkowo dobrze zbadanych enzymów zarówno pod względem specyficzności substratowej, jak i budowy centrum aktywnego. Enzym wykazuje zdolność rozszczepiania wiązania pirofosforanowego (22), hydrolizując między innymi ADP, UDP, ATP i UTP (15). Jony magnezu aktywują enzym wobec wszystkich substratów, jedynie ATP hydrolizowany jest w tych warunkach wolniej. Fosfataza wykazuje silnie zaznaczone własności fosfotransferazy (39, 40).

Stereospecyficznym inhibitorem enzymu jest L-feniloalanina. Wyniki badań nad wpływem czynników, reagujących z grupami tiolowymi i czynników blokujących wolne grupy aminowe, na aktywność enzymu oraz jego hamowanie przez L-feniloalaninę wskazują na obecność wolnych grup-SH i lizyny w centrum aktywnym (23), warunkujących jego działanie

Z łożyska ludzkiego wyodrębniono alkaliczną fosfatazę o optymalnym pH działania 9,0 (26, 59), o własnościach fosfotransferazy i pirofosfatazy. Enzym najłatwiej odszczepia resztę fosforanową w położeniu 3', wolniej w 5', hydrolizuje również, jakkolwiek z mniejszą szybkością, ADP i ATP.

Określenie alkalicznych fosfataz jako enzymów odszczepiających wyłącznie resztę fosforanową związaną estrowo, a więc przez tlen, podważyły badania Neumanna (43, 44), który jako substraty dla fosfatazy z *E. coli* stosował związki o ogólnym wzorze $R-S-PO_3Na_2$ ($R: -CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NHCOCH_3$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2COOC_2H_5$). Hydroliza wiązań C-S-P i C-O-P przebiega podobnie: enzym działa optymalnie w tym samym pH wobec obu rodzajów substratów, jest aktywowany przez NaCl zarówno w stosunku do fosforanu p-nitrofenolu, jak i do cystaminofosforanu, V_{maks} i K_m są tego samego rzędu, a cystamino-S-fosforan hamuje hydrolizę p-nitrofenolu. Powyższe podobieństwa nasuwają przypuszczenie, że to samo centrum aktywne warunkuje odszczepienie nieorganicznego fosforanu z utworzeniem zarówno grupy hydroksylowej, jak i tiolowej.

W świetle dotychczasowych danych alkaliczne fosfatazy stanowią grupę mało specyficznych enzymów, w wielu wypadkach z wyraźnie zaznaczoną aktywnością pirofosfataz i fosfotransferaz. W mechanizmie katalizy ważną rolę odgrywają jony metali dwuwartościowych. Powstający w czasie reakcji kompleks enzym- PO_3H_2 zawiera resztę fosforanową przyłączoną do seryny stosunkowo silnym wiązaniem.

2. Fosfatazy kwaśne

Dwie kwaśne fosfatazy wyodrębniono z *E. coli*: kwaśną fosfatazę o optymalnym pH 5,8 oraz fosfoheksozofosfatazę (19, 42). Pierwszy z tych enzymów jest aktywny wobec podobnych substratów jak alkaliczna fosfataza z *E. coli*, drugi enzym o optymalnym pH 6,0 hydrolizuje również większość estrów fosforanowych z różną jednak szybkością. Najszybciej hydrolizowany jest glukozo-6-fosforan, glukozo-1-fosforan i fruktozo-6-fosforan. Nukleotydy są hydrolizowane około 100 razy wolniej.

Z łożyska ludzkiego wyodrębniono trzy kwaśne fosfatazy. Enzymy o optymalnych pH 5,5, 4,0 i 5,5 różnią się specyficznością, a ich aktywność jest hamowana przez odmienne czynniki (16). Fosfataza I jest niespecyficznym enzymem, rozkładającym między innymi hydrokortyzono-21-fosforan i fosfoenolopirogronian. Enzym II, również o niskiej specyficzności, hydrolizuje ATP i nieorganiczny pirofosforan. Oba enzymy są hamowane przez jony fluorkowe, molibdenianowe i winianowe. Kwaśna fosfataza III wykazuje znaczną specyficzność substratową (17). Z dotychczas przebadanych związków substratami dla enzymu okazały się 17-estradiolo-3-fosforan, L-tyrozyno-O-fosforan i fosforan *p*-nitrofenolu. Jony winianowe nie hamują czynności enzymatycznej. Kompetytywnymi inhibitorami kwaśnej fosfatazy III są 5-fosfopirydoksyna, puryny i ich pochodne. Pirymidyny nie mają wpływu hamującego.

Z lizosomów wątroby szczura otrzymano kwaśną fosfatazę o optymalnym pH 4,0 (7). Szybkość odszczepiania przez ten enzym reszty fosforanowej od nukleotydów zależy od jej położenia, rodzaju cukru i zasady.

Kwaśna fosfataza z prostaty ludzkiej o optymalnym pH 5,5 posiada niewielką specyficzność substratową (54, 56). Hydrolizuje mono- i oligonukleotydy, fosfopolipeptydy, fosfokreatynę. Od nukleotydów najszybciej odszczepiana jest reszta fosforanowa w położeniu 2'- i 3'- wolniej w 5'- (55). Na szybkość reakcji enzymatycznej wpływa również rodzaj cukru i zasady oraz długość łańcucha polinukleotydowego (58). Kwaśna fosfataza z prostaty ma oprócz własności hydrolitycznych własności transferazowe (8, 32, 33, 45). W badaniach nad tym procesem jako dawcy reszt fosforanowych używano fosforanów alifatycznych i aromatycznych, biorcami były pentadiol, glicerol, nukleozydy (12, 13, 45). Enzym hamują fluorki, kwasy hydroksykarboksylowe (3), benzoesan rtęci (61), jony molibdenianowe, żelazawe i miedziowe. Hamowanie jonami fluorkowymi zależy od stężenia substratu i ulega zmniejszeniu w obecności anionów niektórych kwasów dwu- i trójkarboksylowych, szczególnie kwasu malonowego, szczawowego i cytrynowego. Wyjaśnienie tego zjawiska podał Rainer i wsp. (51), sugerując, że substrat, jony fluorkowe i jony ochronne współzawodniczą między sobą o kationowe grupy białka. Kwasy hydroksykarboksylowe, na przykład kwas L(+)-winowy są kompetytywnymi inhibitorami enzymu. Hamujący wpływ wywierają kwasy z wolną i zestryfikowaną grupą karboksylową. Hamowanie kwasem winowym jest charakterystyczne dla kwaśnych fosfataz z łożyska (16) i prostaty (3) i odróżnia je od innych enzymów tego typu. Czynnikiem wywierającym również silny wpływ hamujący na czynność fosfatazy z prostaty jest benzoesan rtęci. Aktywność zahamowaną przez ten związek można przywrócić dodając cysteiny, a przez jony Fe^{2+} i Cu^{2+} dodając cytrynianu. Enzym wykazuje małą termostabilność (38). Rozcieńczone roztwory czy-

stego enzymu szybko się inaktywują, zwłaszcza przechowywane w szklanych, podlegających wstrząsom, naczyniach. Aminy i skrobia mają działanie ochronne.

Z marchwi wyizolowano enzym o silnie zaznaczonych własnościach fosfotransferazowych (14). Z izomerów nukleotydów najłatwiej odszczepia on resztę fosforanową w położeniu 5'. Różnice w szybkości hydrolizy pomiędzy 3' i 5' izomerami są niewielkie, grupa fosforanowa z izomeru 2' odszczepiana jest znacznie wolniej. W obecności nukleotydów aktywność hydrolazowa enzymu jest hamowana, a ujawnia się jego aktywność fosfotransferazowa: powstają nowe nukleotydy, zawierające resztę fosforanową głównie w pozycji 5', a w znikomej ilości w pozycji 2'. Nukleozydy pirymidynowe są lepszymi akceptorami od nukleozydów purynowych. Dezoksyrybonukleozydy są fosforylowane łatwiej niż rybonukleozydy, przy czym powstają izomery 5'.

Mechanizm działania kwaśnych fosfataz i budowa centrum aktywnego nie są jeszcze dokładnie poznane. Enzymy te zachowują całkowitą aktywność po działaniu związkami wiążącymi jony metali, stąd wniosek, że metale w procesie katalizy nie odgrywają zasadniczej roli. Cecha ta odróżnia fosfatazy kwaśne od alkalicznych. Nie stwierdzono również u tej grupy enzymów powstawania kompleksu: seryna-reszta kwasu fosforowego w centrum aktywnym enzymu. Badania wpływu czynników modyfikujących aminokwasy pozwalają przypuszczać, że podczas reakcji enzymatycznej powstaje labilny kompleks tyrozyny z fosforanem (10). Wskazuje to na znaczną różnicę w mechanizmie działania obu rodzajów fosfataz.

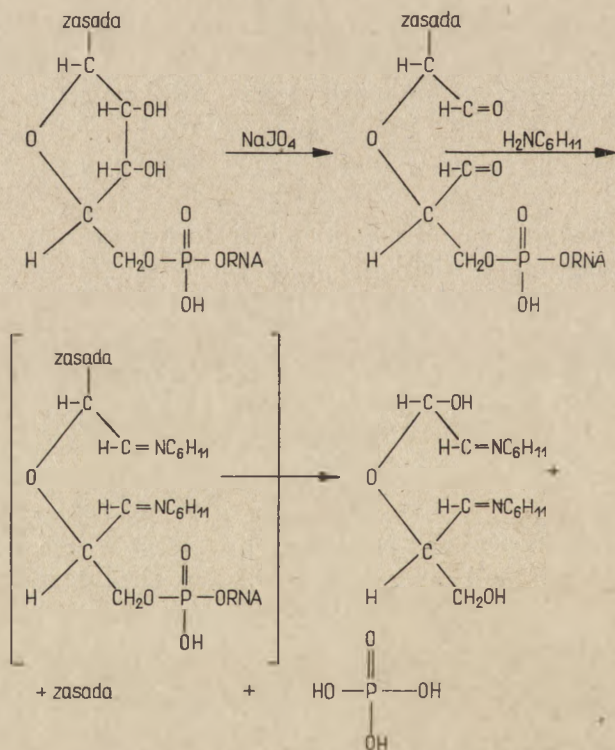
Badania kinetyki reakcji uwalniania fosforu przez enzymy mało specyficzne są znacznie utrudnione przez zachodzący jednocześnie proces transfosforylacji. Optymalne *pH*, aktywatory i inhibitory są przeważnie dla obydwu procesów jednakowe, dlatego też poszukuje się czynników, które mogłyby przesuwać równowagę reakcji w określonym kierunku (35). Znalezienie ich pomogłoby wytłumaczyć biologiczną rolę tych procesów.

III. Zastosowanie kwaśnych i alkalicznych fosfataz w diagnostyce i w badaniu sekwencji nukleotydów w kwasach nukleinowych

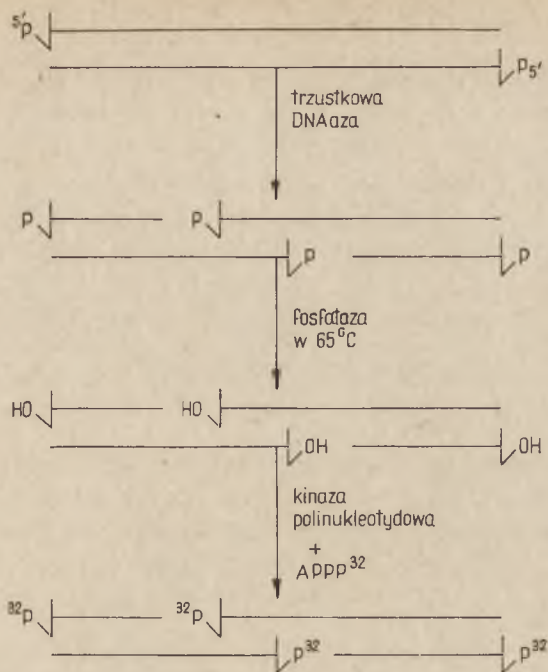
Duże zainteresowanie kwaśnymi i alkalicznymi fosfatazami w ostatnich latach spowodowały różne przyczyny. Między innymi próbowano powiązać zmiany aktywności tych enzymów w krwi z różnymi stanami patologicznymi. Historycznie pierwszymi pracami tego rodzaju były badania nad przydatnością oznaczania aktywności kwaśnej fosfatazy w surowicy w diagnostyce raka sterczu (28). Obecnie znaczenie diagnostyczne

ma również określanie poziomu alkalicznej fosfatazy w surowicy. Zwiększenie aktywności enzymu stwierdza się w krzywicy (15), przy czym oddaje ono dość wiernie dynamikę procesu chorobowego. W diagnostyce stosuje się także badanie aktywności tego enzymu do wykrywania przerzutów nowotworowych do wątroby (57), w przypadkach żółtaczk mechanicznej i zaporowej marskości wątroby (48).

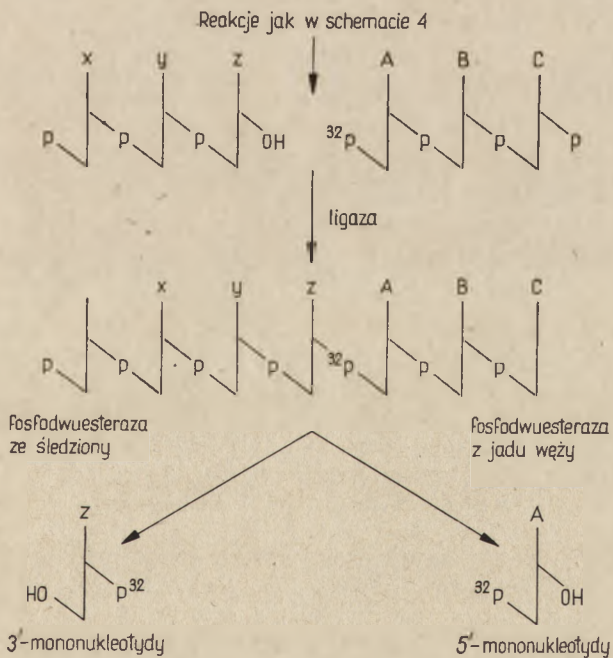
Kwaśne i alkaliczne fosfatazy okazały się przydatne do badania struktury kwasów nukleinowych: do oznaczania sekwencji nukleotydów oraz do określania długości łańcucha polinukleotydowego (50). Badanie sekwencji nukleotydów można przeprowadzić dwiema metodami. Pierwsza, wyłącznie enzymatyczna, polega na działaniu na kwasy nukleinowe lub polinukleotydy fosfomonoesterazą, a następnie fosfodwuesterazą (50). Za pomocą chromatografii produktów reakcji oddziela się nukleotydy od nukleozydów, co pozwala stwierdzić, jaka zasada znajdowała się na ufosforylowanym końcu łańcucha. Druga metoda, enzymatyczno-chemiczna, polega na odszczepieniu końcowego fosforanu przez fosfatazę.



Schemat 3. Reakcje zachodzące na zdefosforylowanym końcu łańcucha kwasu nukleinowego pod działaniem nadjodanu sodu i amin (69)



Schemat 4. Reakcje enzymatyczne prowadzące do powstawania DNA znakowanego ^{32}P (65)



Schemat 5. Reakcje enzymatyczne pozwalające na identyfikowanie zasad łąsiadujących z wprowadzonym atomem ^{32}P (64)

W dalszych etapach utleniania się rybozę nadjodanem sodu i działa na nią aminą w wyniku czego końcowa zasada zostaje odszczepiona od łańcucha i można ją zidentyfikować (schemat 3) (34, 47, 67, 69). Ustalanie długości łańcucha oligonukleotydowego przeprowadza się oznaczając stosunek ilości końcowych grup fosforanowych, odszczepionych przez enzym, do całkowitej ilości fosforanu po kwaśnej hydrolizie (50).

Enzymem najczęściej używanym w badaniach nad strukturą kwasów nukleinowych jest alkaliczna fosfataza z *E. coli*. Enzym ten używany jest także do otrzymywania DNA znakowanego ^{32}P (schemat 4) oraz do lokalizowania przerw w łańcuchu kwasu dezoksyrybonukleinowego (schemat 5) (24, 64, 65, 66).

Badania swoistości substratowej, struktury centrum aktywnego, czynników hamujących i aktywujących kwaśne i alkaliczne fosfatazy mają na celu wyjaśnienie roli biologicznej tych enzymów. Ostatnio przypisuje się im udział nie tylko w katabolizmie, ale również w tworzeniu nowych nukleotydów (11, 12, 13) podczas przemiany kwasów nukleinowych.

LITERATURA

1. Abdul-Fadl M. A., King E. J., *Biochem. J.* **44**, 431 (1949).
2. Abdul-Fadl M. A., King E. J., *Biochem. J.* **44**, 434 (1949).
3. Abdul-Fadl M. A., King E. J., *Biochem. J.* **45**, 51 (1949).
4. Albers D., *Z. Physiol. Chem.* **261**, 43 (1939).
5. Albers H., Albers E., *Z. Physiol. Chem.* **232**, 165 (1935).
6. Arsenis CH., Touster O., *J. Biol. Chem.* **242**, 3399 (1967).
7. Atkinson M. R., Morton R. K., *Comparative Biochemistry*, red. M. Florin, H. S. Mason, Academic Press, New York 1960, t. 2. str. 1.
8. Axelrod B., *Advan. Enzymol.* **17**, 159 (1956).
9. Bauer E., Schäffner, Krumej F., *Z. Physiol. Chem.* **237**, 191 (1935).
10. Boer P., Strin E. P., Abstracts of VI FEBS Meeting, Praga 1968, Komunikat nr 222.
11. Brawerman G., Chargaff E., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2020 (1953).
12. Brawerman G., Chargaff E., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4114 (1953).
13. Brawerman G., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 524 (1955).
14. Brunngraber E. F., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* **242**, 4834 (1967).
15. Delory G. E., Hetherington M., *Can. J. Med. Sci.* **30**, 4 (1952).
16. DiPietro D. L., Zengerle F. S., *J. Biol. Chem.* **242**, 3391 (1967).
17. DiPietro D. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 1303 (1968).
18. Dorn G. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3500 (1968).
19. Dvorak H. F., Brockman R. W., Heppel L. A., *Biochemistry* **6**, 1743 (1967).
20. Eaton R. H., Moss D. W., *Biochem. J.* **104**, 67P (1967).
21. Fernley N. H., Walher P. G., *Biochem. J.* **104**, 1011 (1964).
22. Fernley N. H., Bisaz S., *Biochem. J.* **107**, 279 (1968).
23. Fishman N. H., Ghosh N. K., *Biochem. J.* **105**, 1163 (1967).
24. Fujimura R. K., Volkin E., *Biochemistry* **7**, 3488 (1968).
25. Garen A., Lewinthal C., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 470 (1960).
26. Georgatsos J. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 619 (1967).

27. Ghosh N. K., Fishman W. H., *Biochem. J.* **105**, 779 (1968).
28. Gutman E. B., Sproul E. E., Gutman A. B., *Am. J. Cancer* **28**, 485 (1936).
29. Heppel L. A., *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, t. 2, str. 530.
30. Heppel L. A., Harkness D. R., Hilmoe R. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 841 (1962).
31. Von Hofsten B., Porath J., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 1 (1962).
32. Hummel J. D., Kalnitsky G., *Annual Rev. Biochem.* **33**, 15 (1964).
33. Jeffrie G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 155 (1957).
34. Khyn I. X., Cohn W. E., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 9 (1961).
35. Koschland D. E., *Science* **142**, 1533 (1963).
36. Kuo M. H., Blumenthal H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 13 (1961).
37. Kuo M. H., Blumenthal H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 101 (1963).
38. London M., Wigler P., Hudson P. B., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 236 (1954).
39. Meyerhof O., Green H., *J. Biol. Chem.* **178**, 655 (1949).
40. Meyerhof O., Green H., *J. Biol. Chem.* **183**, 377 (1953).
41. Morton R. K., *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, t. 2, str. 533.
42. Neu H. C., Heppel L. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 3685 (1965).
43. Neumann H., *J. Biol. Chem.* **243**, 4671 (1968).
44. Neumann H., Boross L., Katchalski J., *J. Biol. Chem.* **234**, 3142 (1959).
45. Nigam V. N., Fishman W. H., *J. Biol. Chem.* **234**, 2394 (1959).
46. Nordlie R. C., Hanson T. L., Johns P. T., *J. Biol. Chem.* **242**, 4144 (1967).
47. Ogur M., Small J. D., *J. Biol. Chem.* **235**, PC 60 (1960).
48. Orłowski M., *Enzymologia Kliniczna*, red. E. Szczeklik. P.Z.W.L., Warszawa 1963, str. 262.
49. Ostrowski W., Tsugita A., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 68 (1961).
50. Privat de Garilhe M., *Les nucleases*, Hermann, Paryż 1964.
51. Reiner J. M., Tsuboi K. K., Hudson P. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 165 (1955).
52. Roche J., Thoai N. V., *Advan. Enzymol.* **10**, 83 (1950).
53. Rogers O., Reithel F. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 97 (1960).
54. Schlesinger S., Schlesinger M. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 3369 (1967).
55. Schmidt G., *Methods in Enzymology*, red. S. P. Kolowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, t. 2, str. 523.
56. Schmidt G., Cubiles R., Zölner N., Hecht L., Strichler N., Seraidarian K., Seraidarian M., Thannhauser S. J., *J. Biol. Chem.* **192**, 715 (1951).
57. Shay H., Siple H., *J. Lab. Clin. Med.* **43**, 741 (1954).
58. Staechelin M., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 219 (1964).
59. Sussman H. H., Laga E., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 281 (1968).
60. Suzuki U., Yoshimura Y., Takasumi M., *Tokyo Imp. Univ. Coll. Agric. Bull.* **7**, 503 (1907), cyt. na podstawie (48).
61. Tsuboi K. K., Hudson P. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **55**, 191 (1955).
62. Tunis M., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 257 (1960).
63. Volkin E., *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, t. 2, str. 539.

64. Weiss B., Jacqemin-Sablou A., Live R., Richardson C. C., *J. Biol. Chem.* **243**, 4543 (1968).
65. Weiss B., Live T. R., Richardson C. C., *J. Biol. Chem.* **243**, 4530 (1968).
66. Weiss B., Thompson A., Richardson C. C., *J. Biol. Chem.* **243**, 4556 (1968).
67. Whitfeld P. R., *Biochem. J.* **58**, 390 (1954).
68. Wilson J. B., Dayan J., Cyr K., *J. Biol. Chem.* **239**, 4182 (1964).
69. Yu Ch. T., Zamecnik P. C., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 148 (1960).

JÓZEF JANICKI *, JERZY WARCHALEWSKI **,
JANUSZ SKUPIN ***, JERZY KOWALCZYK **

Inhibitory trypsyny pochodzenia roślinnego

Trypsin Inhibitors of Plant Origin

Chemical and biological properties of inhibitors of trypsin and some other proteolytic enzymes from plant are reviewed. Their mechanism of action and role in animal nutrition are discussed.

W ostatnich 30 latach ukazało się wiele prac na temat białek wykazujących działanie antyproteolityczne, w szczególności zaś antytrypsynowe. Pierwszy obszerniejszy przegląd inhibitorów trypsyny opracowali w 1954 roku Laskowscy (102). Wprawdzie już przedtem ukazało się kilka publikacji (123, 128, 159), lecz omawiano w nich tylko niektóre problemy dotyczące tych inhibitorów. Równocześnie z artykułem Laskowskich, Green i Neurath (68) poruszyli niektóre aspekty aktywacji i hamowania proteolizy. W rok później Laskowski (101) podał sposoby otrzymywania kilku inhibitorów trypsyny. Wymienione prace charakteryzowały jednak głównie inhibitory pochodzenia zwierzęcego. Znacznie później ukazała się praca przeglądowa (138) zajmująca się wyłącznie inhibitorami trypsynowymi występującymi w roślinach.

Inhibitory trypsyny wyodrębnione z trzustki znalazły już zastosowanie w leczeniu między innymi skaz krwotocznych fibrynolitycznych i stanów zapalnych a zwłaszcza ostrej martwicy trzustki (124). Wielu autorów (4, 59, 131, 138) zwraca uwagę na znaczenie fizjologiczne jakie mogą mieć roślinne białka trypsynowe wobec pokaźnego udziału pokarmów roślinnych w żywieniu człowieka i zwierząt. Brak monografii z tego zakresu w literaturze polskiej skłania do podjęcia tego tematu.

I. Występowanie inhibitorów

Od czasu gdy Osborne i Mendel (131) wykazali korzystny wpływ podwyższonej temperatury na wartość odżywczą fasoli sojowej, podejmowano liczne próby identyfikacji czynnika lub czynników, które są szkodliwe i opóźniają wzrost zwierząt karmionych surową paszą roślinną.

* Prof. dr, Katedra Technologii Rolnej, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań

** Mgr, Katedra Technologii Rolnej, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań

*** Doc. dr, Katedra Technologii Rolnej, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań

Lepiej poznane sojowe inhibitory trypsyny

Nazwa Inhibitora	Właściwości fizyko-chemiczne	Uwagi	Literatura
Kryształiczny inhibitor Kunitza	<p>Z trypsyną tworzy kompleks w stosunku 1 : 1; działa kompetywnie; białko typu globuliny, pozbawione fosforu i węglowodanów, wytrąca się kwasem trójchlorooctowym, denaturuje przez ogrzewanie oraz traktowanie kwasem względnie zasadą tracąc aktywność antytrypsynową; hamuje również chymotrypsynę; przy <i>pH</i> 2 pepsyna wolno hydroлізуje go; p.i. * <i>pH</i> 4,5; c.c.z. 24 000 ± 3 000.</p>		94, 95, 96, 97
SBTI A ₁	<p>Tworzy z trypsyną kompleks w stosunku 1 : 1; N-końcowy aminokwas Asp lub Asp-NH₂; p.i. nieco poniżej <i>pH</i> 4,5; c.c.z. 14 300.</p>	Wszystkie 4 inhibitory uzyskano z frakcji albuminowej po chromatografii na DEAE-celulozie	142 143
SBTI A ₂	<p>Właściwości takie same jak kryształicznego inhibitora Kunitza</p>		140
SBTI B ₁	<p>Różnią się od dwu poprzednich oraz między sobą specyficzną aktywnością, szybkością sedimentacji, ruchliwością elektroforetyczną i zachowaniem się podczas chromatografii jonowymiennej</p>		141
SBTI B ₂			
AA.	<p>Wykazuje dwie niezależne od siebie aktywności antytrypsynową i antychymotrypsynową; odporny na ogrzewanie oraz na działanie kwasem względnie pepsyną przy <i>pH</i> 1,5 i temp. 37°; p.i. <i>pH</i> 4,2; c.c.z. 24 000.</p>	Oczyszczano go chromatograficznie na hydroksypatycie, DEAE- i CM-celulozie	14, 15, 16, 17, 18, 19
1,9 S	<p>Hamuje również działanie chymotrypsyny; zawiera ponad 19% cystyny a nie zawiera glicyny i cysteiny; c.c.z. 16 400.</p>	Wyodrębniono go w ilości preparatywnej obok drugiego inhibitora o właściwościach podobnych do kryształicznego inhibitora Kunitza	194
F ₁	<p>Nie tworzy stechiometrycznego kompleksu z trypsyną; ma znaczne działanie antychymotrypsynowe; zawiera tyrozynę; c.c.z. 18 300.</p>		
F ₂	<p>Podobny do kryształicznego inhibitora Kunitza</p>		
F ₃	<p>Nie tworzy stechiometrycznego kompleksu z trypsyną; nieznacznie hamuje chymotrypsynę; nie zawiera tyrozyny, posiada tryptofan i dużo mostków S-S; c.c.z. 23 400.</p>	Otrzymano je z handlowego preparatu sojowego inhibitora trypsyny po chromatografii na DEAE-celulozie	61

*punkt izoelektryczny

1. Inhibitory z soi (*Glycine max.*)

Z uwagi na dużą zawartość białka w tej roślinie (około 34%), szczególnie intensywnie badano jej inhibitory trypsynowe, mimo to jednak dotychczas nie ustalono ich ostatecznej liczby. Dokładniej scharakteryzowane inhibitory trypsyny z soi zestawiono w tabelicy 1.

Początkowo sądzono, że hamowanie przez krystaliczny inhibitor Kunitza jest typu kompetytywnego (28), później Green (67) wykazał jego niekompetytywny charakter podczas działania trypsyny na białkowe substraty, natomiast przy działaniu na syntetyczne substraty, które mają większe powinowactwo do trypsyny hamowanie miało charakter raczej kompetytywny.

Fratalli i Steiner (61) uszeregowali sojowe inhibitory trypsyny, opierając się na ich aktywności antytrypsynowej: F_2 , $SBTIA_2 = SBTIA_1 =$ oczyszczony inhibitor AA $= 1,9 S$ inhibitor $> F_1 > F_3$; oraz antychymotrypsynowej: $1,9 S$ inhibitor \geq oczyszczony inhibitor AA $\geq SBTIA_1 > F_2 > F_1 \geq F_3$. Birk i Waldman (20) badali rozmieszczenie inhibitorów trypsyny w soi i nie stwierdzili ich obecności w liściach, łodygach oraz pustych strączkach, natomiast zaobserwowali, że zawartość inhibitora w nasionach wzrastała wraz z dojrzewaniem. Poza cytowanymi ukazało się również kilka innych prac dotyczących sojowych czynników antytrypsynowych (1, 30, 32, 33, 60, 70, 129, 167, 173).

2. Inhibitory z innych roślin

Obok badań nad białkami sojowymi wykazującymi aktywność antytrypsynową, liczni badacze poszukiwali podobnych białek w wielu innych roślinach szczególnie ważnych z punktu widzenia żywieniowego. Stwierdzono ich występowanie w fasoli zwykłej (*P. vulgaris*) (25, 30, 31, 87, 137, 139, 167, 180, 181), złotej (*P. aureus*) (25, 38, 39, 40, 41, 76, 77, 183), limeńskiej (*P. lunatus*) (25, 55, 58, 72, 84, 85, 175), bobie (*Vicia faba*) (6, 7, 9, 62, 63, 160, 162, 166), grochu gołębim (*Cajanus cajan*) (176) oraz w zbożach (25, 66, 74, 100, 103, 104, 112, 134, 154, 155, 156), ziemniakach (*Solanum tuberosum*) (161, 165, 191), lucernie siewnej (*Medicago sativa*) (121, 145) i w innych roślinach (1, 25, 42, 66, 90, 109, 118, 153, 157, 163, 164, 178).

W tabelicy 2 podano te inhibitory trypsyny wyizolowane z wymienionych roślin, które zostały szczegółowiej zbadane.

Ostatnio Haynes i Feeney (72) wyodrębnili metodą chromatografii jonowymiennej z kilku odmian fasoli limeńskiej sześć inhibitorów o jednoczesnym działaniu antytrypsynowym i antychymotrypsynowym. Stosunki ilościowe pomiędzy tymi inhibitorami różniły się nieznacznie w zależności od odmiany fasoli. Badając bób podwójny i bobik Ambel i Sohonie (6, 7) stwierdzili, że inhibitory trypsyny występują we

Tablica 2

Lepiej poznane roślinne inhibitory trypsyny

Roślina	Właściwości fizyko-chemiczne	Uwagi	Literatura
Fasola zwykła	<p>Hamuje trypsynę i chymotrypsynę tworząc kompleks w stosunku 1:1; zawiera b. dużo cystyny i histydyny, mało waliny, nie zawiera cukrów; odporny na ogrzewanie w 90°; c. cz. 15 000 ± 800.</p> <p>1 cz. inhibitora blokuje 2 cz. trypsyny; zawiera: dużo cystyny (30 reszt/mol), mało metioniny (1 reszta/mol), nie zawiera tryptofanu i cysteiny; zawiera 2 cz. heksozy /1 cz. inhibitora; c. cz. 23 000.</p>	<p>Skład aminokwasowy podobny do inhibitora z fasoli limeskiej (58, 84, 82a)</p> <p>Obecności heksozy nie stwierdzono w innych inhibitorach wyodrębnionych z roślin</p>	<p>137,139</p> <p>181</p>
Fasola złota	<p>Blokuje trypsynę niekompetytywne w stosunku 1:1; nie wpływa na aktywność pepsyny i chymotrypsyny; odporny na ogrzewanie; c. cz. 18 000</p> <p>Tworzy z trypsyną kompleksy w stosunku 1:1 oraz 2:1; zawiera 4 mostki S-S/mol oraz 1 resztę tyrozyny, która jonizuje w pH 12; c.cz. w grantcach 8 100—12 000.</p>	<p>Stosowano metodę wyodrębnienia podobną do metody Kunitza (94,95)</p> <p>Składa się z dwu części A i B; Część A powstaje z części B w wyniku działania kw. trójchloroocetowego podczas wyodrębniania inhibitora</p>	<p>76, 77</p> <p>38, 39, 40, 41,183</p>
Fasola limeska	<p>Zawiera 16,5% cystyny, 5,4% histydyny a pozbawiony jest tryptofanu; jednorodny elektroforytycznie, stabilny w czasie gotowania, w miarę odporny na działanie kwasów, zasad, pepsyny i papainy; po redukcji traci zdolność hamowania; c.cz. 10 000.</p>	<p>Chromatograficznie rozdzielono na 4 jednorodne frakcje o c.cz. od 8 000 do 10 000 (84,85). Całkowicie zredukowane inhibitory ulegają działaniu hydrolicznemu trypsyny (55).</p>	<p>58</p>

Lepiej poznane roślinne inhibitory trypsyny

Roślina	Właściwości fizyko-chemiczne	Uwagi	Literatura
Bób	Krystaliczny, stabilny w czasie ogrzewania, hamuje również acetylotrypsynę, chymotrypsynę i papainę; c.cz. 23 000, p.i. <i>pH</i> 6,9.	Wydzielono go z bobu podwójnego	9, 160, 162, 166
Groch gołębí	Tworzy stechiometryczny kompleks z trypsyną; zawiera cukry, mało cystyny i metioniny a nie zawiera histydyny; wytrąca się 5% kw. trójchlorooctowym i 1,8M kw. nadchlorowym.	Otrzymano przez wytrącanie siarczanem amonu i acetonem	176
Pszemca	Zawiera cukry; nie wykazuje antychymotrypsynowego działania; nietrwały podczas ogrzewania, jednorodny po chromatografii i ultrawirowaniu.	Oczyszczono przez wytrącanie siarczanem amonu i kwasem trójchlorooctowym. Elektroforeza wykazała obecność drugiego związku w ilości ok. 1%. Nie występuje w otrębach i zarodku.	154, 155, 156
Kukurydza	1 µg inhibitora blokuje działanie proteolityczne 1,35 µg trypsyny; białko zasadowe nie zawiera cukrów; c. cz. od 19 500 do 21 190.	Wydrebniono z odtuszczonej śruty	74
Ziemniaki	Właściwości częściowo podobne do inhibitorów z fasoli; traci aktywność antytrypsynową po ogrzaniu.	Otrzymano w formie krystalicznej po wytrąceniu siarczanem amonu i kwasem trójchlorooctowym	161, 165

wszystkich częściach kiełkującego nasienia i rośliny, oraz we wszystkich stadiach wzrostu, przy czym aktywność antytrypsynowa w nasionach była wysoka, w korzeniach — niska, a w liściach i łodygach — pośrednia. Aktywność ta podczas postępującego kiełkowania zmniejszała się w liścieniach a wzrastała w pędach.

P o l a n o w s k i (134) zaobserwował, że wodny wyciąg z ziaren żyta nie ulega autolizie ani nie wykazuje aktywności proteolitycznej wobec kazeiny. Inhibitor trypsyny zawarty w tym wyciągu okazał się termolabilny, nierozpuszczalny w 5% kwasie trójchlorooctowym i 0,15 M kwasie sulfosalicylowym oraz wytrącał się taniną, co wskazuje na jego białkowy charakter. W obecności celulozy przy pH 4,5 wyciąg wodny tracił aktywność inhibitora a jednocześnie pojawiała się aktywność proteolityczna, co wskazywałoby na obecność w ziarnie żyta kompleksu enzym-inhibitor, dysocjującego przy pH 4,5. Burger i Siegelman (35) zanotowali obecność w jęczmieniu inhibitora BAPA-zy (substrat: α -N-benzilo-DL-arginino-p-nitroanilid). W ziemniakach oprócz opisanego w tabelicy 2 czynnika antytrypsynowego wykryto również inhibitor hamujący działanie trypsyny, α -chymotrypsyny i plazminy (191). Jest on dobrze rozpuszczalny w wodzie, 0,9% roztworze NaCl i roztworach buforowych, nie dializuje przez błony półprzepuszczalne, odznacza się dość znaczną termolabilnością oraz, jak większość białek, wykazuje maksimum absorpcji przy 280 nm.

Znacznie wcześniej B a a l s i R y a n (11, 148) wyodrębnili z ziemniaków, oczyścili i wykrystalizowali bardzo aktywny inhibitor chymotrypsyny, który tworzył stechiometryczny kompleks z enzymem, również otrzymany w postaci krystalicznej. Otrzymany przez tych autorów inhibitor był dostatecznie oporny na ogrzewanie w wodnym roztworze, zawierał bardzo mało węglowodanów i co należy podkreślić, w jego cząsteczce znaleziono kwas cysteinowy i jedną resztę sulfotlenku metioniny. Reagował on kompetytywnie z karboksypeptydazą B i hamował proteolityczne ale nie estrolityczne działanie trypsyny, a także silnie hamował proteazy pochodzące z grzybów oraz z *B. subtilis*, nie hamował natomiast aktywności pepsyny, karboksypeptydazy A, papainy, bromelainy i ficyny (147). W ziemniakach wykryto ponadto inhibitory proteazy bakteryjnej (184, 195) oraz inhibitor kalikreiny (186).

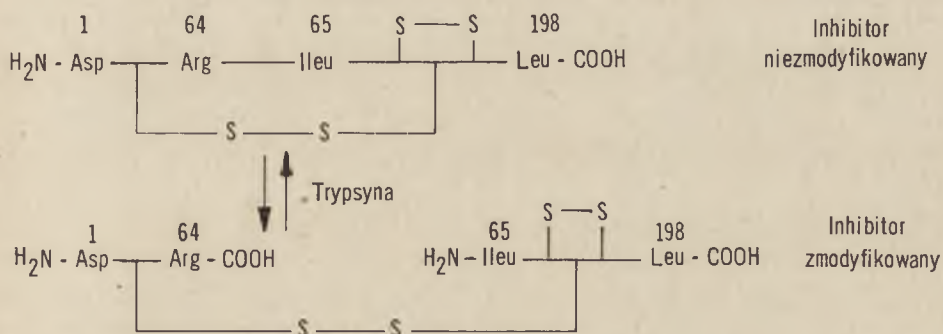
Być może istnieje jakieś powinowactwo pomiędzy tymi inhibitorami, ale jak dotąd nie jest to jeszcze ustalone.

II. Budowa i mechanizm działania niektórych inhibitorów

Jednym z lepiej poznanych inhibitorów jest krystaliczny inhibitor trypsyny wyodrębniony przez Kunitza z soi. Ustalono jego skład aminokwasowy (192), N-końcowy aminokwas — Asp lub Asp-NH₂ i C-końco-

wy aminokwas — Leu (46), sekwencję N-końcowego pięciopeptydu, którym okazał się Asp-Fen-Wal-Leu-Asp (78). Badano również jego skręcalność optyczną (81a, 82, 82a, 83, 83a, 84), właściwości sedymentacyjne, wykreślono krzywą miareczkowania potencjometrycznego (192), badano właściwości widma, fluorescencyjną polaryzację oraz zmiany w budowie inhibitora po denaturacji (51, 172, 193). Ponadto przebadano wpływ chemicznych modyfikacji niektórych reszt aminokwasowych na aktywność tego inhibitora (170, 171). Przez działanie 9 M mocznika lub pod wpływem redukcji inhibitor tracił około 30—40% swojej aktywności antytrypsynowej, a przez powolne utlenianie na powietrzu można było przywrócić aktywność utraconą wskutek redukcji (168, 169, 171a).

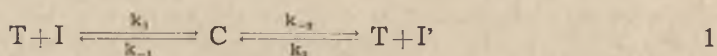
Ważnym etapem w zrozumieniu mechanizmu inhibicji było stwierdzenie przez Lebowitza i Laskowskiego (105), że podczas reakcji inhibitor trypsyny — trypsyna wyzwalają się protony, których uwalnianie się w pierwszej fazie reakcji inicjuje trypsyna, natomiast w drugiej następuje rozszczepienie się jednego wrażliwego wiązania w inhibitorze z jednoczesnym utworzeniem się kowalentnego wiązania, prawdopodobnie typu estrowego, pomiędzy aktywną serylową resztą trypsyny i nowo utworzonym C-końcowym aminokwasem inhibitora. To spostrzeżenie może wyjaśnić niezwykle silny charakter kompleksu utworzonego pomiędzy trypsyną i jej inhibitorem z soi (56). Następnie stwierdzono (132), że oczyszczony sojowy inhibitor trypsyny poddany 24-godzinnej inkubacji z roztworem trypsyny przy pH 3,75 ulega modyfikacji i w jego cząsteczce występują dwa N-końcowe aminokwasy — Asp lub Asp-NH₂ oraz Ileu. Karboksypeptydaza B uwalnia ze zmodyfikowanego inhibitora około 1 M argininy, podczas gdy przed modyfikacją nie uwalniała żadnego C-końcowego aminokwasu. Po redukcji i karboksymetylacji a następnie po chromatografii na żelu *Sephadex G-75* uzyskano dla niezmodyfikowanego inhibitora jeden szczyt, natomiast dla zmodyfikowanego — dwa oddzielne szczyty. Zawartość poszczególnych aminokwasów w niezmodyfikowanym



Schemat 1. Modyfikacja sojowego inhibitora trypsyny pod wpływem reakcji z trypsyną (według 132)

inhibitorze okazała się równa sumie ich zawartości w dwu szczytach uzyskanych z cząsteczki zmodyfikowanej trypsyną. Na podstawie tych badań *Ozawa i Laskowski* (132) doszli do wniosku, że modyfikacja inhibitora polega na przekształceniu jednego łańcucha w dwa łańcuchy powiązane ze sobą pojedynczym mostkiem S-S. Jest to wynik rozerwania pod wpływem trypsyny jednego wiązania pomiędzy 64 resztą argininy i 65 resztą izoleucyny (schemat 1).

Reakcję między trypsyną i sojowym inhibitorem trypsyny *Finckenstadt i Laskowski* (57) przedstawili wzorem (wzór 1), w którym T oznacza trypsynę, I inhibitor niezmodyfikowany, (Arg-Ileu, wiązanie nierozzerwane), I' inhibitor zmodyfikowany (Arg-Ileu, wiązanie rozerwane), C kompleks trypsyna-inhibitor.



Podzielili oni przebieg reakcji na 4 etapy. Pierwszy etap (k_1) polega na formowaniu się kompleksu inhibitor niezmodyfikowany — trypsyna; w drugim etapie (k_{-2}) inhibitor ulega modyfikacji przy udziale katalitycznej ilości trypsyny; trzeci etap (k_2) prowadzi do utworzenia kompleksu zmodyfikowanego inhibitora i trypsyny; natomiast w czwartym etapie (k_{-1}) istnieje możliwość szybkiej dysocjacji kompleksu do trypsyny i inhibitora niezmodyfikowanego na skutek gwałtownego obniżenia pH z 8 do 2.

Podobne badania jak *Ozawa i Laskowski* prowadzili *Birk i wsp.* (19) na sojowym inhibitorze trypsyny i α -chymotrypsyny oznaczonym jako inhibitor AA. Inhibitor ten nie traci aktywności podczas inkubacji z trypsyną przy pH 3,75 ale jego aktywne centrum prawdopodobnie ulega modyfikacji, bowiem działanie karboksypeptydazy B znacznie obniża zdolność hamowania trypsyny, przypuszczalnie na skutek odłączenia od inhibitora nowo utworzonej C-końcowej argininy lub lizyny. Inkubacja inhibitora AA w tych samych warunkach z α -chymotrypsyną powoduje zauważalne obniżenie jego działania hamującego α -chymotrypsynę. Prawdopodobnie zatem inhibitor AA ma dwa niezależne od siebie centra aktywności inhibitorowej — jedno dla trypsyny a drugie dla α -chymotrypsyny.

Podobnym mechanizmem działania do opisanego wcześniej (sojowego) inhibitora trypsyny (132) charakteryzuje się inhibitor wyodrębniony z kukurydzy przez *Hochstrassera i wsp.* (74). Jest on zbudowany z dwóch łańcuchów polipeptydowych połączonych ze sobą mostkiem S-S, przy czym jeden z łańcuchów składa się ze 155 a drugi z 49 reszt aminokwasowych. Próbując objaśnić istnienie w fasoli limeńskiej inhibitorów o jednoczesnym działaniu antytrypsynowym i antychymotrypsynowym, *Haynes i Feeney* (72) rozważają dwie możliwości: według pierwszej inhibitor składa się z dwu, nieco różniących się cząsteczek, z których jedna, główna, hamuje tylko trypsynę a druga wykazuje podwójną aktyw-

ność, lecz obie zachowują się jednakowo chromatograficznie i elektroforetycznie; według drugiej możliwości występuje tylko jedna cząsteczka, lecz o mniejszej aktywności antychymotrypsynowej. Chemiczna modyfikacja grup aminowych kwasem trójnitrobenzenosulfonowym, całkowicie znosi zdolność hamowania trypsyny przy jednoczesnym zachowaniu aktywności antychymotrypsynowej. Amidynacja grup aminowych także znacznie obniża aktywność antytrypsynową. Krytyczną dla aktywności inhibitora jest więc zapewne „szybko” reagująca ϵ -aminowa grupa lizyny. Dalsze badania H a y n e s a i wsp. (73) potwierdziły ich sugestie odnośnie kinetyki działania kilku badanych przez nich inhibitorów trypsyny.

III. Fizjologiczna i żywieniowa rola inhibitorów

Rola inhibitorów enzymów proteolitycznych w metabolizmie roślin nie jest jeszcze ostatecznie ustalona. Wydaje się jednak prawdopodobne, że inhibitory mogą odgrywać decydującą rolę w regulacji metabolizmu białek (7). Potwierdzają to badania wykazujące, że zawartość inhibitora w młodych i rosnących tkankach jest większa niż w starych (75). Ostatnie badania R y a n a i H u i s m a n a (149) sugerują, że wyodrębniony uprzednio przez nich chymotrypsynowy inhibitor I z ziemniaków jest syntetyzowany w liściach rośliny a następnie zostaje przemieszczony do tkanki twórczej, gdzie prawdopodobnie odbywa się szybka synteza białka. Inhibitory mogą również hamować enzymy proteolityczne w fazie dojrzewania ziarna przed stanem spoczynku. Zaobserwowane przez P o l a n o w s k i e g o (134) powinowactwo inhibitora do celulozy może, jego zdaniem, wskazywać na fizjologiczną rolę zbudowanych z celulozy ścian komórek w aktywowaniu kompleksu enzym-inhibitor. Podczas przechowywania ziarna pH jego spada z 6,5 do około 4, co może powodować dysocjowanie kompleksu enzym-inhibitor w czasie anabiozy. Wewnętrzne przemieszczanie związków ułatwia zwiększenie się zawartości wody w okresie wchłaniania i wówczas inhibitor dyfunduje w kierunku zewnętrznych warstw nasion, gdzie zostaje zaadsorbowany na celulozie okrywy nasiennej.

1. Blokowanie proteolizy

Zauważono, że częściowo oczyszczony inhibitor trypsyny kilkakrotnie zateżony, opóźnia wzrost kurcząt (71) i szczurów (92). Opóźnienie to można zniwelować przez dodanie do diety trypsyny (2,3), co wskazuje na zahamowanie proteolizy w górnej części jelita młodych kurcząt (5). Zapobieżenie hamowaniu zależy od wieku kurcząt i długości okresu skarmiania paszą z surowej soi (126). Treść jelita kurcząt karmionych surbwą mączką sojową albo białkiem zwierzęcym z dodatkiem inhibitora trypsyny oka-

zała się strawiona w mniejszym stopniu niż u kurcząt karmionych samym białkiem zwierzęcym lub mączką z nasion bawełny pozbawioną inhibitora (13). Wyniki te wskazywałyby, że opóźnianie wzrostu związane jest z zahamowaniem proteolizy przez inhibitory trypsyny zawarte w paszy, wskutek czego większa część białka pokarmowego nie może być wykorzystana i zostaje wydalona.

Poczyniono jednak również kilka obserwacji, które nie potwierdzają tej sugestii. Borchers i Ackerson (23) oraz Jaffe (79) nie znaleźli jakiegokolwiek zależności pomiędzy zawartością inhibitora trypsyny a wartością odżywczą dużej grupy roślin strączkowych. Preparat inhibitora trypsyny otrzymany przez Borchersa i wsp. (27) nie wpływał na wzrost szczurów i kurcząt. Również dodane do diety szczurów inhibitory trypsyny otrzymane z bobu i bobiku nie wpływały ujemnie na wzrost szczurów (9, 133, 162).

Znacznie później Jaffe i Vega Lette (81) obserwowali hamowanie wzrostu u szczurów i królików skarmianych kilkoma odmianami fasoli oraz soją. Wcześniejsze niepublikowane badania tych autorów wykazały jednak, że białka fasoli zwykłej są bardzo odporne na trawienie enzymatyczne i nie tracą zdolności hamowania różnych enzymów proteolitycznych nawet po usunięciu inhibitorów trypsyny. Jaffe i Vega Lette przypuszczają zatem, że zaobserwowane przez nich hamowanie wzrostu może być spowodowane małą podatnością na trawienie większości białek tych roślin, a także hamowaniem aktywności enzymów przez białka zawarte w tych roślinach, odmienne jednak od inhibitorów trypsyny. Według badań Lienera (108) nieoczyszczony inhibitor trypsyny już w małym stężeniu hamuje wzrost kurcząt i szczurów nawet wówczas, kiedy ponad 95% aktywności antytrypsynowej zniszczono przez działanie 0,1 N HCl w 55° przez 18 godz. Wyraźne opóźnienie wzrostu zaobserwowano również u zwierząt karmionych zhydrolizowanym białkiem albo mieszaniną aminokwasów z dodatkiem surowej mączki sojowej (48, 110, 187) lub inhibitora trypsyny otrzymanego z fasoli limeńskiej (93).

Nitsan i Bondi (127) wyjaśnili, że nie ma zahamowania proteolizy w jelitach szczurów i myszy, natomiast wyraźnie występuje ono u młodych kurcząt. Okazało się też, że dodanie trypsyny poprawia wartość odżywczą mączek sojowych nawet wówczas, kiedy dodawano zinaktywowaną lub zdenaturowaną przez ogrzanie trypsynę (24). Jednak Lipke i wsp. (111) a także Brambila i wsp. (34) donieśli, że dodawanie trypsyny do paszy nie przyspiesza wzrostu zwierząt doświadczalnych, karmionych surową mączką sojową.

Podsumowując wyniki omówionych badań oraz wykluczając obserwacje poczynione na młodych kurczętach, należy podać w wątpliwość pogląd, że główną przyczyną hamowania wzrostu zwierząt karmionych surowymi mączkami roślinnymi, zawierającymi inhibitory trypsyny, jest blokowanie

enzymów proteolitycznych. Ponieważ białka sojowe (53) oraz sojowy inhibitor trypsyny (88, 96) są trawione przez pepsynę w kwaśnym środowisku, a obecność sojowego inhibitora trypsyny przedłuża czas opróżnienia żołądka (47, 116) można przypuszczać, że ilość inhibitora przedostającego się do jelita jest niewielka. Zatem ilość trypsyny blokowanej przez inhibitor również nie może być duża, a straty te może szybko uzupełnić zwiększenie wydzielania enzymu z trzustki (152).

2. Stymulowanie wydzielania wewnętrznego

U kurcząt karmionych surową mączką sojową obserwuje się przerost trzustki (37a), a także zwiększenie wydzielania z niej enzymów proteolitycznych (114). Podobne zjawisko występuje również u szczurów (21). Obserwowane przerosty trzustki przypisuje się raczej hiperplacji niż hipertrofii organizmu (158). Są pewne dane, że przerost trzustki zależy od obecności inhibitorów trypsyny (69, 122). Haines i Lyman (69) sądzą, że przerost ten nie jest związany z zahamowaniem proteolizy a z jakimś innym działaniem inhibitora trypsyny.

Natomiast Rackis i wsp. (144) nie znaleźli żadnej korelacji pomiędzy przerostem trzustki a ilością podawanego inhibitora trypsyny, lecz zanotowali obecność w tak zwanej „serwatkowej” frakcji soi innego związku wywołującego ten efekt. Również Saxena i wsp. (151) stwierdzili, że przerost trzustki powodują nie inhibitory trypsyny a oporny na pepsynę i trypsynę czynnik zawarty w nierozpuszczalnej w wodzie frakcji nasion soi. Także Pubols i wsp. (136) wymieniają związek, który nie jest inhibitorem trypsyny a powoduje przerost trzustki. Niedawno okazało się też (64), że otrzymana z wyciągów „serwatki” sojowej frakcja zawierająca inhibitor trypsyny, w miarę oczyszczania traci zdolność powodowania przerostu trzustki, a krystaliczny preparat tego inhibitora wprawdzie hamuje wzrost zwierząt, ale nie ma żadnego wpływu na trzustkę. Creek i wsp. (45) zaobserwowali u kurcząt, że zastąpienie w diecie ziarn pszenicy w 30% albo 55,5% zmielonymi kielkami pszenicy hamuje wzrost tych zwierząt i powoduje przerost wątroby i trzustki. Substancja czynna jest rozpuszczalna w wodzie, termolabilna oraz znacznie obniża wykorzystanie białka i tłuszczu diety (43, 44). Natomiast u szczurów Olsen (130) nie obserwuje żadnego szkodliwego wpływu kielków pszenicznych.

Tak u szczurów jak i u kurcząt, karmionych surową mączką sojową lub mączką ogrzaną i wzbogaconą w inhibitor trypsyny, stwierdzono wysoki poziom niewchłoniętego azotu w jelitach (13, 113), mimo przerostu trzustki i zwiększonego wydzielania enzymów proteolitycznych (114). Straty azotu wiązano jednak właśnie ze zwiększonym wydzielaniem białek z trzustki a nie z hamowaniem proteolizy w jelitach (113, 115).

K h a y a m b a s h i i L y m a n (91) doszli do wniosku, że inhibitor trypsyny może uwalniać jakiś hormonalny czynnik pobudzający wydzielanie z trzustki, jednak próby obliczenia strat spowodowanych zwiększonym wewnętrznym wydzielaniem azotu białkowego do światła jelita, nie potwierdzają cytowanych wyżej poglądów (99, 106, 107, 113).

3. Wpływ na metabolizm białkowy

D r o r i G e r t l e r (50) stwierdzili u kurcząt i szczurów, że karmienie nieogrzaną mączką sojową jako źródłem białka obniża aktywność dehydrogenazy ksantynowej, oksydazy ksantynowej i aminotransferazy asparaginowej w wątrobie oraz arginazy w wątrobie i nerkach w porównaniu ze zwierzętami karmionymi mączką ogrzaną. Autorzy ci przypuszczają, że inhibitory sojowe hamują biosyntezę tych enzymów lub białek w ogóle. Są pewne dane, że inhibitory trypsyny stymulują przemianę metioniny do cystyny i wbudowywanie tej ostatniej w białka.

C a r r o l l i w s p . (36) zauważyli, że jelita szczurów karmionych surową mączką sojową zawierały nienaturalnie dużą ilość mostków dwusiarczkowych w białkach. K w o n g i B a r n e s (98) przedstawiają dane wskazujące, że u szczurów dodatek krystalicznego inhibitora trypsyny do diety wzmacnia przemianę metioniny w cystynę, oraz zwiększa ilość związanej cystyny w trzustce głównie wbudowanej w białka trzustki (12).

4. Inne działanie przypisywane inhibitorom

S a m b e t h i w s p . (150) rozdzielili na *DEAE*-celulozie „serwatkę” sojową na 4 frakcje. Wszystkie frakcje miały aktywność antytrypsynową, natomiast tylko jedna z nich wykazywała aktywność hemoaglutyninową i toksyczność śródtrzewną przy podawaniu jej szczurom. Podawane kurczętom jako pasza frakcje wywoływały w sposób zróżnicowany przerost trzustki i skurczenie woreczka żółciowego przy czym te, które najsilniej wpływały na trzustkę jednocześnie najsilniej działały też na woreczek żółciowy. Skurcz woreczka żółciowego S a m b e t h i w s p . przypisywali zmniejszonej ilości żółci, co występuje też przy stałym karmieniu kurcząt nieogrzaną soją. Ponadto zaobserwowano, że inhibitory trypsyny są wiązane przez plazminę (125), hamują elastazę (10, 182) i inne endopeptydazy (177), działają antyfibrynolitycznie (146, 190), przeciwzapalnie (118), przedłużają czas koagulacji (8), uniemożliwiają tworzenie się trombin (65, 86, 117, 120, 174) oraz wpływają na wchłanianie tłuszczów (122, 150).

IV. Uwagi końcowe

Obecnie znanych jest w soi przynajmniej 8 związków hamujących trypsynę. F r a t t a l i i S t e i n e r (61) przypuszczają, że wykrycie takiej dużej liczby różniących się między sobą inhibitorów może być wynikiem

heterogeniczności genetycznej surowca wyjściowego używanego przez różnych badaczy (16, 141, 194). W większości prac omówionych w tym artykule badano najlepiej poznany sojowy krystaliczny inhibitor Kunitza. Wielu badaczy (4, 59, 119, 131) potwierdziło korzystny wpływ ogrzewania na wartość biologiczną surowych pokarmów roślinnych a po ustaleniu, że istnieje zależność odwrotnie proporcjonalna między wartością odżywcza białka a ilością zawartego w nim inhibitora trypsyny, zalecano uwzględnianie tego czynnika przy ocenie jakości artykułów spożywczych i paszowych (26, 179, 188). Jednakże badania porównawcze wartości odżywczej surowych i ogrzanych pasz ze skiełkowanej soi (48, 49, 54) oraz z innych roślin strączkowych (37) częściowo podważają to kryterium oceny pasz. Rola inhibitorów trypsyny w tłumieniu wzrostu zwierząt doświadczalnych zapewne nie polega głównie na blokowaniu proteolizy w jelicie. Większość badań żywieniowych, szczególnie wcześniejszych, prowadzono na zaledwie częściowo oczyszczonych preparatach inhibitorów lub na mączkach roślinnych, co mogło prowadzić do mylnych wniosków tym bardziej, że niektóre handlowe preparaty krystalicznego inhibitora trypsyny z soi zawierają, jak się okazało (143), do 50% zanieczyszczeń. Ponadto wyizolowane z różnych roślin inhibitory trypsyny, poza cechami wspólnymi jak budowa białkowa i mostki dwusiarczkowe, w dużym stopniu różniły się składem aminokwasowym czy wrażliwością na ogrzewanie. Wreszcie należy pamiętać, że w nieogrzewanych roślinach strączkowych znaleziono także inne związki toksyczne (22, 29, 80, 109, 135, 150, 185, 189). Wszystko to może tłumaczyć sprzeczne wyniki niektórych prób żywieniowych. Zastosowanie dokładniejszych i czulszych metod oczyszczania i oznaczania inhibitorów (52) rokuje nadzieje wyjaśnienia pewnych rozbieżności. Do uporządkowania obrazu w tej dziedzinie przyczyni się też zarówno stwierdzenie, że rodzaj i wiek zwierząt doświadczalnych bardzo istotnie rzutują na uzyskiwane wyniki (5, 127) jak i bardziej precyzyjna systematyka i definicje różnych typów hamowania enzymów, zaproponowane przez Keletiego i Telegdiego (89).

LITERATURA

1. Abramowa E. P., Cernikov M. P., *Wopr. Pit.* 23, z. 4, 13 (1964).
2. Almquist H. J., Merritt J. B., *Arch. Biochem. Biophys.* 35, 352 (1952).
3. Almquist H. J., Merritt J. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 83, 269 (1953).
4. Altschul A. M., Lyman C. M., Thurber F. H., *Processed Plant Protein Foodstuffs*, Academic Press, New York 1958.
5. Alumot E., Nitsan Z., *J. Nutrition* 73, 71 (1961).
6. Ambe K. S., Sohonie K., *Experientia* 12, 302 (1956).
7. Ambe K. S., Sohonie K., *J. Sci. Industr. Res.* 15C, 136 (1956).

8. Andreenko G. V., Kudryashov B. A., *Wopr. Med. Chim.* 7, 513 (1961).
9. Apte U., Sohonie K., *J. Sci. Industr. Res.* 16C, 225 (1957).
10. Bagdy D., Falk M., Tolnay P., *Acta Physiol. Hung.* 21, 123 (1962).
11. Balls A. K., Ryan C. A., *J. Biol. Chem.* 238, 2976 (1963).
12. Barnes R. H., Kwong E., *J. Nutrition* 86, 245 (1965).
13. Bielorai R., Bondi A., *J. Sci. Food Agric.* 14, 124 (1963).
14. Birk Y., *Biochim. Biophys. Acta* 54, 378 (1961).
15. Birk Y., Abstr. 3rd Meeting Fed. European Biochem. Soc. F. 1966 str. 231.
16. Birk Y., Gertler A., Khalef S., *Biochem. J.* 87, 281 (1963).
17. Birk Y., Gertler A., Khalef S., *Biochim. Biophys. Acta* 67, 326 (1963).
18. Birk Y., Gertler A., Khalef S., *Biochim. Biophys. Acta* 147, 402 (1967).
19. Birk Y., Gertler A., Khalef S., *Israel J. Chem.* 5, 130 (1967).
20. Birk Y., Waldman M., *Qual. Plant. Materiae Vegetabiles* 12, 199 (1965).
21. Booth A. N., Robbins D. J., Ribelin W. E., DeEds F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 104, 681 (1960).
22. Borchers R., *Federation Proc.* 24, 1494 (1965).
23. Borchers R., Ackerson C. W., *J. Nutrition* 41, 339 (1950).
24. Borchers R., Ackerson C. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 78, 81 (1951).
25. Borchers R., Ackerson C. W., Kimmett L., *Arch. Biochem. Biophys.* 13, 291 (1947).
26. Borchers R., Ackerson C. W., Mussehl F. E., *Poultry Sci.* 27, 601 (1948).
27. Borchers R., Ackerson C. W., Mussehl F. E., Moehl A., *Arch. Biochem. Biophys.* 19, 317 (1948).
28. Borchers R., Ackerson C. W., Sandstedt R. M., *Arch. Biochem. Biophys.* 12, 367 (1947).
29. Bouthilet R. J., Hunter W. L., Luhman C. A., Ambrose D., Lepkovsky S., *Poultry Sci.* 29, 837 (1950).
30. Bowman D. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 57, 139 (1944).
31. Bowman D. E., *Science* 102, 358 (1945).
32. Bowman D. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 63, 547 (1946).
33. Bowman D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* 16, 109 (1948).
34. Brambila S., Nesheim M. C., Hill F. W., *J. Nutrition* 75, 13 (1961).
35. Burger W. C., Siegelman H. W., *Physiol. Plantarum* 19, 1089 (1966).
36. Carroll R. W., Hensley G. W., Sittler C. L., Wilcox E. L., Graham W. R., (Jr.), *Arch. Biochem. Biophys.* 45, 260 (1953).
37. Chattopadhyay H., Banerjee S., *Indian J. Med. Res.* 41, 185 (1953).
- 37a. Chernick S. S., Lepkovsky S., Chaikoff I. L., *Am. J. Physiol.* 155, 33 (1948).
38. Chou Y. T., Chi C. W., *Acta Biochim. Sin.* 5, 199 (1965).
39. Chu H. M., Chi C. W., *Acta Biochim. Sin.* 3, 229 (1963).
40. Chu H. M., Chi C. W., *Acta Biochim. Sin.* 5, 519 (1965).
41. Chu H. M., Sant-o S., Jen M. H., Chi C. W., Tsao T. C., *Acta Biochim. Sin.* 4, 588 (1964).
42. Couch J. R., Creger C. R., Bakshi Y. K., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 123, 263 (1966).
43. Creek R. D., Vasaitis V., *Poultry Sci.* 41, 1351 (1962).
44. Creek R. D., Vasaitis V., Pollard W. O., Schumeier G., *Poultry Sci.* 41, 901 (1962).

45. Creek R. D., Vasaitis V., Schumaier G., *Poultry Sci.* **40**, 822 (1961).
46. Davie E. W., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **212**, 507 (1955).
47. De Muelenaere H. J. H., *J. Nutrition* **32**, 197 (1964).
48. Desikachar H. S. R., De S. S., *Science* **106**, 421 (1947).
49. Desikachar H. S. R., De S. S., *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 285 (1950).
50. Dror Y., Gertler A., *J. Nutrition* **93**, 401 (1967).
51. Edeldoeh H., Steiner R. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 931 (1963).
52. Eldridge A. C., Anderson R. L., Wolf W. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 495 (1966).
53. Evans R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **11**, 15 (1946).
54. Everson G. J., Steenbock H., Cederquist D. C., Parsons H. T., *J. Nutrition* **27**, 225 (1944).
55. Ferdinand W., Moore S., Stein W. H., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 524 (1965).
56. Finkenstadt W. R., Laskowski M. (Jr.), *J. Biol. Chem.* **240**, PC 962 (1965).
57. Finkenstadt W. R., Laskowski M. (Jr.), *J. Biol. Chem.* **242**, 771 (1967).
58. Fraenkel-Conrat H., Bean R. C., Ducay E. D., Olcott H. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **37**, 393 (1952).
59. Frampton V. I., *Nutritional Evaluation of Food Processing*, red. R. S. Harris, H. von Loesecke, John Wiley and Sons, 1960.
60. Franek F., *Coll. Czech. Chem. Comm.* **24**, 1734 (1959).
61. Frattali V., Steiner R. F., *Biochemistry* **7**, 521 (1968).
62. Gaitonde M. K., Sohonie K., *Current Sci. India* **20**, 217 (1951).
63. Gaitonde M. K., Sohonie K., *J. Sci. Industr. Res.* **11**, B, 339 (1952).
64. Garlich J. D., Nesheim M. C., *J. Nutrition* **88**, 100 (1966).
65. Glazko A. J., *J. Clin. Invest.* **26**, 364 (1947).
66. Gontea I., Gardev M., *Comm. Acad. Rep. Populare Romine* **8**, 723 (1958).
67. Green N. M., *J. Biol. Chem.* **205**, 535 (1953).
68. Green N. M., Neurath H., w *The Proteins* red. N. Neurath, K. Bailey, Academic Press, New York 1954, tom II, str. 1057.
69. Haines P. C., Lyman R. L., *J. Nutrition* **74**, 445 (1961).
70. Ham W. E., Sandstedt R. M., *J. Biol. Chem.* **154**, 505 (1944).
71. Ham W. E., Sandstedt R. M., Mussehl F. E., *J. Biol. Chem.* **161**, 635 (1945).
72. Haynes R., Feeney R. E., *J. Biol. Chem.* **242**, 5378 (1967).
73. Haynes R., Osuga D. T., Feeney R. E., *Biochemistry* **6**, 541 (1967).
74. Hochstrasser K., Muss M., Werle E., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 1337 (1967).
75. Honavar P. M., Sohonie K., *Chem. Abstr.* **51**, 10669 (1957).
76. Honavar P. M., Sohonie K., *Ann. Biochem. Exptl. Med.* **19**, 57 (1959).
77. Honavar P. M., Sohonie K., *J. Sci. Industr. Res.* **18** C, 202 (1959).
78. Ikenaka T., Shimada K., Matsushima Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 193 (1963).
79. Jaffe W. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **75**, 219 (1950).
80. Jaffe W. G., *Experientia* **18**, 76 (1962).
81. Jaffe W. G., Vega Lette C. L., *J. Nutrition* **94**, 203 (1968).
- 81a. Jirgensons B., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 532 (1959).
82. Jirgensons B., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 235 (1958).

- 82a. Jirgensons B., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 59 (1961).
83. Jirgensons B., *J. Biol. Chem.* **240**, 1064 (1965).
- 83a. Jirgensons B., *Makromol. Chem.* **51**, 137 (1962).
84. Jirgensons B., Ikenaka T., Gorguraki V., *Makromol. Chem.* **39**, 149 (1960).
85. Jones G., Moore S., Stein W. H., *Biochemistry* **2**, 66 (1963).
86. Kagan L. J., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **45**, 604 (1964).
87. Kakade M. L., Evans R. J., *J. Agric. Food Chem.* **13**, 450 (1965).
88. Kassel B., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **219**, 203 (1956).
89. Keleti T., Telegdi M., *Enzymologia* **31**, 39 (1966).
90. Kendall K. A., *J. Dairy Sci.* **34**, 499 (1951).
91. Khayambashi H., Lyman R. L., *Federation Proc.* **25**, 2750 (1966).
92. Klose A. A., Hill B., Fevold H. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **62**, 10 (1946).
93. Klose A. A., Greaves J. D., Fevold H. L., *Science* **108**, 88 (1948).
94. Kunitz M., *Science* **101**, 668 (1945).
95. Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **29**, 149 (1946).
96. Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **30**, 291 (1947).
97. Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **30**, 311 (1947).
98. Kwong E., Barnes R. H., *J. Nutrition* **81**, 392 (1963).
99. Kwong E., Barnes R. H., Fiala G., *J. Nutrition* **77**, 312 (1962).
100. Laporte P., Trémolières J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **156**, 1261 (1962).
101. Laskowski M. w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, t. 2, str. 36.
102. Laskowski M., Laskowski M. (Jr.), w *Advances in Protein Chemistry* red. M. L. Anson, K. Bailey, J. T. Edsall, Academic Press, New York 1954, t. 9, str. 203.
103. Learmonth E. M., Wood J. C., *Chem. Industr.* str. 1569 1960.
104. Learmonth E. M., Wood J. C., *Cereal Chem.* **40**, 61 (1963).
105. Lebowitz J., Laskowski M. (Jr.), *Biochemistry* **1**, 1044 (1962).
106. Lepkovsky S., Bingham E., Pencharz R., *Poultry Sci.* **38**, 1289 (1959).
107. Lepkovsky S., Furuta F., Koike T., Hasegawa N., Dimick M. K., Krause K., Barnes F. J., *Brit. J. Nutrition* **19**, 41 (1965).
108. Liener I. E., *J. Biol. Chem.* **193**, 183 (1951).
109. Liener I. E., *Am. J. Clin. Nutrition* **11**, 281 (1962).
110. Liener I. E., Deuel H. J. (Jr.), Fevold H. L., *J. Nutrition* **39**, 325 (1949).
111. Lipke H., Fraenkel G. S., Liener I. E., *J. Agric. Food Chem.* **2**, 410 (1954).
112. Lorenc-Kubis I., VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Sympozjum Międzynarod. Biosynteza Białek, Olsztyn 25—27 lipiec 1968 — Streszczenie s. 76.
113. Lyman R. L., *J. Nutrition* **62**, 285 (1957).
114. Lyman R. L., Lepkovsky S., *J. Nutrition* **62**, 269 (1957).
115. Lyman R. L., Wilcox S. S., Monsen E. R., *Am. J. Physiol.* **202**, 1077 (1962).
116. Lyman R. L., Wilcox S. S., *J. Nutrition* **79**, 28 (1963).
117. MacFarlane R. G., *J. Physiol.* **106**, 104 (1947).
118. Mansfeld V., Rybák M., Horáková Z., Hladovec J., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **318**, 6 (1960).
119. Mickelsen O., Yang M. G., *Federation Proc.* **25**, 104 (1966).

120. Milstone J. H., *J. Gen. Physiol.* **38**, 757 (1955).
121. Mooijman J. G. J. M., *Dissertation Abstr.* **25**, 4339 (1965).
122. Nesheim M. C., Garlich J. D., Hopkins D. T., *J. Nutrition* **78**, 89 (1962).
123. Neurath H., Schwert G. W., *Chem. Rev.* **46**, 69 (1950).
124. Niewiarowski S., *Enzymy w Biologii i Medycynie*, PZWL Warszawa 1965.
125. Nissen U., Astrup T., *Federation Proc.* **25**, 30 (1966).
126. Nitsan Z., Alumot E., *J. Nutrition* **84**, 179 (1964).
127. Nitsan Z., Bondi A., *Brit. J. Nutrition* **19**, 177 (1965).
128. Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R. H., *Crystalline Enzymes* 2-nd ed. Columbia University Press, New York.
129. Obara T., Kimura M., *J. Food Sci.* **32**, 531 (1967).
130. Olsen E. M., *Can. J. Biochem.* **45**, 1673 (1967).
131. Osborne T. B., Mendel L. B., *J. Biol. Chem.* **32**, 369 (1917).
132. Ozawa K., Laskowski M. (Jr.), *J. Biol. Chem.* **241**, 3955 (1966).
133. Phadke K., Sohonie K., *J. Sci. Industr. Res.* **21C**, 272 (1962).
134. Polanowski A., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 389 (1967).
135. Potter G. C., Kummerow F. A., *Science* **120**, 224 (1954).
136. Pubols M. H., Saxena H. C., McGinnis J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **117**, 713(1964).
137. Pusztai A., *Biochem. J.* **101**, 379 (1966).
138. Pusztai A., *Nutrition Abstr. Revs.* **37**, 1 (1967).
139. Pusztai A., *Eur. J. Biochem.* **5**, 252 (1968).
140. Rackis J. J., Proc. Seed Protein Conf., New Orleans, 1963 str. 98.
141. Rackis J. J., Anderson R. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 230 (1964).
142. Rackis J. J., Sasame H. A., Anderson R. L., Smith A. K., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 6265 (1959).
143. Rackis J. J., Sasame H. A., Mann R. K., Anderson R. L., Smith A. K., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 471 (1962).
144. Rackis J. J., Smith A. K., Nash A. M., Robbins D. J., Booth A. N., *Cereal Chem.* **40**, 531 (1963).
145. Ramirez J. S., Mitchell H. L., *J. Agric. Food Chem.* **8**, 393 (1960).
146. Rush B. (Jr.), Clifton E. E., *Am. J. Physiol.* **166**, 485 (1951).
147. Ryan C. A., *Biochemistry* **5**, 1592 (1966).
148. Ryan C. A., Balls A. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1839 (1962).
149. Ryan C. A., Huisman Q. C., *Nature* **214**, 1047 (1967).
150. Sambeth W., Nesheim M. C., Serafin J. A., *J. Nutrition* **92**, 479 (1967).
151. Saxena H. C., Jensen L. S., McGinnis J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 101 (1963).
152. Scow R. O., *Endocrinology* **60**, 359 (1957).
153. Shain Y., Mayer A. M., *Physiol. Plantarum* **18**, 853 (1965).
154. Shyamala G., Kennedy B. M., *J. Am. Dietetic Assoc.* **41**, 115 (1962).
155. Shyamala G., Kennedy B. M., Lyman R. L., *Nature* **192**, 360 (1961).
156. Shyamala G., Lyman R. L., *Can. J. Biochem.* **42**, 1825 (1964).
157. Siddappa G. S., *J. Sci. Industr.* **16C**, 199 (1957).
158. Singh J., Schaible P. J., Zindel H. C., Ringer R. K., *Quart. Bull. Michigan Agric. Exptl. Stat.* **47**, 17 (1964).
159. Smith E. L. w The Enzymes red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, Academic Press, New York 1951, tom I, str. 793.

160. Sohonie K., Ambe K. S., *Nature* **175**, 508 (1955).
161. Sohonie K., Ambe K. S., *Nature* **176**, 972 (1955).
162. Sohonie K., Apte U., Ambe K. S., *J. Sci. Industr. Res.* **17C**, 42 (1958).
163. Sohonie K., Bhandarkar A. P., *J. Sci. Industr. Res.* **13B**, 500 (1954).
164. Sohonie K., Bhandarkar A. P., *J. Sci. Industr. Res.* **14C**, 500 (1955).
165. Sohonie K., Honavar P. M., *Sci. Culture (India)* **21**, 538 (1956).
166. Sohonie K., Huprikar S. V., Joshi M. R., *J. Sci. Industr. Res.* **18C** 95 (1959).
167. Stead R. H., De Muelenaere H. J. H., Quicke G. V., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 703 (1966).
168. Steiner R. F., *Nature* **204**, 579 (1964).
169. Steiner R. F., *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 111 (1965).
170. Steiner R. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 257 (1966).
171. Steiner R. F., *Biochemistry* **5**, 1964 (1966).
- 171a. Steiner R. F., De Lorenzo F., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **240**, 4648 (1965).
172. Steiner R. F., Edeldoch H., *J. Biol. Chem.* **238**, 925 (1963).
173. Szilágyi S., *Acta Biol. Debrecina* **3**, 117 (1965).
174. Tagnon H. J., Soulier J. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **61**, 440 (1946).
175. Tauber H., Kershaw B. B., Wright R. D., *J. Biol. Chem.* **179**, 1155 (1949).
176. Tawde S., *Ann. Biochem. Exptl. Med.* **21**, 359 (1961).
177. Tolnay P., Abstr. 3-rd Meeting Fed. Eur. Biochem. Soc., **F**, 232 (1966).
178. Ubatuba F. B., *Rev. Brasil. Biol.* **15**, 1 (1955).
179. Van Buren J. P., Steinkraus K. H., Hackler L. R., ElRawi I., Hand D. B., *J. Agric. Food Chem.* **12**, 524 (1964).
180. Wagh P. V., Klaustermeier D. F., Waibel P. E., Liner I. E., *J. Nutrition* **80**, 191 (1963).
181. Wagner L. P., Riehm I. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 672 (1967).
182. Walford R. L., Kickhöfen B., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 191 (1962).
183. Wang K., Chi C. W., Tsao T. C., *Acta Biochim. Sin.* **5**, 510 (1965).
184. Watanabe K., Yoshikawa M., Nonoquchi Y., Kondo K., *Nippon Nōgei-Kagaku Kaishi* **32**, 260 (1958).
185. Weaver J. M., *Federation Proc.* **14**, 301 (1955).
186. Werle E., Appel W., Happ E., *Z. Vitamin-Hormon-Fermentforsch.* **10**, 127 (1959).
187. Westfall R. J., Bosshardt D. K., Barnes R. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **68**, 498 (1948).
188. Westfall R. J., Hauge S. M., *J. Nutrition* **35**, 379 (1948).
189. Wilgus H. S. (Jr.), Gassner F. X., Patton A. R., Gustavson R. G., *J. Nutrition* **22**, 43 (1941).
190. Winterstein A., Straessle R., *Proc. 18-th Internat. Congr. Haematol., Tokyo* **3**, 1708 (1960) — publ. 1962.
191. Worowski K., VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Sympozjum Międzynarodowe Biosynteza Białek, Olsztyn 25—27 lipiec 1968, streszczenie str. 75.
192. Wu Y. V., Scheraga H. A., *Biochemistry* **1**, 698 (1962).
193. Wu Y. V., Scheraga H. A., *Biochemistry* **1**, 905 (1962).
194. Yamamoto M., Ikenaka T., *J. Biochem.* **62**, 141 (1967).
195. Yoshikawa M., Kiyohara T., Ito K., *Hyogo Noka Daigaku Kenkyu Hokoku, Nōgei-Kagaku Hen* **6**, 35 (1963).

ESTERA KRAJEWSKA *

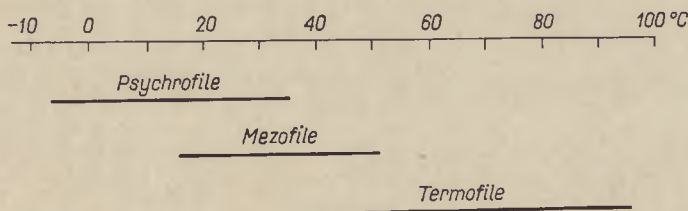
Układ biosyntezy białka u bakterii termo- i psychrofilnych

Protein-Synthesizing Systems of Thermophilic and Psychrophilic Bacteria

The characteristics of protein synthesizing systems of thermophilic and psychrophilic bacteria are described. Data concerning thermal stability of the systems' components in aspect of the growth temperature ranges of the organisms are discussed.

Temperatura jest jednym z najważniejszych czynników środowiskowych, kontrolujących wzrost i aktywność organizmów. Na naszym globie bakterie rozwijają się w zakresie temperatur od $-7,5^{\circ}$ do ponad 90°C (8, 22, 36, 38, 59, 68). Jednak określony szczep zdolny jest do aktywnego wzrostu tylko w przedziale około 30°C . W zależności od wymagań temperaturowych przyjęto dzielić bakterie (jak i w ogóle mikroorganizmy) na trzy zasadnicze grupy: termo-, mezo- i psychrofilne (schemat 1). Mimo pewnej umowności powyższego podziału, pozostaje faktem bezspornym, że mikroorganizmy psychrofilne zdolne są do wzrostu i reprodukcji w temperaturach bliskich 0°C , zaś bakterie termofilne w temperaturach powyżej 55° , w jakich nie mogą się rozwijać żadne inne mikro- i makroorganizmy (z wyjątkiem termofilnych sinic). Dla wielu przebadanych szczepów termofilnych tak wysoka temperatura środowiska jest niezbędna do rozwoju (8, 22, 36, 59).

Na temat występowania, ekologii, fizjologii i biochemii bakterii termo- i psychrofilnych istnieje obszerna literatura. W ciągu ostatnich lat po-



Schemat 1. Podział bakterii na psychrofilne, mezofilne i termofilne w zależności od zakresu temperatury wzrostu

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

jawiło się sporo opracowań monograficznych i przeglądowych (8, 22, 23, 27, 36, 38, 39, 68).

Zdolność do wzrostu w określonym przedziale temperatur jest dziedzicznie utrwaloną cechą, która tylko w nieznacznym stopniu ulega zmianom (8, 23, 36). Można zatem przypuszczać, że przynależność danego szczepu bakteryjnego do grupy termo-, mezo- czy psychrofilnej określają właściwości któregoś z zasadniczych układów w komórce, na przykład układu syntetyzującego białka. Co więcej, można mniemać, że istnieje korelacja między przedziałem temperatur, w jakich rośnie szczep bakteryjny, a wrażliwością na inaktywację cieplną makrocząsteczek wchodzących w skład tegoż układu, tj. kwasów nukleinowych i wielu białek enzymatycznych.

Wrażliwość na denaturację termiczną substruktur komórkowych i makrocząsteczek biologicznie aktywnych można badać dwójako: 1) śledząc zależność własności fizycznych od temperatury, 2) badając wpływ szoku temperaturowego na aktywność biologiczną.

Różnice w wymaganiach temperaturowych omawianych grup bakterii nie są duże i wykluczają możliwość termicznego rozerwania wiązań kowalencyjnych, a więc niszczenia struktury pierwszorzędowej kwasów nukleinowych i białek. W grę zatem wchodzi indukowane przez temperaturę zmiany konformacyjne, które mogą prowadzić do całkowitej czy częściowej utraty sprawności funkcjonalnej systemu lub tylko pewnych jego elementów.

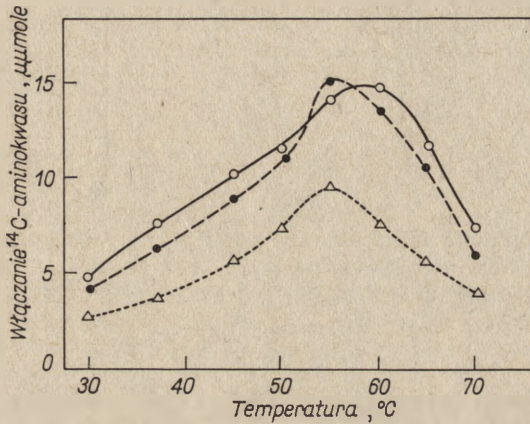
Termicznej destrukcji struktury drugorzędowej kwasu nukleinowego towarzyszy wzrost absorpcji w bliskim nadfiolecie, co łatwo można śledzić spektrofotometrycznie. Temperaturę (T_m), w której przyrost absorpcji stanowi połowę całkowitego jej przyrostu, przyjęto za miernik trwałości konformacji tego związku. W myśl powszechnie przyjętego modelu struktura drugorzędowa kwasu nukleinowego uwarunkowana jest głównie występowaniem wiązań wodorowych między parami zasad: guaniną i cytozyną (G-C) oraz adeniną i tyminą (A-T) w kwasie dezoksyrybonukleinowym, a adeniną i uracylem (A-U) w kwasie rybonukleinowym. Ponieważ energetycznie bogatsza jest para G-C, zachodzi korelacja między opornością preparatu kwasu nukleinowego na denaturację cieplną a zawartością w nim par G-C. Stwierdziło to wielu autorów dla syntetycznych i naturalnych kwasów dezoksy- i rybonukleinowych (24, 26, 57).

I. Bezkomórkowe układy syntetyzujące białka

Badania nad biosyntezą białka u bakterii termo- i psychrofilnych prowadzono głównie w układach bezkomórkowych, otrzymanych w zasadzie według metody opracowanej dla *E. coli* (45, 60 70).

1. Układ z bakterii termofilnych

Bezkomórkowy układ syntetyzujący białka otrzymali z bakterii termofilnej *B. stearothermophilus* 2184 Friedman i Weinstein (31). Układ ten włączał sprawnie znakowane ^{14}C aminokwasy: fenyloalaninę, lizynę i prolinę w zakresie temperatur 30—70°, mimo że szczep nie jest zdolny do wzrostu w 37°. Optimum temperatury dla tych reakcji wynosi 55—60°, a włączanie przy 65° było zawsze większe niż przy 37° (rysunek 1).

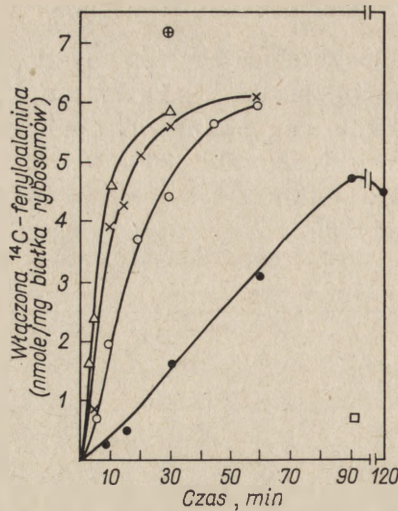


Rys. 1. Endogenne włączanie fenyloalaniny (•), proliny (o) i lizyny (Δ) przez frakcję S-30, (otrzymaną po wirowaniu homogenatu z *B. stearothermophilus* przy 30 000 g) jako funkcja temperatury
Czas inkubacji 20 min. (wg 31)

W równoległe prowadzonych doświadczeniach system bezkomórkowy z *E. coli* włączał w 65° zaledwie 12% ilości włączanej w 37°. Pod wpływem syntetycznej matrycy poliU, układ termofilny działał przy 37° równie efektywnie jak przy 65° (31). Analogiczne wyniki uzyskali Algranati i Lengyel (1) dla otrzymanego z innej bakterii termofilnej układu pracującego z syntetycznymi homo- i kopolimerami jako matrycami.

2. Układ z bakterii psychrofilnych

Bezkomórkowy układ syntetyzujący białka wyodrębnili z psychrofilnej bakterii *Pseudomonas* sp. 412 Krajewska i Szer (43). Szczep ten rośnie w zakresie temperatur 0—31°C (optimum około 24°). Otrzymany układ syntetyzował aktywnie polifenyloalaninę pod wpływem poliU w temperaturach od 0° do 45°. Porównanie z układem *E. coli* B wykazało duże podobieństwo aktywności obu systemów *in vitro* w zakresie 25—45°. Jednak przy 9—10° układ z *E. coli* włączał jedynie około 10% ilości fenyloalaniny włączanej przy 37° (rysunek 2), zaś w pobliżu 0° nie funkcjonował wcale. Bezkomórkowy układ z *Pseudomonas* sp. 412 syntetyzo-



Rys. 2. Kinetyka włączania feniloalaniny pod wpływem poli U przez system bezkomórkowy z *Pseudomonas* sp. 412: (·) 9°, 7.6 mM Mg²⁺; (o) 25°, 12.5 mM Mg²⁺; (x) 37°, 14 mM Mg²⁺; (Δ) 45°, 18 mM Mg²⁺

W celu porównania podano wyniki dla systemu bezkomórkowego z *E. coli*: (⊕) 37°, 14 mM Mg²⁺; (□) 9°, 7.6 mM Mg²⁺; (wg 43)

wał białko pod wpływem naturalnego mRNA z faga lepiej w 35° niż w 25° (91).

Inny psychrofilny szczep, *Micrococcus cryophilus* ATCC 15174, nie był jednak zdolny do syntezy białka powyżej 25°, tj. powyżej maksymalnej temperatury wzrostu tego organizmu ani *in vivo*, ani *in vitro*. Jak się okazało, powyżej 25° zachodzi inaktywacja trzech enzymów aktywujących aminokwasy oraz nieodwracalna denaturacja tRNA swoistego dla kwasu glutaminowego (51, 51a).

Jak widać z powyższego zależność między zakresem temperatur, w jakich rośnie organizm, a zakresem temperatur, w jakim jest aktywny układ syntetyzujący białko *in vitro*, nie układa się prosto i jednoznacznie. W szczególności układ ten nie jest czynnikiem ograniczającym minimalną temperaturę wzrostu u badanych szczepów termofilnych i nie zawsze jest czynnikiem limitującym maksymalną temperaturę wzrostu u bakterii psychrofilnych.

Wydaje się zatem celowe porównanie poszczególnych elementów wchodzących w skład układu oraz ogniw procesu syntezy białka.

II. DNA i synteza mRNA

Wprawdzie kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) bezpośrednio nie wchodzi w skład układu syntetyzującego białko, ale ze względu na determinującą rolę tego związku w syntezie białka wydaje się rzeczą celową uwzględnienie go w tym przeglądzie. Przypuszczenie, że istnieje korelacja między przedziałem temperatur, w jakim szczep rośnie, a termostabil-

nością jego DNA nie zostało potwierdzone (5, 53, 56, 81, 100). Preparaty DNA termofilnych fagów nie wykazują wyższej zawartości G-C ani też nie dysocjują w wyższych temperaturach, niż preparaty DNA z fagów mezofilnych (11, 81, 101). Z drugiej strony wiadomo, że preparaty DNA bakterii przynależnych do różnych grup taksonomicznych różnią się znacznie zawartością par G-C, a zatem i wartościami T_m (35, 58). Ponadto wartości T_m dla preparatów DNA o zawartości zaledwie 25% par G-C (oznaczone w buforach osmotycznie zbliżonych do płynów ustrojowych) przekraczają 80° (58). A zatem temperatury, przy których zachodzi denaturacja cieplna DNA, przewyższają znacznie temperatury wymagane przez większość organizmów dla wzrostu.

Na temat transkrypcji DNA na informacyjny kwas rybonukleinowy (mRNA) u bakterii termo- i psychrofilnych istnieją pewne pośrednie informacje. Saunders i Campbell (80) wyodrębnili mRNA z *B. stearotherophilus* szczep 10 po pulsowym (30 sekund) znakowaniu za pomocą ^{32}P . Skład nukleotydomowy tego RNA odpowiada komplementarnemu składowi nukleotydomowemu DNA. Bubela i Holdsworth (9) śledzili zanik radioaktywności w szybko znakującym się RNA (a więc najprawdopodobniej w mRNA) u *B. stearotherophilus* i u *E. coli*. U termofilnej bakterii proces ten przebiega podobnie w 63° i w 40° i jest 5—6 razy szybszy niż u *E. coli* w 40°. Malcolm (51) u psychrofilnej bakterii *Micrococcus cryophilus* zaobserwował, że znakowana trytem urydyna włącza się do szybko znakującego się RNA w 30°, tj. w temperaturze przewyższającej maksymalną temperaturę wzrostu szczepu, bardzo podobnie jak w temperaturze optymalnej (20°) dla jego wzrostu. Autor wyciągnął stąd wniosek, że komponenty uczestniczące w syntezie RNA zależnej od DNA nie są termolabilne i że proces transkrypcji nie ogranicza w temperaturach powyżej 25° wydolności układu syntetyzującego białko u tego organizmu.

Ostatnio Remold-O'Donnell i Zillig (78) wydzielili i częściowo oczyścili zależną od DNA polimerazę RNA z trzech szczepów *B. stearotherophilus*. Własności fizyczne i biologiczne enzymu u wszystkich tych szczepów okazały się w zasadzie bardzo podobne do własności enzymu wydzielonego w tej samej pracowni z *E. coli* (32, 99). Jednak preparaty enzymatyczne z bakterii termofilnych wykazywały większą oporność na denaturację cieplną niż preparat z *E. coli* (78).

III. RNA rozpuszczalny i synteza aminoacylo-tRNA

1. Własności fizyczne i chemiczne sRNA

Preparat sRNA z *B. stearotherophilus* daje w ultrawirówce jedno pasmo o stałej sedymentacji 4S (5, 31, 53). Skład czterech głównych zasad oznaczono dla niefrakcjonowanych sRNA z bakterii termofilnych (53, 80), oraz z psychrofilnego szczepu *Pseudomonas sp.* 412 (42). W tablicy 1

przedstawiono przykładowo dane dla przedstawicieli termo-, mezo- i psychrofilnych bakterii. Zwraca uwagę duże podobieństwo danych, co jest tym bardziej godne uwagi, że stosowane były różne techniki badawcze.

W sRNA z *E. coli* znaleziono stosunkowo dużo tzw. nietypowych zasad (19). W sRNA z bakterii termofilnych pseudourydyna stanowi około 10% urydyny (53), a u *E. coli* około 14% (19), natomiast ilość 4-tiouracylu jest taka sama (Lipsett, wg 27).

Podobieństwo składu nukleotydowego odzwierciedla podobieństwo profili denaturacji cieplnej preparatów sRNA z bakterii termo- i mezofilnych (5, 31, 42, 53, 80) oraz mezo- i psychrofilnych (42). Również efekt hyperchromowy jest bardzo podobny dla wszystkich preparatów niefrakcjonowanego sRNA. Grzanie do około 90° powoduje wzrost absorpcji o około 30%.

Dane powyższe odnoszą się do sRNA, a więc stanowią wartości średnie dla wszystkich cząsteczek tRNA. Wiadomo jednak, że u *E. coli* swoiste tRNA, specyficzne dla określonych aminokwasów, mają odmienny skład nukleotydowy (49, 71). Również profile denaturacji cieplnej preparatów tRNA specyficznych różnią się między sobą, a także odbiegają od krzywej topnienia niefrakcjonowanego sRNA (49, 71).

Poza jednym doniesieniem o wyjątkowej termolabilności tRNA swoistego dla kwasu glutaminowego u *Micrococcus cryophilus* (51) nie ma danych o specyficznych tRNA bakterii termo- i psychrofilnych.

2. Syntetazy aminoacylo-tRNA

Wielu autorów stwierdziło, że enzymy z bakterii termofilnych, warunkujące aktywację aminokwasów i przyłączenie ich do swoistych tRNA, wykazują wyższe optima temperaturowe niż enzymy z *E. coli*. Dotyczy to syntetaz: izoleucylo-tRNA (5), leucylo-tRNA (31, 97), fenyloalanylo-tRNA (31), walilo-tRNA (25). Enzymy z termofilnych bakterii przyłączają aminokwasy zarówno do sRNA termofilnego jak i do sRNA z *E. coli*. Ponieważ enzymy z *E. coli* nie działają w temperaturach optymalnych dla preparatów termofilnych, prawdopodobnie wysokie optimum tych reakcji (55—65°) jest funkcją termofilności enzymów (5, 25, 31).

Natomiast B u b e l a i H o l d s w o r t h (10) zaobserwowali, że reakcje aktywacji aminokwasów i wytworzenia kompleksu leucylo-tRNA u nieoznaczonego szczepu *B. stearothermophilus* przebiegają wolno do 35—40°, a z największą szybkością w 60°. Preparat enzymatyczny ogrzewany 10 minut w 60° traci około 50% aktywności, zaś frakcja związana z błoną cytoplazmatyczną po ogrzewaniu 20 minut w 65° — tylko 20% aktywności. Autorzy sądzą zatem, że enzym *per se* nie jest termostabilny, a jego wysokie optimum temperaturowe może być wynikiem stabilizującego wpływu błony. Ponieważ zaobserwowano dużą szybkość przemiany

Tablica 1

Skład nukleotydydowy niefrakcjonowanego sRNA (mole na 100 moli sumy czterech nukleotydydów)

	sRNA termofilny		sRNA mezofilny		sRNA psychrofilny <i>Pseudomonas</i> sp. 412 (wg 42)
	<i>B. stearothermophilus</i> (wg 53)	<i>B. stearothermophilus</i> (wg 80)	<i>E. coli</i> (wg 19)	<i>B. subtilis</i> (wg 67)	
A	20,5	18,7	20,3	18,5	18,8
G	31,5	31,7	32,1	32,9	33,4
C	26,5	30,5	28,9	25,8	25,7
U*	21,1	18,9	18,3	22,8	22,1
G+C	58,0	62,3	61,9	58,7	59,1
A+G/C+U	1,09	1,02	1,11	1,07	1,09
A+C/G+U	0,90	0,97	0,98	- 0,80	0,80

* łącznie z kwasami pseudourydylowym i rybotymidylowym

białek i kwasów nukleinowych u tego szczepu, wysokie optimum temperatururowe enzymu mogłoby także być uwarunkowane jego szybką re-syntezą (9).

Krajewska i Szer (43) stwierdzili, że syntetaza fenyloalanylo-tRNA z psychrofilnego szczepu *Pseudomonas* sp. 412 nie ulega inaktywacji w 45°, tj. w temperaturze o 15° wyższej niż maksymalna temperatura wzrostu tej bakterii. Również pozostałe syntetazy aminoacylo-tRNA z tego szczepu są *in vitro* bardziej aktywne w temperaturze o 5° wyższej od maksymalnej temperatury wzrostu, niż w temperaturze bliskiej optymalnej dla wzrostu (25°C) (91).

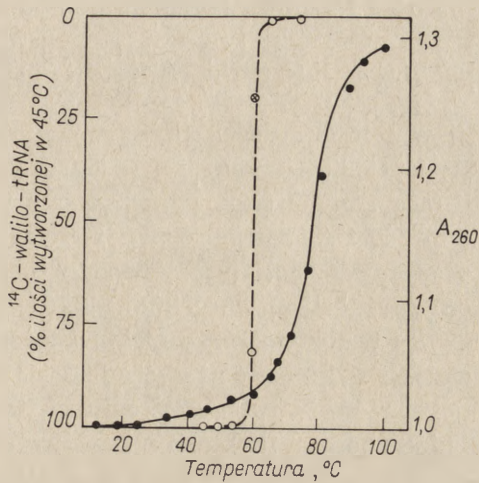
Psychrofilny szczep *Micrococcus cryophilus* ma termolabilne syntetazy aminoacylo-tRNA specyficzne dla kwasu glutaminowego i proliny (w słabszym stopniu też dla histydyny), ulegające inaktywacji w temperaturach powyżej 25° (51, 51a). Inaktywacja cieplna tych enzymów ujawnia się zarówno na etapie aktywacji aminokwasów, jak i przyłączenia ich do tRNA. Natomiast proces transportu kompleksów aminoacylo-tRNA i dalsza reakcja polimeryzacji aminokwasów nie są wrażliwe na stosowane szoki temperatururowe. Preinkubacja w ciągu 1 godziny w 30° nie ma istotnego wpływu na aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA swoistych dla wszystkich pozostałych aminokwasów u tego szczepu (51, 51a).

3. Znaczenie natywnej konformacji tRNA

Zachowanie natywnej konformacji cząsteczek tRNA jest prawdopodobnie warunkiem koniecznym dla wytworzenia kompleksu aminoacylo-tRNA. Świadczą o tym następujące spostrzeżenia. Arcà i wsp. (5) stwierdzili, że w nieoczyszczonych ekstraktach z *B. stearothermophilus* B synteza izoleucylo-tRNA była gwałtownie hamowana przy 80°, podczas gdy reakcja aktywacji aminokwasu zachodziła sprawnie nawet przy 85°. Ponieważ preinkubacja przez 10 minut w 80° nie wpływała w sposób istotny na późniejszy przebieg reakcji w 50°, zahamowania syntezy izoleucylo-tRNA w 80° nie można tłumaczyć denaturacją enzymu czy sRNA. Zaobserwowano jednak, że powyżej 75° sRNA wykazywał około 50% efektu hyperchromowego (5).

Fresco i wsp. (25) w układzie zawierającym enzym specyficzny dla waliny z termofilnego *B. coagulans* i niefrakcjonowany sRNA z *E. coli* zaobserwowali całkowite zahamowanie syntezy walilo-tRNA powyżej 55°, mimo że aktywacja aminokwasu przebiegała sprawnie aż do 75°. Żadnej zmiany nie zaobserwowano po ponownym dodaniu enzymu do układu w 60°. Dopiero obniżenie temperatury przywracało całkowicie zdolność układu do wytwarzania kompleksu walilo-tRNA. Krzywa denaturacji cieplnej niefrakcjonowanego sRNA z *E. coli* wykazywała w temperaturze 55—60° zaledwie 10% utratę całkowitego efektu hyperchromowego (ry-

sunek 3). Ponieważ enzym wytwarzał kompleks z sRNA bakterii termofilnych w 65°, autorzy przypuszczają, że enzym „rozpoznaje” tylko natywną formę tRNA (25).



Rys. 3. Synteza kompleksu walilo-tRNA (o) i względna absorpcja przy 260 nm (●) niefrakcjonowanego sRNA jako funkcja temperatury

Wszędzie 1 mM waliny; ⊕ 0.1 mM (wg 25)

Malcolm (51a) zaobserwował utratę 75% wyjściowej aktywności akceptorowej tRNA specyficznego dla kwasu glutaminowego i 50% tRNA specyficznego dla proliny u psychrofilnego *Micrococcus cryophilus* w wyniku ogrzewania przez 10 minut w 30°, chociaż profil denaturacji cieplnej niefrakcjonowanego sRNA w standartowym buforze nie wykazywał zmian do 45°. Zjawisko to występowało tylko w układach zawierających homologiczne syntetazy aminocylo-tRNA. Natomiast w układach heterologicznych, zawierających sRNA z bakterii psychrofilnej i enzymy z bakterii mezo- i termofilnej, preinkubacja sRNA w 30° nie miała wpływu na wytworzenie kompleksów glutamilo-tRNA i prolilo-tRNA. Zatem nieznaczne zmiany konformacyjne, które mogły zajść w trakcie preinkubacji sRNA w 30°, uniemożliwiły ich estryfikację z aktywowanymi aminokwasami wyłącznie przez enzymy z bakterii psychrofilnej, ale pozwoliły na „rozpoznanie” ich przez odpowiednie enzymy z innych źródeł. Świadczy to, że pojęcie „natywnej konformacji” bynajmniej nie jest jednoznaczne fizjologicznie (51a).

Brakiem omawianych prac jest to, że autorzy używali niefrakcjonowanych preparatów sRNA. Stąd niezupełna zgodność wyników. Dopiero praca z homogennymi preparatami swoistych tRNA może dać bezsporną odpowiedź: 1) czy i do jakiego stopnia zachowanie natywnej struktury drugo- i trzeciorzędowej jest konieczne do wytworzenia kompleksu aminocylo-tRNA i 2) czy preparaty specyficznych tRNA różnią się wrażli-

wością na denaturację cieplną w zależności od tego, czy zostały wydzielone z bakterii termo-, mezo- lub psychrofilnych.

IV. Rybosomy i synteza łańcucha peptydowego

1. Charakterystyka rybosomów

Widma absorpcji w temperaturach pokojowych rybosomów bakterii termofilnych (53, 87) i psychrofilnych (42) są bardzo podobne do profili rybosomów bakterii mezofilnych (96); wykazują one minimum przy 235, maksimum przy około 260 i spadek absorpcji powyżej 300 nm.

Podobnie jak rybosomy *E. coli* (96) rybosomy bakterii termofilnych (31, 53, 87) i rybosomy bakterii psychrofilnej (43, 91) mają współczynnik sedymentacji około 70S i w roztworach o niskim stężeniu Mg^{2+} dysocjują na podjednostki o stałych sedymentacji około 50S i 30S.

Istnieje wiele spostrzeżeń, że rybosomy bakterii termofilnych są bardziej termostabilne niż rybosomy bakterii mezofilnych. McLaughlin i wsp. (61) zaobserwowali, iż ogrzewanie w 70° nie miało istotnego wpływu na profile sedymentacji rybosomów bakterii termofilnych; rybosomy *E. coli* zaś wykazywały trwałość tylko do 55°.

Wielu autorów stwierdziło, że rybosomy bakterii termofilnych ulegają degradacji termicznej w wyższych temperaturach, a zatem wykazują wyższe wartości T_m , niż rybosomy szczepów mezofilnych w tych samych buforach (5, 28, 53, 61, 76, 80, 88). Co więcej, rybosomy *B. stearothermophilus* otrzymane z bakterii hodowanych w 65° były bardziej trwałe niż rybosomy z komórek hodowanych w 37° (88).

Natomiast wrażliwość na denaturację termiczną rybosomów z bakterii psychrofilnych różniła się bądź nieznacznie od wrażliwości rybosomów bakterii mezofilnych (76), bądź też nie różniła się wcale (42, 43). Badania porównawcze podjednostek rybosomalnych *Pseudomonas sp.* 412 i *E. coli* B dały bardzo podobne profile denaturacji cieplnej i niemal identyczne wartości T_m (42).

Większa termostabilność rybosomów bakterii termofilnych może być zdeterminowana przez: a) bardziej stabilną strukturę RNA, b) bardziej trwałe białka, c) obecność dodatkowego czynnika stabilizującego (53).

2. RNA rybosomowy (rRNA)

Zawartość procentowa RNA w rybosomach bakterii termofilnych (28, 53, 87) jest zbliżona do zawartości RNA w rybosomach bakterii mezofilnych (37, 96). Analiza sedymentacyjna rRNA wykazała obecność dwóch komponent o stałych sedymentacji 16S i 21S (53) lub 16S i 23S (31, 80). Wirowanie w gradiencie sacharozy rRNA natychmiast po otrzymaniu dało dwa szczyty odpowiadające cząsteczkom o stałych sedymentacji 16S

Tabela 2

Skład nukleotydowy rybosomalnego RNA (mole na 100 moli sumy czterech nukleotydów)

(wg 53)	rRNA termofilny		rRNA mezofilny			rRNA psychrofilny		
	<i>B. stearothermophilus</i> (wg 53)	<i>B. stearothermophilus</i> (wg 86) ^a	<i>E. coli</i> (wg 85)	<i>E. coli</i> (wg 17)	<i>B. subtilis</i> (wg 63)	<i>V. marinus</i> (wg 76)	7E-3 (wg 76)	<i>Pseudomonas</i> sp. 412 (wg 41)
A	25,9	26,1	25,0	23,4	25,9	26,2	25,3	24,8
G	34,5	34,6	31,5	32,9	31,0	30,8	29,0	32,0
C	22,1	25,2	22,1	22,2	22,3	21,1	21,0	20,9
U*	17,5	14,2	21,4	21,5	20,8	21,9	24,7	22,3
G+C	56,6	59,8	53,6	55,1	53,3	51,9	50,0	52,9
A+G/C+U	1,53	1,54	1,30	1,29	1,32	1,33	1,19	1,31
A+C/G+U	0,92	1,05	0,89	0,84	0,93	0,90	0,86	0,84

* wyłącznie z kwasem pseudouridylowym, ^a średnio dla 3-ch szczepów, ^b średnio dla 5-ciu szczepów, ^c średnio dla 2-ch szczepów

i 23S w stosunku 1 : 1,6 (28). Dane te nie różnią się zatem od wyników uzyskanych dla *E. coli* (44).

Skład nukleotydowy rybosomowego RNA został oznaczony dla bakterii termofilnych (53, 76, 80) i dla bakterii psychrofilnych (41, 76). Niektóre dane przedstawione są w tablicy 2.

Przeciwnie niż w wypadku sRNA, występują tu pewne różnice między preparatami pochodzącymi od różnych grup. W szczególności zawartość G-C w rRNA bakterii termofilnych jest większa niż w preparatach bakterii mezo- i psychrofilnych.

Wielu autorów stwierdziło, że wartości T_m dla rRNA bakterii termofilnych są wyższe niż wartości T_m dla analogicznych preparatów bakterii mezofilnych (5, 28, 53, 76, 86). Jest to zrozumiałe, gdyż wyższe wartości T_m odzwierciedlają większy udział par G-C w preparatach termofilnego rRNA (53, 76, 80, 86). Preparaty termofilnego rRNA były też mniej wrażliwe na denaturacyjne działanie wysokich stężeń mocznika (5, 53, 86).

Celem wyeliminowania ewentualnych różnic, mogących wynikać z przynależności badanych bakterii do odległych grup systematycznych, Stenesh i Holazo (86) porównali rRNA trzech szczepów termofilnych i trzech szczepów mezofilnych z rodzaju *Bacillus*. Uzyskane wartości T_m wynosiły średnio: $69,7^\circ$ dla termofili i $64,6^\circ$ dla mezofili, a frakcja G-C stanowiła odpowiednio 59,8% i 55,1% sumy czterech głównych zasad. Dla wyjaśnienia tych wyników autorzy przyjmują hipotezę Coxa (16), że na drugorzędową strukturę RNA składają się dwa rodzaje odcinków spiralnych, zawierających różny odsetek par G-C, a zatem „topiących się” w różnych temperaturach. Dla rRNA z *E. coli* Cox obliczył, że pierwszy rodzaj segmentów zawiera około 50% G-C i dysocjuje do 55° , drugi zaś zawiera około 67% G-C i dysocjuje powyżej 55° . Stenesh i Holazo (86) sądzą zatem, że rRNA bakterii termofilnych zawiera więcej tych drugich segmentów.

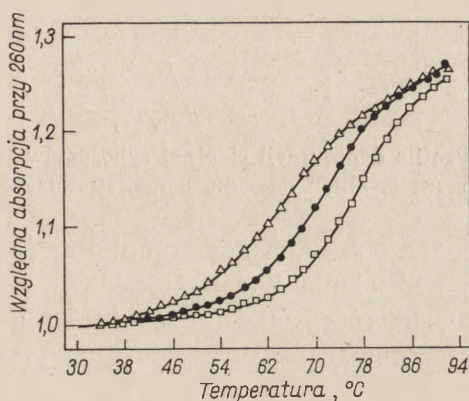
Elektroforeza i chromatografia preparatów rRNA trawionych rybonukleazą trzustkową dały bardzo zbliżone wyniki u termo- i mezofili (86). Mogłoby to wskazywać na podobieństwo sekwencji nukleotydów, które mogą się jednak różnić względną częstotliwością występowania (86).

Pace i Campbell (76) przebadali 19 szczepów bakteryjnych, których maksymalne temperatury wzrostu zmieniały się od 18 do 73° . Zmianom tym towarzyszył na ogół wzrost wartości T_m rybosomów od 69° do 79° , jak też wzrost zawartości G-C w preparatach rybosomowego RNA od 50% do 59%.

Podany skład nukleotydów rRNA psychrofilnego *Pseudomonas sp.* 412 o zawartości około 53% G-C (41) jest zbliżony do uzyskanych przez innych autorów dla preparatów rRNA szczepów mezofilnych (17, 53,

63, 64, 76, 85, 86). Również profile denaturacji cieplnej i wartości T_m tego preparatu (41) są zbliżone do analogicznych wyników dla preparatów mezofilnych (53, 76, 86).

Proces denaturacji cieplnej rRNA przebiega stopniowo i w przedziale od 20 do 90° wykazuje 25—30% efekt hyperchromowy (41, 76, 82, 86). Rysunek 4 przedstawia profile denaturacji termicznej preparatów rRNA z bakterii termo-, mezo- i psychrofilnych.



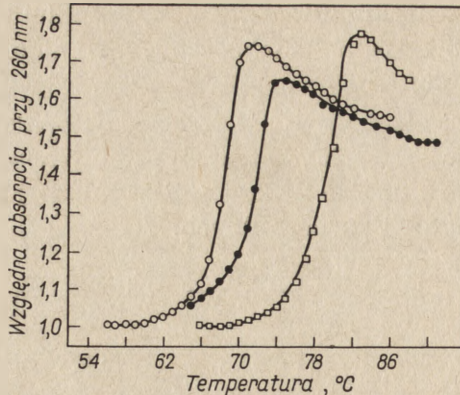
Rys. 4. Profile denaturacji cieplnej RNA rybosomowego (wg 76)

(Δ) *Vibro marinus* 15381 (psychrofil), (\bullet) *Spirillum itersonii* SI-1 (mezoofil), (\square) *B. stearothermophilus* (termofil)

3. Białka rybosomów

Denaturacja termiczna rybosomów zachodzi w wyższych temperaturach niż denaturacja odpowiednich preparatów rRNA. Toteż wartości T_m rybosomów są wyższe niż wartości T_m preparatów rRNA w tych samych roztworach (28, 42, 53). Odmiennie wyniki otrzymano dla rybosomów i rRNA *E. coli* w buforze bez Mg^{2+} (28) i z Mg^{2+} (82). Denaturacja rybosomów zachodzi w stosunkowo wąskim przedziale temperatur, przebiega gwałtownie, co sugeruje, że mamy do czynienia z procesem kooperacyjnym. Efekt hyperchromowy podczas denaturacji cieplnej rybosomów jest znacznie większy niż podczas denaturacji samego rRNA. Na rysunku 5 przedstawiono przykładowo profile denaturacji cieplnej rybosomów bakterii termo-, mezo- i psychrofilnych.

Ponieważ denaturacja termiczna rybosomów jest procesem nieodwracalnym, trudno powiedzieć, dlaczego przebiega ona inaczej niż denaturacja RNA rybosomów. Elson (21) tłumaczy większy efekt hyperchromowy aktywnością rybonukleazy uwalnianej w miarę degradacji rybosomów. Wielu autorów dopatruje się w ostrości przebiegu procesu denaturacji cieplnej rybosomów stabilizującego wpływu białek rybosomal-



Rys. 5. Profile denaturacji cieplnej rybosomów (wg 76)

(○) 7E-3 (psychrofil), (●) *E. coli* B (mezofil), (□) *B. stearothermophilus* (termofil)

nych (53, 76, 80). Trudno jednak — przynajmniej na razie — sprecyzować, na czym polega współdziałanie białek i RNA w rybosomach. Pace i Campbell (76) sugerują, że we współdziałaniu tym biorą udział wiązania jonowe i wodorowe między zasadowymi białkami a kwaśnymi resztami RNA rybosomów. Z badań Stevensa i Morrison (88) wynika, że efekt hyperchromowy podczas termicznej degradacji rybosomów *B. stearothermophilus* uwarunkowany jest zarówno denaturacją białek, jak i częściową hydrolizą RNA, chociaż trudno powiedzieć, które z tych zjawisk jest czynnikiem inicjującym.

Zaobserwowano, że trudniej jest usunąć białka z rybosomów bakterii termofilnych niż z rybosomów bakterii mezofilnych: w warunkach, w których z rybosomów bakterii termofilnej uwalniało się 50% białek, z rybosomów *E. coli* uwalniało się aż 85% białek (53).

Stenesh i Yang (87) zaobserwowali intensywniejszą degradację rybosomów bakterii mezofilnych niż bakterii termofilnych pod wpływem rybonukleazy rybosomowej, zarówno powyżej 60° jak i w 37°. Analogiczne spostrzeżenia poczynili Algranati i Lengyel (1). Również Friedman i Ricca (wg 27) stwierdzili, że wprawdzie po pięciu minutach trawienia rybonukleazą z trzustki zostały uwolnione jednakowe ilości nukleotydów z rybosomów bakterii termo- i mezofilnych, to jednak po dłuższym czasie enzym rozkładał większą ilość rRNA w preparacie z *E. coli* niż w preparacie z bakterii termofilnej.

Elektroforeza na żelu skrobiowym białek rybosomów termofilnych dała obraz podobny do uzyskanego w analogicznych warunkach dla białek rybosomów *E. coli* (53). Również elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z mocznikiem nie ujawniła istotnych różnic między preparatami *B. stearothermophilus* i *E. coli* (Flaks, wg 28). Skład aminokwasowy białek rybosomów termofilnych (80) i *E. coli* (84) są w zasadzie podobne. Autorzy stwierdzili jednak nieco mniejszy udział aminokwasów zasado-

wych w preparacie bakterii termofilnej (13,2% wobec 17,8% w preparacie z *E. coli*) oraz większą zawartość cystyny, co sugeruje istnienie większej liczby mostków dwusiarczkowych, a zatem bardziej sztywną konfigurację białek termofilnych (80). Brak natomiast informacji o składzie aminokwasowym białek rybosomalnych u bakterii psychrofilnych.

4. Poliaminy rybosomowe

Stają — aczkolwiek ilościowo znikomą — komponentą rybosomów są poliaminy. U bliżej nieoznaczonego szczepu *Pseudomonas* hodowanego w temperaturze pokojowej, Kim (40) znalazł wyłącznie putrescynę. Substancja ta jest bardzo silnie związana z rybosomami, gdyż w ciągu 12 godzin dializy nie stwierdzono wymiany między putrescyną endogenną a znakowaną z otoczenia (w obojętnym pH i w obecności 10^{-3} M Mg^{2+}). Gdy do środowiska, w którym prowadzono dializę, wprowadzono znakowaną sperminę, została ona wykryta w obu podjednostkach rybosomowych (40). Należy tu zaznaczyć, że wśród poznanych bakterii psychrofilnych najczęściej bodaj spotyka się przedstawicieli rodzaju *Pseudomonas* (23, 36, 38). U bakterii mezofilnych znaleziono głównie putrescynę i spermidynę (28, 88, 95). U bakterii termofilnych wykryto putrescynę i spermidynę (28) lub spermidynę i sperminę (Toschi wg 53, 88).

Zawartość poliamin w preparatach rybosomalnych zależy w dużym stopniu od sposobu preparowania i oczyszczania rybosomów (95). Stevens i Morrison (88) oznaczyli zawartość poliamin w komórkach i preparatach rybosomowych *B. stearothermophilus* hodowanego w różnych temperaturach oraz dla porównania u *E. coli* (tablica 3). Okazało się, że temperatura hodowli nie miała większego wpływu na ogólną ilość poliamin w komórkach hodowanych w 45° i 55°; komórki hodowane w 65° wykazały nawet spadek zawartości poliamin. Temperatura hodowli wpłynęła natomiast w sposób istotny na zawartość poliamin, szczególnie sperminy, w rybosomach. Korelacja między temperaturą hodowli a zawartością sperminy w rybosomach może nasunąć wniosek, że właśnie ta substancja umożliwia rybosomom termofilnych bakterii funkcjonowanie w wyższych temperaturach. Jednakże — jak wykazali ci sami autorzy — usunięcie poliamin z rybosomów *B. stearothermophilus* bynajmniej nie zwiększa wrażliwości tych ostatnich na denaturację cieplną (w obecności 10^{-2} M Mg^{2+}) i rybosomy te są bardziej termostabilne niż rybosomy *E. coli*, z których poliamin nie usunięto (88).

Wielu autorów stwierdziło stabilizujący wpływ dwu- i poliamin na strukturę drugorzędową syntetycznych i naturalnych polinukleotydów w roztworach (28, 41, 50, 52, 53, 62, 89, 94). Najsilniejszy efekt wywiera spermina, słabszy spermidyna, a najmniejszy dwuaminy, z których najbardziej efektywne są putrescyna i kadaweryna, tj. dwuaminy najczęściej

Tablica 3

Zawartość poliamin u *B. stearothermophilus* i *E. coli* (wg 88)

Temperatura wzrostu	Poliaminy w całych komórkach (mikromole/milimol P-RNA)			Poliaminy w rybosomach (mikromole/milimol P-RNA)		
	putres- cyna	spermi- dyna	spermi- na	putres- cyna	spermi- dyna	spermi- na
<i>B. stearothermophilus</i>	—	14,0	22,0	—	3,8	6,0
45°		18,0	29,0			
		22,0	29,0			
55°	—	12,0	30,0	—	8,2	12,1
		22,0	21,0			
65°	—	9,0	11,0	—	2,2	21,0
		4,0	18,0			
		8,6	23,0			
<i>E. coli</i>	54,0	1,1	—			
37°	53,0	1,3	—	1,3	1,0	—

występujące w materiale biologicznym (50, 89, 94). Zaobserwowano również — uwidoczniający się w zmianie profili denaturacji cieplnej i we wzroście wartości T_m — stabilizujący wpływ dwu- i poliamin na rybosomy *in vitro* (28, 53, 88).

Z przedstawionych wyżej danych wynika chyba niewątpliwie, że poliaminy odgrywają istotną rolę w utrzymaniu struktury rybosomów *in vivo*, aczkolwiek trudno na razie precyzować, jaki(e) jest(są) mechanizm(y) ich działania. Prócz tej części, która się adsorbuje na rybosomach podczas preparatyki i która może być łatwo z nich usunięta, pewna niewielka ilość tych zasad pozostaje zawsze bardzo silnie z rybosomami związana (40, 88). Tabor i Kellog (95) uważają, że poliaminy związane są w rybosomach jonowo.

5. Synteza łańcucha polipeptydowego

Wytworzenie trwałego kompleksu rybosom-mRNA-aminoacylo-tRNA jest koniecznym warunkiem do zainicjowania procesu syntezy łańcucha polipeptydowego.

Z badań nad syntetycznymi kwasami nukleinowymi w roztworach wodnych wiadomo, że współdziałanie między oligo- i polinukleotydami jest słabe (46, 47). A zatem współdziałanie między trójnukleotydem antykodonu tRNA a komplementarną trójką kodonu mRNA nie wystarcza na ogół do utrzymania trwałości kompleksu w temperaturach powyżej 25°, tj. w zakresie temperatur fizjologicznych dla wszystkich bakterii (z wyjątkiem tzw. obligatorycznie psychrofilnych). Toteż można założyć, że rybosom odgrywa istotną rolę w stabilizacji kompleksu. Przypuszcze-

nie to potwierdziły badania na układach modelowych: poliA-rybosom-lizylo-tRNA, poliU-rybosom-fenyloalanylo-tRNA, poliUG-rybosom-walilo-tRNA (61). Wartości T_m oznaczone dla wszystkich badanych kompleksów były wyższe niż 50° , podczas gdy wartości T_m dla układów trójnukleotyd-polinukleotyd w tych samych buforach nie przekraczały 25° . Intensywne przemywanie rybosomów nie miało wpływu na trwałość kompleksów. Termiczna (grzanie przez 10 minut w 60°) dysocjacja kompleksów z poliA i poliU okazała się niemal w pełni odwracalna. Niektóre wyniki tej pracy przedstawiono w tablicy 4.

Tablica 4

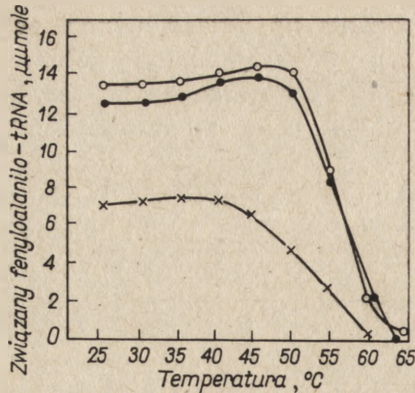
Wartości T_m kompleksów: rybosom-mRNA-aminoacytylo-tRNA
(wg 61) T_m ($^\circ\text{C}$)

Źródło rybosomów	fenyloalanylo-sRNA -poliU	lizylo-sRNA- poliA	walilo-sRNA- poliUG
<i>E. coli</i> B	55—56	60	63
<i>E. coli</i> MRE600	50	58	
<i>E. coli</i> Q-13	56	61	
<i>B. megatherium</i>	48	59	
Relikuloocyty szczura	57	60	
<i>B. stearothermophilus</i>	57	64	72

Uderzające jest, że stabilizujący wpływ rybosomów bakterii termofilnych jest tylko nieznacznie większy niż wpływ rybosomów bakterii mezofilnych w układach zawierających poliA i poliU. A przecież rybosomy bakterii termofilnej są odporne na denaturację cieplną aż do 70° , zaś rybosomy *E. coli* tylko do 55° . Większą — zależną od pochodzenia rybosomów — różnicę wartości T_m układów zawierających poliUG autorzy tłumaczą dodatkowym ubocznym efektem destrukcji rybosomów bakterii mezofilnych w temperaturze 63° (61).

Szer (90, 91) używając hybrydów rybosomowych złożonych z podjednostek 30S i 50S otrzymanych z *E. coli* i *Pseudomonas sp.* 412, stwierdził, że podjednostka 50S odgrywa istotną rolę w stabilizacji kompleksu poliU-(30S)rybosom-fenyloalanylo-tRNA. W obecności podjednostki 50S podwaja się ilość przyłączonego aminoacylo-tRNA, a temperatura dysocjacji kompleksu wzrasta średnio o 10° (od około 40° do 50°) (rysunek 6) niezależnie od tego, czy dodawano podjednostki homologiczne czy heterologiczne.

Ostatnio Skoultchi i wsp. (83) wydzielili z supernatantu (po odwirowaniu rybosomów) *B. stearothermophilus* czynniki polimeryzujące analogiczne do wcześniej opisanych dla *E. coli* (2, 33, 34, 48, 69, 72, 77). Czynniki te częściowo oczyszczono i rozdzielono na trzy frakcje: S_1 , S_2 i S_3 . Wszystkie trzy czynniki okazały się niezbędne w syntezie polifenylo-



Rys. 6. Wpływ podjednostki 50S na ilość związanego fenyloalaniny-tRNA przez kompleks podjednostki 30S-poliU i na trwałość termiczną kompleksu: rybosom-poliU-fenyloalaniny-tRNA (wg 91)

(x) 30S z *Pseudomonas* sp. 412, (O) 30S z *Pseudomonas* sp. 412 + 50S z *Pseudomonas* sp. 412, (.) 30S z *Pseudomonas* sp. 412 + 50S z *E. coli*

alaniny kierowanej przez poliU w układzie bezkomórkowym, zawierającym rybosomy i fenyloalaniny-tRNA z *E. coli*. Faktory S_1 i S_3 uczestniczą w zależnej od GTP reakcji przyłączenia aminoacylo-tRNA do kompleksu mRNA-rybosom (75). Te same czynniki polimeryzujące wiążą wszystkie aminoacylo-tRNA (zbadano 15), z jedynym wyjątkiem — metioniny-tRNA_F zarówno, gdy metionina jest formylowana, jak i nieformylowana (75). Prawdopodobnie u *B. stearothermophilus* — podobnie jak u *E. coli* (14, 15, 55, 74, 93, 98, 100) — formylowana metioniny-tRNA_F inicjuje syntezę łańcucha peptydowego.

6. Wpływ szoku temperaturowego na aktywność rybosomów

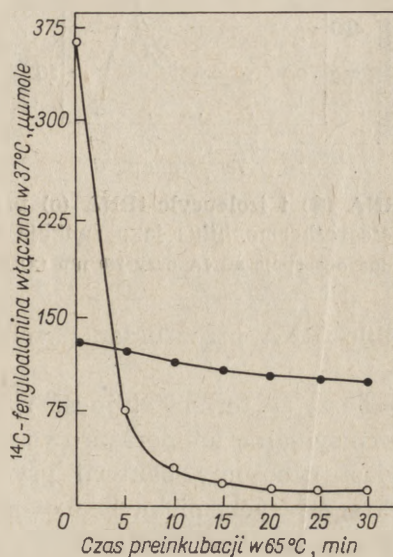
Friedman i wsp. (28) zaobserwowali duże różnice we wpływie jaki wywiera preinkubacja rybosomów *B. stearothermophilus* i *E. coli* w 65° na wydajność polimeryzacji fenyloalaniny pod wpływem poliU w 37° (rysunek 7). Po 5-ciu minutach grzania w 65° rybosomy bakterii termofilnych zachowują 94% wyjściowej aktywności, zaś rybosomy bakterii mezofilnych zaledwie 21%. Po 15 minutach grzania pozostaje 80% i 5% aktywności, zaś po 30 minutach 74% i 4%. Podobne wyniki dla rybosomów bakterii termo- i mezofilnych uzyskali też inni badacze (1).

Malcolm (51) preinkubował rybosomy z *Micrococcus cryophilus* w 40° przez 10 minut i nie stwierdził wpływu tego zabiegu na syntezę polifenyloalaniny pod wpływem poliU w 20°.

V. Zagadnienie granicznych temperatur wzrostu

Czy graniczne temperatury wzrostu bakterii — maksymalne i minimalne — są zdeterminowane przez system syntezy białka w komórce?

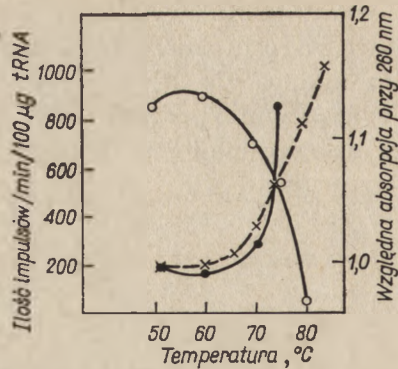
Z badań Malcolm'a (51, 51a) wynika, że czynnikiem limitującym maksymalną temperaturę wzrostu *Micrococcus cryophilus* jest termolabilność trzech syntetaz aminoacylo-tRNA. Natomiast u psychrofilnego *Pseudomonas* sp. 412 syntetazy aminoacylo-tRNA działały w temperaturach wyższych niż jego maksymalna temperatura wzrostu (43, 91).



Rys. 7. Wpływ inkubacji w 65° rybosomów *E. coli* (○) i *B. stearotherophilus* (●) na włączenie feniloalaniny w 37° (wg 28)

Arcà i wsp. (7) sugerują, że u podstaw śmierci cieplnej komórek bakteryjnych leży przyłączanie niewłaściwego aminokwasu do tRNA akceptora, co w wyniku powoduje błędy w odczytywaniu kodu genetycznego. Doświadczenia Chapeville'a i wsp. (12) wykazały bowiem, że właśnie cząsteczka tRNA, a nie aminokwas, decyduje o specyficzności tej reakcji. Wiadomo, że walina może być aktywowana przez syntetazę specyficzną dla izoleucyny; lecz reakcja przyłączenia jej do tRNA nie jest katalizowana przez heterologiczny enzym (7, 73). Jednak w temperaturach skrajnych reakcja ta zachodziła. W 75° syntetaza specyficzna dla izoleucyny z *B. stearotherophilus* katalizowała tworzenie kompleksu walilo-tRNA (z tRNA swoistym dla izoleucyny), mimo że reakcja nie przebiegała w 50°–60° (6, 7). Podobnie enzym ten katalizował wytwarzanie serylo- i treonylo-tRNA w 75°, ale nie w 50° (6). Według tych autorów, przyłączanie niewłaściwego aminokwasu spowodowane jest zmianami w drugorzędowej strukturze sRNA w wyższych temperaturach, czego dowodem są obserwowane w tych temperaturach efekty hyperchromowe w krzywych topnienia sRNA (rysunek 8).

Do podobnych wniosków doszedł Malcolm (51a) w oparciu o wyżej referowane wyniki, które uzyskał podczas enzymatycznej syntezy



Rys. 8. Synteza walilo-tRNA (●) i izoleucylo-tRNA (○) przez syntetazę izoleucylo-tRNA z *B. stearotherophilus* jako funkcja temperatury
Względna absorpcja sRNA przy 260 nm (x) (wg 6)

glutamylo-tRNA i prolilo-tRNA przez układ psychrofilny z *Micrococcus cryophilus*.

Niektórzy autorzy sądzą, że termostabilność rybosomów jest czynnikiem ograniczającym maksymalną temperaturę wzrostu bakterii termofilnych (27, 53). Natomiast rybosomy bakterii psychrofilnych są trwałe w temperaturach przekraczających, niekiedy nawet bardzo znacznie, maksymalne temperatury wzrostu tych szczepów (43, 51, 76). Znamienne są wyniki Pace i Campbell (76): autorzy zestawili 19 szczepów, których maksymalne temperatury wzrostu mieszczą się w zakresie 18°—73°, zaś wartości T_m ich rybosomów między 69° a 79° (tablica 5). Jak widać, różnice między wartością T_m rybosomów a maksymalną temperaturą wzrostu organizmu wynoszą 5°—6° u bakterii termofilnych, a u bakterii psychrofilnych aż 45—50°. Niewspółmierność tych wskaźników jest uderzająca i wyklucza przypuszczenie, że wrażliwość na denaturację termiczną rybosomów ogranicza maksymalne temperatury wzrostu u badanych szczepów mezo- i psychrofilnych.

O ile minimalna temperatura wzrostu szczepu bakteryjnego związana jest z funkcjonowaniem układu syntetyzującego białko w komórce?

Friedman i Weinstein (29) zaobserwowali, iż bezkomórkowy system z *B. stearotherophilus* włącza leucynę pod wpływem poliU w znacznie większym stopniu w 37° niż w 65° (stosunek włączonej leucyny do fenyloalaniny wynosi odpowiednio 118% i 16%). Ci sami autorzy stwierdzili również, że system bakterii termofilnych włącza prolinę (kod genetyczny dla proliny: CCC, CCU, CCG i CCA) pod wpływem poliUG i poliUAG w 37°, a nie włącza w 65° (30). Podobne obserwacje poczyniono dla innych układów zawierających syntetyczne matryce w temperaturach bliskich temperaturze minimalnej dla danego organizmu (92). Literatura na ten temat jest jednak zbyt skąpa, by wnioskować, czy i do jakiego stopnia zjawisko to posiada walor ogólny.

Tablica 5

Maksymalne temperatury wzrostu i wartości T_m rybosomów (wg 76)

Organizm	Maksimum temp. wzrostu (°C)	T_m rybosomów (°C)
<i>V. marinus</i> (15 381)	18	69
7E-3	20	69
1-1	28	74
<i>V. marinus</i> (15 382)	30	71
2-1	35	70
<i>D. desulfuricans</i> (chlonicus)	40	71
<i>D. vulgaris</i> (8 303)	40	73
<i>E. coli</i> (B)	45	72
<i>E. coli</i> (Q13)	45	72
<i>S. Itersonii</i> (SI-1)	45	73
<i>B. megaterium</i> (Paris)	45	75
<i>B. subtilis</i> (SW-25)	50	74
<i>B. coagulans</i> (43P)	60	34
<i>D. nigrificans</i> (8 351)	60	75
<i>Thermophile</i> T-107	73	78
<i>Thermophile</i> 194	73	78
<i>B. stearothermophilus</i> (1503 R)	73	79
<i>Thermophile</i> B	73	79
<i>B. stearothermophilus</i> (10)	73	79

Das i Goldstein (18) przypuszczają, że czynnikiem uniemożliwiającym wzrost *E. coli* w 0° jest niezdolność do wytworzenia w tej temperaturze połączenia mRNA-rybosom. Krajewska i Szer (43) stwierdzili jednak, że po preinkubacji rybosomów *E. coli* z poliU w temperaturze pokojowej i dodaniu oziębionego ich roztworu do również oziębianych pozostałych komponent, układ nie włączał aminokwasów w temperaturze bliskiej 0°, ani po dodaniu supernatantu z bakterii homologicznych, ani z psychrofilnych.

Szer (91) wydzielił z rybosomów psychrofilnych szczepu *Pseudomonas* sp. 412 czynnik białkowy warunkujący zdolność systemu bezkomórkowego tej bakterii do funkcjonowania w niskich temperaturach. Czynnik ten, nazwany przez autora faktorem P, dodany do układu bezkomórkowego z *E. coli* jak też i do układu z mutantą mezofilnego otrzymanego z *Pseudomonas* 412, umożliwia syntezę polifenylalaniny pod wpływem poliU w temperaturze bliskiej 0°.

Krzywe śmierci cieplnej bakterii przypominają krzywe reakcji monomolekularnych (36). Zjawisko takie zgodne jest z efektem wpływu wysokich temperatur na duże struktury komórkowe, na przykład na błony komórkowe, gdyż uszkodzenie błony nawet w jednym miejscu może spowodować wyciek treści komórkowej, a więc śmierć. Śmierć cieplna uwa-

runkowana inaktywacją termolabilnych enzymów lub rybosomów, których wiele kopii jest w komórce, nie wykazywałaby tego rodzaju kinetyki (8). Spostrzeżenia poczynione w pracy z psychrofilnymi bakteriami morskimi, u których — jak się wydaje — śmierć cieplna jest spowodowana uszkodzeniem błony komórkowej i w następstwie liżą komórki, przemawia również na korzyść powyższej hipotezy (68). Wielu badaczy uzależnia również minimalną temperaturę wzrostu szczepu bakteryjnego od aktywności błon komórkowych, w szczególności od mechanizmów regulujących przepuszczalność błon. Zagadnienie to wykracza jednak poza ramy niniejszego artykułu. Jest ono omówione w pracach monograficznych (8, 13, 23, 68).

VI. Uwagi końcowe

W części wstępnej zaznaczono, że najistotniejszym kryterium odróżnienia bakterii termofilnych od pozostałych grup jest ich zdolność do wzrostu w temperaturze powyżej 50°. Wprawdzie nie ma prostej zależności między temperaturą wzrostu bakterii a termostabilnością układu syntezy białka, jednak niewątpliwie rybosomy i syntetazy aminoacylo-tRNA bakterii termofilnych są bardziej odporne na denaturację cieplną niż analogiczne preparaty bakterii mezo- i psychrofilnych. Najdokładniej pod tym względem badano rybosomy bakterii termofilnych i większa ich stabilność — w porównaniu z rybosomami pozostałych grup — została wielokrotnie udowodniona w oparciu o badania fizyczne i biologiczne. Mimo to podstawy molekularne tego zjawiska nie są znane. Mało przekonujące wydaje się twierdzenie, że podłożem tego zjawiska jest większa zawartość G-C w rybosomalnym RNA termofilnym (86). Bardziej słuszna wydaje się sugestia, że większa termostabilność rybosomów termofilnych jest uwarunkowana subtelnym współdziałaniem między RNA a białkami rybosomalnymi (53, 76, 80). Natura tego współdziałania jest jednak niejasna. Prawdopodobnie jakąś zasadniczą rolę odgrywają tu poliaminy, aczkolwiek trudno na razie istotę jej sprecyzować (31, 88).

Ponieważ — z wyjątkiem α -amylazy (54) i dehydrogenazy triozofosforanowej (3) — nie otrzymano w stanie czystym białek enzymatycznych z bakterii termofilnych, jest rzeczą niemożliwą stwierdzenie czy stabilność syntetaz aminoacylo-tRNA jest wynikiem specyficznej ich struktury, czy też skutkiem obecności w preparatach czynników ochronnych (8, 36, 80).

Kryterium rozpoznawczym bakterii psychrofilnych jest ich zdolność do wzrostu w temperaturach bliskich 0°. Zdolność ta związana jest z właściwościami rybosomów, jak to zostało wykazane w heterologicznym systemie syntezy białka, zawierającym komponenty psychrofilnego *Pseudomonas* sp. 412 i *E. coli* (43). Badania hybrydów rybosomowych otrzy-

many z podjednostek pochodzących od tych dwóch szczepów wykazały, że zdolność syntezy polipeptydu w niskich temperaturach warunkują podjednostki 50S (90). W podjednostce tej u *E. coli* zawarty jest enzym syntetyzujący wiązania peptydowe, tzw. transferaza peptydylowa (65, 66, 79). Jaka jest funkcja otrzymanego przez Szerę faktora P (91), o którym była mowa wyżej, trudno na razie orzekać.

Z przytoczonych danych wynika, że temperatury, w których ulegają denaturacji cieplnej kwasy nukleinowe psychro-, mezo- i termofilnych bakterii, są do siebie zbliżone. Są one stosunkowo wysokie i mieszczą się w zakresie temperatur, w jakich żyją bakterie termofilne. Spostrzeżenie to może świadczyć na korzyść hipotezy, że ewolucyjnie pierwsze były bakterie termofilne, z których — w miarę stygnięcia skorupy ziemskiej — na drodze mutacji i selekcji rozwinęły się szczepy mezo- i psychrofilne. Zmiany termostabilności interesującego nas układu objęły przede wszystkim białka. Istnieje wiele obserwacji, że oporność na denaturację cieplną tych makrocząsteczek mieści się na ogół w przedziale temperatur w jakich żyje organizm (8, 23). Warto tu wspomnieć, że otrzymane w laboratoriach mutanty temperaturowe *E. coli* odznaczały się termolabilnymi syntetazami aminoacylo-tRNA (20, 102), a w jednym tylko przypadku obniżenie maksymalnej temperatury wzrostu uwarunkowane było zwiększoną wrażliwością podjednostki rybosomowej 50S (4).

Zwolennikiem hipotezy o takim kierunku ewolucji bakterii jest Marré (59), który swoje przekonanie opiera na spostrzeżeniu, iż wśród organizmów termofilnych spotyka się wyłącznie przedstawiciele bakterii i sinic, tj. organizmów pierwotnych. Inny zwolennik tej hipotezy uzasadnia ją faktem, że wiele spotykanych obecnie bakterii termofilnych jest taksonomicznie zbliżonych do bakterii kopalnych (8).

Autorka dziękuje Dr W. Szerowi za udostępnienie materiałów niepublikowanych.

Autorka korzystała z częściowego poparcia *Wellcome Trust* i *Agricultural Research Service*, U. S. Dept. of Agriculture (UR-E21-(32)-30).

LITERATURA

1. Algranati J. D., Lengyel P., *J. Biol. Chem.* **241**, 1778 (1966).
2. Allende J. E., Seeds N. W., Conway T. W., Weissbach H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **58**, 1566 (1967).
3. Amelunxen R. E., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 175 (1966).
4. Apirionn D., *J. Mol. Biol.* **16**, 285 (1966).
5. Arcà M., Calvori L., Frontali L., Tecce G., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 440 (1964).
6. Arcà M., Frontali L., Saporà O., Tecce G., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 284 (1967).
7. Arcà M., Frontali L., Tecce G., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 326 (1965).
8. Brock T. D., *Science* **158**, 1012 (1967).

9. Bubela B., Holdsworth E. S., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 364 (1966).
10. Bubela B., Holdsworth E. S., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 376 (1966).
11. Carnevalli F., Donelli G., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 376 (1968).
12. Chapeville F., Lipmann F., Ehrenstein G. von, Weisblum B., Ray W. J. Jr., Benzer S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1086 (1962).
13. Chapman D., w *Thermobiology*, red. A. H. Rose, Academic Press, Londyn-New York 1967, str. 123.
14. Clark B. F. C., Marcker K. A., *Nature* **206**, 994 (1965).
15. Clark B. F. C., Marcker K. A., *Nature* **211**, 378 (1966).
16. Cox R. A., *Biochem. J.* **98**, 841 (1966).
17. Cramer P., Erdmann V. A., *Nature* **218**, 92 (1968).
18. Das H. K., Goldstein A., *J. Mol. Biol.* **31**, 209 (1968).
19. Dunn D. B., Smith J. D., Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **2**, 113 (1960).
20. Eidlic L., Neidhardt F. C., *J. Bacteriol.* **89**, 706 (1965).
21. Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 372 (1959).
22. Farrell J., Rose A. H. *Ann. Rev. Microbiol.* **21**, 101 (1967).
23. Farrell J., Rose A. H., w *Thermobiology*, red. A. H. Rose, Academic Press, Londyn-New York 1967, str. 147.
24. Felsenfeld G., Sandeen G., *J. Mol. Biol.* **5**, 587 (1962).
25. Fresco J. R., Adams A., Ascione R., Henley D., Lindahl T., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **31**, 527 (1966).
26. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P., *Nature* **188**, 98 (1960).
27. Friedman S. M., *Bacteriol. Rev.* **32**, 27 (1968).
28. Friedman S. M., Axel R., Weinstein J. B., *J. Bacteriol.* **93**, 1521 (1967).
29. Friedman S. M., Weinstein J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 988 (1964).
30. Friedman S. M., Weinstein J. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 339 (1965).
31. Friedman S. M., Weinstein J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 593 (1966).
32. Fuchs E., Millette R. L., Zillig W., Walter G., *Eur. J. Biochem.* **3**, 183 (1967).
33. Gordon J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1574 (1967).
34. Gordon J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 179 (1968).
35. Hill L. R., *J. Gen. Microbiol.* **44**, 419 (1966).
36. Ingraham J. L., w *The Bacteria*, red. I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York-Londyn, 1962, t. 4, str. 266.
37. Ismande J., Caston J. D., *J. Mol. Biol.* **16**, 28 (1966).
38. Janota-Bassalik L., *Post. Microbiol.* **1**, 231 (1962).
39. Janota-Bassalik L., *Post. Microbiol.* **6**, 419 (1967).
40. Kim K., *J. Bacteriol.* **91**, 193 (1966).
41. Krajewska E., Streszczenia, VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochem. Olsztyn, 1968, str. 35.
42. Krajewska E., dane niepublikowane.
43. Krajewska E., Szer W., *Eur. J. Biochem.* **2**, 250 (1967).
44. Kurland C. G., *J. Mol. Biol.* **2**, 83 (1960).
45. Lengyel P., Speyer J. F., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1936 (1961).
46. Lipsett M. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 224 (1963).
47. Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F., *J. Biol. Chem.* **236**, 857 (1961).

48. Lucas-Lenard J., Haenni A. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 554 (1968).
49. Mahler H. R., Dutton G., Mehrotra B. D., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 199 (1963).
50. Mahler H. R., Mehrotra B. D., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 211 (1963).
51. Malcolm N. L., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 493 (1968).
- 51a. Malcolm N. L., *Nature* **221**, 1031 (1969).
52. Mandel M., *J. Mol. Biol.* **5**, 435 (1962).
53. Mangiantini M. T., Tecce G., Toschi G., Trentalance A. *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 252 (1965).
54. Manning G. B., Campbell L. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2952 (1961).
55. Marcker K. A., Sanger P., *J. Mol. Biol.* **8**, 835 (1964).
56. Marmur J., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 342 (1960).
57. Marmur J., Doty P., *Nature* **183**, 1427 (1959).
58. Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **5**, 109 (1962).
59. Marrè E., w *Physiology and Biochemistry of Algae*, red. R. A. Lewin, Academic Press, New York-Londyn 1962, str. 541.
60. Matthaei J. H., Nirenberg M. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1580 (1961).
61. Mc Laughlin C. S., Dondon J., Grunberg-Manago M., Michelson A. M., Saunders G., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **31**, 601 (1966).
62. Mehrotra B. D., Mahler H. R., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 78 (1964).
63. Midgley J. E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 513 (1962).
64. Miura K. I., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 62 (1962).
65. Monro R. E., *J. Mol. Biol.* **26**, 147 (1967).
66. Monro R. E., Maden B. E. H., Traut R. R., w *Genetic Elements*, red. D. Shugar, Academic Press-PWN, Londyn-New York-Warszawa 1966, str. 179.
67. Morell P., Smith I., Dubnau D., Marmur J., *Biochemistry* **6**, 258 (1967).
68. Morita R. Y., *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **4**, 105 (1966).
69. Nakamoto T., Conway T. W., Allende J. E., Spyrides G. J., Lipmann F., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **28**, 227 (1963).
70. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1588 (1961).
71. Nishimura S., Harada F., Narushima U., Takeshi S., *Biochim. Biophys. Acta* **142**, 133 (1967).
72. Nishizuka Y., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 212 (1966).
73. Norris A. T., Berg P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 330 (1964).
74. Ochoa S., *Naturwissenschaften* **55**, 505 (1968).
75. Ono Y., Skoultchi A., Klein A., Lengyel P., *Nature* **220**, 1304 (1968).
76. Pace B., Campbell L. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1110 (1967).
77. Ravel J. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1810 (1967).
78. Remold-O'Donnell E., Zillig W., *Eur. J. Biochem.* **7**, 318 (1969).
79. Rychlik I., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 425 (1966).
80. Saunders G. P., Campbell L. L., *J. Bacteriol.* **91**, 332 (1966).
81. Saunders G. P., Campbell L. L., *J. Bacteriol.* **91**, 340 (1966).
82. Schlessinger D., *J. Mol. Biol.* **2**, 92 (1960).
83. Skoultchi A., Ono Y., Moon H. M., Lengyel P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 675 (1968).
84. Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **4**, 395 (1962).

85. Spahr P. F., Tissières A., *J. Mol. Biol.* **1**, 237 (1959).
86. Stenesh J., Holazo A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 286 (1967).
87. Stenesh J., Yang C., *J. Bacteriol.* **93**, 930 (1967).
88. Stevens L., Morrison M. R., *Biochem. J.* **108**, 633 (1968).
89. Szer W., *Acta Biochim. Polon.* **13**, 251 (1966).
90. Szer W., *Federation Proc.* **28**, 901 (1969).
91. Szer W., dane niepublikowane.
92. Szer W., Ochoa S. J., *J. Mol. Biol.* **8**, 823 (1964).
93. Sztabert-Grzelakowska B., *Post. Biochem.* **14**, 509 (1968).
94. Tabor H., *Biochemistry* **1**, 496 (1962).
95. Tabor C. W., Kellog P. D., *J. Biol. Chem.* **242**, 1044 (1967).
96. Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R., *J. Mol. Biol.* **1**, 221 (1959).
97. Vanhumbecck J., Lurquin P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 908 (1968).
98. Waller J. P., *J. Mol. Biol.* **7**, 483 (1963).
99. Walter G., Zillig W., Palm P., Fuchs E., *Eur. J. Biochem.* **3**, 194 (1967).
100. Webster R. E., Engelhardt D. L., Zinder H. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 155 (1966).
101. Welker N. E., Campbell L. L., *J. Bacteriol.* **89**, 175 (1965).
102. Yaniv M., Jacob F., Gros F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 1609 (1965).

RECENZJE

Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. Tom X, cz. 3, Red. Ralph T. Holman, Pergamon Press, 1969, str. 96

Kolejny tom tego seryjnego wydawnictwa przynosi dwa artykuły monograficzne: Lipidy diolowe (L. D. Bergelson), i Biochemia lipidów zawierających wiązania eterowe (F. Snyder). L. D. Bergelson z Instytutu Związków Naturalnych Akademii Nauk ZSSR w Moskwie był jednym z pierwszych badaczy, którzy przed pięciu laty zwrócili uwagę na występowanie w przyrodzie glikolowych analogów glicerydów, zawierających zamiast glicerolu glikole: etylenowy, propylenowy, butylenowy i inne. Począwszy od 1964 roku Bergelson i współpracownicy opublikowali dużą ilość prac dotyczących tego zagadnienia. W artykule zawarte są oryginalne opracowania metodyczne. W rozdziale pt.: „Oznaczenie dioli w lipidach” autor omawia szeroko zastosowanie chromatografii gazowej do oznaczania i identyfikacji lipidów diolowych. Metoda ta stanowi obecnie najważniejszą technikę badania omawianych związków. W dalszych rozdziałach artykułu zestawiono inne metody analizy lipidów diolowych, właściwości fizyczne tych związków oraz podano przykłady metod ich syntezy chemicznej.

Niewiele dotychczas wiadomo o metabolizmie i roli fizjologicznej lipidów diolowych; największe ich ilości stwierdza się w organizmach i tkankach szybko rosnących, na przykład u drożdży oraz w regenerującej wątrobie szczura. Artykuł Bergelsona stanowi pierwsze opracowanie tego nowego i interesującego zagadnienia.

Zagadnienie biochemii lipidów zawierających wiązanie eterowe, opracowane przez F. Snydera (*Lipid Research Laboratory, Oak Ridge*), liczy już około 50 lat i należy ze względu na charakter technik badawczych do mniej wdzięcznych dziedzin biochemii lipidów. Artykuł Snydera zawiera dużo wiadomości głównie na temat występowania zarówno lipidów obojętnych, jak i fosfolipidów posiadających ugrupowanie eteru alkilowego lub alk-1-enilowego. Część artykułu poświęcona metabolizmowi omawianych związków nie wnosi nowych elementów do nie poznanego jeszcze mechanizmu ich biosyntezy i zawiera wiele znanych, często sprzecznych między sobą doniesień różnych autorów, bez, jak można by oczekiwać, próby oceny tych danych. Wiele interesujących wiadomości zawiera rozdział pt.: „Efekty biologiczne powodowane przez alkilowe etery glicerolu”, omawiający właściwości farmakologiczne i terapeutyczne tych połączeń.

Ze szkodą dla wartości artykułu pominięte zostały przez autora dane dotyczące rozmieszczenia i funkcji omawianych połączeń we frakcjach podkomórkowych. Brak również w artykule oceny metod analitycznych obecnie stosowanych w badaniach nad tymi związkami.

Oba artykuły zawarte w recenzowanym tomie stanowią bardzo cenne opracowania przeznaczone głównie dla biochemików zajmujących się lipidami.

T. Chojnacki

Chemical Biology of Inflammation, red. John C. Houck i Bernard K. Forscher, Pergamon Press, 1968, str. 334+XI

Książka „Chemical Biology of Inflammation” stanowi zbiór referatów wygłoszonych na sympozjum pod tym tytułem, które odbyło się w Brook Lodge, Augusta, Michigan w roku 1967. Sympozja i konferencje o podobnym charakterze, których tematem jest stosunkowo wąska gałąź wiedzy zyskują sobie coraz większą popularność jako platforma dyskusji i wymiany poglądów. Zaproszenia do udziału w takich konferencjach otrzymują z reguły najwybitniejsi specjaliści w danej dyscyplinie nauki.

W związku z tym trudno jest recenzentowi, którego specjalność nie jest w dodatku bezpośrednio związana z tematyką konferencji, oceniać jej wartość czy poziom, który zresztą powinien być wysoki z założenia. Najśluszej będzie więc chyba omówić pokrótce treść konferencji.

W sposób najogólniejszy zapalenie można zdefiniować jako reakcję tkanki na uraz (mechaniczny, chemiczny, immunologiczny itp.), który uszkadzając strukturę komórek powoduje przedostanie się niektórych substancji komórkowych na zewnątrz do przestrzeni śródkomórkowych i substancji podstawowej. Zapoczątkowuje to cały ciąg reakcji chemicznych i fizykochemicznych prowadzących w efekcie do niedokrwienia i martwicy tkanki. Książka zawiera 29 referatów, w których omówiono poszczególne fazy procesu zapalnego, reakcje i zachowanie się elementów morfotycznych oraz scharakteryzowano poszczególne substancje biorące udział w procesie zapalnym. Omówiono reakcje i zachowanie się limfocytów, makrofagów i płytek krwi, swoistość i właściwości enzymów uwalnianych z komórek (enzymy lizosomalne), działanie tych enzymów na substancję podstawową, i wreszcie zmiany zachodzące w substancji podstawowej z uwzględnieniem przemiany kolagenu i kwaśnych mukopolisacharydów. Szczególnie bogato są reprezentowane referaty omawiające udział układu krzepnięcia krwi w procesie zapalnym, słabiej — aspekty immunologiczne procesu zapalnego. Odczyny immunologiczne w zapaleniach są tematem tylko czterech referatów, a tylko jeden z nich omawia nadwrażliwość typu późnego.

Książka jest przeznaczona dla specjalistów interesujących się różnymi aspektami procesu zapalnego, a więc przede wszystkim dla patologów. Ze względu na szeroki wachlarz poruszanej problematyki może być interesująca również dla specjalistów zajmujących się zjawiskiem koagulacji, biochemików, immunologów i histologów.

J. Kościelak

KOMUNIKATY

Komitet Organizacyjny
XVII Zjazdu
Polskiego Towarzystwa
Mikrobiologów
Warszawa, ul. Chocimska 24
tel. 45-30-20; 45-32-21

Komunikat

Uprzejmie zawiadamiamy, że w dniach od 9 do 12 września 1970 roku odbędzie się w Warszawie XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Czterodniowe obrady Zjazdu toczyć się będą przed południem na posiedzeniach plenarnych, na których wygłaszane będą wykłady na tematy, które mogą budzić szersze zainteresowanie. Obrady w godzinach popołudniowych zostaną zorganizowane na innych zasadach, niż na dotychczasowych zjazdach. Zamiast tradycyjnego podziału na sekcje mikrobiologii ogólnej, lekarskiej itp., zostaną zorganizowane sesje tematyczne, poświęcone omówieniu w wykładzie wstępnym dorobku w ściśle określonej dziedzinie, jak np. „biosynteza ściany komórkowej”, czy też „replikacja wirusów”, po czym przedstawione zostaną doniesienia z prac doświadczalnych, obejmujących wyłącznie problematykę danego tematu. Komitet Organizacyjny zasięgał opinii licznych członków Towarzystwa, jak też i poszczególnych Oddziałów terenowych PTM. Ponad 98⁰/₀ zapytanych osób wypowiedziało się za tym sposobem organizacji obrad uważając, że przyczyni się to do podniesienia poziomu naukowego obrad, a także pozwoli na zgromadzenie się podczas jednej sesji wszystkich osób zainteresowanych daną wąską specjalnością, co powinno jednoczyć bardziej aniżeli formalna przynależność do określonej dziedziny mikrobiologii. Komitet Organizacyjny otrzymał ponad 100 propozycji zorganizowania takich sesji tematycznych. Są one pilnie i szeroko studiowane, a ponadto skierowane do konsultacji naszych najwybitniejszych specjalistów krajowych. Po zatwierdzeniu programu naukowego Zjazdu przez Zarząd Główny PTM, Komunikat nr 2 podaje szczegółowy wykaz sesji tematycznych, na które można będzie zgłaszać referaty z prac doświadczalnych. Referaty na sesjach plenarnych zostaną wygłoszone na zaproszenie Komitetu Organizacyjnego. Komunikat nr 2 ukaże się wczesną jesienią bieżącego roku. Ostateczny termin zgłaszania tekstów referatów lub ich streszczeń będzie wyznaczony na 30 kwietnia 1970 roku. Jesienią zostanie też rozesłana karta informacyjna, po której wypełnieniu zorientujemy się w liczbie uczestników, planujących wziąć udział w XVII Zjeździe PTM.

Uprzejmie prosimy o zachęcanie do udziału w Zjeździe naszego Towarzystwa osób, nie będących członkami PTM, a zainteresowanych problematyką mikrobiologiczną; będą oni mile widziani na naszym Zjeździe.

Komitet Organizacyjny będzie wdzięczny za wszelkie uwagi, rady i zalecenia, które miałyby się przyczynić do poprawy poziomu naukowego i organizacyjnego planowanego Zjazdu naszego Towarzystwa.

Za Komitet Organizacyjny XVII Zjazdu PTM

Sekretarz
Dr Cecylia Zak

Przewodniczący
Doc. dr Janusz Jeliaszewicz

SPIS TREŚCI

J. Geisler — Kalcytonina, jej własności i rola w homeostazie wapnia	3
J. Tomaszewski, K. Woźniak — Renina i angiotensyna	21
K. Wiśniewski — Działanie „transportowe” insuliny a synteza białek	33
E. Bańkowski, W. Gałasiński — Tankowe enzymy kolagenolityczne	41
K. Worowski, R. Farbiszewski — Udział lipidów i lipoproteidów w procesie hemostazy	51
G. Muszyńska — Jony w katalizie enzymatycznej	67
E. Dziembor — Fosfohydrolazy monoestrów otofosforanowych	89
J. Janicki, J. Warchalewski, J. Skupin, J. Kowalczyk — Inhibitory trypsyny pochodzenia roślinnego	101
E. Krajewska — Układ biosyntezy białka u bakterii termo- i psychro- filnych	119
Recenzje książek (T. Chojnacki, J. Kościelak)	145
Komunikat Komitetu Organizacyjnego XVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów	147

W 2-im zeszycie tego tomu ukaza się:

1. Mechanizm działania penicyliny na komórkę bakteryjną — Z. Tynecka
2. Metabolizm i regulacja sekrecji aldosteronu — B. Szukalski
3. Toksohormon — J. Trojanowski
4. Funkcje transferryny — K. Konopka
5. Wpływ kwasu 2,3-dwufosfoglicerynowego na wydajność przenoszenia tlenu
przez hemoglobinę — A. L. Pawlak
6. Metody badania struktury centrum aktywnego enzymów — G. Palamarczyk,
J. Rytka
7. Owoalbumina — M. I. Bukowska
8. Niejednorodność histonów — J. Bartkowiak, L. Kłyszewko-Stefanowicz

POSTĘPY BIOCHEMII

January 1970

ARTICLES IN POLISH

Volume 16

Number 1

J. Geisler — Calcitonin, Its Properties and The Role in Calcium Homeostasis (Dept. Radiobiol. and Health Protect. Inst. Nucl. Res., Warszawa)	3
J. Tomaszewski, K. Woźniak — Renin and Angiotensin (Res. Center, Med. School, Lublin)	21
K. Wiśniewski — The "Transport" Effect of Insulin and Protein Synthesis (Dept. Pharmacol., Med. School, Białystok)	33
E. Bańkowski, W. Gałasiński — Tissue Collagenolytic Enzymes (Dept. Chem. Physiol., Med. School, Białystok)	41
K. Worowski, R. Farbiszewski — The Role of Lipids and Lipoproteids in Hemostatic Processes (Dept. Chem. Physiol., Med. School, Białystok)	51
G. Muszyńska — Ions in The Enzymatic Catalysts (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	67
E. Dziembor — Orthophosphoric Monoester Phosphohydrolases (Interfac. Dept. Chem. Physiol., Med. School, Kraków)	89
J. Janicki, J. Warchalewski, J. Skupin, J. Kowalczyk — Trypsin Inhibitors of Plant Origin (Dept. Agric. Technol., High School Agric., Poznań)	101
E. Krajewska — Protein-Synthesizing Systems of Thermophilic and Psychrophilic Bacteria (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	119
Chronicle	145

Pw

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

poleca nowości:

N. A. Kisielew: *Mikroskopia elektronowa makrocząsteczek biologicznych.*
Tłum. z rosyjskiego s. 221 rys. il. tab. bibliogr. zł 32.—

Książka prezentuje szczegóły wielocząsteczkowych struktur kwasów nukleinowych, zwłaszcza zaś układów krystalograficznych i subtelnej budowy białek — głównie na materiale wirusologicznym, ale też i cytologicznym w rozdziale o rybosomach. Zawiera podstawowe wiadomości z mikroskopii elektronowej, krystalografii kryształów biologicznych, biologii molekularnej, wirusologii oraz metodyki. Interesujący materiał ilustracyjny.

M. W. Wolkensztejn: *Biologia molekularna.* Tłum. z rosyjskiego s. 493,
rys. il. bibliogr. pł. obw. zł 68.—

Treść: Fizyka i biologia; Komórki, wirusy, dziedziczność; Cząsteczki biologiczne; Fizyka makrocząsteczek; Fizyka białka; Fizyka kwasów nukleinowych; Synteza białka; Swoistość biologiczna i budowa cząsteczek; Procesy mechanochemiczne; Zagadnienia biofizyki molekularnej.

10

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., Podręcznik Biochemii, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np. Schneider W. C., w Methods in Enzymology, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

SPIS TREŚCI

J. Geisler — Kalcitonina, jej własności i rola w homeostazie wapnia	3
J. Tomaszewski, K. Woźniak — Renina i angiotensyna	21
E. Bańkowski, W. Gałasiński — Tankowe enzymy kolagenolityczne	41
K. Wiśniewski, R. Farbiszewski — Udział lipidów i lipoproteidów w procesie hemostazy	51
G. Muszyńska — Jony w katalizie enzymatycznej	67
E. Dziembor — Fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych	89
J. Janicki, J. Warchalewski, J. Skupin, J. Kowalczyk — Inhibitory trypsyny pochodzenia roślinnego	101
E. Krajewska — Układ biosyntezy białka u bakterii termo- i psychro- filnych	119
Recenzje książek (T. Chojnacki, J. Kościelak)	145
Komunikat Komitetu Organizacyjnego XVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów	147