

P. 939 -

Postępy

BIOCHEMII

KOMITET BIOCHEMICZNY POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ROK I - ZESZYT 1



PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



<http://rcin.org.pl>

POSTĘPY BIOCHEMII

ROK I

ZESZYT 1

WYDAJE

KOMITET BIOCHEMICZNY POLSKIEJ AKADEMII NAUK

POD REDAKCJĄ

JÓZEFA HELLERA



Staske
Staske

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH
WARSZAWA

1953

SKŁAD
KOMITETU BIOCHEMICZNEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

*

PRZEWODNICZĄCY
JÓZEF HELLER, Warszawa

*

SEKRETARZ
JERZY MEDUSKI, Warszawa

*

CZŁONKOWIE
TADEUSZ BARANOWSKI, Wrocław — ANTONI DMOCHOWSKI, Łódź —
WŁODZIMIERZ NIEMIERKO, Łódź — JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH, Lublin —
IGNACY REIFER, Warszawa — BOLESŁAW SKARŻYŃSKI, Kraków —
ZDZISŁAW STOLZMANN, Poznań

Okladkę projektował
MAREK ANTOSIEWICZ

*

Redaktor odpowiedzialny
Dr farm. JAN PODLEWSKI

*

Redaktor techniczny
MAREK ANTOSIEWICZ

*

Korektor techniczny
HENRYK CZERASZKIEWICZ

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH, WARSZAWA, 1953

Rok I, Zeszyt 1 * Nakład 2150 egz. * Objętość 13 a. w. = 7,75 a. d. * Papier ilu-
stracyjny kl. V, 70 g, 70×100/16 * Oddano do składania 8. 10. 53 * Podpisano do
druku 4. 11. 53 * Druk ukończono 15. 12. 53 * Zamówienie nr 1086 * E-4-43131

TORUŃSKA DRUKARNIA DZIEŁOWA, TORUŃ, UL. KATARZYNY NR 4
Cena zł 16,90

„Postępy Biochemii“ są wydawnictwem Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk (Wydział II).

Trzonem treści „Postępów Biochemii“ będą referaty wygłaszane na Sympozjach Komitetu.

Sympozja, stanowiące otwarte posiedzenie Komitetu, mają charakter konferencyj roboczych. Są one pomyślane jako dyskusje metodyczne, mające ułatwić planowanie naukowe przez krytyczne naświetlanie zagadnień, które, zdaniem Komitetu, nie są w bieżącym planowaniu naszych placówek badawczych uwzględniane w zakresie wystarczającym.

Referaty i dyskusje mają pomóc w przejściu od ogólnie sformułowanych problemów do ścisłego tematu roboczego, mają ułatwić dobór metod i scharakteryzować główne trudności, z którymi należy się liczyć przy ich stosowaniu.

Artykuły zamieszczane w „Postęпах Biochemii“ nie są dosłownym powtórzeniem referatów wygłoszonych na Sympozjach. W ostatecznej ich redakcji znajduje już swój wyraz wywołana przez nie dyskusja. Piśmiennictwo jest w nich z zasady uwzględniane znacznie dokładniej, niż to jest możliwe w referacie przeznaczonym do wygłoszenia. Wreszcie znajdują w nich odbicie nowe osiągnięcia, opublikowane w okresie między odbyciem Sympozjum a oddaniem materiału do druku.

Dzięki temu „Postępy Biochemii“ będą nie tylko utrwalonym dorobkiem Sympozjów, ułatwiającym pracę w zakresie planowania, ale równocześnie będą służyć młodym pracownikom nauki i studentom jako lektura uzupełniająca, jako „wypisy“ biochemiczne, ułatwiające rozszerzenie wiadomości nabytych z podręczników. W ten sposób Komitet Biochemiczny zamierza wypełnić lukę szczególnie dotkliwą w dzisiejszej dobie, kiedy większość młodzieży napotyka trudności wynikające z niezajomości języków obcych. Tego drugiego zadania nie spełniłyby należycie same Sympozja, które ze względu na wysiłek organizacyjny mogą odbywać się nie częściej niż dwa razy do roku. Redakcja zamierza zatem, począwszy od drugiego zeszytu, uzupełnić materiały Sympozjów monograficznym opracowaniem innych problemów, według ustalonego przez Komitet planu.

Trzecią wreszcie kategorią publikacyjną w „Postęпах Biochemii“ będą krótkie artykuły związane z pobytem w Polsce naszych zagranicznych kolegów z Krajów Demokracji Ludowych lub tych spośród uczonych krajów kapitalistycznych, którzy wspólnie z nami wyznają zasadę, że naczelnym przykazaniem uczonego jest praca naukowa dla dobra ludzkości.

Obecnie oddajemy do rąk Czytelników pierwszy zeszyt, na który składają się materiały I Sympozjum, odbytego w Łodzi w dn. 24 lutego 1952 r. na temat roli biologicznej związków fosforowych, oraz II, odbytego dnia 8 października 1952 r. w Rokitnicy Bytomskiej, na temat biochemii nowotworów.

Zeszyt uzupełniająca artykuły związane z pobytem w Polsce R. L. M. Synge i F. B. Strauba.

SPIS TREŚCI

SYMPOZJUM I

	Str.
<i>Józef Heller</i> : O związkach fosforowych wysokiej energii	5
<i>Włodzimierz Niemierko</i> : O metodach rozdzielania związków fosforowych w tkankach zwierzęcych	34
<i>Janina Opińska-Blauth</i> : Osiągnięcia metody chromatografii bibułowej w analizie związków fosforowych	43
<i>Stella Niemierko</i> : O meta- i polifosforanach w organizmach żywych	50
<i>Stanisław E. Karpiak</i> : Głos w dyskusji	59

SYMPOZJUM II

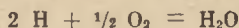
<i>Bolesław Skarżyński</i> : Struktura chemiczna tkanek nowotworowych	62
<i>Stanisław Józkiwicz</i> : Chemiczne czynniki rakotwórcze	74
<i>Włodzimierz Ostrowski</i> : Biochemiczna diagnostyka raka	88
<i>Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen</i> : Wpływ hormonów na nowotwory	98
<i>Bolesław Skarżyński</i> : Wpływ odżywiania i składników pokarmowych na rozwój nowotworów	112
<i>R. L. M. Syngé</i> : Zasady chromatografii	120
<i>M. Kramer, E. Pettko i F. B. Straub</i> : Mikrometoda oznaczania kwasu adenozyntrójfosforowego	122

Celami tej pracy było zwrócenie uw.
 na rolę fosforu w procesach w tkankach
 zwierzęcych. Funkcje fosforu w organizmie
 - dofosforanów
 Fosfor i woda -
 w badaniach nad: *Lumbricus terrestris*
Limnaea stagnalis
Tenebrio molitor
 Rola jako pierwiastka węgla fosforu w
 establishmentie formacji biochemicznej
 przy zwróceniu uwagi na rolę
 w procesie <http://rcin.org.pl> i innych
 niemieckich. Takie są kierunki

JÓZEF HELLER (WARSZAWA)

O ZWIĄZKACH FOSFOROWYCH WYSOKIEJ ENERGII

Źródłem energii substancji żywej są procesy utleniania. Utlenianiem w najszerszym znaczeniu nazywamy odłączenie elektronu. W żywej substancji donatorem elektronu jest wodór, ostatecznym zaś akceptorem tlen. Istota utleniania sprowadza się zatem w biologii do reakcji:



Jest to reakcja bardzo silnie egzergoniczna. Z biologicznego punktu widzenia obciążona jest jednak pewną wadą, wspólną na ogół reakcjom, w których bierze udział wodór — wyzwolona w niej energia przechodzi bezpośrednio w energię ciepłą i rozprasza się bezużytecznie w otoczeniu. Taki przebieg ma również utlenianie składników ustrojowych, przeprowadzone za pomocą prostych układów enzymatycznych *in vitro*. Jeżeli jednak reakcję katalizujemy za pomocą złożonego układu wielozaczynowego, na przykład mitochondrialnego preparatu cykloforazy, sprawa przebiega inaczej. W postaci ciepła otrzymujemy tylko niewielką część energii, odpowiadającej utlenieniu użytego substratu, reszta zostaje przetworzona w energię chemiczną pewnych związków o labilnej budowie, które przez przejście w formę stabilną, uboższą w energię, mogą wyzwolić zawartą w nich nadwyżkę energii. Tego rodzaju związki, stanowiące jakby przenośniki energii, zawierają przeważnie grupy fosforanowe. Pierwszy niefosforanowy związek, o podobnej funkcji akumulatorowej, poznano dopiero niedawno; jest nim koferment A o budowie merkaptydowej.

Związki wysokoenergetyczne odgrywają doniosłą rolę w metabolizmie żywej substancji. Przenoszą one energię wyzwoloną w egzergonicznych procesach katabolicznych na endergoniczne procesy anaboliczne. Dzięki nim splatają się w jedną całość procesy katabolizmu, dysymilacji, z procesami anabolicznymi, asymilacji.

W szkicu tym, którego głównym tematem jest opisany wyżej proces transformacji energii uzyskanej z procesów utleniających w energię wysokoenergetycznych związków, omówię kolejno: a) przebieg utleniania, b) najważniejsze typy związków wysokoenergetycznych, c) dane doświadczalne i pomiary dotyczące procesu transformacji, wreszcie d) sposoby użytkowania nagromadzonej po transformacji energii.

PROCESY UTLENIANIA W SUBSTANCJI ŻYWEJ

Utlenianie wodoru, któremu odpowiada redukcja tlenu, przebiega w substancji żywej najczęściej jako przeniesienie elektronów z dwóch atomów wodoru na atom tlenu. Produktem utlenienia są więc dwa jony wodorowe i podwójnie ujemny jon tlenu, które łączą się ostatecznie na cząsteczkę wody. Energia wyzwolona w pro-

cesie przejścia elektronu z jednego gramatomu wodoru na tlen da się obliczyć jako iloczyn z ładunku elektrycznego i napięcia. Ładunek elektryczny jednego gramrównoważnika, czyli 6.06×10^{23} ładunków elementarnych nazywamy 1 faradem, który odpowiada 96 500 kulombom. Przepływ takiego ładunku pod napięciem 1 wolta odpowiada energii 96 500 dżuuli. Możemy obliczyć równowartość kaloryczną dla tej ilości energii, stosując równoważnik 0,239 kal. za 1 dżuul. W ten sposób obliczamy jako efekt energetyczny przeniesienia 1 F pod napięciem 1 V wartość 23 068 kal. (kalorii gramowych).

Wartości energetyczne w tym artykule oznaczają zawsze zmiany wolnej energii (ΔF) *. Ilość energii uwalniająca się w postaci ciepła (ΔH) może być mniejsza od ΔF lub większa, zależnie od równoczesnych zmian w entropii (ΔS), według równania:

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S$$

Potencjał elektrody wodorowej o $\text{pH} = 7$, mierzony wobec elektrody wodorowej normalnej, wynosi $-0,42$ V. Potencjał elektrody tlenowej, mierzony w stosunku do tej samej elektrody normalnej, wynosi $+0,81$ V. Zatem napięcie, przy którym odbywa się przeniesienie elektronu z wodoru na tlen, wynosi $1,23$ V. Mnożąc 23 068 kal. przez 1,23 otrzymujemy 28 373 kal. Taka ilość energii uwalnia się przez utlenienie jednego gramatomu wodoru na wodę. Na powstanie gramcząsteczki wody przypada zatem 56 746 kal.

Ta ogromna ilość energii nie wyzwala się w żywej substancji od razu. Wędrówka elektronu od wodoru na tlen odbywa się etapami. Cała różnica potencjału $1,23$ V dzieli się na odcinki. Energię każdego etapu możemy obliczyć podobnie, jak to wyżej uczyniono dla całości procesu, tj. mnożąc 23 068 kal. przez skok potencjału pomiędzy ciałem wyjściowym a akceptorem wodoru lub elektronu na danym etapie, wyrażony w woltach.

Musimy jednak uświadomić sobie przy tych rozważaniach, że pomiary potencjałów oksydoredukcyjnych układów biologicznych natrafiają na szereg trudności, wobec czego większość wartości tych potencjałów uzyskuje się drogą pośrednią przez wyliczenie ze zmian wolnej energii w przebiegu danej reakcji. Zatem droga eksperymentalna jest wprost przeciwna do tej, którą ze względu na jasność wykładu posłużyliśmy się wyżej. Faktycznie obliczamy różnicę potencjału dzieląc zmianę wolnej energii przez 2×2068 kal. **

Zmianę wolnej energii w danej reakcji wylicza się, gdy to możliwe, z danych termochemicznych, a najczęściej ze stałej równowagi K wedle równania:

$$\Delta F = -RT \ln K$$

Ostateczną zatem podstawą eksperymentalną zarówno dla oznaczenia zmian wolnej energii, jak i potencjału oksydoredukcyjnego układu jest zwykle oznaczenie K przez dokładny pomiar stężeń związków reagujących i produktów reakcji w punkcie równowagi w określonej temperaturze.

Pierwszy etap utlenienia polega na aktywowaniu dwu atomów wodoru w danym substracie przez specyficzną dehydrogenazę i na przeniesieniu ich na właściwy

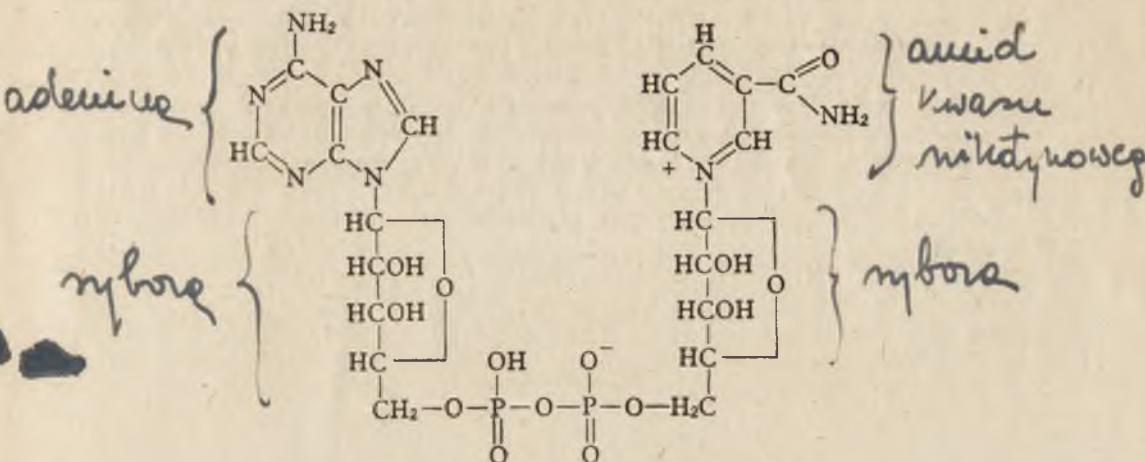
* Wedle propozycji z r. 1951 (*Report of the Royal Society Committee on Symbols*) zastępują obecnie autorzy anglosascy symbol ΔF przez ΔG .

** Ścisłe:

$$E'_0 = - \frac{\Delta G^0}{2F} - \frac{RT}{2F} \text{pH}$$

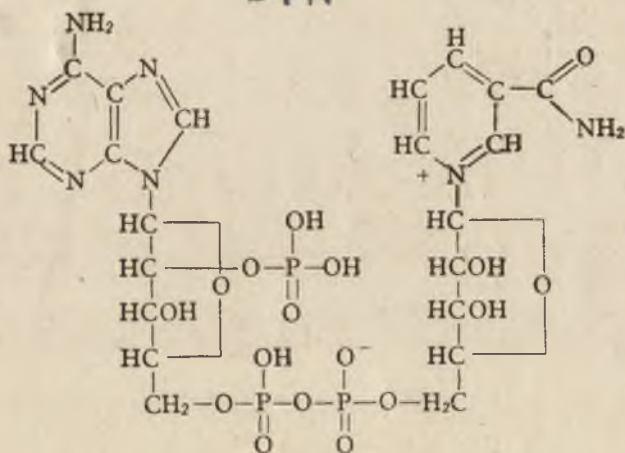
gdzie ΔG^0 oznacza zmianę wolnej energii, obliczonej dla warunków standardowych, R stałą gazową, T temperaturę, a $F = 2068$ kal.

akceptor. Akceptorem wodoru dla większości hydrogenaz jest kodehydrogenaza I (synonimy: kodehydrazaza I, kozymaza). Jest to dwunukleotyd adeninopirydynowy (DPN).



1. Dwunukleotyd adeninopirydynowy.

DPN



1a. Kodehydrogenaza II (fosfokozymaza).

Potencjał oksydoredukcyjny kozymazy wynosi:

$$E_0 = - 0,282 \text{ V}$$

(E_0 = potencjał oksydoredukcyjny układu zawierającego równe ilości formy utlenionej i zredukowanej). Zatem skok potencjału od $- 0,42$ wyniósł $0,14$ V, co dla dwu gramatomów wodoru daje energię 6480 kal. Wielkość ta ma wartość tylko orientacyjną, a to z trzech powodów:

1. Wyczenia potencjału kozymazy ze stałej równowagi K (por. wyżej) dają różne wartości, zależnie od tego, jaką reakcją posługujemy się w doświadczeniu. Podana wyżej, ogólnie przyjęta wartość $- 0,282$ V została wyliczona przez *Bor-sooka* (1940) z równowagi układu: alkohol — aldehyd octowy. Bezpośredni pomiar potencjału (*Barron i Hastings*, 1934) dał $- 0,29$. Z równowagi między kwasem

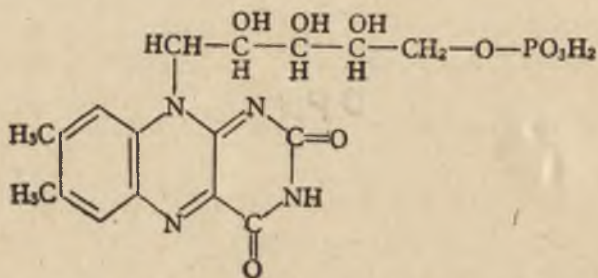
jabłkowym a szczawiowo-octowym można wyliczyć — 0,210. Wreszcie dla równowagi między izopropanolem i acetonem obliczają *K. Burton* i *T. H. Wilson* (1953) (1) (w tej pracy omówione są również wcześniejsze cytowane tamże oznaczenia) wartość —0,320, podaną już w 1949 r. przez *Dixona*. Niektórzy autorzy formułują to w ten sposób, że „potencjał E_0 kozymazy przesuwają się zależnie od natury białka apofermentu, z którym koferment łączy się w czasie reakcji“.

2. W układzie tym, podobnie jak we wszystkich, w których przenosi się nie sam elektron, lecz cały atom wodoru, potencjał jest zależny od pH, które może być różne w różnych miejscach komórki i w różnych momentach.

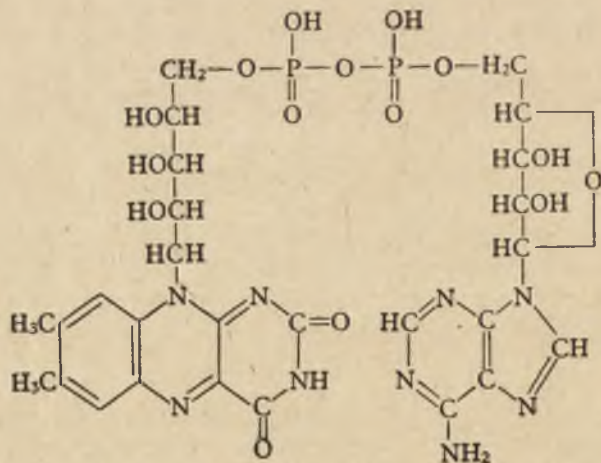
3. Aktualna wartość potencjału przesuwają się wraz ze zmianą stosunku stężeń formy zredukowanej do utlenionej w granicach $\pm 0,1$ V.

Dla niektórych dehydrogenaz specyficznym akceptorem jest fosfokozymaza (ko-dehydrataza II, TPN), bogatsza od pierwszej o jedną grupę fosforanową.

Następny etap utlenienia polega na przejściu pary atomów wodoru ze zredukowanej kozymazy lub fosfokozymazy na rdzeń aloksazynowy, związany w postaci kwasu fosforyboflawinowego albo dwunukleotydu flawinoadeninowego ze specyficznym białkiem enzymatycznym.



2. Kwas fosforyboflawinowy (FMN).



3. Dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD).

Dla zredukowanej kozymazy specyficznym zaczynem jest diaforaza, która zawiera dwunukleotyd flawinoadeninowy, dla zredukowanej zaś fosfokozymazy reduktaza cytochromowa, zawierająca nukleotyd flawinowy. Potencjał oksydoredukcyjny tych zaczynów, przy różnym stężeniu ich formy utlenionej i zredukowanej, leży w pobliżu 0 (dla „żółtego fermentu“ Warburga —0,06), czyli równa się mniej

nych za poszczególne, opisane wyżej etapy utlenienia. Możemy pod tym względem podzielić dehydrogenazy na trzy grupy. Do pierwszej należą opisane wyżej typowe dehydrogenazy, przenoszące dwa atomy wodoru na kozymazę lub fosfokozymazę. Liczne zaczyny tej grupy udało się nie tylko wyosobnić, lecz nawet wykrytyzować. Żaden z nich nie zawiera barwnej grupy prostetycznej. Drugą grupę stanowią enzymy, które nie wymagają obecności nukleotydów pirydynowych i reagują wprost z enzymami flawinowymi. Wyosobniono już niektóre zaczyny tej grupy, lecz dotąd żadnego nie otrzymano w stanie czystym. Wreszcie trzecią grupę stanowią enzymy przenoszące elektrony z substratu na cytochrom c pozornie bezpośrednio. Nie udało się bowiem dotąd wykazać w tych układach oddzielnych przenośników pośrednich. Enzymy tej grupy są na ogół mocno związane ze strukturą komórkową i nie udało się dotąd wydzielić ich w stanie czystym. Wyjątek stanowi dehydrogenaza drożdżowa dla kwasu mlekowego, która jest rozpuszczalna i zawiera grupę prostetyczną podobną do cytochromu b. Również i ten enzym ulega zniszczeniu przy próbach oczyszczania. Przypuszczalnie dehydrogenazy grupy drugiej i trzeciej (przez niektórych autorów określane jako dehydrogenazy oksytropowe) zawierają przenośniki pośrednie w postaci mocno związanej grupy prostetycznej. U niektórych przemawia za tym ich barwa.

Najważniejszym enzymem w grupie trzeciej jest oksydaza kwasu bursztynowego, zawierająca w jednym kompleksie dehydrogenazę o flawinowej grupie prostetycznej i oksydazę cytochromową. Przy działaniu tego zaczynu odłączenie wodoru z kwasu bursztynowego odbywa się przy potencjale około 0, tak że udział kozymazy jest wyłączony, a cały spadek potencjału od odłączenia wodoru do zredukowania tlenu wynosi tylko 0,81 V.

Oprócz oksydazy cytochromowej znamy jeszcze szereg innych oksydaz reagujących wprost z tlenem. Najważniejszą cechą zapewniającą oksydazie cytochromowej wyjątkowe stanowisko jest to, że przenosi sam elektron, wobec czego produktem końcowym jest woda, powstająca z połączenia dwuwartościowego ujemnego jonu tlenowego z dwoma jonami wodorowymi. Inne oksydazy przenoszą na cząsteczkę tlenu dwa atomy wodoru, dając w wyniku wodę utlenioną. Woda utleniona służy jako substrat bądź dla katalazy, bądź dla różnych peroksydaz. Katalaza rozkłada ją na wodę i wolny tlen, peroksydazy przenoszą atom tlenu z wody utlenionej na różne związki. Filogenetycznie oksydaza cytochromowa przedstawia wyższy stopień rozwoju, w organizmie zwierzęcym stanowi też główną drogę metaboliczną, po której przebiega ponad 95% całej przemiany.

Omawialiśmy dotąd koleje atomów wodoru odłączonych od podłoża, aż do ich połączenia się z tlenem na wodę. Należy z kolei zastanowić się, jakie są dalsze losy pozostałej reszty cząsteczki. Z reguły związek powstały z innego przez odłączenie dwu atomów wodoru nie jest zdolny bezpośrednio do oddawania dalszych atomów wodoru. Podlega więc takim przemianom, jak przyłączenie cząsteczki wody, odłączenie CO₂ lub kondensacja z innym związkiem. Produktem takich przekształceń jest znowu związek zdolny do oddania pary atomów wodoru. Główny szlak tego rodzaju przemian, występujący w całym świecie żywej substancji, a w tkankach zwierzęcych stanowiący prawie wyłączną drogę przemian, znany jest pod nazwą cyklu kwasów trójkarboksylowych lub cyklu Krebsa.

Punktem wyjścia tego cyklu jest kwas octowy, który jest wspólnym pośrednim ogniwem w metabolizmie wszystkich trzech zasadniczych rodzajów składników ustrojowych. W przemianach cukrowców powstaje przez tlenową dekarboksylację kwasu pirogronowego. W przemianie tłuszczowej jest on fragmentem, odrywającym się kolejno z łańcucha kwasu tłuszczowego w przebiegu beta-oksydacji. W przemianie białkowej poszczególne kwasy aminowe tracą grupę aminową bądź przez transaminację, bądź przez tlenową dezaminację. Bezazotowa pochodna kwasu aminowego włącza się zależnie od swego charakteru chemicznego już to w szlak

przemian cukrowych, już to tłuszczowych, które oba, jak wiemy, prowadzą do kwasu octowego. Poglądy te na rolę kwasu octowego zgodne są z oceną ilości kwasu octowego powstającą w przemianie pośredniej w ciągu doby. Ocenę oparto na pomiarach rozcieńczenia wprowadzonego do organizmu szczura kwasu octowego, naznaczonego węglem promieniotwórczym, przez normalny kwas octowy, powstający w przemianie endogennej.

Gdyby u człowieka o wadze 70 kg przyjąć na jednostkę wagi te same wartości, jakie otrzymano u szczura, wypadałoby na dobę 600 do 700 g kwasu octowego.

Jest to wynik zupełnie zgodny z wyobrażeniem, że prawie cały przyjęty pokarm przechodzi poprzez stadium kwasu octowego.

W cyklu kwasów trójkarboksylowych kwas octowy w postaci kompleksu z koenzymem A łączy się z kwasem szczawiowo-octowym na kwas cytrynowy uwalniając koenzym. Kwas cytrynowy przekształca się poprzez kwas cis-akoniowy w kwas izocytrynowy. Z kwasu izocytrynowego odłączają się dwa atomy wodoru tak, że pozostaje kwas szczawiowo-bursztynowy. Przez dekarboksylację środkowej grupy karboksylowej (przy udziale dwufosfotaminy) powstaje kwas alfa-ketoglutarynowy. Kwas alfa-ketoglutarynowy ulega dekarboksylacji połączonej z utlenieniem. Produktem tych przemian jest kwas bursztynowy, który przy udziale dehydrogenazy bursztynowej przechodzi w nienasycony kwas fumarowy. Kwas fumarowy przechodzi przez przyłączenie cząsteczki wody w kwas jabłkowy, który pod wpływem dehydrogenazy jabłkowej utlenia się na kwas szczawiowo-octowy. Kwas szczawiowo-octowy może się połączyć z następną cząsteczką kwasu octowego na kwas cytrynowy i w ten sposób cykl się zamyka.

Z wszystkich komórek tkanek zwierzęcych daje się wydzielić kompleks zaczynów potrzebnych do wszystkich reakcji tego cyklu w postaci jednostki strukturalnej, zachowującej się jak jeden zaczyn. Ze względu na to powiązanie z reakcjami cyklu Krebsa nazwano ten kompleks cykloforazą (5). Badania nad cykloforazą rozpoczęte w r. 1946 zostały umożliwione przez wprowadzenie ulepszonej techniki rozdrabniania, czyli homogenizowania komórek. Homogenizaty wiruje się najpierw w zwyczajnej wirówce celem oddzielenia grubszych resztek oraz jąder komórkowych, po czym odlany płyn wiruje się na szybkoobrotowej wirówce, otrzymując osad złożony głównie z mitochondrii. Osad zawieszony w odpowiednim roztworze solnym ma wszelkie właściwości cykloforazy. Jest rzeczą ciekawą, że właściwości poszczególnych enzymów cykloforazy, związanych w mitochondriach, różnią się nie tylko ilościowo, ale nawet jakościowo od właściwości tychże enzymów w stanie całkowitego oddzielenia. Zaczyny izolowane tracą łatwo swoje koenzymy, w mitochondriach koenzymy są związane ściślej ze swymi apoenzymami. Dalsze różnice zachodzą w położeniu optimum pH, powinowactwie do podłoża, wrażliwości na różne inhibitory. Jeżeli do preparatu cykloforazy mitochondrialnej dodać natychmiast odpowiednie substraty, to preparat taki katalizuje całość przemian cyklu w ciągu wielu godzin. Jeśli jednak przechowujemy preparat nawet w optymalnych warunkach, lecz bez substratów, a więc nie w stanie pracy, to w szybkiej kolejności traci on aktywność związaną z poszczególnymi składnikami.

W preparacie z nerek — już po 1 do 2 godzin zachodzi potrzeba dodania jonu magnezowego i AMP. Po dalszych kilku godzinach układ wymaga już uzupełnienia przez Mg, ATP, DPN i TPN. Po 10 godzinach zjawia się potrzeba dalszych dodatków.

Zakres działania zaczynowego cykloforazy jest bardzo szeroki. Preparaty mitochondrialne katalizują wszystkie reakcje cyklu trójkarboksylowego, poza tym utlenienie kwasów tłuszczowych. Katalizują też fosforylacje, związane z utlenieniem, syntezę cytruliny i kwasu hipurowego, tlenową dezaminację szeregu aminokwasów, transaminację oraz niektóre reakcje jednowęglowe, jak przemiana glikokolu w se-

rynę. Dopiero poznanie strukturalnie związanych kompleksów zaczynowych, jakimi są preparaty mitochondriowe cykloforazy, umożliwiło eksperymentalne udowodnienie powiązania, jakie zachodzi między procesami utlenienia a fosforylacją. Udało się wykazać, że związki fosforowe wysokiej energii mogą powstać w wyniku przemian cyklu Krebsa tam, gdzie następuje odłączenie pary atomów wodoru z przeniesieniem na kozymazę.

Również następne etapy wędrówki atomów wodoru lub samych elektronów, aż do połączenia się ich z tlenem, są źródłem powstawania wiązań fosforanowych wysokoenergetycznych.

Mechanizm powstawania wiązań wysokiej energii w związku z procesem utlenienia udało się wyjaśnić tylko w niektórych przypadkach, które w dalszych rozdziałach omówimy szczegółowo. W wielu przypadkach ustalone fakty pozwalają jedynie na skonstruowanie mniej lub więcej prawdopodobnych hipotez, w bardzo wielu stwierdzono tylko istnienie transformacji, lecz o jej mechanizmie niczego nie możemy powiedzieć. Istnienie powiązania wykazujemy pośrednio: wiązanie grupy fosforanowej przez glikozę na ester glikozo-6-fosforanowy odbywać się może tylko kosztem wiązania fosforanowego wysokiej energii, dostarczonej przez ATP. Skoro więc w jakimś oddychającym układzie następuje estryfikacja między fosforanem a glikozą w ilości wielokrotnie przewyższającej zawartość ATP, możemy uważać to zjawisko za dowód przejściowego utworzenia ATP w ilości odpowiadającej ilości zestryfikowanego z glikozą fosforu. Jeśli za miarę utlenienia weźmiemy ilość zużytego tlenu, to stosunek zestryfikowanego fosforu do zużytego tlenu jest miarą wydajności przemiany energii utlenień w energię wiązań fosforanowych. Ważną pomocą w śledzeniu tego przekształcenia energii jest okoliczność, że szereg związków, jak np. 2,4-dwunitrofenol, hamuje fosforylację tlenową, nie wpływając na sam przebieg procesów utlenienia.

od czasu wyznaczenia kwasu fosforowego fosfor

NAJWAŻNIEJSZE TYPY ZWIĄZKÓW WYSOKOENERGETYCZNYCH

Początkiem znajomości związków o wysokiej energii było stwierdzenie przez *Meyerhofa* i *Suranyi* (6), że hydroliza fosfokreatyny wyzwała duże ilości ciepła. Na razie nie zwrócono na to większej uwagi. Jednak w r. 1930 *Lundsgaard* (7) wykazał, że w skurczu alaktycznym mięśnia zatrutego kwasem jodooctowym wyzwała się kosztem rozkładu fosfokreatyny tyle samo ciepła, licząc na jednostkę pracy, co w przemianie prowadzącej do wytwarzania kwasu mlekowego. Wiedziano już z prac *Eggletonów* (8) z r. 1927 oraz *Fiskego* i *Subbarowa* z r. 1929 (9), że w normalnym mięśniu fosfokreatyna rozpadą się w czasie pracy, a resyntetyzuje się w czasie spoczynku tlenowego. W r. 1931 *Lundsgaard* (10) obliczył, że rozpad 2 cząsteczek fosfokreatyny dostarcza tyleż energii, co przemiana $\frac{1}{2}$ glikozy na kwas mlekowy, tj. 24 000 kal. Autor ten wnioskował, że wysokoenergetyczne wiązania grupy fosforanowej są normalnym źródłem energii dla pracy mięśnia. Zwraca on też uwagę na dużą wydajność przemiany energii pochodzącej z glikogenolizy na energię wiązań fosforanowych oraz na fakt, że wiązania te są do dyspozycji mięśnia nawet przy całkowitym zahamowaniu glikogenolizy. W r. 1934 badania szkoły *Parnasa* (11), zwłaszcza *Osterna* oraz badania *Lohmanna* (12) wiaśniały sposób przenoszenia energii. Pośrednikiem między ogniwami łańcucha glikolitycznego a fosfokreatyną okazał się odkryty przez *Lohmanna* (13) w r. 1929 kwas adenozynotrójfosforowy. Poznano reakcje odtwarzania się ATP z ADP kosztem kwasu fosforogronowego (14) i fosforanu fosfoglicerolowego (15). Stwierdzono zdolność przerzucania grup fosforowych przez te związki wraz z energią na kwas adenozynodwufosforowy, z którego w ten sposób odtwarzał się kwas adenozynotrójfosforowy. Ciągle jednak nie umiano jeszcze zrozumieć, skąd biorą się wiązania fosforanowe wysokiej energii w nieobecności procesów glikogenolitycznych.

Przełomowe znaczenie w tej kwestii miało poznanie fosforylacji sprzężonej z utlenianiem. Zjawisko fosforylacji oksydacyjnej odkrył Engelhardt (16a, b) w r. 1930, a więc w czasie, kiedy rola związków fosforowych w przenoszeniu energii nie była jeszcze znana, stąd prace te nie zwróciły wówczas należytej uwagi. Jedni z pierwszych podjęli to zagadnienie eksperymentalnie Belitzer i Czibakowa (17a) oraz Kalchar (17b) w r. 1939.

Równocześnie Lipmann wykazał powstawanie wiązań fosforowych ciał wysokoenergetycznych przy utlenianiu ketokwasów, tak że ustalił się pogląd, iż większa część energii utlenień we wszystkich komórkach przechodzi w wysokoenergetyczne związki fosforowe. Poglądy te zebrał i przedstawił systematycznie w r. 1941 Lipmann (18) w artykule, który jeszcze dzisiaj może z pożytkiem służyć jako wprowadzenie do tego zagadnienia.

Lipmann położył największy nacisk na badany przez siebie bezwodnik octowo-fosforowy, który uważał za prototyp innych bezwodników karboksylowo-fosforanowych (acylofosforany). Tę klasę ciał uważa za główny trzon związków wysokoenergetycznych (19).

Pod tym względem przewidywania Lipmanna nie sprawdziły się. Formą wysokoenergetyczną, czynną w rozlicznych przemianach kwasu octowego okazał się wysoceobniony przez Lynena (20) związek tego kwasu z kofermentem A. Współczesne badania, zwłaszcza Ochoa (21) wskazują na udział kofermentu A w szeregu przemian kwasów tłuszczowych.

Naszkicowany tu obraz rozwoju badań byłby niekompletny, gdybyśmy nie podkreślili specjalnie roli, jaką odegrała tu biochemia polska. Jest to tym potrzebniejsze, że w obcym piśmiennictwie rola ta jest obecnie przeważnie przemilczana. Zastugą lwowskiej szkoły było odkrycie fosforylacji (Parnas i Baranowski, 1935) (15a) i zrozumienie znaczenia tego typu reakcji w substancji żywej, gdzie odwrócenie procesów hydrolitycznych jest przeważnie praktycznie niemożliwe ze względu na olbrzymią przewagę stężenia wody nad stężeniem wszystkich innych składników. Dalszą, może ważniejszą zastugą było zerwanie z pojęciem „reakcji sprzężonych“ w tym znaczeniu, że „energia wyzwolona w jednych, miałaby bez związku ściśle materialnego między nimi służyć do zużycia w innych, endotermicznych“ (Parnas, 14). Wykazano, że koenzym działa nie przez samą swoją obecność (ATP, ADP), lecz że bierze czynny udział w reakcji, oddając lub przyjmując grupę fosforanową. W tej samej pracy (14) szkicuje już Parnas bardzo wyraźnie możliwość fosforylacji oksydacyjnej.

Po tym krótkim rysie historycznym przystępujemy do systematycznego omówienia związków wysokoenergetycznych.

Z wyjątkiem odkrytych niedawno związków kwasu octowego i bursztynowego z kofermentem A, wszystkie znane nam związki wysokiej energii są pochodnymi fosforowymi.

Fosfor występuje w żywej substancji jedynie w postaci pochodnych kwasu orto-, piro- i trójfosforowego. Szczególnie liczne są estry kwasu ortofosforowego. Do tej grupy należy większość koenzymów, z których wiele jest zarazem pochodnymi witamin. Energia wiązań estrowych jest rzędu 2 do 4 tys. kal. na mol. W przeciwieństwie do tego energia wiązań wysokiej energii jest rzędu 11 500 do 16 000 kal. Stosunki te przedstawia tabela I, zaczerpnięta z artykułu Avisona i Hawkinsa (22).

Znamy 4 typy wiązań pochodnych fosforanowych o wysokiej energii. Pierwszy typ występuje w fosfagenach, tj. w fosfokreatynie u kręgowców i fosfoargininie u zwierząt bezkręgowych. Baldwin i Yudkin (23) twierdzą, że pierścienice zawierają jakiś trzeci odmienny fosfagen, którego zasadowej składowej nie zdołali jeszcze zidentyfikować. W związkach tych fosfor łączy się bezpośrednio z azotem aminowym.

fosfagenu - fosfokreatyna - kręgowców
fosfoarginine u w. beik

w ATP. Odwrotnie też, energia przenosząca się wraz z końcową grupą fosforanową ATP może być użyta we wszystkich reakcjach endergonicznych, których przebieg udało się dotąd zrealizować. Wiązanie między rybozą a pierwszą resztą fosforanową jest wiązaniem niskiej energii. Natomiast oba wiązania międzyfosforanowe są wiązaniami wysokiej energii. Przez szereg lat istniała kontrowersja, czy ATP w metabolizmie oddaje jedną czy obie grupy fosforanowe. Sytuacja wyjaśniła się, gdy w r. 1943 *Kalckar* (24) wykazał istnienie zacynu *m i o k i n a z y*. Enzym ten katalizuje powstawanie z dwu cząsteczek ADP jednej cząsteczki ATP i jednej AMP (kwasu adenilowego). Kwas adenilowy jest w tkankach zwierzęcych nietrwały. Jeżeli nie zostanie w krótkim czasie z powrotem ufosforylowany, podlega działaniu dezaminazy, która go zmienia na kwas inozynowy, zawierający hipoksantynę w miejsce adeniny.

Najwcześniej wyjaśniono rolę ATP w glikogenolizie. Heksokinaza przenosi grupę fosforanową z ATP na 6 węgiel glikozy, dając glikozo-6-fosforan. Reakcja ta połączona jest z dużą utratą energii, bo kosztem wiązania wysokoenergetycznego powstaje wiązanie estrowe, przedstawiające tylko 3300 kal. Jakkolwiek zredukowana, energia ta wystarczy na przeprowadzenie estru poprzez glikozo-1-fosforan w glikogen. Wiązanie glikozydowe jest równoważne energetycznie z wiązaniem estrowym fosforanu. Dlatego fosforoliza glikogenu może się odbywać bez doprowadzenia energii. W glikogenolizie ester glikozo-1-fosforowy przechodzi poprzez glikozo-6-fosforowy w fruktozo-6-fosforowy. W tym miejscu potrzebne jest nowe doprowadzenie energii, więc do węgla pierwszego estru fruktozo-6-fosforowego przyłącza się z ATP grupa fosforanowa. Podobnie jak i w wyniku działania heksokinazy, mamy tutaj stratę energii.

Straty te wywołane przez przejście ATP w ADP wyrównują się w reakcji ADP z fosfokreatyną. Fosfokreatyna stanowi zatem jak gdyby pogotowie energetyczne mięśnia. W dalszych etapach glikogenolizy regeneruje się ATP z ADP kosztem związków, o których będzie mowa niżej. Wtedy z kolei ATP reaguje z kreatyną, odtwarzając fosfokreatynę i przechodząc w ADP. Reakcja ta została wyjaśniona przez *Parnasa* (11) oraz *Lohmanna* (12) i zapoczątkowała dzisiejszy kierunek w poglądach na mechanizm krążenia energii.

Tego samego typu wiązania co w ATP występują również w pirofosforanach nieorganicznych. Poglądy na biologiczną rolę pirofosforanów przechodziły zmienne koleje. Pierwotnie *Lohmann* (25) izolując ATP uzyskał wskutek rozkładu nieorganiczny pirofosforan, który uważał za właściwy składnik tkankowy. Oba związki mają bowiem identyczną krzywą hydrolizy. Jednak *Davenport* i *Sacks* (26) wykazali w r. 1929, że w pierwotnym przesączu uzyskanym z mięśnia nie da się za pomocą specyficznej metody kolorymetrycznej wykazać obecności nieorganicznego pirofosforanu.

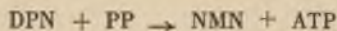
W latach późniejszych uczeni radzieccy *Ferdmann* i *Feinschmidt* (27) twierdzili, że udowodnili obecność nieorganicznego pirofosforanu w mięśniu, wykazując nadwyżkę grup w wiązaniu pirofosforanowym ponad oczekiwaną zawartość pentozy. Jednak badania *Parnasa* i jego szkoły (28) dowiodły, że stosowana przez autorów radzieckich metoda dawała za niskie wartości dla pentozy. Równocześnie uczniowie *Parnasa*, *Gibayto* i *Umschweif* (29), znaleźli czułą i specyficzną metodę oznaczania nieorganicznych pirofosforanów i dowiedli za jej pomocą nieobecności pirofosforanów w wyciągach mięśniowych.

Dopiero po 10 latach odżywa w piśmiennictwie sprawa pirofosforanów. *Cori* (30) wykazuje pojawienie się drobnych ilości pirofosforanów w czasie doświadczeń metabolicznych *in vitro*. Równocześnie *Mann* (31) stwierdza występowanie większych ilości meta- i pirofosforanów u pleśni *Aspergillus niger*. Kilka lat później *Wiame* (32) znalazł te związki w drożdżach. Wreszcie w r. 1950 *Heller* i współpracownicy (33) znajdują duże ilości pirofosforanów w narządach płcio-

wych samca motyla wilczomlecza. W tym samym roku *Niemierkowie* (34) wykazują w odchodach molika *Galleria mellonella* oprócz pirofosforanów zawartość znacznych ilości metafosforanów.

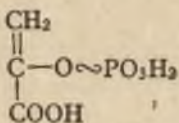
Na ogół przyjmowano milcząco, że nieorganiczne pirofosforany przedstawiają ten sam typ wiązań wysokoenergetycznych co ATP. Pogląd ten zachwiał się, gdy *J. Roche* (35) doniósł, że udało mu się uzyskać syntezę PP z ortofosforanu pod działaniem rozdrobnionej i przesianej zawiesiny śluzówki jelita. Z danych *Roche'a* wynika wartość energetyczna wiązania PP około 1900 kal., co pozostaje w sprzeczności z całokształtem naszych wiadomości. Badania *Meyerhofa* (36) nie potwierdziły wyników *Roche'a*, pomiary zaś ciepła wyzwolonego przy enzymatycznej hydrolizie PP (37) dały wartość 9000 kal. Stąd można ocenić zmianę wolnej energii w tej reakcji na około 10 000 kal.

Badania lat ostatnich wykazały, że nieorganiczne pirofosforany nie są w metabolizmie produktami odpadkowymi, lecz że biorą w przemianach czynny udział. Jedne z pierwszych — badania *Cornberga* (38) wykazały udział pirofosforanów w syntezie dwunukleotydów: kozymazy i flawinoadeninowego z odpowiednich mononukleotydów i ATP. Odwrotnie też, dwunukleotydy te rozpadają się pod wpływem nieorganicznego pirofosforanu i swoistego enzymu na mononukleotyd nikotynowy (NMN) i ATP względnie na kwas ryboflawinofosforowy i ATP.



W reakcji tej stała równowagi *K* wynosi około 1, więc suma energii wiązań PP i DPN jest równa sumie energii obu grup, końcowej i przedostatniej, w ATP. *Ohlmeyer* i *Shatas* (37) obliczają energię wiązania P—O—P w DPN na nieco ponad 12 000 kal. Ostatnio *Lipmann* i współpracownicy (39) wykazali rolę pirofosforanu w reakcjach kofermentu A. Rola biologiczna nieorganicznych wielofosforowych związków o typie kwasu metafosforowego niezupełnie jest jasna.

Trzeci typ wiązań fosforanowych wysokiej energii przedstawia kwas fosfopirogronowy.



7. Kwas fosfopirogronowy.

Charakterystyczna konfiguracja polega tu na połączeniu grupy fosforanowej z węglem enolowym. Kwas fosfopirogronowy reaguje z ADP, przy czym powstaje ATP i wolny kwas pirogronowy. Energia wiązania fosforanowego kwasu fosfopirogronowego jest większa niż energia grupy końcowej ATP. Dlatego przez szereg lat nie umiano przeprowadzić odwrócenia tej reakcji. Reakcja ta, odkryta przez *Parnasa* i współpracowników (11), była uważana przez pierwsze lata za jedno z głównych źródeł energii.

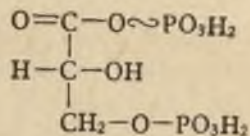
Czwartym typem wiązań jest połączenie grupy fosforanowej z grupą karbonylową.

Pierwszy taki związek wyosobnili *Negelein* i *Brömel* (15b) jako produkt enzymatycznego utlenienia fosfogliceroaldehydu. Jest to kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy.

Bezwodnikową strukturę potwierdza występowanie prążka absorpcyjnego przy 2400 Å podobnie jak w bezwodniku kwasu octowego. Związek ten reaguje z ADP, dając ATP i kwas 3-fosfoglicerynowy.

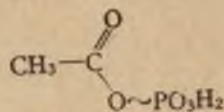
Do tego samego typu należy odkryty przez *Lipmanna* (40) acetylofosforan.

Lipmann uważał go za prototyp innych acylofosforanów, którym przypisywał dominującą rolę w przenoszeniu energii. Dzisiaj jednak wydaje się, że przemiany, o których mówił *Lipmann*, odbywają się przy udziale kofermentu A.

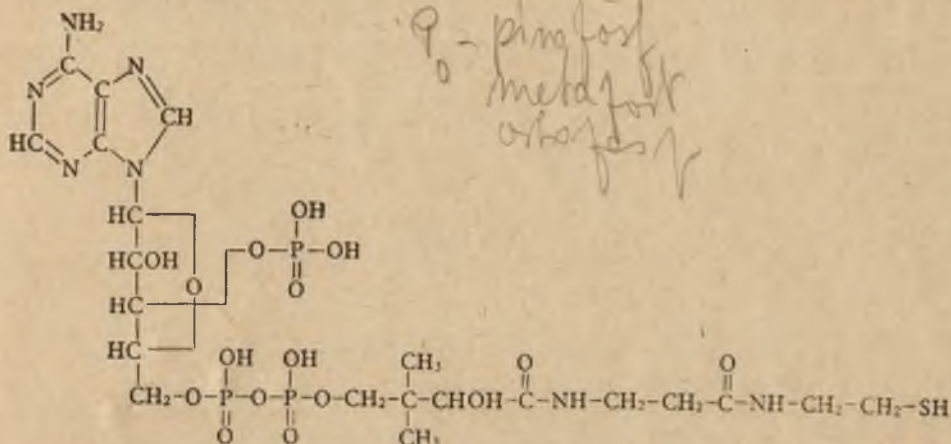


8. Kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy.

Badania nad koenzymem A zaczęły się od stwierdzenia przez *Nachmansona* (41), że do acetylowania choliny niezbędna jest obecność ATP. Prace *Lipmanna* i współpracowników nad acetylowaniem sulfonamidów (42) wykazały obecność nieznanego dotąd kofermentu, oraz że związek ten zawiera kwas pantotenowy, wielofosforan adenozyny i siarkę związaną z kwasem pantotenowym. *Shell* (cyt. wg *Lynena*, 20) wyjaśnił, że fragment siarkowy jest beta-merkaptocytyloaminą, a wreszcie *Kaplan* (cyt. wg *Lipmanna*, 39) w r. 1952 wykazał, że dodatkowa reszta fosforanowa jest najprawdopodobniej związana z trzecim węgłem rybozy.



9. Acetylofosforan.



10. Koferment A.

Za słusznością powyższego wzoru przemawiają wyniki analizy grupy *Lipmanna*, wykonane na najczystszych preparatach (39). Rola metaboliczna koenzymu A wynika jasno z prac *Lynena*. Autor ten wyosobnił z drożdży (20) kompleks kofermentu ze związaną na siarce grupą acetylową. Preparat ten przeprowadza w obecności odnośnych enzymów bez dalszych dodatków różne acetylowania, np. sulfonamidów, choliny, kondensuje z kwasem szczawiowo-octowym resztę acetylową na kwas cytrynowy, syntetyzuje kwas acetoctowy itp. Wiązanie między siarką a resztą acetylową jest wiązaniem wysokiej energii. Kompleks ten jest długo poszukiwanym „czynnym octanem“. Bierze on udział w licznych przemianach kwasu octowego, których przegląd daje np. praca *K. Bernharda* (43). Sam koenzym możemy określić jako przenośnik grup acetylowych między układami donatorów i akceptorów. Zarazem jako związek wysokiej energii jest on ogniwem pośredniczącym w wymianie energii między wysokoenergetycznymi związkami fosforowymi a pochodnymi acylowymi wysokiej energii. Do tych ostatnich należą prócz acetylo-CoA wykazane niedawno benzoilo-CoA i bursztyno-CoA. Przykładem przeniesienia energii „fosforanowej“ na acyle jest reakcja zachodząca między koenzymem A, kwasem octowym i ATP. Jak wykazał *Lynen* (20), ATP reaguje z kofermentem A, tworząc fosforylo-koenzym A. Kompleks ten wymienia resztę fosforanową na octanową i powstaje w ten sposób „czynny octan“ (acetylo-CoA).

- 1) $\text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{ADP} + \text{CoA-fosforan}$
- 2) $\text{CoA-fosforan} + \text{octan} \rightarrow \text{acetylo-CoA} + \text{fosforan}$

Inną reakcję tego typu wykazał *Lipmann* (39).

- 1) $\text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{AMP} + \text{CoA} - \text{pirofosforan}$
- 2) $\text{CoA-pirofosforan} + \text{octan} \rightarrow \text{acetylo-CoA} + \text{pirofosforan}$

Reakcja ta jest odwracalna: pirofosforan działając na acetylo-CoA daje pirofosforan koenzymu i kwas octowy. Pirofosforan koenzymu może reagować z AMP odtwarzając ATP. W ten sposób energia czynnego fosforanu przekształca się w energię wiązań fosforanowych.

Rola metaboliczna acetylofosforanu nie przedstawia się jasno na tle współczesnych badań. Według *Ochoa* (21) u tych drobnoustrojów, które nie posiadają enzymu kondensującego octan z kwasem szczawiowo-octowym na kwas cytrynowy, jedyną drogą uwolnienia koenzymu A z jego związku z kwasem octowym jest reakcja z nieorganicznym fosforanem. Powstaje przy tym acetylofosforan i wolny koferment A, którego krążenie zostaje w ten sposób zapewnione. Dalsza droga metaboliczna acetylofosforanu musiałaby iść bądź przez odwrócenie tej reakcji, bądź przez przeniesienie grupy fosforanowej na ADP z powstaniem wolnego kwasu octowego. Ponieważ znane nam drogi metaboliczne kwasu octowego wymagają aktywowania go kosztem ATP, obie drogi stanowią pod względem energetycznym ślepy zaułek.

Gromadzenie energii w związkach chemicznych — wyżej opisane — nosi nazwę wiązań wysokoenergetycznych. Nazwa ta, jakkolwiek przyjęta we wszystkich prawie językach, nie oddaje istoty rzeczy i prowadzi często do fałszywych interpretacji, dlatego staraliśmy się jej unikać w dotychczasowym wykładzie. Najczęstszym błędem jest łączenie pojęcia wiązań wysokoenergetycznych z pojęciem wiązań mocnych. W rzeczywistości jednak wiązania te, jako wyswobadzające energię, są wiązaniami słabymi i łatwo ulegają rozerwaniu, natomiast niskoenergetyczne wiązania estrowe odznaczają się dużą stałością i mogą być określone jako wiązania mocne. Do łatwo hydrolizujących należą fosfokreatyna, fosfoarginina, obie grupy końcowe ATP i zwłaszcza acylofosforany. Spośród pochodnych estrowych łatwo hydrolizuje glikozo-1-fosforan, dorównując pod tym względem ATP, natomiast wysokoenergetyczny kwas fosfopirogronowy hydrolizuje 3-krotnie wolniej. Wysokoenergetyczne związki fosforowe rozpadają się powoli nawet w nieobecności właściwych enzymów. Pod tym względem wysokoenergetyczne pochodne CoA są o wiele trwalsze (*Lynen*, 20).

Na przykładzie kwasu pirogronowego omówimy mechanizm powstawania nagromadzonej energii i damy próbną interpretację roli grupy fosforanowej.

Kwas pirogronowy powstaje przez odwodnienie kwasu glicerynowego. Ciepło spalania kwasu pirogronowego wynosi 280 000 kal., kwasu glicerynowego zaś 286 500 kal., stąd $\Delta H = 6500$ kal. Chcąc obliczyć zmianę wolnej energii trzeba w myśl równania

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S$$

uwzględnić zmiany w entropii. Entropia kwasu glicerynowego wynosi 48,9, kwasu pirogronowego zaś 70,6, zatem przyrost entropii w tej reakcji wynosi 21,7, co w temperaturze 25⁰ (czyli 298⁰ w skali bezwzględnej) daje 6450 kal. Tę wielkość trzeba dodać do różnicy ciepła spalania i otrzymujemy wtedy jako wolną energię przejścia kwasu glicerynowego w pirogronowy: 12 950 kal. Z tego 6500 kal. yzwala się jako ciepło i rozprusza w otoczeniu, 6450 zużywa się na wzrost entropii.

Jeśli reakcję odwodnienia przeprowadzimy nie na wolnym kwasie glicerynowym, lecz na jego estrze fosforanowym, to uwalnia się niespełna 300 kal. Nadwyżka zatem około 12 600 kal. musi tkwić w jakiejś formie w powstałym związku. Dodając do tego 3000 kal., które trzeba doprowadzić przy estryfikacji kwasu glicerynowego, a które uwalniają się przy hydrolizie, dostajemy łącznie 15 600 kal. jako nadwyżkę energii kwasu fosfopirogronowego ponad pirogronowym. Z tego 6450 kal. przypada na zwiększoną entropię kwasu pirogronowego w stosunku do glicerynowego, zatem przy hydrolizie kwasu fosfopirogronowego powinno się otrzymać około 9000 kal. Wartość uzyskana doświadczalnie przez *Meyerhofs* i *Schultza* (44) wynosi 8450 kal.

Podobnie przedstawia się także sprawa transformacji energii w reakcjach utlenienia. Energia wyzwalamąca się przy utlenieniu i rozpraszająca się jako ciepło nie pojawia się, jeśli utlenieniu podlega odpowiednia pochodna fosforanowa, np. gdy przez utlenienie grupy aldehydowej powstaje kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy. Tak samo należy sobie wyobrazić reakcje z udziałem CoA zamiast grupy fosforanowej.

Mechanizm tego „zmagazynowania“ energii w kwasie fosfopirogronowym tłumaczymy wedle *Oespera* (45) ugrupowaniem enolowym powstałego związku. W kwasie pirogronowym forma ketonowa przedstawia znacznie niższą zawartość energii niż forma enolowa. Dlatego przemiana formy enolowej w ketonową przebiega samorzutnie i prawie kompletnie, forma enolowa występuje zaledwie w śladach. Przy odwodnieniu kwasu glicerynowego powstaje forma ketonowa kwasu pirogronowego, natomiast przy odwodnieniu kwasu 2-fosfoglicerynowego powstaje wyłącznie forma enolowa. Obecność grupy fosforanowej umożliwia trwanie formy enolowej, usunięcie grupy fosforanowej działa jak pociągnięcie języczka spustowego w broni palnej, wyzwalamąc nagle przejście formy enolowej w ketonową z uwolnieniem energii. Źródłem energii jest zatem nie hydroliza *per se*, tylko zapoczątkowana przez nią przemiana formy enolowej w ketonową. Jeśli wyzwolenie reakcji nastąpi nie przez hydrolizę, ale przez połączenie się kwasu fosfopirogronowego poprzez grupę fosforanową z jakimś akceptorem, energia może przejść na akceptorowy składnik kompleksu i przeprowadzić go w nietrwały stan aktywny.

Przy rozpadnięciu kompleksu grupa fosforanowa pozostaje przy akceptorze i utrwała chwiejny w zasadzie stan wysokoenergetyczny tego ciała.



(D = donator, A = akceptor, \approx , P = wiązanie fosforanowe wysokiej energii).

W stosunku do innych ciał wysokoenergetycznych interpretacja nie jest tak prosta jak dla kwasu fosfopirogronowego, można jednak przypuszczać, że zasada magazynowania energii jest podobna.

PRZEGLĄD NAJWAŻNIEJSZYCH REAKCJI EGZERGONICZNYCH POWIĄZANYCH Z POWSTAWANIEM ZWIĄZKÓW WYSOKOENERGETYCZNYCH

Najlepiej poznaną dziedziną metabolizmu pośredniego, dostarczającą najwięcej danych ilościowych o przetwarzaniu uwalnianej energii na energię związków wysokoenergetycznych, jest przemiana cukrowcowa, którą omówimy łącznie z cykłem kwasów trójkarboksylowych. Zgodnie z propozycją *Lynena* (cyt. wg *Holzera*, 46) możemy procesy egzergoniczne, dostarczające w tym ciągu reakcji energii na tworzenie związków fosforowych wysokiej energii — podzielić na trzy kategorie: jako pierwszą kategorię możemy wydzielić proces powstawania kwasu fosfopirogronowego z kwasu 2-fosfoglicerynowego. Dwa wiązania wysokoenergetyczne powstające przy tym z przeróbki z jednej cząsteczki glikozy możemy uważać po prostu za zwrot energii włożonej w proces glikolizy. Przypominamy bowiem, że jedna cząsteczka ATP degraduje się do ADP przy zestryfikowaniu glikozy na glikozo-6-fosforan, druga zaś służy do umieszczenia w fruktozo-6-fosforanie drugiej grupy fosforanowej na węglu 1. Z jednej cząsteczki dwufosfoheksozy powstają więc dwie cząsteczki kwasu fosfopirogronowego, które reagują z dwoma cząsteczkami ADP, odtwarzając 2 ATP i przechodząc w dwie cząsteczki kwasu pirogronowego. W ten sposób zamyka się wewnętrzne krążenie energii i reszt fosforanowych, będące beztlenową fazą przemiany cukrowej. Bilans ten nie ulega zmianie także i wtedy, gdy za punkt

wyjścia weźmiemy glikogen. Na to bowiem, by reszta glikozowa weszła w skład glikogenu, musi najpierw glikoza przejść w ester glikozo-6-fosforowy kosztem ATP.

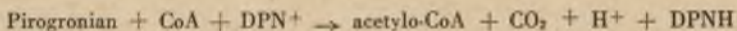
Jako drugą kategorię przemian ujmuje *Lynen fosforylacje substratowe*, polegające na oderwaniu od substratu i przeniesieniu na kodenydrzę dwu atomów wodoru, w niektórych przypadkach łącznie z dekarboksylacją związku. Takiej przemianie towarzyszy wytworzenie jednego wiązania wysokiej energii.

Trzecią wreszcie grupę stanowią w ujęciu *Lynena* właściwe fosforylacje oksydatywne, tj. powstawanie wysokoenergetycznych związków fosforowych przy przechodzeniu atomów wodoru lub elektronów z kozymazy przez dalsze akceptory na tlen. Każdemu etapowi wędrówki pary atomów wodoru lub pary elektronów odpowiada przejście jednej cząsteczki ADP w ATP. Należą tu także takie utlenienia, w których wodór z substratu przechodzi wprost na flawinę.

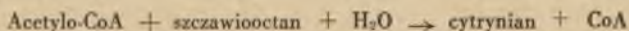
Jak przedstawiliśmy w rozdziale I, cała droga wodoru do tlenu może odbywać się w 4 etapach, z których każdy może być źródłem przetworzenia jednej cząsteczki ADP na ATP, a więc pośrednio źródłem estryfikacji jednej cząsteczki glikozy. Na pierwszym etapie zachodzi fosforylacja substratowa, na trzech pozostałych — fosforylacja oksydacyjna.

Spśród przemian substratowych omówimy dokładniej grupę poznanych dotąd trzech przemian o wspólnym lub podobnym mechanizmie. Są to: tlenowa dekarboksylacja kwasu pirogronowego, tlenowa dekarboksylacja kwasu alfa-ketoglutarowego i utlenienie aldehydu 3-fosfoglicerynowego na kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy.

Zrozumienie dekarboksylującego mechanizmu utlenienia kwasu pirogronowego łączy się ściśle z pracami nad kofermentem A. Przez wiele lat wyniki były sprzeczne lub dopuszczały różne sposoby interpretacji, ponieważ posługiwano się nieczystymi preparatami zaczynowymi, stanowiącymi mieszaninę indywidualnych fermentów. Dopiero prace *Severo Ochoa* (47) oparte na oczyszczonych zaczynach z tkanek zwierzęcych i z różnych drobnoustrojów wyjaśniły, że pirogronian w obecności koenzymu A i DPN utlenia się, dając acetylo-koenzym A, CO₂ i DPNH₂.



Jeżeli koenzym A obecny jest w małym stężeniu, jak w komórkach, reakcja się zatrzymuje skutkiem związania całego koenzymu A z octanem. Dalszy bieg reakcji zależy od rodzaju dodanego enzymu i dalszych substratów. Jeśli dodać kwasu szczawiowo-octowego i enzymu kondensującego, który występuje we wszystkich tkankach zwierzęcych, to powstaje kwas cytrynowy, a uwolniony koenzym A katalizuje utlenienie dalszych ilości kwasu pirogronowego:

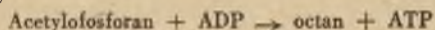


Reakcja ta nie dostarcza w tej formie wysokoenergetycznych związków fosforowych. Związkiem wysokoenergetycznym jest tutaj kompleks acetylo-koferment A, którego energia zużywa się na kondensację z kwasem szczawiowo-octowym na kwas cytrynowy.

Jeżeli zamiast kwasu szczawiowo-octowego i enzymu kondensującego wprowadzimy fosfotransacetylazę występującą u niektórych bakterii oraz fosforan nieorganiczny, to otrzymamy acetylofosforan i wolny koferment A, utlenienie zaś pirogronianu biegnie dalej, póki starczy fosforanu:



Reakcja ta może być pośrednio źródłem fosforylacji glikozy, jeśli acetylofosforan przeniesie swą energię wraz z grupą fosforanową na ADP. Powstaje wtedy nieczynny kwas octowy:

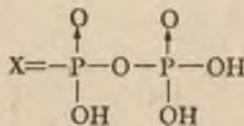
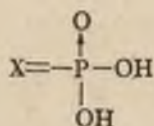
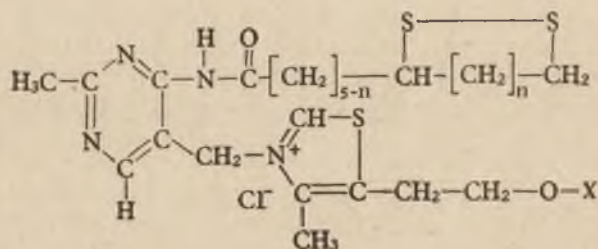


„czynny octan“. Zaburzenie w tej fazie mogłoby doprowadzić do powstania acetoiny, tym bardziej że lipotiamid ma dwie grupy sulfohydrylowe, mógłby się więc łączyć równocześnie z dwiema cząsteczkami substratu.

Lipotiamid jest również kofermentem tlenowej dekarboksylacji kwasu alfa-ketoglutazarowego.

Opisane reakcje odpowiadają pierwszemu etapowi utlenienia, tj. przeniesieniu pary atomów wodoru z substratu na DPN. Przeniesienie tych atomów z DPNH₂ na rdzeń flawinowy, a dalej samych elektronów przez układ cytochromowy na tlen — jest źródłem dalszych trzech fosforylacji.

W sumie więc utlenienie kwasu pirogronowego na octowy dostarcza 4 wiązań wysokiej energii.



X=H

12. Lipotiamid.

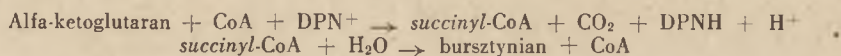
Utlenienie kwasu alfa-ketoglutazarowego nastęcało te same trudności badawcze co utlenienie kwasu pirogronowego. Tutaj również praca przygotowawcza Kaufmana (49) z pracowni Ochoa, który przygotował czyste układy enzymatyczne, pozwoliła zrozumieć przebieg reakcji. W pewnym uproszczeniu, posługując się dodatkowymi informacjami z prac innych autorów, możemy przebieg tych reakcji przedstawić następująco: koferment A przyłącza się grupą sulfohydrylową do węgla karbonylowego kwasu alfa-ketoglutazarowego. W obecności dwufosfotiaminy i DPN następuje pod wpływem karboksylazy (por. wyżej o lipotiamidzie, który również przy tlenowej dekarboksylacji kwasu alfa-ketoglutazarowego ma być właściwym (54) kofermentem) i dehydrogenazy odszczepienie grupy CO₂ i przeniesienie dwu atomów wodoru na DPN. Wynikiem reakcji jest na tym etapie wysokoenergetyczny związek bursztyno-koferment A (*succinyl-CoA*).

Występowanie pośrednie tego związku udowodnili w pracowni Greena Sanadi i Littlefield (50).

Związek *succinyl-CoA* może brać udział jako „aktywny bursztynian“ w reakcjach endergonicznych albo też reagując z ADP i fosforanem nieorganicznym może przejść w wolny bursztynian i ATP. Ta ostatnia reakcja nie przebiega stechiometrycznie, ponieważ interferuje z nią hydrolityczny rozpad kompleksu na wolny bursztynian i koferment A.

Występowanie hydrolizującego zaczynu odróżnia reakcję utlenienia kwasu alfa-ketoglutazarowego od utlenienia kwasu pirogronowego. Opisowaliśmy wyżej, jak w oczyszczonych układach w obecności stechiometrycznych ilości kofermentu A reakcja utlenienia kwasu pirogronowego zatrzymuje się wskutek związania całego

kofermentu. Przy utlenianiu kwasu alfa-ketoglutarrowego nigdy nie dochodzi do ustalenia takiej równowagi, gdyż hydroliza *succinyl*-CoA dostarcza ciągle wolnego koenzymu.



Dalsze utlenienia zredukowanej kozymazy dostarcza z trzech cząsteczek ADP 3 ATP w procesie fosforylacji oksydatywnej.

Zarówno zatem utlenianie kwasu pirogronowego, jak i kwasu alfa-ketoglutarrowego przebiega z wytworzeniem pośredniego kompleksu acetylo-CoA lub *succinyl*-CoA, w którym zachowuje się część energii uzyskanej w utlenieniu. W głównym szlaku metabolicznym energia *succinyl*-CoA dostarcza wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego, podczas gdy energia acetylo-CoA zużywa się na syntezę cytrynianu.

Trzecią analogiczną reakcją okazało się powstawanie kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego z aldehydu 3-fosfoglicerynowego i nieorganicznego fosforanu. W r. 1939 *Warburg* (51) podał próbę interpretacji tej reakcji. Wyobrażał sobie, że do grupy aldehydowej przyłącza się fosforanowa reszta nieorganiczna, dając związek niskiej energii (według terminologii dzisiejszej). Związek ten ulega działaniu dehydrogenazy, oddając dwa atomy wodoru na kodehydrazę. Rezultatem reakcji jest bezwodnik kwasowy fosfoglicerynofosforowy (ester Negeleina), który reaguje z ADP dając ATP i kwas 3-fosfoglicerynowy. Ostatnio w pracowni *Lynena* sprawę tej reakcji podjął *Holzer* (52). Szukając analogii z opisanymi wyżej reakcjami utlenienia kwasu pirogronowego i alfa-ketoglutarrowego założył, że i tu reakcja zaczyna się od przyłączenia grupy sulfohydrylowej enzymu do węgla aldehydowego substratu. Nie udało się wprawdzie wykazać udziału koenzymu A w tej reakcji, ale *Holzer* udowodnił wrażliwość dehydrogenazy na inhibitory grup SH, z czego wynika, że SH wchodzi jako grupa czynna w skład samej cząsteczki białka enzymatycznego. Zwłaszcza instruktywnie wypadły doświadczenia z inaktywacją za pomocą kwasu jodooctowego. Wiadomo z prac *Lynena*, że kwas ten reaguje z grupą SH koenzymu A w ten sposób, że odszczepia się HJ, a reszta kwasu octowego [$-\text{CH}_2\text{COOH}$] przyłącza się do siarki, blokując w ten sposób koenzym. Podobnie reaguje z kwasem jodooctowym dehydrogenaza triozy. Można ją ochronić przed zatruciem, jeśli przed dodaniem kwasu jodooctowego pozwolić jej na krótko zetknąć się z triozą. Zachodzi tu więc wyraźnie konkurencja o grupę SH między fizjologicznym substratem, fosfotriozą, a inhibitorem-kwasem jodooctowym. Według *Holzera* zatem powstaje najpierw kompleks fosfotriozy z fermentem, przy czym połączenie zachodzi między węglem aldehydowym triozy a grupą SH fermentu. Kompleks ten zostaje utleniony przez przeniesienie dwu atomów wodoru na kozymazę, przez co wiązanie C—S staje się wiązaniem wysokoenergetycznym. W rozpadzie fosforolitycznym przy udziale nieorganicznego fosforanu uwalnia się zaczyn, wydzielając wysokoenergetyczny kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy. W ten sposób tłumaczony mechanizm utlenienia fosfotriozy upodabnia się do omawianych wyżej utlenień alfa-ketokwasów. Różnica między nimi polega na braku dekarboksylacji w ostatnio omówionej reakcji oraz na tym, że reagująca grupa SH wchodzi w skład cząsteczki białkowej zaczynu, w poprzednich zaś reakcjach jest składnikiem drobnocząsteczkowego kofermentu. Ta ostatnia różnica powoduje, że szlak reakcji triozy jest ściśle wyznaczony i przeniesienie energii może się odbyć wyłącznie na ADP, natomiast wysokoenergetyczny kompleks kofermentu A może reagować na różne sposoby.

Zredukowana przy utlenieniu triozy kozymaza jest substratem dalszych reakcji, przenoszących wodór lub elektron na tlen, dostarczając energii na trzy kolejne fosforylacje oksydatywne.

Inne reakcje fosforylacji substratowej nie są jeszcze należycie wyjaśnione.

Mechanizm fosforylacji oksydacyjnych jest dziedziną prawie zupełnie nie zbadaną. Nie wiadomo nawet, jaką formę ma pierwotny związek wysokiej energii powstający przy utlenieniu kozymazy. Pierwszą bezpośrednią wskazówką, że idzie tu o pochodną fosforanową, jest wynik doświadczeń *Greena* i współpracowników (5) z P^{32} i preparatem cykloforazy mitochondrialnej. Okazało się, że procesom utlenienia towarzyszy znikanie nieorganicznego fosforanu. Fosfor ten przechodzi w jakąś postać, która nie ulega wymyciu nawet przy starannym przemywaniu mitochondriów zimnym roztworem soli. Autorzy określają ten związany fosforan jako fosforan żelowy i uważają go za labilny ester fosforowy. Według *Greena* może tu wchodzić w rachubę fosforylo-CoA. Wyszukiwano też przypuszczenia, że „pierwotnym estrem“ (*primary ester*) jest ester fosforowy kozymazy tak nietrwały, że rozpada się już w czasie odbicia. O pierwotnych związkach wysokoenergetycznych odpowiadających poziomom diaforazy i cytochromu w ogóle nic powiedzieć nie potrafimy. Wyszukiwano nawet wątpliwości, czy można mówić o ścisłej lokalizacji poszczególnych fosforylacji na przestrzeni między DPN a tlenem. *Slater* (64) przypuszczał nawet, że ostatnim „produktywnym“ etapem jest przeniesienie elektronu na cytochrom c, gdyż pracując w nieobecności oksydazy cytochromowej z cytochromem c jako ostatecznym akceptorem, otrzymał dla utlenienia kwasu alfa-ketoglutarowego przez preparat sercowy tę samą wartość P : O co przy przeniesieniu elektronów na tlen. Wyniki te jednak nie wydają się prawdopodobne, bo wskazywałyby na wytworzenie trzech wysokoenergetycznych wiązań kosztem zaledwie 26 000 kal. *Krebs* (63) uważa za rzecz udowodnioną przez swoje badania, że przejście elektronu z cytochromu c na tlen związane jest z wysokoenergetyczną fosforylacją. Przy utlenianiu bowiem kwasu bursztynowego w izolowanym układzie, jak to przeprowadził *Krebs*, może powstać przy redukcji cytochromu c tylko jedno wiązanie. Doświadczenie zaś wykazało dokładnie dwa wiązania, zatem drugie mogło powstać jedynie przy utlenieniu cytochromu c tlenem za pomocą oksydazy cytochromowej. Przytaczamy tę kontrowersję dla naświetlenia, jak bardzo jeszcze nie są ustalone poglądy na sprawę fosforylacji związanej z utlenieniem.

Ostatnio otrzymaliśmy nowy bezpośredni dowód istnienia fosforylacji tlenowych w pracy *M. Cohn* (66). Autorka przygotowała nieorganiczny kwas fosforowy, w którym wszystkie 4 atomy tlenu były izotopami O^{18} . Każda estryfikacja takiego kwasu musi przy hydrolizie spowodować zastąpienie jednego atomu O^{18} przez O^{16} wody. Przy utlenianiu kwasu alfa-ketoglutarowego za pomocą preparatu mitochondrialnego autorka stwierdziła, że już po godzinie 90% izotopowego tlenu uległo wymianie. Równoczesne pomiary życia tlenu wykazały, że na jeden zużyty atom tlenu przypada około 10 wymian. Świadczy to nie tylko o sprawnym przebiegu fosforylacji, ale także o tym, że „pierwotny ester“ szybko przenosi dalej grupy fosforanowe i że takich przeniesień jest kilka pod rząd. Wymiana O^{18} zostaje całkowicie zahamowana przez dodanie DNP, co świadczy wyraźnie o jej związaniu z oksydacyjnymi fosforylacjami.

Podajemy poniżej krótki przegląd badań, które miały na celu ilościowe zbadanie wydajności fosforylacji wysokoenergetycznej.

W r. 1941 *Colovick, Kalckar* i *Cori* (55) podjęli próbę zbadania ilościowego związku między utlenieniem glikozy a fosforylacją, przy czym miarą była ilość reszt fosforanowych, zestryfikowanych przez glikozę w postaci estru *Hardena-Younga*. Znaleźli 5 cząsteczek estru na 1 cząsteczkę utlenionej glikozy, czyli 10 reszt P na 12 atomów O. Ten niezadowolający wynik świadczy o tym, że (w warunkach doświadczeń tych autorów) niekontrolowane reakcje uboczne zużywały ponad 75%

energii uzyskanej z utlenienia. S. Ochoa (56) wykazał przy utlenianiu kwasu pirogronowego przez miazgę z mózgu gołębia, że przynajmniej w fazie początkowej przypadają 2 zestryfikowane reszty fosforanowe na 1 atom zużytego tlenu i pierwszy wskazał na możliwość, że fosforylacja może być związana nie tylko z oderwaniem atomów wodoru od podłoża, ale także z dalszymi fazami ich wędrówki ku tlenowi. W r. 1943 (57) badając estryfikację związaną z utlenieniem kwasu alfa-ketoglutazarowego na bursztynowy otrzymuje stosunek P : O równy 3. Dalszy postęp przyniosły dopiero badania oparte na preparatach cykloforazy. Hunter i Hixon (58) badali ponownie fosforylację przy przemianie kwasu alfa-ketoglutazarowego na bursztynowy i znaleźli P : O = 3,4. Ponieważ doświadczenia dają wartości minimalne, należało przyjąć, że powstają 4 wiązania fosforowe.

Lehninger i Smith (59) ustalają dla utlenienia kwasu beta-oksymasłowego na acetoctowy stosunek P : O = 2 do 3, przyjmują więc 3 i stwierdzają, że mogą to być tylko fosforylacje oksydatywne, bo przeniesienie 2H na kozymazę uwalnia najwyżej 1000 kal. i nie może być źródłem energii fosforylacji.

Friedkin i Lehninger (60) wykazali za pomocą promieniotwórczego P³², że podczas powyższego utlenienia powstaje ATP³². Należy więc przyjąć, że utlenienie zredukowanej kozymazy na wodę daje 3 wiązania wysokoenergetyczne. Iloraz 4 dla całego utlenienia otrzymali również Barkulis i Lehninger (61) oraz Judah (62).

Badania te prowadzono przeważnie w obecności fluorku celem zapobieżenia defosforylacji powstałych estrów fosforocukrowych oraz działaniu miokinazy, a miarą ilości wytwarzanego ATP był przyrost estrów heksozofosforowych, powstałych z glikozy i ATP działaniem heksokinazy.

Tabela II

Lp.	Reakcja	Zużycie H ₂ O	Wydaj- ność CO ₂	Zestry- fikowa- ny PO ₄	ΔG Kal.*	... etap
1	Pirogronian + 1/2 O ₂ + CoA + H → acetylo-CoA + CO ₂	1	1	3-4**	-55	- 3,1
2	Szczawiowo-octan + acetylo-CoA + H ₂ O → cytrynian + CoA + H	0	0	0	- 7,8	
3	Cytrynian → cis-akonitan + H ₂ O	0	0	0	- 2,04	
4	cis-Akonitan + H ₂ O → izocytrynian	0	0	0	- 0,45	
5	Izocytrynian + 1/2 O ₂ → szczawiowo-bursztynian + H-O	1	0	3	- 52,5	- 0,6
6	Szczawiowo-bursztynian + H → alfa-ketoglutaran + CO ₂	0	1	0	- 8,6	
7	alfa-Ketoglutaran + 1/2 O ₂ → bursztynian + CO ₂	1	1	4	- 69,8	- 17,9
8	Bursztynian + 1/2 O ₂ → fumaran + H ₂ O	1	0	2	- 35,7	(+ 16,2)
9	Fumaran + H ₂ O → jabłczan	0	0	0	- 0,88	
10	Jabłczan + 1/2 O ₂ → szczawiowo-octan + H ₂ O	1	0	3	- 44,8	+ 7,1

Objaśnienia do tabeli II.

* Symbol ΔG wprowadzono w r. 1951 (Report of the Royal Society Committee on Symbols) na miejsce dawniej powszechnie używanego symbolu ΔF na oznaczenie zmiany wolnej energii. Znak minus oznacza energię uwolnioną, a więc reakcję egzergoniczną, znak plus energię związaną w reakcji, a więc charakteryzuje reakcje endergoniczne.

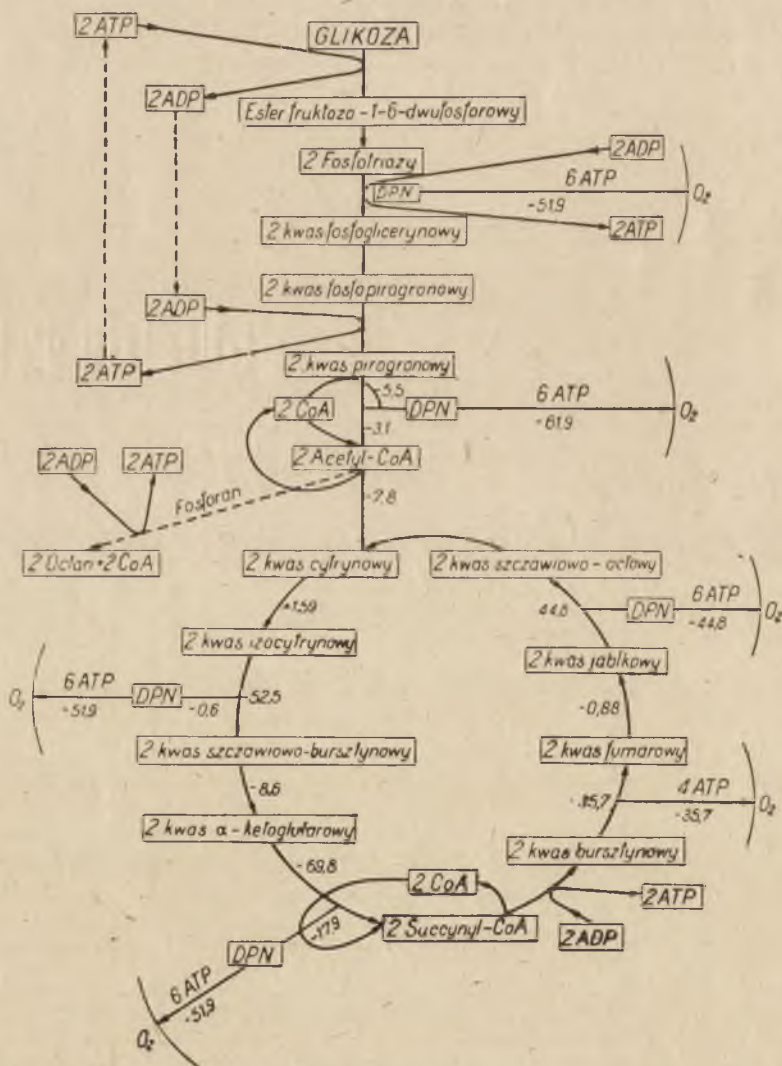
** 3 wiązania — w cyklu Krebsa, 4 wiązania — w razie przzerwania cyklu i wymiany: acetylo-CoA + fosforan → acetylofosforan + CoA.

*** Wartości tej kolumny obliczono jako różnicę z ΔG danej reakcji i ΔG utlenienia DPNH₂. Redukcja DPN daje w reakcji 1 tylko 3,1 Kal., powstanie więc wiązania wysokoenergetycznego w 1 etapie wymaga dalszego wytłumaczenia. W reakcji 7 redukcja DPN daje 17,9 Kal., powstanie więc wiązania wysokoenergetycznego jest zrozumiałe. W reakcji 8 liczba w nawiasach mówi, że redukcja DPN wymagałaby doprowadzenia 16,2 Kal., zatem udział DPN w tej reakcji jest ze względów termodynamicznych niemożliwy. Reakcja 10 przebiega z udziałem DPN, jednak ten pierwszy etap nie tylko nie wyzwala energii, ale wymaga doprowadzenia 7,1 Kal.

Należy pamiętać, że wszystkie te wyliczenia odnoszą się do uk'adów w 50% zredukowanych. Przy przesunięciu stosunków stężeń formy utlenionej do stężeń formy zredukowanej zmieniają się także wartości ΔG.

Ostatnio H. A. Krebs (63) przeprowadził bezpośrednie oznaczenia, używając ortofosforanu z promieniotwórczym P^3 i mierząc manometrycznie zużycie tlenu. Po 60 minutach rozdzielił chromatograficznie związki fosforowe i oznaczył ich specyficzną aktywność, co po zastosowaniu odpowiednich poprawek pozwoliło oznaczyć szybkość reakcji $ADP + P = ATP$ w badanym okresie. Iloraz P/O przy utlenieniu kwasu bursztynowego na fumarowy wynosi 2, przy utlenieniu alfa-ketoglutowego na fumarowy 3. Stąd iloraz dla reakcji alfa-ketoglutowej \rightarrow bursztynowej musi wynosić 4. W ten sposób dane poprzednich autorów zostały potwierdzone zupełnie inną techniką doświadczalną. Badania te stanowią zarazem potwierdzenie słuszności metody pośredniej, która mierzy produkcję ATP z ADP przez przyrost fosforylowanej glikozy.

Dla zrozumienia związku między daną reakcją a ilością powstałych związków wysokoenergetycznych niezbędna jest znajomość wolnej energii danej reakcji. Dane takie, oparte bądź na danych termochemicznych, bądź na pomiarach stałej rów-



13. Schemat fosforylowań.

nowagi reakcji, przejrzał krytycznie i zestawił niedawno *Krebs*, 1953 (65). Podajemy je w tabeli II łącznie z innymi danymi, zaczerpniętymi z monografii *Avisona* i *Hawkinsa* (22).

Dane tej tabeli przedstawiliśmy graficznie na załączonym schemacie fosforylowań.

ROZKOJARZENIE UTLENIEŃ I FOSFORYLACJI

Wspominaliśmy już o działaniu 2,4-dwunitrofenolu (DNP), pod wpływem którego ustają fosforylacje związane z utlenianiem. Skojarzona normalnie akcja utlenień i fosforylacji, utrzymująca odpowiednio wysokie stężenie związków wysokoenergetycznych w ustroju, zostaje rozkojarzona. Utlenienia biegają dalej, nawet zostają wzmożone, jednak uwolniona w nich energia rozprasza się w otoczeniu jako ciepło, bez korzyści dla pracy mięśniowej lub procesów anabolicznych.

Z tego rodzaju interpretacją działania DNP spotykamy się po raz pierwszy w r. 1945 w artykule *Lardy'ego* i *Elvehjema* (67). Autorzy ci wysunęli hipotezę, że związki, które jak DNP hamują użytkowanie energii utlenień lub glikolizy, wstrzymują powstawanie wysokoenergetycznych związków fosforowych. Przegląd związków o takim działaniu znanych w r. 1945 podali autorzy w przytoczonej tabeli III.

Tabela III

Czynnik	Pobudza	Hamuje	Piśmiennictwo
DNP	Oddychanie i glikoliza	Odtwarzanie fosfagenu	1)
DNP	Oddychanie i glikoliza	Asymilacja	2)
DNP	Oddychanie i glikoliza	Ruchliwość plemników	3)
Azydki	Fermentacja drożdżowa	Asymilacja	4)
Wodzian chloralu i chloreton	Oddychanie	Asymilacja, luminescencja	5)
Gramicydyna	Oddychanie	Asymilacja, wiązanie P	6)
Toksyna dyfterytryczna	Hydroliza ATP		7)

1) *Ronzoni E., Ehrenfest E.*: J. B. Ch. 115, 749, 1936. — 2) *Pictet M. J., Clifton C. E.*: J. Cell. Comp. Physiol. 22, 147, 1943. — 3) *Lardy H. A., Phillips P. H.*: J. B. Ch. 149, 177, 1943. — 4) *Winzler R. J.*: Science 69, 327, 1946. — 5) *McFloy W. D.*: J. Cell. Comp. Physiol. 23, 171, 1944. — *Hotchkiss R. D.*: Adv. in Enzym. 4, 153, 1943. — 7) *Braun A. D., Rattner M. Y.*: Biochimija 7, 171, 1942.

Wpływ pobudzający tych ciał na glikolizę i utlenianie tłumaczą autorzy tym, że odpada zależność tych procesów od dopływu nieorganicznego fosforanu i ADP, które normalnie stanowią czynnik ograniczający szybkość glikolizy.

Teoria *Lardy'ego* i *Elvehjema* uzyskała doświadczalne podstawy dzięki pracy *Loomisa* i *Lipmanna* (68), którzy wykazali, że DNP hamuje w małych stężeniach w sposób odwracalny fosforylacje, związane z utlenianiem glutaminianu. Podobnie działa atebryna (68) oraz azydki (68), aureomycyna (*Loomis* 70) oraz szereg barwników oksydoredukcyjnych (71).

Specjalne zainteresowanie budzi fakt powiększenia listy związków „rozkojarzających“ o tyroksynę (72) przez *Lardy'ego*. Autor ten wykazał następnie (73) wpływ tyroksyny na zwiększenie rozpadu ATP i próbował oprzeć na podobnym mechanizmie ogólną teorię działania hormonów. Obserwacje *Lardy'ego* potwierdził *Martius* (74) na mitochondriach z wątroby szczura. Natomiast *Lipmann* i współpracownicy twierdzą, że poszukiwali takiego efektu, lecz nie zdołali go nigdy wykazać (75) dla tyroksyny. Bardzo silne działanie otrzymali ci autorzy stosując

związek antagonistyczny, kwas 3,5-dwujodo-4-benzoilobenzoowy. Tak więc sprawa tyroksyny jako czynnika rozkojarzającego nie jest jeszcze jasna.

Ważnym postępowaniem było stwierdzenie przez *Huntera* i *Spectora* (76) w r. 1951, że rozkojarzeniu przez DNP i związki podobnie działające ulegają tylko oksydacyjne fosforylacje, związane z dalszymi etapami utleniania zredukowanej kodehydrogenazy. Natomiast fosforylacje substratowe, takie jak przy utlenianiu kwasu pirogronowego lub alfa-ketoglutarynowego są niewrażliwe na DNP. Tak więc DNP i podobnie działające środki pozwalają nam eksperymentalnie oddzielić fosforylacje oksydacyjne od substratowych. *Green* i współpracownicy stwierdzili, że (77) DNP i gramicydyna hamują aktywację kwasów tłuszczowych przez przebiegające równocześnie reakcje cyklu trójkarboksylowego (tzw. efekt zapłonu, *sparking phenomenon*). Można zatem przypuszczać, że ten efekt oraz fosforylacja oksydacyjna posiadają jakiś wspólny etap wrażliwy na DNP (*Green*, 5).

Zwrócono również uwagę na ewentualny związek między działaniem DNP a efektem Pasteura, czyli hamującym wpływem utlenienia na natężenie fermentacji. *Johnson* już w r. 1941 (78) wysunął przypuszczenie, że efekt Pasteura jest następstwem lepszej wydajności fosforylacji oksydacyjnej w porównaniu z fosforylacją glikolityczną. Przemawia za tym fakt, stwierdzony przez *Lynena* (79), że proces oddychania drożdży zniejsza ilość ortofosforanów dostępnych dla fermentacji. *Seits* i *Engelhardt* badali (80) w r. 1949 wpływ DNP, azydków, arsenianu, karbaminianu etylu i azotynu sodowego na przebieg oddychania, glikolizy i fosforylacji u drożdży, w erytrocytach i komórkach nowotworowych. Autorzy ci wykazali, że związki chemiczne, znoszące efekt Pasteura, z reguły hamują także fosforylacje oksydacyjne. *Judah* i *Williams* (71) znajdują, że liczne związki, znane jako inhibitory fosforylacji oksydacyjnej, hamują efekt Pasteura w różnych tkankach. Autorzy ci uważają jednak, że hamowanie efektu Pasteura jest tak różne w różnych tkankach danego zwierzęcia i wykazuje takie różnice gatunkowe, że przenoszenie wyników doświadczeń *in vitro* na stosunki *in vivo* wymaga nadzwyczajnej ostrożności.

UŻYTKOWANIE ZWIĄZKÓW WYSOKOENERGETYCZNYCH

Przyjmujemy dziś, że wszystkie procesy życiowe, wymagające dopływu energii, odbywają się bezpośrednim kosztem energii zawartej w związkach wysokoenergetycznych. Najbardziej uniwersalnym dostarczycielem energii jest ATP. Spośród energochłonnych czynności życiowych wysuwa się bezsprzecznie na pierwszy plan praca mięśniowa. U osobnika ciężko pracującego fizycznie rozchód energii na pracę mięśniową może kilkakrotnie przewyższać wszystkie inne rozchody razem wzięte. Dziś uznaje się ogólnie, że bezpośrednim procesem pokrywającym ten wydatek energii jest przejście ATP w ADP. Pogląd ten opiera się przede wszystkim na stwierdzeniu, że w mięśniu zmęczonym lub stępszym ATP i fosfagen są zużyte, że mięsień zatruty kwasem monojodoctowym może wykonać tyle pracy, na ile pozwala zawarty w nim zapas ATP i fosfagenu (7). Wiadomo zaś z prac *Lohmanna* i *Parnasa* (11, 12), że fosfagen w pracy mięśniowej odtwarza ATP z ADP, w spoczynku zaś sam się odtwarza kosztem ATP, wzbogaconego w procesach glikogenolizy. Bardzo silnym poparciem poglądu o bezpośrednim związku ATP ze skurczem mięśnia było odkrycie w r. 1939 przez *Engelhardta* i *Ljubimową* (81), że białko kurczliwe mięśnia, miozyna, posiada wszelkie właściwości zaczynu ATP-azy. Wreszcie prawie naoczny dowód okazała się obserwacja *Szent-Györgyiego* (82), że włókna spreparowane z miozyny kurczą się pod wpływem ATP. Podobne działanie ma ATP, jak wykazano następnie, na miofibryle (83), a nawet na wyisobnione włókienka mięsne. Może najbardziej przekonywający obraz związku między ATP a pracą mięśniową dał *Straub* (84).

Poglądy *Strauba* można streścić w następujący sposób: kurczliwym elementem mięśnia jest aktomiozyn, połączenie dwu białek: miozynu i aktynu. Aktyn występuje wolno w postaci globularnej (aktyn G), w aktomiozynie zaś w spolimeryzowanej formie fibrylnej (aktyn F). W skład każdej cząsteczki aktynu G wchodzi 2 cząsteczki ATP, połączone z białkiem prawdopodobnie za pośrednictwem Ca. Przy polimeryzacji aktynu, a więc także przy tworzeniu aktomiozynu ATP przechodzi w ADP z odszczepieniem ortofosforanu. Depolimeryzacja następuje przez dołączenie do związanych grup ADP reszty fosforanowej, co wymaga wysokiej energii, a więc reszta ta musi pochodzić z ATP środowiska. W ten sposób przy depolimeryzacji zużywa się wolny ATP mięśnia, przechodząc w ADP, przy polimeryzacji zaś uwalnia się nieorganiczny fosforan ze związanego ATP. Hydrolytyczny rozpad ATP zawartego w stanie wolnym w mięśniu, który rzekomo przebiega przy pracy mięśnia, byłby zatem złudzeniem powstałym przez zsumowanie efektu dwu reakcji: 1) przeniesienia reszty fosforowej z wolnego ATP na związany ADP przy depolimeryzacji i 2) hydrolytycznego odszczepienia grupy fosforowej ze związanego ATP przy polimeryzacji aktynu. Związanie ADP lub ATP z aktynem jest bardzo ściśle. Nukleotyd związany nie podlega ani dializie, ani działaniu ATP-azy. *Straub* nie znajduje dotąd danych (podobnie zresztą jak i inni autorzy), które by pozwoliły rozstrzygnąć, co w jego teorii odpowiada fazie skurczowej a co rozkurczowej mięśnia.

Poza energią mechaniczną może też w mięśniu z energii ATP powstawać energia cieplna. Dzieje się tak w skurczach izometrycznych, które przebiegają jako drobne drgania fibrylne pod wpływem zimna. Odczuwamy to jako dreszcze. Organ elektryczny występujący u niektórych ryb składa się z elementów, które możemy uważać za przekształcone komórki mięśniowe. Potężne wyładowania elektryczne tego organu, który np. u *Electrophorus electricus* wytwarza napięcie do 2000 V, czerpią swą energię z rozkładu ATP. I w tym organie, jak w mięśniu, bezpośrednią rezerwą energetyczną, która pozwala natychmiast odtworzyć ATP, jest fosfokreatyna, pośrednim zaś dostarczycielem energii — przemiana cukrowców.

Energia ATP może się również przekształcić w światło w odpowiednich narządach zwierzęcych. Wiadomo, że w organach świetlnych działają zaczyn lucyferaza na niezbadany dotąd dokładnie substrat zwany lucyferyną. Znalazienie w lucyferynie łatwo rozpadających się związków fosforowych nasunęło *McElroyowi* przypuszczenie, że chodzi tu o ATP. Istotnie udało się temu badaczowi (85) użyć skąpa ze świecących owadów oczyszczone wyciągi, które świecą po dodaniu ATP. Intensywność początkowa światła i cała ilość wysyłanego światła jest wprost proporcjonalna do ilości dodanego ATP. Zanikanie świecenia przebiega równoległe do przechodzenia ATP w ADP. Świecenie nie występuje, jeśli preparat nie zawiera czynnej ATP-azy. Przywrócenie mu aktywności ATP-azy powoduje w obecności ATP świecenia. Tak więc wydaje się rzeczą stwierdzoną, że również świecenie zwierząt czerpie potrzebną energię z ATP. Energia elektryczna i świetlna występuje jednak w świecących zwierzętach raczej wyjątkowo.

Drugą ważną drogą, na której odbywa się użytkowanie energii ATP, jest praca osmotyczna, zachodząca bez przerwy we wszystkich tkankach. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech żywej substancji jest jej zdolność wchłaniania swoich własnych składników znacznie szybciej, niż są wchłaniane składniki obce, choćby o podobnej budowie i takiej samej wielkości cząsteczkowej. Dalszą jej właściwością jest umiejętność utrzymywania swego składu, odmiennego od składu otaczających ją płynów. W ostatnich latach stało się jasne, że pozorna równowaga stężeń, którą obserwujemy po obu stronach powierzchni granicznych, nie da się wytłumaczyć prawami chemii fizycznej. Liczne badania przeprowadzone w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat na układach modelowych dały wyniki, które zawodzą przy próbach zastosowania ich do żywej substancji. Prawa chemii fizycznej odnoszą się do zamknię-

tych układów termodynamicznych, a żywej substancji do takich zaliczyć nie można. Procesy przebiegają w niej bowiem przy stałym dopływie energii. Obserwowane równowagi są pozornie tylko równowagami w sensie termodynamicznym. Są to równowagi dynamiczne, podtrzymywane stale kosztem przebiegających równocześnie przemian egzergonicznych. Należy przypuszczać, że procesy prowadzące do tych równowag dynamicznych przebiegają w obszarze powierzchni granicznych, gdzie można oczekiwać występowania w dużym stężeniu biokatalizatorów, wbudowanych w sposób przestrzennie zorientowany w strukturę tych powierzchni (*Straub* 1952).

Już wchłanianie z przewodu pokarmowego (86) ma charakter pracy osmotycznej i wykazuje dużą niezależność od praw osmozy i dyfuzji. Wchłanianie jelitowe przebiega ze zużyciem energii u wszystkich kręgowców i u wielu zwierząt bezkręgowych, u których w tym kierunku prowadzono badania. Podobny charakter ma wchłanianie zwrotne w kanalikach nerkowych. W procesach tych fizjologowie już od dawna przypisują ogromną rolę mechanizmowi fosforylacji produktów wchłanianych.

Jako przykład pracy, wykonywanej celem utrzymania składu komórkowego odmiennego od otoczenia, wybierzemy zagadnienie potasu. *Krebs* i współpracownicy (87) badali za pomocą K^+ wymianę potasu między skrawkami kory mózgowej lub siatkówki a otaczającym je płynem. Stężenie potasu w korze mózgowej było 18-krotnie wyższe niż w płynie otaczającym. Na początku doświadczenia potas dyfundował do płynu i skrawki traciły do 40% potasu. Po kilkunastu minutach jednak proces się odwracał, tak że po 30 minutach ustalała się pierwotna różnica stężeń i dała się utrzymać przez następne kilkadziesiąt minut. Warunkiem takiego przebiegu było równoczesne utlenienie glikozy i glutamianu. Równowaga utrzymywała się tak długo, jak długo oddychanie skrawków kosztem tych dwu substratów przebiegało normalnie. Równoczesne pomiary aktywności wykazały, że w tym stanie pozornej równowagi przebiegała żywa wymiana potasu między skrawkami a płynem. Przy badaniu skrawków kory mózgowej w ciągu 1 minuty wymieniało się około 4% wszystkich jonów K, zawartych w skrawku, a w przypadku siatkówki nawet 7 do 10%. Praca potrzebna do utrzymania różnicy stężeń w tych warunkach wynosi dla mózgu 355 kal. na minutę i kg, tj. około 2,5% całego metabolizmu tego narządu, który wykazuje najwyższą przemianę podstawową w całym organizmie. Podobną zależność od metabolizmu równowagi dynamicznej w stężeniu potasu krwinek względem potasu osocza znalazł *Straub* (88), który ocenia wydatek energetyczny na ten cel na 10% całej przemiany materii w krwinkach.

(Pracę osmotyczną obliczamy ze wzoru:

$$- \Delta F = RT \ln \frac{C_1}{C_2}$$

gdzie R oznacza stałą gazową; T oznacza temperaturę absolutną, zaś $-\Delta F$ pracę potrzebną na przeniesienie 1 mola ze stężenia C_1 do C_2).

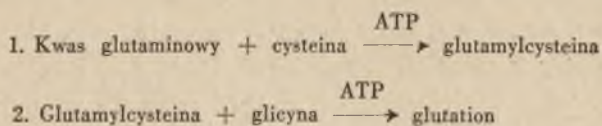
Omówiliśmy tu sprawę jednego tylko składnika, potasu, spośród tak licznych składników żywej substancji, których stężenie jest inne niż w płynach otaczających. Nic więc dziwnego, że *Krebs* uważa pracę osmotyczną z tym związaną za jedną z głównych, jeśli nie za przeważającą składową przemianę podstawowej, tj. rozchodu energii osobnika w absolutnym sporzynku. Rolę ATP w pokrywaniu tego rozchodu wykazał na krwinkach *Straub* (88).

Dalszym ważnym sposobem użytkowania energii ATP jest praca chemiczna przy procesach syntezy. W ostatnich latach poznaliśmy bliżej to zagadnienie na kilku przykładach, jak omówiona już synteza „czynnego octanu“ z octanu i ATP (20, 39), prowadząca do syntezy kwasu cytrynowego, acetylocholino, do acetylowania pochodnych sulfonamidowych itp. Dalszym przykładem jest synteza glutaminy z kwasu

glutaminowego i amoniaku. *Leuthardt* i *Bujard* (89) wykazali udział ATP w tej reakcji. Ostatnio badali ją na oczyszczonym enzymie z *Lupinus albus* *Denes* i *Garda* (90). Według ich badań ADP hamuje kompetentynie (przez współzawodnictwo) syntezę, co świadczy o powstawaniu pośredniego związku fosforowego z glutaminianu i ATP. Za takim mechanizmem przemawia również powstawanie w przebiegu syntezy równoważnej ilości ortofosforanu (91).

W syntezie mocznika z ornityny trzykrotnie występuje faza wymagająca udziału ATP, który degraduje się przy tym na ADP. Ostatnim wreszcie przykładem będzie synteza glutationu specjalnie interesująca ze względu na powstające przy tym wiązanie peptydowe. Możemy więc ten proces uważać do pewnego stopnia za model syntezy białka, dla której brak nam dotąd odpowiednich danych doświadczalnych.

Syntezę glutationu z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny badali *Bloch* i współpracownicy (92—94). Nie oczyszczony zaczyn otrzymany z wątroby gołębia katalizował całkowitą syntezę w obecności ATP. Ostatnio (93) otrzymali autorzy oczyszczoną frakcję, która działała tylko na γ -glutamylcysteinę łącząc ją z glicyną. Reakcja przebiega zatem w 2 etapach, z których każdy wymaga ATP.



Autorzy ci wykazali, że dodanie ATP nie zawsze stwarza warunki do przebiegu reakcji wymagających doprowadzenia energii. Dla wielu reakcji, podobnie jak dla omawianej syntezy glutationu, potrzebna jest nie tylko obecność ATP, ale niezbędne jest ponadto otrzymywanie stężenia ATP na wysokim poziomie. Jeśli ATP zużywa się, a nie odtwarza na nowo, stężenie spada. Przyczynia się do tego ATP-aza, obecna zwykle w preparatach enzymatycznych z tkanek jako zanieczyszczenie. Ważnym momentem hamującym jest przy tym gromadzący się ADP, który konkuruje o grupę fosforanową z hipotetycznym pośrednim związkiem fosforowym. Optymalnie zatem przebiega synteza tylko w takich układach, w których stale ATP powstaje z ADP, np. w obecności czynnego układu glikolitycznego. Zatem samo nagromadzenie ATP nie stwarza jeszcze warunków do przebiegu reakcji endergonicznych. Niezbędne jest krążenie grup fosforanowych, regeneracja ADP na ATP. Mamy tu jeszcze jeden przykład ogólnego zjawiska biologicznego, nazywanego przez fizjologów homeostazą: organizmy przeciwdziałają próbom naruszenia równowagi nie przez nagromadzenie ciał zobojętniających czynnik szkodliwy, lecz przez stałe ich produkowanie lub uwalnianie w miarę potrzeby.

Również dla normalnego toku przemian w całym ustroju potrzebne jest stałe krążenie energii związków fosforowych. W razie zmniejszenia zużycia dochodzi do braku ADP. Są dane przemawiające za tym, że stan taki powoduje zahamowanie procesów oksydacyjnych. Przypuszcza się też, że w tym przypadku wzmaga się uwalnianie nieorganicznego pirofosforanu (77). Najprawdopodobniejszym źródłem powstawania pirofosforanu byłaby omówiona w tym artykule synteza dwunukleotydów z ATP i nukleotydu nikotynowego albo kwasu ryboflawinofosforowego.

UWAGI KOŃCOWE

Utlenienie wodoru, główne źródło energii ustrojów, dostarcza energii w formie, która bezpośrednio nie może być ani wprost użytkowana, ani przekazana procesom asymilacji.

Bilanse energetyczne w postaci dominującej przed dwudziestu laty w biochemii nie mają istotnego sensu biologicznego. Odkrycie powszechnej zasady przekształ-

cenia energii, fermentacji i utlenień w energię związków fosforanowych, bogatych w energię, pozwoliło powiązać bezpośrednio asymilację z dysmiliacją. Czym dla przemiany materii była nauka o dynamicznym stanie ustroju, tym dla przemiany energii stało się pojęcie fosforanowych przenośników energii. Dopiero oba te pojęcia razem wzięte pozwalają nam zrozumieć żywy ustrój jako twór dynamiczny w ciągłej wymianie z otoczeniem, w którym bezustannie stany nierównowagi chemicznej dążą do wyrównania, a równocześnie powstają nowe.

W ten sposób zarysowuje się skomplikowany obraz dynamicznej równowagi, który nazywamy życiem.

PIŚMIENNICTWO

- 1) *Burton K., Wilson T. H.*: Bioch. J. 1953, 54, 86. — 2) *Rodkey F. L., Ball E. G.*: J. Biol. Chem. 1950, 182, 17. — 3) *Michaelis L., Schubert, Smythe*: J. Biol. Chem., 1936, 116, 587. — 4) *Slater E. C.*: Bioch. J. 1950, 46, 484. — 5) *Green E. D.*: Symposium sur le cycle tricarboxylique, 1952, Paris, s. 5. — 6) *Meyerhof O., Suranyi J.*: Biochem. Z., 1927, 191, 106. — 7) *Lundsgaard E.*: Bioch. Z. 1930, 217, 162. — 8) *Eggleton P., Eggleton G. P.*: Biochem. J. 1927, 21, 190. — 9) *Fiske C. H., Subbarow Y.*: J. Biol. Chem. 1929, 81, 629. — 10) *Lundsgaard E.*: Biochem. Z. 1931, 233, 322.
- 11) *Parnas J. K., Ostern P. and Mann T.*: Bioch. Z. 1934, 272, 64. — 12) *Lohmann K.*: Naturwiss. Bioch. Z. 1954, 271, 264. 13) *Lohmann K.*: Naturwiss. 1929, 624. — 14) *Parnas J. K.*: Roczniki Nauk Roln. Le.n. 1936, 40, 385. — 15a) *Parnas J. K., Baranowski T.*: C. R. Soc. Biol. 1935, 120, 307. — 15b) *Negelein E. und Broemel H.*: Bioch. Z. 1939, 303, 132. — 16a) *Engelhardt W. A.*: Bioch. Z. 1930, 227, 16. — 16b) *Engelhardt W. A.*: Bioch. Z. 1932, 251, 343. — 17a) *Belitzer W. A., Czibakowa E. T.*: Biochimija 1939, 4, 516. — 17b) *Kalckar H.*: Bioch. J. 1939, 33, 631. — 18) *Lipmann F.*: Adv. Enzymol. 1941, 1, 99. — 19) *Lipmann F.*: Adv. Enzymol. 1946, 6, 231. — 20) *Lynen F. und Reichert E.*: Angew. Chem. 1951, 63, 46.
- 21) *Ochoa S.*: Symp. sur le cycle tricarbox. Paris, 1952, 73. — 22) *Avison A. W. D., Hawkins J. D.*: Quart. Rev. 1952. — 23) *Baldwin E., Yudkin W. H.*: Proc. Roy. Soc. 1950, 136-B, 614. — 24) *Kalckar H.*: J. Biol. Chem. 1943, 148, 127. — 25) *Lohmann K.*: Bioch. Z., 1928, 202, 466. — 26) *Davenport H. A., Sucks J.*: Biol. Chem. 1929, 81, 469. — 27) *Ferdmann O., Feinschmidt O.*: Bioch. Z., 1935, 277, 203. — 28) *Parnas J. K., Umschweif B.*: Bul. Soc. Chem. Biol. 1937, 19, 325. — 29) *Umschweif B., Gibayto K.*: Hoppe-Seiler, 1937, 246, 163. — 30) *Cori F. C.*: Symposium on Respir. Enzymes. Wisconsin, 1942.
- 31) *Mann T.*: Bioch. J. 1944, 38, 339 i 38, 345. — 32) *Wiame J. M.*: Bull. Soc. Chim. Biol. 1946, 28, 552. — 33) *Heller J., Karpiak St., Zubikowa J.*: Nature, 1950, 166, 187. — 34) *Niemierko W., Niemierko S.*: Acta Biol. Exper. 1950, 15, 111. — 35) *Roche J. i wspópr.*: Bull. Soc. Chim. Biol. 1945, 27, 599. — 36) *Meyerhof O., Oesper P.*: Arch. Biochem. 1952, 38, 237. — 37) *Ohlmeier P., Shatas R.*: Arch. Biochem. 1951, 36, 411. — 38) *Kornberg A.*: J. Biol. Chem. 1948, 176, 1475. — 39) *Lipmann F., Jones M. E., Black S.*: Symp. s. 1. cycle tricarboxylique, Paris, 1952, s. 55. — 40) *Lipmann F.*: J. Biol. Chem. 1940, 134, 463.
- 41) *Nachmanson D., Machado A. L.*: J. Neurophys. 1943, 6, 397. cyt. wg. *Ann. Rev. Bioch.* 1944. — 42) *Lipmann F. i wspópr.*: J. Biol. Chem. 1950, 186, 235. — 43) *Bernhard K.*: Sitzungsber. Schweiz. Akad. Wiss., 1950, 6, 407. — 44) *Meyerhof O., Schultz W.*: Biochem. Z. 1935, 281, 292. — 45) *Oesper P.*: Arch. Biochem. 1950, 27, 255. — 46) *Holzer H.*: Angew. Chemie, 1952, 64, 248. — 47) *Severo Ochoa*: Physiol. Rev., 1951, 31, 56. — 48) *Littlefield J. W., Sanadi D. K.*: J. B. Chem. 1952, 199, 65. — 49) *Kaufman S.*: Phosphorus Metabolism, 1951, 1, 370, cyt. wg. (21). — 50) *Sanadi D. K., Littlefield J. W.*: Feder. Proc. 1952, 11, 280.
- 51) *Warburg O., Christian W.*: Biochem. Z. 1939, 303, 40. — 52) *Holzer H., Holzer E.*: Hoppe-Seilers Z. 1952, 291, 67. — 53) *Schweet R. S., Cheslock K.*: J. Biol. Chem. 1952, 199, 749. — 54) *Reed L. J., De Busk B. G.*: J. Biol. Chem. 1952, 199, 873. — 55) *Colovick S. P., Kalckar H. M., Cori C. F.*: J. Biol. Chem. 1941, 137, 343. — 56) *Ochoa S.*: J. B. Chem. 1941, 138, 751. — 57) *Ochoa S.*: J. Biol. Chem. 1943, 149, 577. — 58) *Hunter F. E., Hixon W. W.*: J. Biol. Chem. 1949, 181, 73. — 59) *Lehninger A. L., Smith S. W.*: J. Biol. Chem. 1949, 181, 435. — 60) *Friedkin N., Lehninger A. L.*: J. Biol. Chem. 1949, 178, 611.
- 61) *Barkulis S. S., Lehninger A. L.*: J. B. Chem. 1951, 190, 339. — 62) *Judah J. D.*: Biochem. J. 1951, 49, 271. — 63) *Krebs H. A. i wspópr.*: Biochem. J. 1953, 54, 107. — 64) *Slater E. C.*: Nature 1950, 166, 982. — 65) *Burton K., Krebs H. A.*: Biochem. J. 1953, 54, 94. — 66) *Cohn M.*: J. Biol. Chem., 1953, 201, 735. — 67) *Lardy H. A., Elvehjem C. A.*: Ann. Rev. Bioch. 1945, 14, 1. — 68) *Loomis W. F., Lipmann F.*: J. Biol. Chem. 1948, 173, 807. — 69) *Loomis W. F., Lipmann F.*: J. Biol. Chem. 1949, 179, 503. — 70) *Loomis W. F.*: Feder. Proc. 1949, 8, 220.

- 71) Judah J. D., Williams-Ashman H. G.: *Bioch. J.* 1951, 48, 33. — 72) Lardy H. A., Feldott G.: *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 1951, 54, 638. — 73) Lardy H.: II Congrès I. de Bioch., Paris, Communications, 1952, str. 56. — 74) Martius C.: II Congrès Intern. Bioch., Paris. Communic., str. 60. — 75) Dutoit Ch. C., Hoch F. L., Wright E., Lipmann F.: 1952, II Congr. I. de Biochem., Paris, Communic., str. 50. — 76) Hunter F. E., Spector S.: *Feder Proc.*, 1951, 10, 201. — 77) Gross J. C., Taggart J. V., Covo G. A., Green D. E.: *J. Biol. Chem.*, 1948, 177, 655. — 78) Johnson M. J.: *Science*, 1941, 94, 200. — 79) Lynen F.: *Liebigs Ann.*, 1941. 546. 120. — 80) Seits J. E., Engelhardt V. A.: *C. R. Acad. Sci. URSS*, 1949, 66, 439.
- 81) Engelhardt V. A., Ljubimowa N. M.: *Nature*, 1939, 144, 668. — 82) Szent-Györgyi A.: *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1942, 1, 17. — 83) Perry S. V.: *Biochem. J.*, 1950, 47, XXXVIII. — 84) Straub F. B., Feuer G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, 4, 455. — 85) McElroy W. D., Strehler B. L.: *Arch. Bioch.*, 1949, 22, 420. — 86) Straub F. B.: *Acta Phys. Hung.*, 1952, 4, Suppl. 3. — 87) Krebs H. A., Eggleton L. V. and Terner C.: *Bioch. J.*, 1951, 48, 530. — 88) Straub F. B.: *Wykład wyg'oszony w Warszawie*, 1953. — 89) Leuthardt F., Bujard E.: *Helv. Med. Acta*, 1947, 14, 247. — 90) Denes G., Garda Z. S.: *Acta Physiol. Hung.* 1953, 4, 1.
- 91a) Elliot W. H.: *Feder. Proc.*, 1949, 11, 207. — 91b) Elliot W. H.: *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 661. — 92) Bloch K.: *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 1245. — 93) Yanari S., Snoke J. E., Bloch K.: *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 561. — 94) Snoke J. E., Yanari S., Bloch K.: *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 573.

WŁODZIMIERZ NIEMIERKO (ŁÓDŹ)

O METODACH ROZDZIELANIA ZWIĄZKÓW FOSFOROWYCH W TKANKACH ZWIERZĘCYCH

Od czasu wykrycia kwasu kreatynofosforowego (*Fiske i Subbarow 1927, Eggleton i Eggleton 1927*) i wyjaśnienia jego znaczenia dla procesów chemicznych zachodzących w mięśniach ogromnie wzrosło zainteresowanie biochemików również i szeregiem innych poznanych drobnocząsteczkowych związków fosforowych, jak kwas adenozynotrój-, dwu- i jednofosforowy, estry heksozo- i triozofosforowe, kwas fosfopirogronowy, acetylofosforan i inne. Dzięki licznym badaniom wielu autorów, wśród których obok *Meyerhoja, Embdena, Carich* należy na jednym z pierwszych miejsc wymienić *Parnasa* i jego współpracowników, została w dużej mierze poznana różnorodna rola wymienionych związków w zawitych i szybko po sobie postępujących procesach przemian węglowodanowych, przede wszystkim w mięśniach, ale również w innych tkankach zwierzęcych oraz w mikroorganizmach i częściowo w roślinach. Wyjaśniło się następnie, że przy bezpośrednim udziale niektórych z przytoczonych związków fosforowych, przede wszystkim zaś ATP jako donatora reszt fosforanowych i niejako uniwersalnego akumulatora energii chemicznej, zachodzą przemiany nie tylko węglowodanów, lecz prawdopodobnie również tłuszczów i białek.

Wymienione drobnocząsteczkowe organiczne połączenia fosforowe, do których należy dołączyć jeszcze nieorganiczne orto-, meta- i pirofosforany, są wszystkie razem obejmowane nazwą „związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasach”. Nazwa ta pochodzi stąd, że substancje te są zwykle wyodrębniane z materiału biologicznego za pomocą działania kwasu trójchlorooctowego, który równocześnie służy przy tym do odbiałczania. Należy zaznaczyć, że związki fosforowe rozpuszczalne w kwasie są rozpuszczalne również w wodzie. Do pozostałych związków fosforowych, które ze względu na wymienioną, niejako klasyczną procedurę postępowania analitycznego można nazwać nierozpuszczalnymi związkami fosforowymi, zaliczamy fosfolipidy, kwasy nukleinowe oraz występujące na ogół rzadziej, fosfoproteiny.

W czasach nowszych, szczególnie dzięki zastosowaniu metody izotopowej, wyjaśniło się, że znaczną aktywność fizjologiczną wykazują nie tylko rozpuszczalne związki fosforowe, o czym wiedziano już wcześniej, ale również nierozpuszczalne związki fosforowe, przede wszystkim zaś kwasy nukleinowe (por. *Davidson, 1950*).

Z przytoczonych danych wynika, że dla zrozumienia całokształtu procesów chemicznych zachodzących w organizmach żywych jest konieczne poznanie przemiany poszczególnych związków fosforowych, z którą w ten lub inny sposób jest związana większość zjawisk biologicznych. Wobec ścisłego powiązania ze sobą w organizmie wszystkich procesów biochemicznych poznanie udziału w nich związków fosforo-

wych możliwe jest w pełnej mierze jedynie za pomocą metod analizy chemicznej, które pozwalałyby na równoczesne ilościowe oznaczenie w tym samym materiale biologicznym wszystkich zawartych w nim związków fosforowych.

Systematyczny bieg analizy umożliwiający oznaczenie szeregu związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie opracował *Lohmann* (1928). Autor ten posługując się do oznaczenia fosforu metodą *Fiske i Subbarow* (1925), za pomocą której wykrywa się jedynie ortofosforany nieorganiczne, frakcjonował związki fosforowe na podstawie łatwości, z jaką ulegają one hydrolizie, odszczepiając ortofosforan w czasie ogrzewania z kwasem. W ten sposób można było w otrzymanym z materiału biologicznego wyciągu kwasu trójchlorooctowego wykryć ortofosforan nieorganiczny, dający się oznaczyć bezpośrednio, następnie związki fosforowe labilne, hydrolizujące się po jednej minucie ogrzewania z kwasem (fosfokreatyna lub fosfoarginina) i po 7 minutach ogrzewania (ATP), oraz związki trudno hydrolizujące się, odłączające ortofosforan po 30, 60 i 180 minutach ogrzewania. Po całkowitym spaleniu wyciągu kwasu trójchlorooctowego stężonym kwasem siarkowym i azotowym można było oznaczyć tzw. całkowity fosfor rozpuszczalny i następnie z różnicy obliczyć zawartość fosforu w związkach nie ulegających hydrolizie.

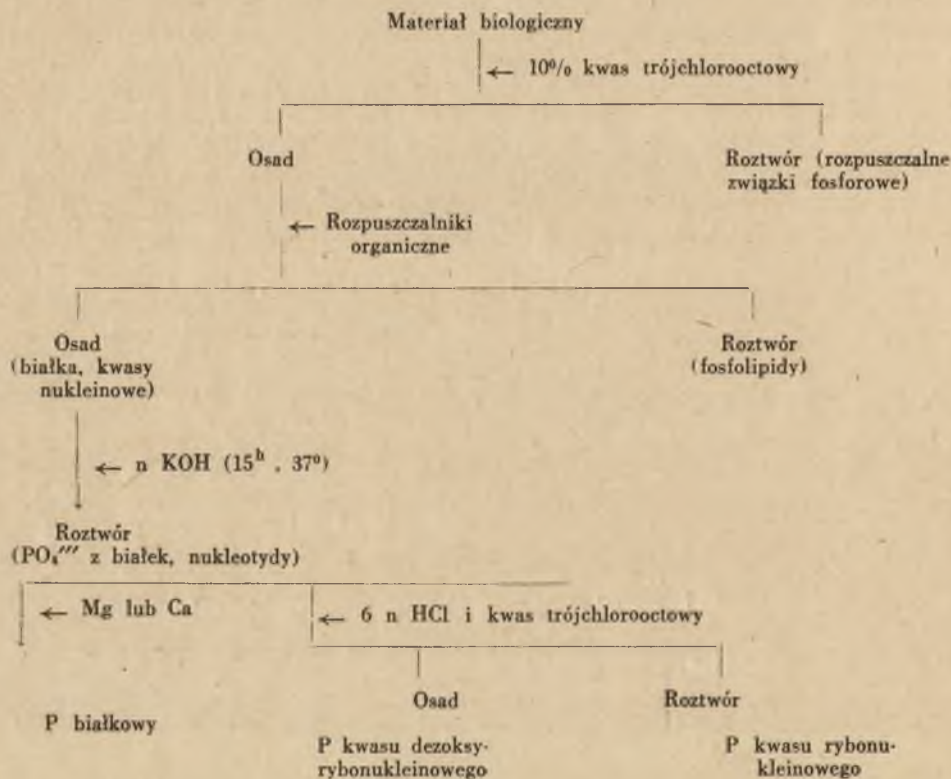
Metoda *Lohmanna* nie daje ścisłych wyników. Jednym z jej słabych punktów jest między innymi to, że jak się okazało, istnieją bardzo labilne związki, które ulegają rozpadowi już w czasie samej procedury oznaczania fosforu według *Fiske i Subbarow*. Dlatego to, co się oznacza w roztworze kwasu trójchlorooctowego przed hydrolizą, nie odpowiada zawartości w materiale biologicznym ortofosforanu nieorganicznego, lecz przewyższa go o ilość fosforu odłączonego od związków bardzo labilnych. Metoda *Lohmanna* ma jednak tę zaletę, że jest bardzo łatwa w wykonaniu i wymaga nieznacznych ilości materiału badanego. Dla ogólnej charakterystyki zawartości labilnych i trudno hydrolizujących się związków fosforowych metoda ta jeszcze i obecnie ma często zastosowanie.

W czasach nowszych opracowany został szereg innych metod bardziej skomplikowanych, ale umożliwiających ściślejsze rozfrakcjonowanie związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie. Metody te, szczegółowo opisane w monografii *Umbreit i in.* (1945), polegają na oddzieleniu od siebie związków fosforowych na podstawie różnej rozpuszczalności ich soli magnezowych, barowych, wapniowych i innych w wodzie i alkoholu. Oddzielone od siebie w powyższy sposób frakcje związków fosforowych lub pojedyncze substancje są następnie ilościowo oznaczane bądź poprzez zawartość w nich fosforu, bądź jakimiś innymi metodami, jak oznaczenie zawartości glikozy, fruktozy, pentoz, puryn itd. Również jednak i te metody są jeszcze bardzo dalekie od doskonałości i wymagają różnorodnych modyfikacji w zależności od specyfiki badanego materiału. Ostatnio zaczęły się ukazywać metody rozdzielania drobnocząsteczkowych związków fosforowych za pomocą chromatografii bibułowej (*Hanes i in.*, 1949, *Bandurski i in.*, 1951, *Opińska i in.*, 1952, *Doman i Kagan*, 1952). Metody te niewątpliwie mają przed sobą wielką przyszłość.

Jeżeli chodzi o związki fosforowe nierozpuszczalne, to metody, które służą do oznaczania kwasów nukleinowych i fosfoproteinów z jednej strony i fosfolipidów z drugiej strony, były opracowywane przeważnie całkowicie niezależnie od siebie.

Systematyczny bieg analizy przy ilościowym oznaczaniu kwasów nukleinowych i fosfoproteinów został podany dopiero w latach ostatnich głównie przez *Schmidta i Thannhausera* (1945) oraz *Schneidera* (1945, 1946), których sposób postępowania jest obecnie najbardziej rozpowszechniony. Autorzy ci rozpoczynają całą procedurę od odbiałczania badanego materiału kwasem trójchlorooctowym, do którego przechodzą przy tym rozpuszczalne związki fosforowe. Następnie z osadu zawierającego białka, kwasy nukleinowe i lipidy usuwają te ostatnie za pomocą ekstrakcji róż-

nymi rozpuszczalnikami organicznymi (alkohol etylowy i metylowy, eter, chloroform). W otrzymanej w ten sposób suchej pozostałości oddziela się od siebie fragmenty związków fosforowych pochodzących z kwasów rybonukleinowych i dezoksyrybonukleinowych oraz z białek. Samo rozdzielanie wykonuje się za pomocą prowadzonej w ściśle określonych warunkach hydrolizy wspomnianej suchej pozostałości kwasem trójchlorooctowym na gorąco (*Schneider*, 1945), bądź 1 n KOH z późniejszym działaniem kwasu (*Schmidt* i *Thannhauser*, 1945). Schemat postępowania wg *Schmidta* i *Thannhausera* jest następujący:



Oddzielone według powyższego schematu fragmenty kwasów rybonukleinowych i dezoksyrybonukleinowych są następnie oznaczane najczęściej poprzez fosfor, ale również i poprzez pentozy lub puryny.

W czasach najnowszych *Ogur* i *Rosen* (1950) opracowali metodę oznaczania kwasów nukleinowych w tkankach roślinnych. Zmodyfikowali oni ekstrahowanie i frakcjonowanie tych związków przez zastosowanie do hydrolizy zamiast kwasu trójchlorooctowego kwasu nadchlorowego. Sposób postępowania polegał na następujących czynnościach: 1) oddzielenie związków rozpuszczalnych w gorącym 70% alkoholu, 2) ekstrakcja lipidów gorącym alkoholem i eterem, 3) usunięcie z pozostałości związków rozpuszczalnych w kwasie nadchlorowym i 4) oznaczanie w pozostałym osadzie fragmentów kwasów nukleinowych i fosfoproteinów oddzielonych od siebie za pomocą hydrolizy kwasem nadchlorowym. Metoda powyższa została przez autorów sprawdzona również na wątrobie zwierząt ssących i dała dla kwasów nukleinowych wartości zgodne z uzyskanymi za pomocą metody *Schneidera*. *Ogur* i *Rosen* nie badali jednak zachowania się przy tym sposobie postępowania związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie, jak również nie interesowali się, jakiego rodzaju związki fosforowe mogły przechodzić do gorącego 70% alkoholu.

Przechodząc do fosfolipidów, jako do trzeciej i ostatniej grupy związków fosforowych, musimy zaznaczyć, że analiza lipidów w ogóle, w szczególności zaś rozdzielanie poszczególnych frakcji fosfolipidów, ma swoją bardzo długą historię, ale do dnia dzisiejszego stanowi jeden z najtrudniejszych i najmniej opracowanych działów metodyki analizy biochemicznej (*Thudichum*, 1901; *Thierfelder* i *Klenk*, 1930; *Hilditch*, 1940; *Bloor*, 1943; *Deuel*, 1950). Postępowanie rozpoczyna się zwykle od wysuszenia materiału biologicznego lub odwodnienia go za pomocą tych lub innych substancji chemicznych. Z przygotowanego wysuszonego materiału ekstrahuje się następnie lipidy w aparatach ekstrakcyjnych rozpuszczalnikami organicznymi, jak gorący alkohol, eter, benzen, chloroform i wiele innych. Działa się również bezpośrednio na świeżą substancję rozpuszczalnikami organicznymi, które jednocześnie odwadniają badany materiał i przynajmniej częściowo rozpuszczają lipidy.

Uzyskana po odparowaniu rozpuszczalników pozostałość na ogół zawiera poza lipidami różne domieszki obce i zwykle wymaga oczyszczenia. Najczęściej stosuje się do tego eter naftowy, który mało się nadaje do bezpośredniego ekstrahowania lipidów z materiału biologicznego, ale jest za to ich najbardziej wybiórczym rozpuszczalnikiem.

Dla ogólnego zorientowania się w ilości fosfolipidów w badanym materiale wystarcza spalić próbkę oczyszczonego w powyższy sposób ekstraktu kwasem siarkowym i azotowym i oznaczyć w nim zawartość fosforu, nazywanego fosforem lipidowym. Natomiast ilościowe wyodrębnienie fosfolipidów z ekstraktu i oddzielenie od siebie poszczególnych ich frakcji bardzo rzadko może doprowadzić do ściśłych wyników, szczególnie w skali mikroanaliz. Zasada oddzielania fosfolipidów polega przede wszystkim na ich nierozpuszczalności w acetonie. Dotyczy to jednak jedynie chemicznie czystych związków. Zachodząca w znacznym stopniu wzajemna rozpuszczalność różnych lipidów powoduje bowiem to, że każda z oddzielonych frakcji zawiera bardzo znaczne domieszki innych frakcji. Oczyszczenie ich związane jest z koniecznością wielokrotnego strącania i rozpuszczania poszczególnych frakcji lipidowych i wymaga dużych ilości materiału. W czasach najnowszych ukazał się bardzo szczegółowy i systematyczny opis ilościowych oznaczeń fosfolipidów opracowany na podstawie piśmiennictwa i stosowany przez *Brantego* (1949) w związku z jego badaniami nad lipidami układu nerwowego.

Podany powyżej krótki przegląd metod analitycznych, które służą do badania przemian fosforowych, wskazuje na to, że do chwili obecnej brak jeszcze danych o takiej metodzie postępowania, która umożliwiałaby równoczesne oznaczanie związków fosforowych należących do wszystkich trzech omówionych frakcji: związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie, kwasów nukleinowych wraz z fosfoproteinami i fosfolipidów.

Trudności opracowywania tego rodzaju metody są w dużej mierze związane z tym, że wśród związków fosforowych rozpuszczalnych istnieją, jak zaznaczono wyżej, substancje bardzo labilne, które mogą łatwo ulec rozpadowi już w czasie wykonywania samej analizy. Dlatego wszystkie metody, które służą do badań przemian związków fosforowych rozpuszczalnych, rozpoczynają się od wyciągania tych substancji z oziębionego materiału biologicznego oziębionym roztworem kwasu trójchlorooctowego i ich natychmiastową dalszą analizą.

Z drugiej natomiast strony analiza fosfolipidów rozpoczyna się od ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi materiału uprzednio wysuszonego lub odwodnionego środkami chemicznymi. Tymczasem, jak wykazano w wielu przypadkach (*S. Niemierko*, 1950), nawet suszenie na zimno w próżni może powodować daleko idący rozpad rozpuszczalnych związków fosforowych zawartych w badanym materiale biologicznym i zjawianie się znacznych ilości ortofosforanu nieorganicznego.

Równoczesne oznaczanie i frakcjonowanie związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie, połączone z analizą kwasów nukleinowych i oznaczeniem ogólnej ilości fosforu lipidowego, wydaje się możliwe przy zastosowaniu metody Schmidta i Thannhausera lub Schneidera. Metody te nie pozwalają jednak na równoczesne oznaczenie zawartości wody w badanym materiale, co w wielu przypadkach może mieć duże znaczenie, szczególnie wówczas, gdy dane te nie mogą być uzupełnione specjalną analizą równoległą, jak np. w badaniach drobnych narządów lub drobnych organizmów.

Przytoczone wyżej dane skłoniły nas (*W. Niemierko, S. Niemierko i P. Włodawer, 1952*) do opracowania metody, która dawałaby możliwość oznaczenia wody i suchej substancji w badanym materiale, pozwalałaby na oddzielenie związków fosforowych rozpuszczalnych, kwasów nukleinowych wraz z fosfoproteinami i fosfolipidów oraz umożliwiałaby dalsze badanie poszczególnych frakcji.

Wydawało się, że procedura postępowania, która odpowiadałaby powyższym wymogom, powinna rozpoczynać się od ilościowego usuwania z badanego materiału wody i lipidów z możliwością dalszego frakcjonowania lipidów i oznaczania poszczególnych fosfolipidów. W otrzymanej suchej substancji odlipidowanej przy zastosowaniu kwasu trójchlorooctowego można byłoby oddzielić od siebie związki fosforowe rozpuszczalne w kwasie i kwasy nukleinowe wraz z fosfoproteinami. Należało przy tym zwrócić szczególną uwagę na to, aby ekstrahowanie lipidów i usuwanie wody nie pociągnęło za sobą możliwości rozpadu labilnych związków fosforowych rozpuszczalnych.

Po licznych wstępnych próbach zdecydowano się stosować do usuwania wody i lipidów działanie na oziębiony materiał biologiczny oziębionej mieszaniny acetonowo-chloroformowej (5:1). Szczególne zalety acetonu polegają w tym przypadku z jednej strony na jego właściwościach odwadniających, z drugiej strony na jego wybitnych właściwościach bardzo łatwego rozpuszczania wszystkich lipidów poza fosfolipidami. Niewielki dodatek chloroformu miał powodować rozpuszczenie również fosfolipidów.

Po odparowaniu rozpuszczalników organicznych i wody ekstrakt lipidowy, jak się okazało, całkowicie rozpuszczał się w eterze naftowym, co wskazywało, że nie zawierał on domieszek obcych. Suma ekstraktu lipidowego i suchej substancji odlipidowanej dawała możliwość obliczenia całkowitej zawartości substancji suchej w badanym materiale, a zatem również i wody.

Analizy wykonane na gąsienicach mola woskowego, zawierających w swoim ciele bardzo duże ilości tłuszczów obojętnych, wydawały się wskazywać na to, że po 3—4-krotnym roztarciu gąsienic na zimno z mieszaniną acetonowo-chloroformową i po następnym 2—3-krotnym roztarciu pozostałości z samym chloroformem z materiału zostają usunięte, praktycznie biorąc, wszystkie lipidy wraz z fosfolipidami. O ile bowiem odsączoną pozostałość ekstrahowano dalej w aparacie ekstrakcyjnym w ciągu kilku godzin gorącym chloroformem, w uzyskanym w ten sposób roztworze chloroformowym znajdowano najwyżej 1—2% tej ilości lipidów (i fosforu lipidowego), która uprzednio rozpuściła się na zimno. Ponieważ wartości te znajdowały się w granicach błędów analiz, przystąpiono w dalszych doświadczeniach do sprawdzenia najważniejszego momentu procedury, mianowicie do oznaczania w odlipidowanej na zimno pozostałości (po odparowaniu w temperaturze pokojowej resztek acetonu i chloroformu) zawartości związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie. W tym celu ekstrahowano je oziębionym 5% roztworem kwasu trójchlorooctowego i uzyskane wyniki zestawiono z danymi otrzymanymi za pomocą bezpośredniej ekstrakcji kwasem trójchlorooctowym materiału świeżego wg Schmidta i Thannhausera.

Porównanie ze sobą tych danych pozwoliło stwierdzić całkowitą zgodność wyników uzyskanych naszą metodą i metodą Schmidta i Thannhausera. Dotyczyło to

Met. M. i. u. porównanie
wzrostu tej form

zarówno ogólnej zawartości fosforu rozpuszczalnego, jak i fosforu nieorganicznego oraz labilnych związków fosforowych. Postępowanie nasze umożliwiało zatem usuwanie z materiału badanego lipidów i wody bez obawy rozłożenia w czasie tej procedury labilnych związków fosforowych. Okazało się ponadto, że uzyskany odlipidowany suchy materiał można przez czas dłuższy przechowywać w eksskatrze, analiza bowiem tego materiału wykonana po kilku tygodniach wykazała, że zawartość fosforu nieorganicznego i fosforu związków labilnych nie uległa żadnej zmianie.

Następne serie analiz miały na celu porównanie ze sobą wyników uzyskanych nową metodą i metodą Schmidta i Thannhausera dla wszystkich trzech frakcji związków fosforowych, tj. 1) fosforu rozpuszczalnego, 2) fosforu kwasów nukleinowych i 3) fosforu lipidowego. Uzyskane dane wskazywały na to, że o ile pierwsza frakcja dawała wyniki identyczne dla obu metod, to frakcje druga i trzecia stałe dawały wyniki ze sobą niezgodne: procedura nasza w porównaniu z metodą Schmidta i Thannhausera dawała stałe niższe wartości dla fosforu lipidowego, natomiast odpowiednio wyższe wartości dla fosforu nukleinowego.

Nasunęło się przypuszczenie, że ekstrahowanie świeżej substancji acetonem i chloroformem może pozostawić w stanie nierozpuszczalnym te lipidy, które w materiale biologicznym występują w postaci lipoprotein. Z badań licznych autorów wynika (por. zestawienie piśmiennictwa: *Macheboef*, 1936; *Przyłęcki*, 1941; *Chargaff*, 1944; „Lipo-proteins“, 1949), że lipoproteiny stosunkowo dobrze rozpuszczają się w wodzie, natomiast źle albo wcale nie rozpuszczają się w eterze etylowym. Rozpad lipoprotein i uwolnienie z nich lipidów może być dokonane między innymi przez działanie alkoholu (*Hardy i Gardiner*, 1910).

Przystępując do naszych badań braliśmy powyższe dane pod uwagę, niemniej jednak byliśmy poniekąd zasugerowani następującymi okolicznościami. Po pierwsze tym, że jak wynika z doświadczeń *Macheboefa* i *Sandora* (1932), aceton w pewnych przypadkach jest zdolny do rozkładania lipoprotein na równi z alkoholem. Po drugie, stwierdzonym przez nas faktem, że nawet wielogodzinna ekstrakcja gorącym chloroformem rozpuszcza dodatkowo z badanego materiału jedynie zupełnie nieznaczne ilości lipidów wraz z fosfolipidami w porównaniu z ekstrakcją zimną mieszaniną acetonowo-chloroformową. Po trzecie wreszcie — obawą zastosowania alkoholu ze względu na dobrze znany fakt przechodzenia do roztworu alkoholowego różnych substancji nielipidowych, w tym nieokreślonych bliżej związków fosforowych.

W celu wyświeślenia kontrowersji powstałej przy porównaniu naszej metody z metodą Schmidta i Thannhausera, dotyczącej znajdowania przy ekstrakcji acetonowo-chloroformowej zbyt niskich wartości dla fosforu lipidowego i odpowiednio zbyt wysokich wartości dla fosforu nukleinowego, przystąpiliśmy do następujących doświadczeń.

Na materiał (gąsienice mola woskowego), z którego w wyczerpujący sposób zostały usunięte wszystkie substancje rozpuszczające się w zimnej mieszaninie acetonowo-chloroformowej i w gorącym chloroformie, podziałano zimnym roztworem alkoholowo-eterowym (3:1). Zebrane oddzielnie i zanalizowane na zawartość fosforu wyciągi acetonowo-chloroformowe z jednej strony i alkoholowo-eterowe z drugiej strony dały możliwość przekonać się, że do alkoholu z eterem przechodzi dodatkowo około 8—10% fosforu w porównaniu z ilością rozpuszczającą się w acetonie i chloroformie. W następnych doświadczeniach przekonano się, że po dalszym zadziałaniu gorącym alkoholem-eterem wydobywa się z materiału jeszcze około 8—10% fosforu, w sumie zatem o około 15—20% więcej niż przy działaniu mieszaniny acetonowo-chloroformowej i gorącego chloroformu. Pozostałość po odparowaniu alkoholu i eteru praktycznie biorąc całkowicie rozpuszczała się w eterze naftowym, a zatem, jak można było sądzić, składała się z samych lipidów. Ogólna

ilość tych dodatkowo wyekstrahowanych lipidów była bardzo nieduża, natomiast zawartość w nich fosforu była znaczna i wynosiła około 1,5%; były to zatem po części fosfolipidy.

Z przytoczonych doświadczeń należało wnioskować, że mieszanina acetonowo-chloroformowa nie rozkłada i nie ekstrahuje przynajmniej części lipidów, prawdopodobnie związanych z białkami, jako lipoproteiny.

Połączenia te są natomiast rozkładane przez działanie alkoholu-eteru, w związku z czym uwolnione lipidy, które są w dużej mierze fosfolipidami, przechodzą do roztworu.

W świetle powyższych faktów opisana pierwotna procedura odwadniania i odlipidowania materiału biologicznego za pomocą acetonu i chloroformu musiała być uzupełniona działaniem na pozostałość gorącą mieszaniną alkoholowo-eterową. Należało jednak przede wszystkim sprawdzić, czy zmieniony sposób postępowania w dalszym ciągu pozostawia labilne związki fosforowe rozpuszczalne w kwasie w stanie nierozłożonym.

Wykonane analizy pozwoliły stwierdzić, że również i po zastosowaniu zmodyfikowanej procedury (wg której ze świeżego materiału biologicznego są usuwane wszystkie lipidy, nie wyłączając tych, które występowały w postaci lipoproteinów) zarówno zawartość, jak i skład frakcji związków fosforowych rozpuszczalnych są identyczne z tymi, jakie uzyskuje się według metody Schmidta i Thannhausera.

W tabeli zestawiono wyniki kilku analiz wykonanych obydwoma metodami na gąsienicach mola woskowego (*W. Niemierko, S. Niemierko i P. Włodawer, 1952*).

Metoda stosowana	Nr	P nieorg. mg ⁰ / ₀	P — 7 min. mg ⁰ / ₀	P całk. rozp. mg ⁰ / ₀
Schmidt i Thannhauser	1	15,2	15,8	113
	2	14,5	18,5	116
	3	14,8	22,5	117
Nowa metoda	4	15,8	18,9	114
	5	13,4	17,2	104
	6	14,6	26,3	115

Analogiczne wyniki otrzymano ponadto na innym materiale biologicznym, mianowicie na wątrobie i mózgu świnki morskiej (*W. Niemierko, S. Niemierko i P. Włodawer, 1953*). I w tym przypadku po wyczerpującej ekstrakcji świeżego materiału acetonem i chloroformem można było za pomocą alkoholu i eteru uwolnić z pozostałości około 10—20% dodatkowych ilości fosfolipidów, które prawdopodobnie występowały w tkance pod postacią lipoprotein. W przypadku analizy wątroby substancje, które przechodziły do roztworu alkoholowo-eterowego, były dobrze rozpuszczalne w eterze naftowym. Świadczyło to o tym, że za pomocą stosowanej procedury nie ekstrahowano domieszek obcych, nie lipidowych. Przy analizie mózgu natomiast część substancji dodatkowo wyciągniętych w powyższy sposób alkoholem-eterem niecałkowicie przeszła do eteru naftowego. Związane jest to prawdopodobnie z tym, że niektóre składniki lipidowe tkanki nerwowej, przede wszystkim te, w których skład wchodziły oksywasy, są źle rozpuszczalne w eterze naftowym.

Wobec tego, że cała frakcja alkoholowo-eterowa rozpuszczała się w chloroformie, sądzimy, że i w tym przypadku składała się ona z samych lipidów.

Analizy wykonywane równoległe metodą naszą i metodą Schmidta i Thannhausera pozwoliły przekonać się, że we wszystkich zbadanych przez nas przypadkach

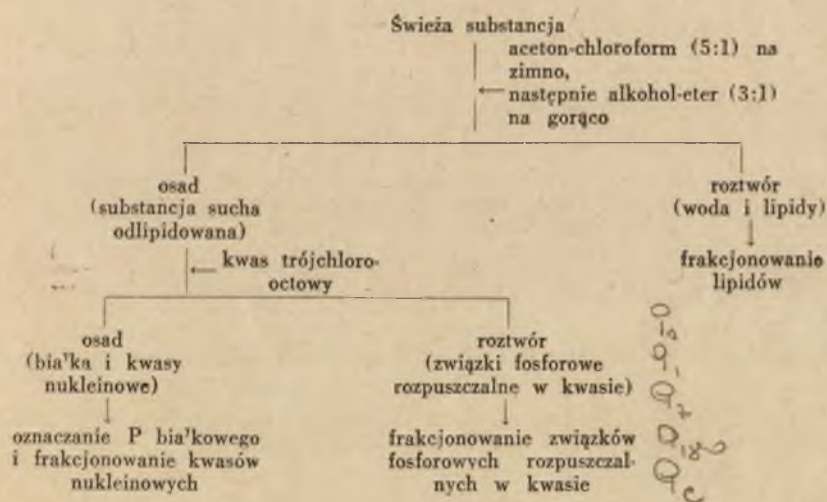
zawartość i skład frakcji fosforowej rozpuszczalnej w kwasie były identyczne w obu sposobach postępowania. Bardzo zbliżona okazała się również zawartość fosforu nukleinowego i fosforu lipidowego znalezionych obydwoma metodami. Jednocześnie dało się jednak stwierdzić, że usuwanie lipidów według *Schmidta* i *Thannhausera* z osadu po kwasie trójchlorooctowym niewątpliwie jest połączone z jakąś zmianą w składzie lipidów. Lipidy uzyskane po odparowaniu rozpuszczalników organicznych w tym przypadku, w przeciwieństwie do naszej metody, tylko częściowo rozpuszczały się w eterze naftowym, przy czym pozostający osad zawierał duże ilości fosforu.

Dalsze badania nad wyświetleniem tego zagadnienia są w toku.

Przytoczone i omówione powyżej fakty pozwalają przypuszczać, że opracowana przez nas metoda może mieć ogólne zastosowanie w badaniach przemian związków fosforowych w tkankach zwierzęcych. Metoda pozwala:

- 1) oznaczyć w badanym materiale zawartość wody i substancji suchej;
- 2) wyodrębnić ze świeżej substancji wszystkie lipidy wraz z fosfolipidami w sposób, który, jak się wydaje, nie powinien zmieniać ich składu i umożliwia ich dalsze frakcjonowanie;
- 3) przechowywać suchą substancję odlipidowaną i oddzielać związki fosforowe rozpuszczalne w kwasie bez rozłożenia labilnych związków fosforowych;
- 4) frakcjonować kwasy nukleinowe i fosfoproteiny.

Schemat całej procedury jest następujący:



Prowadzone obecnie dalsze doświadczenia mają na celu wyjaśnić, czy i w jakiej mierze omawiana metoda może być zastosowana również w badaniach nad lipoproteinami. Wydaje się ponadto, że proponowana procedura rozdzielania frakcji fosforowych może mieć pewne znaczenie dla bliższej charakterystyki rozpuszczalnych związków fosforowych. Tradycyjny sposób ekstrahowania tych substancji kwasem trójchlorooctowym jest zawsze związany z niebezpieczeństwem rozkładu ewentualnie istniejących w badanym materiale połączeń drobnocząsteczkowych związków fosforowych z białkami.

Wydaje się, że ekstrakcja suchej substancji odlipidowanej różnorodnymi rozpuszczalnikami, jak woda, roztwory soli, kwasów, zasad itd., w wielu przypadkach będzie mogła te sprawy wyjaśnić (*W. Niemierko i M. Dydzińska, 1953*).

PIŚMIENICTWO

1) *Bandurski R. S., Axelrod B.*: J. Biol. Chem., 1951, 193, 405. — 2) *Bloor W. R.*: Biochemistry of the fatty acids, New York, 1943. — 3) *Brante G.*: Acta Physiol. Scand., 1949, 18, Suppl. 63. — 4) *Chargaff E.*: Lipoproteins. Adv. in Proteinchem., 1944, 1, 1. — 5) *Davidson J. N.*: The biochemistry of the nucleic acids. London, 1950. — 6) *Deuel H. J.*: The lipids, Vol. 1, New York, 1950. — 7) *Doman N. G., Kagan Z. S.*: Biochimija, 1952, 17, 719. — 8) *Eggleton P., Eggleton G. P.*: Biochem. J. 1927, 21, 190. — 9) *Fiske C. H., Subbarow Y.*: J. Biol. Chem., 1925, 66, 375. — 10) *Fiske C. H., Subbarow Y.*: J. Biol. Chem. 1927, 74, XXII.

11) *Hanes C. S., Isherwood F. A.*: Nature, 1949, 164, 1107. — 12) *Hardy W. B., Gardiner E. S.*: J. of Physiol., 1910, 40, 68. — 13) *Hilditch T. P.*: The chemical constitution of natural fats, 1940. — 14) „Lipo-proteins“. Discussions of the Faraday Society, 1949, nr 6. — 15) *Lohmann*: Biochem. Z., 1928, 194, 306. — 16) *Macheboef M.*: Etats des lipides dans la matière vivante. Paris, 1936. — 17) *Macheboef M., Sandor*: Bull. Soc. Chim. Biol., 1932, 14, 1168. — 18) *Niemierko S.*: Acta Biol. Exper. 1950, 15, 101. — 19) *Niemierko W., Niemierko S., Włodawer P.*: Acta Biol. Exper., 1952, 16, 247. — 20) *Niemierko W., Dydyńska M.*: 1953 (w przygotowaniu).

21) *Niemierko W., Niemierko S., Włodawer P.*: 1953 (w przygotowaniu). — 22) *Ogur M., Rosen G.*: Arch. Biochem., 1950, 25, 262. — 23) *Opieńska J., Madecka-Borkowska J., Borkowski T.*: Acta Physiol. Pol., 1952, 3, 315. — 24) *Przyłęcki S.*: Darstellung und Untersuchung der Mehrstoffe. Die Methoden der Fermentforschung (Bamann u. Myrbäck), 1941, Bd. 1, 432. — 25) *Schmidt G., Thannhauser S. J.*: J. Biol. Chem., 1945, 161, 83. — 26) *Schneider W. C.*: J. Biol. Chem., 1945, 161, 293. — 27) *Schneider W. C.*: J. Biol. Chem., 1946, 164, 743. — 28) *Thierfelder H., Klenk E.*: Die Chemie der Zerebroside und Phosphatide. Berlin, 1930. — 29) *Thudichum J. L. W.*: Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere, Thübingen, 1901. — 30) *Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.*: Manometric Techniques. Minneapolis, 1945.

JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH (LUBLIN)

OSIĄGNIĘCIA METODY CHROMATOGRAFII BIBUŁOWEJ W ANALIZIE ZWIĄZKÓW FOSFOROWYCH

Metoda chromatografii bibułowej znajduje dziś szerokie zastosowanie w każdej dziedzinie badań chemicznych. W szczególności zasługuje na podkreślenie znaczenie tej metody dla rozdzielania mieszanin wieloskładnikowych w małej ilości badanego materiału.

Na ogół metoda powyższa ma znaczenie głównie do celów analizy jakościowej. Ale wciąż narastająca liczba publikacji naukowych, obejmujących ilościowe oznaczenia za pomocą tej metody, rozszerza jej zasięg również do celów analizy ilościowej.

Właściwego początku tej metody należy szukać jeszcze w pracach *Cwieta* (1) i *Tannajewa* (2). Do zapoznania się z teoretycznymi podstawami i szczegółowym opisem tej metody służyć mogą jako prace podstawowe z tej dziedziny: *Williams R. T., Synge R. L. M. „Partition Chromatography“* (3), *Martin, Synge* (4), *Partridge* (5) oraz w polskim piśmiennictwie: *J. Opieńska-Blauth, O. Sakławska-Szymonowa, M. Kański* (6), *J. Opieńska-Blauth, E. Drozdowski, M. Kański* (7), *T. Borkowski* (8). Prostota urządzeń bez konieczności stosowania precyzyjnej aparatury i nieskomplikowana technika przyczyniają się do rozpowszechnienia tej metody. Jedyne może trudności w naszych warunkach doświadczalnych stanowiłyby na razie sprawy zaopatrzenia się w odpowiednią do celów chromatograficznych bibułę i zestaw rozpuszczalników organicznych, z których *n*-butanol odgrywa najważniejszą rolę.

W szczególności do badań biochemicznych i śledzenia procesów przemian metoda chromatografii bibułowej okazała się niezwykle cenna. W zagadnieniach metodycznych przy badaniach pośredniej przemiany rozdzielanie i identyfikacja fosforowych metabolitów budzi nasze szczególne zainteresowanie. Szczegółowa bowiem metoda frakcjonowania związków fosforowych opracowana przez *Le Page i Umbreit* (9) wymaga stosunkowo znacznych ilości materiału wyciśniętego (5–25 mg organicznego P) i jak sami wyżej wymienieni autorzy wskazują, metoda ich, jakkolwiek może być stosowana z powodzeniem do badań nad składem tkanek roślinnych i zwierzęcych, nie nadaje się do badań metabolizmu, a w szczególności przemian u drobnoustrojów.

Do niedawna zastosowanie metod chromatografii bibułowej do wykrywania i rozdzielania związków fosforowych napotykało trudności techniczne, co spowodowało, że liczba prac z tej dziedziny jest stosunkowo niewielka. Wpływało to również z trudności otrzymywania czystych substratów, a w niektórych przypadkach i z nietrwałości tych związków w doświadczalnych warunkach metody chromatograficznej.

Jako pierwszą i podstawową pracę doświadczalną w zakresie chromatografii związków fosforowych wymienić należy publikację *Hanesa i Isherwooda* (10), któ-

rzy opracowali wyczerpujące sposoby chromatograficznego rozdzielania estrów heksozo- i pentozofosforowych za pomocą różnych układów rozpuszczalników. Autorzy wypróbowali około 60 układów rozpuszczalników o charakterze kwaśnym, alkalicznym i obojętnym, mieszających się i niemieszających z wodą. Żaden z wypróbowanych przez nich układów nie nadawał się do rozdzielania wszystkich estrów fosforowych. Najkorzystniejsze warunki rozdzielania dawały następujące układy:

- 1) III-rzędowy butanol, woda, kwas pikrynowy (80 ml + 20 ml + 4 g);
- 2) propanol, woda, amoniak (60 ml + 10 ml + 30 ml stęż. NH_3);
- 3) octan etylowy, woda, pirydyna (100 ml + 100 ml + 45 ml).

Do wywoływania chromatogramów służył im test fosforowo-molibdenowy z siarkowodorem jako czynnikiem redukcyjnym. Test ten był przeprowadzany na bibule przed i po hydrolizie. Do celów hydrolizy autorzy posłużyli się odczynnikami składającym się z 5 ml 60% kwasu nadchlorowego, 10 ml n-kwasu solnego, 25 ml 4% molibdenianu amonowego i wody do 100 ml całkowitej objętości. Po 7-minutowym ogrzewaniu chromatogramów w 85° nawet najtrudniej hydrolizujące estry ulegają hydrolizie.

W drugiej z kolei pracy metodycznej, której celem było chromatograficzne rozdzielanie estrów fosforowych (*Opieńska-Blauth, Madecka-Borkowska, Borkowski* (11)), zastosowano do rozdzielania jeden tylko układ rozpuszczalników — n-butanol, pirydyna, kwas trójchlorooctowy 5% (40, 25, 45). Jako test wywoławczy stosowany był test benzydino-molibdenowy (12). Hydroliza była przeprowadzana według *Hanesa i Isherwooda*.

Weil-Malherbe (13) wykazał, że molibdenian amonowy dodany do odczynnika hydrolizującego jest ściśle swoiście działającym katalizatorem. Dlatego metoda *Hanesa i Isherwooda* oparta na hydrolizie odczynnikiem molibdenowym może budzić słuszne zastrzeżenia. I tak, odnośnie do hydrolizy estru fruktozo-1,6-dwufosforowego *Opieńska-Blauth, Madecka-Borkowska i Borkowski* stwierdzili negatywną katalityczną rolę molibdenianu amonowego, analogicznie do spostrzeżenia *Weil-Malherbe'a* dla fosfoargininy. W celu zidentyfikowania poszczególnych estrów autorzy wprowadzili oprócz testu benzydino-molibdenowego na fosforany jeszcze kilka innych testów barwnych różnicowych dla części węglowodanowej, pozwalających odróżnić ketozy od aldoz, heksozy od pentoz, grupę związków adenylofosforowych od estrów cukrowców.

I tak przystosowano do warunków wywoływania na bibule test anilinowy, rezorcynolowy, orcynolowy, floroglucynolowy (*Bryson, Mitchell* 14). *Novelli* (15) opracował i przystosował do wywoływania na bibule szereg reakcji barwnych dla cukrowców. Najlepsze wyniki otrzymywał przy stosowaniu jako odczynnika wywołującego beta-naftyloaminy (etanol absolutny 50 ml, n-butanol 50 ml, n HCl 3,8 ml, woda 0,4 ml, naftyloamina 0,2% 0,1 ml, siarczan żelazowy 10% 1 kropla). Po rozpyleniu odczynnika wywołującego suszy się chromatogramy 10 minut w $160-170^\circ$. Najwcześniej występuje żółta plama dla fruktozy, szybko brunatniejąca, później dla pentoz zabarwienie czerwonożółte. Aldozy dają żółtobrunatne zabarwienie.

W związku z wątpliwymi wynikami hydrolizy estrów fosforowych odczynnikiem molibdenowym przedsięwzięte zostały przez *Szymonę i Saklowską* (16) próby zastosowania do celów hydrolizy na bibule wyciągu zawierającego fosfatę. Sposób ten pozwolił autorom wykryć i zidentyfikować oprócz substratu glicerofosforany, wszystkie badane uprzednio estry heksozofosforowe, jak również ATP i ADP. Hydroliza enzymatyczna ma tę wyższość nad innymi, że po pierwsze nie niszczy bibuły, a po drugie nie rozkłada komponenty organicznej, która może być zbadana i zidentyfikowana po swojej linii innymi testami różniczkowymi. Ten typ hydrolizy stwarza znacznie szersze możliwości dla identyfikacji badanego związku. Hydroliza enzymatyczna pozwoliła autorom na chromatograficzne opracowanie gli-

cerofosforanów odmian alfa i beta. *Hanes* i *Isherwood* nie uwzględnili tych związków w swoich badaniach. Jak stwierdzili *Opieńska-Blauth* i współpracownicy, zarówno alfa-, jak i beta-glicerofosforan nie ulegają hydrolizie pod wpływem odczynika molibdenowego. Dopiero po zastosowaniu hydrolizy enzymatycznej oznaczono współczynnik R_F dla tych związków. Nie znaleziono różnic między współczynnikami R_F dla glicerofosforanu alfa i beta. Różnice w natężeniu barwy plam alfa i beta-glicerofosforanów stosowanych w tych samych ilościach potwierdzały na drodze chromatograficznej, że beta-glicerofosforan jest właściwym substratem dla fosfatazy.

Jako trzecia chronologicznie praca metodyczna na temat chromatograficznego rozdzielania estrów fosforowych ukazała się w końcu 1952 r. publikacja *Domana* i *Kagana* z Instytutu Biochemicznego *Bacha* w Moskwie (27). Największe trudności, zdaniem autorów, w analizie chromatograficznej stwarza zagadnienie bibuły. Najlepiej nadaje się do tych celów bibuła lniana. Bibuła *Schleichera-Schüllla* zdaniem ich jest nieodpowiednia. Prawdopodobnie bibuła z leningradzkiej wytwórni będzie najlepsza. Autorzy opracowali szereg układów rozpuszczalników, z których najwłaściwszy okazał się układ: metanol, kwas mrówkowy, woda. Do wywoływania chromatogramów służył im również test benzydino-molibdenowy specjalnie uczulony. Przy odpowiedniej technice i dobranym stężeniu benzydiny udało się autorom uczulić ten znany test dwudziestokrotnie. Do hydrolizy estrów fosforowych stosowano hydrolizę enzymatyczną za pomocą fosfatazy preparowanej z jelita. Hydrolizę przeprowadzano na bibule przy pH 8—9 w czasie półtorej godziny. Za pomocą hydrolizy enzymatycznej udało się autorom rozdzielić wszystkie ważniejsze estry heksozofosforowe, a ponadto glicerofosforan i kwas fosfoglicerynowy.

Wade i *Morgan* nie poddawali estrów hydrolizie, lecz oznaczali ich R_F na drodze stabilizacji na bibule pod postacią soli żelazowych. Za pomocą swojej techniki mogli uniknąć błędów metody *Hanesa* i *Isherwooda* wynikających z różnic w hydrolizie. Autorzy stosowali rozpylanie na bibule chlorkiem żelazowym (0,1% w 80% etanolu), a po wysuszeniu w temperaturze pokojowej rozpylanie kwasem sulfosalicylowym (1%). Na słabo zabarwionym tle występowały wyraźnie białe plamy estrów. Autorzy podkreślają znaczenie utrzymania odpowiedniego pH w granicach 1,5—2,5.

Fletcher i *Malpress* (58) ustosunkowali się też krytycznie do metody *Hanesa* i *Isherwooda*. Do swoich badań wprowadzili hydrolizę enzymatyczną alkaliczną monofosfoesterazą przygotowaną metodą *Schmidta* i *Thannhausera* (60). Autorzy oparli się na technice *Bandurskiego* i *Axelroda* (59), którzy stosowali chromatografię dwukierunkową w układach kwaśnym i alkalicznym. Po spływie rozpylali na bibule 5% chlorek wapniowy w etanolu, a po wysuszeniu przeprowadzali hydrolizę enzymatyczną przez 4 godziny w 37°. Plamy ortofosforanów wywoływali w pierwszej fazie molibdenianem amonowym (5%), a po kilku minutach roztworem benzydiny (50 mg chlorowodoru benzydiny w 10 ml kwasu octowego lodowatego po rozcieńczeniu wodą do 100 ml). Za pomocą tej metody udawało się wykrywać jeszcze 0,5 μg P.

Do badań enzymów na bibule opracowana została specjalna technika (według *Reida*, 17) przygotowywania wyciągów enzymatycznych na agarze i powlekania chromatogramów cienką warstwą agaru. W szczególności metoda ta była zastosowana do badań amylazy (*Giri* i *Prasad*, 18).

Coraz częściej spotyka się w piśmiennictwie biochemicznym zastosowanie metody chromatograficznej do wykrywania i rozdzielania związków fosforowych. I tak, *Caldwell* (19) przystosował metodę *Hanesa* i *Isherwooda* do badań porównawczych nad związkami fosforowymi w mięśniach różnych gatunków zwierząt.

Autorowi udało się za pomocą metody chromatografii bibułowej rozdzielić i zidentyfikować obok związków adenozyńofosforowych ATP, ADP, AMP, estry heksozofosforowe i fosfokreatynę.

Rozszerzenie metody chromatograficznej na związki fosforowe ułatwiło badanie metabolizmu u drobnoustrojów. I tak, *Cohen i Scott* (20) zidentyfikowali metodą chromatograficzną na bibule w drożdżowych systemach enzymatycznych ester rybozo-5-fosforowy otrzymany na drodze enzymatycznej z 6-fosfoglikonianu. *Horecker i Smyrniotis* (21) rozdziłili dwa estry rybozofosforowe w enzymatycznych preparatach drożdżowych. *Stadman i Barker* (22) zastosowali chromatografię bibułową do zidentyfikowania acetylofosforanu w preparatach *Clostridium kluveri*. Badania *Bensona* (23), *Arnolffa, Vernona* (24) i innych pozwoliły wykryć metabolity fosforowe w tkankach roślinnych i zwierzęcych metodą chromatograficzną. *Dulberg* i inni (25) zastosowali do badań bakteryjnej fermentacji metodę chromatograficzną po uprzednim oczyszczaniu wyciągów żywicami jonowymiennymi. Do identyfikacji komponenty węglowodanowej stosowali dwa testy: jeden dla aldoz z ftalanem aniliny (26), a drugi z naftorezorcynolem (27) dla ketoz. Zastosowanie jonowymiennych żywic w celu usunięcia nadmiaru kationów i anionów pozwoliło na lepsze rozdzielanie chromatograficzne estrów fosforowych, a w szczególności estru Harden-Younga, estru glikozo-6-fosforowego, fruktozo-6-fosforowego, gl.kozzo-1-fosforowego. Autorzy zalecają dla estrów fruktozowych stosowanie długotrwałej hydrolizy bromowodorem w 37^o w ciągu 3 tygodni. Metoda chromatograficzna, łącznie z oczyszczaniem za pomocą żywic jonowymiennych, znalazła zastosowanie w badaniach glikolizy w preparatach *Brucella suis* i pozwoliła niejednokrotnie stwierdzić, że schemat Embdena-Meyerhofa-Parnasa da się zastosować do badań przemian u bakterii (27). *Szymona i Saktawska* (28) w badaniach na preparatach acetonowych *Mycobacterium phlei* stwierdzili metabolity fosforowe za pomocą chromatografii bibułowej. *Mommaerts i Rupp* (29) badali metodą chromatograficzną defosforylację ATP w skurczu mięśniowym. Dla lokalizacji plam ATP, ADP i AMP służyła im metoda Cartera, polegająca na absorpcji przez adenozyne promieni ultrafioletowych.

Pierwsze chromatograficzne badania adenozyńofosforanów przeprowadzali *Carter* (30), *Snellman i Gelotte* (31) oraz *Cornberg* (32). Do lokalizacji plam służyły fluoresceina i promienie ultrafioletowe. Do spływu były stosowane fosforan dwusodowy i alkohol izoamylowy. Lepsze wyniki otrzymywali *Snellman i Gelotte* przy zastosowaniu 0,5% aminy laurynowej wraz z alkoholem n-amylowym. *Cohn i Carter* (33) rozdziłali adenozyńofosforany za pomocą żywic jonowymiennych, co prowadziło do zwiększenia objętości badanego płynu i było niewygodne do oznaczeń fosforanów i rybozy. *Bock i Alberty* (34) rozdziłali adenozyńofosforany metodą elektroforetyczną, *Caldwell* — chromatografią dwukierunkową. *Eggleton i Hems* (35) w swoich badaniach nad miokinazą rozdziłali ATP, ADP i AMP za pomocą chromatografii jednokierunkowej przy zastosowaniu dwu układów rozpuszczalników kolejno jeden po drugim. Autorzy podkreślają wyższość swojej techniki nad techniką poprzedników, *Cohna, Cartera i Caldwell*.

Wśród prac metodycznych dotyczących rozdzielania związków fosforowych metodą chromatografii bibułowej brak nam systematycznego opracowania rozdzielania fosfotrioz, kwasu fosfopirogronowego, kwasów fosfoglicerynowych.

Uwzględnienie w metodzie chromatograficznej rozdzielania piro-, meta- i ortofosforanów budzi wśród biochemików zrozumiałe zainteresowanie, ponieważ coraz częściej pojawiają się wzmianki w piśmiennictwie o meta- i pirofosforanach, jako ostatecznych metabolitach przemian fosforowych u różnych gatunków świata zwierzęcego. Największe trudności w identyfikowaniu tych związków nastęrcza brak ścisłych definicji chemicznych. Znane są bowiem różne metafosforany o budowie łańcuchowej i cyklicznej, o różnej masie cząsteczkowej. Zrozumiałe jest, że zwią-

ki o tak różnej strukturze będą miały inny współczynnik R_F i będą się różnie zachowywały podczas hydrolizy.

Eastman i *Scott* (36) zaproponowali do rozdzielania orto-, piro- i metafosforanów układ składający się z n-propanolu, wody i amoniaku (0,38) w stosunku 60 : 20 : 20. Systematyczne badania chromatograficzne nad fosforanami mineralnymi: kwasem ortofosforowym, pirofosforowym, trójfosforowym, czterofosforowym, pochodnym z soli Grahama, metafosforowym, trójmetafosforowym, czterometafosforowym, z uwzględnieniem ich wzorów elektronowych, przeprowadził *Ebel* (37).

Do rozdzielania stosowana była chromatografia jednowymiarowa, układy kwaśne i alkaliczne. W układzie zaproponowanym przez *Opieńską-Blauth* i współpracowników (butanol, kwas trójchlorooctowy, pirydyna) rozdzielanie orto-, piro- i metafosforanów nie sprawia trudności. Podkreślić jednak należy, że stosowane były preparaty handlowe bez ścisłego określenia struktury chemicznej pirofosforanu i metafosforanu. Wprawdzie meta- i pirofosforan mają współczynnik R_F bardzo do siebie zbliżone, rozdzielanie ich nie nastęrczało trudności ze względu na różnice w hydrolizie. Pirofosforan w porównaniu do metafosforanu hydrolizuje bardzo słabo. Plama pirofosforanu jest żółta, metafosforanu niebieska.

Wykrywanie i identyfikowanie fosfokreatyny obok kreatyny i kreatyniny może budzić zainteresowanie zarówno ze względu na rolę fosfokreatyny w glikogenolizie, jak i niektóre problemy kliniczne.

Badacze radzieccy, *Einstein* i *Fomina* (38), opracowali sposób rozdzielania i wykrywania obok siebie metodą chromatograficzną fosfokreatyny, kreatyny i kreatyniny. Z wcześniejszych prac należy wymienić publikację *Maw* (39) podającą chromatograficzne rozdzielanie kreatyny i kreatyniny. Wyżej wymienieni autorzy stosowali do rozdzielania tych związków różne układy składające się z butanolu i wody, kolidyny i wody. O ile wpływ i rozdzielanie kreatyny i kreatyniny nie stwarzały żadnych trudności, to fosfokreatyna nie wykazywała w żadnym z tych układów tendencji do spływu i pozostawała zawsze na miejscu wkroplenia. W opracowaniu testów wywoławczych autorzy oparli się na znanym dla kreatyniny teście *Jaffego* z alkalicznym roztworem kwasu pikrynowego. Autorzy stosowali ten sam test dla kreatyny po przeprowadzeniu jej w kreatyninę. Przemiana kreatyny była przeprowadzana wprost na bibule za pomocą 3-godzinne go ogrzewania pasków bibuły w suszarce w 110°. Plamy kreatyny i kreatyniny wywoływano 10% ługiem sodowym i nasyconym roztworem kwasu pikrynowego. Zdaniem autorów test ten nadaje się tylko do celów jakościowych ze względu na odwracalność reakcji kwas pikraminowy \rightleftharpoons kwas pikrynowy. Do celów analizy ilościowej na eluatach z bibuły autorzy opracowali metodę kolorymetryczną z kwasem 2,4-dwunitrobenzoesowym.

Badania *Opieńskiej-Blauth* i *Dominiczaka* (40) dotyczą chromatograficznego rozdzielania kreatyny i kreatyniny. Układ butanol, pirydyna, woda, doskonale nadający się do rozdzielania kreatyny i kreatyniny, nie będzie odpowiedni dla fosfokreatyny, ponieważ w tym układzie związki fosforowe nie wpływają, pozostają w miejscu wkroplenia, tak jak to zresztą stwierdzili badacze radzieccy w innych układach.

Układy kwaśne i alkaliczne nie będą się nadawały również do tych celów ze względu na nietrwałość fosfokreatyny i hydrolizę w tych warunkach.

Przy opracowywaniu testów wywoławczych dla fosfokreatyny, kreatyny i kreatyniny zainteresowanie może budzić test jodowy (*Brante*, 41), zastosowany do badań chromatograficznych większości zasad organicznych. Chromatogramy zanurza się w 0,5% alkoholowym roztworze jodu, suszy w strumieniu gorącego powietrza. Na chromatogramach występują w miejscu zatrzymania związków żółte plamy, które należy ze względu na ich nietrwałość zaraz zaznaczyć ołówkiem. Test jodowy ma wyższość nad innymi, ponieważ te same chromatogramy mogą być zastoso-

wane i do innych celów po usunięciu jodu z bibuły, co nie daje większych trudności.

Piśmiennictwo dotyczące chromatografii kwasów nukleinowych jest stosunkowo bogate. Wymienić tu należy prace *Edstroma* (42), *Buchanana* (43) i serię prac *Markhama* i *Smitha* (44—51). Wszyscy wyżej wymienieni autorzy stosowali do celów badań chromatograficznych hydrolizaty kwasów nukleinowych, przygotowywanych przez godzinne ogrzewanie substratów w 100° w n HCl. Dla chromatograficznego rozdzielania nukleotydów stosowano głównie układ składający się z n-butanolu (77%), wody (13%) i kwasu mrówkowego (10%).

Chromatogramy wywoływano za pomocą lampy analitycznej kwarcowej metodą *Markhama* i *Smitha*. Dla zidentyfikowania rybozy bądź dezoksyrybozy stosowano na bibule odczyny histochemiczne według *Feulgena* albo *Dishego*.

Badania *Markhama* i *Smitha* nad strukturą kwasów rybonukleinowych przeprowadzane były metodą chromatograficzną na alkalicznych hydrolizatach nukleoproteidów. *Levene-Harris* (52), *Carter*, *Cohn*, *Loring*, *Luthy* (53) badali metodą chromatograficzną 4 izomery rybonukleotydowe. Badania *Markhama* i *Smitha* na hydrolizatach otrzymanych za pomocą rybonukleazy wykazały cykliczny charakter nukleotydów pochodzących z kwasów rybonukleinowych. Poszczególne nukleotydy były izolowane metodą chromatografii i elektroforezy bibulowej.

Do badań chromatograficznych stosowano różne układy rozpuszczalników: 1) izopropanol-amoniak, 2) nasycony siarczan amonowy, izopropanol, octan sodowy, 3) n-butanol, kwas mrówkowy. Obiema tymi metodami udało się autorom zbadać po trawieniu rybonukleazą niektóre polinukleotydy, cykliczne formy dwunukleotydów, trójnukleotydy.

Badania *Markhama* i *Smitha* przeprowadzone metodą chromatograficzną i elektroforezy na hydrolizatach kwasów nukleinowych dały podstawę do szeregu wniosków związanych z poznaniem struktury kwasów nukleinowych. *Davidson* i *Smellie* (54, 55) opracowali systematycznie metodę analizy hydrolizatów kwasów rybonukleinowych, drożdżowych i wątrobowych metodą jonoforezy. Zastosowanie do badań radioaktywnego fosforu (P^{32}) pozwoliło wykryć oprócz czterech rybonukleotydów jeszcze sześć innych fosforowych nienukleotydowych związków.

Fosfatydy stanowią tę grupę związków fosforowych, których chromatografia jest bardzo słabo opracowana. Na uwagę zasługuje praca *Levina* i *Chargaffa* (56). Autorzy ci interesowali się przede wszystkim wykrywaniem choliny, którą po hydrolizie fosfatydu przekształcali w ester fosforowy i określali R_F za pomocą testu fosforanowego. W badaniach swoich autorzy stosowali wyłącznie tylko hydrolizaty fosfatydów.

Przegląd badań nad rozdzielaniem związków fosforowych metodą chromatograficzną wykazuje jeszcze duże braki, szczególnie gdy zestawimy ją z osiągnięciami w dziedzinie aminokwasów i cukrowców. Udoskonalenie metod chromatograficznych i rozszerzenie ich na związki fosforowe jest szczególnie wskazane, gdyż przede wszystkim w badaniach przemiany pośredniej zaznacza się brak dobrych metod analitycznych do rozdzielania i oznaczania metabolitów fosforowych. Największe trudności w osiągnięciu dobrych wyników polegają na braku dobrych układów rozpuszczalników. Na ogół za pomocą jednego układu nie udaje się rozdzielić nawet kilku najważniejszych metabolitów estrów fosforowych. Test wywoławczy opiera się na reakcji barwnej dla jonu fosforowego, co jest związane ze swoistymi dla poszczególnych związków warunkami hydrolizy. Odczynnik molibdenowy *Hanesa* i *Isherwooda* działa ściśle swoiście na substraty fosforowe, podobnie i hydroliza enzymatyczna za pomocą fosfatazy nastęrcza te same trudności.

Dla niektórych ważnych związków fosforowych (acetylofosforan, fosfokreatyna) nie opracowano jeszcze optymalnych warunków spływu i odpowiednich układów rozpuszczalników. Niemniej nawet i przy tych niedociągnięciach zasadniczej me-

tody zaczęto wprowadzać próby chromatograficznego rozdzielania związków fosforowych do badań metabolizmu i uzyskano poważne sukcesy. Badania nad mechanizmem skurczu mięśniowego uzyskały za pomocą tej metody nowe możliwości. Największe sukcesy osiągnięto w badaniach nad strukturą kwasów nukleinowych. Wprowadzenie, obok metody chromatografii bibułowej, drugiej niezmiernie cennej metody elektroforezy bibułowej rozszerzyło znacznie zakres badań analitycznych wielkocząsteczkowców i dynamicznego śledzenia procesów biologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- 1) *Cwiet M. S.*: Trudy Warszawskiego Obszczestwa jestestwispytotelnej otdeleni biologii. 1901. — 2) *Tannajew A. A.*: Kapielny metod, Swierdłowski-Moskwa, Gonti, 1939. — 3) *Williams R. T., Syng R. L. M.*: „Partition Chromatography“. — 4) *Martin R. T., Syng R. L. M.*: *Biochem. J.*, 1941, 25, 1358. — 5) *Partridge M.*: *Biochem. J.*, 1948, 42, 238. — 6) *Opieńska-Blauth J., Sakławska-Szymonowa O., Kański M.*: *Annal. UMCS S. D.* 5/9, 1950. — 7) *Opieńska-Blauth J., Drozdowski E., Kański M.*: *Annal. UMCS S. D.* 6/2, 1951. — 8) *Borkowski T.*: *Annal. UMCS S. D.* 6/2, 1951. — 9) *Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.*: *Manometric Techn. and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, Burges Publishing CO, Minneapolis, 1948. — 10) *Hanes C. S., Isherwood F. A.*: *Nature*, 1949, 164, 1107.
- 11) *Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I., Borkowski T.*: *Acta Physiol. Polonica*, 1952, III/3. — 12) *Welcher J.*: *Organic Anal. Reagents*, 1948, 2, 292. — 13) *Weil-Malherbe H., Green R. H.*: *Bioch. J.*, 1951, 49, 286. — 14) *Bryson J. I., Mitchell J. T.*: *Nature*, 1951, 167, 864. — 15) *Novelli*: *Nature*, 1950, 166, 745. — 16) *Szymona M., Sakławska-Szymonowa O.*: *Acta Physiologica Polonica*, 1952, III/3. — 17) *Reid W. W.*: *Nature*, 1951, 168, 739. — 18) *Giri K. W., Prasad A. I. V.*: *Nature*, 1951, 167, 839. — 19) *Caldwell P. C.*: *Biochem. J.* 1952, 50, XXXV. — 20) *Cohen S. S., Scott D. D. M.*: *Science*, 1950, 111, 543.
- 21) *Horecker B. I., Smyrniotis P. Z.*: *Arch. Biochem.* 1950, 29, 232. — 22) *Stadman E. R., Barker H. A.*: *J. Biol. Chem.*, 1950, 184, 769. — 23) *Benson A. A., Barsham J. A., Calvin M., Goodale T. C., Haas V. A., Steph W.*: *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1710. — 24) *Arnoff S., Vernon L.*: *Archiv. Biochem.* 1950, 28, 424. — 25) *Dulberg J., Roessler W. G., Trog H., Sanders C. R., Brever C. R.*: *J. Biol. Chem.* 1952, 194, 199. — 26) *Bagly R. J., Bourne E. J., Stacey*: *Nature*, 1951, 168, 511. — 27) *Doman N. G., Kagan Z. S.*: *Biochimija*, 1952, 17, 719. — 28) *Szymona M., Sakławska-Szymonowa O.* (w druku). — 29) *Mommaerts W. F. H., Rupp J. C.*: *Nature*, 1951, 168, 957. — 30) *Carter*: *J. Am. Chem. Soc.* 1950, 72, 1466.
- 31) *Snellman O., Gelotte B.*: *Nature*, 1951, 168, 461. — 32) *Cornberg A., Tracer W. E.*: *J. Biol. Chem.*, 1950, 186, 577. — 33) *Cohn W. E.*: *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2811. — 34) *Bock R. M., Alberty R. A.*: *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 435. — 35) *Eggleton L. V., Hems R.*: *Biochem. J.*, 1952, 52, 156. — 36) *Eastman W., Scott A. E.*: *Nature*, 1951, 168, 740. — 37) *Ebel J. P.*: *Bull. de la Societé de Chimie Biologiques*, 1952, XXXIV, 321 oraz 1952, XXXIV, 330. — 38) *Einstein J. A., Fomina M. P.*: *Biochimija*, 1950, 15, 4, 321. — 39) *Maw*: *Biochem. Z.*, 1948, 43, 139. — 40) *Opieńska-Blauth J., Dominiczak K.*: 1950 (nie opublikowana).
- 41) *Brante G.*: *Nature*, 1949, 163, 651. — 42) *Edstrom J. E.*: *Nature*, 1951, 168, 876. — 43) *Buchanan J. G.*: *Nature*, 1951, 168, 109. — 44) *Markham R., Smith J. D.*: *Biochem. J.* 1949, 45, 294. — 45) *Markham R., Smith J. D.*: *Biochem. J.*, 1950, 46, 513. — 46) *Markham R., Smith J. D.*: *Biochem. J.*, 1951, 49, 401. — 47) *Markham R., Smith J. D.*: *Research*, 1951, 4, 344. — 48) *Markham R. i Smith J. D.*: *Nature*, 1951, 168, 406. — 49) *Markham R., Smith J. D.*: *Biochem. J.*, 1952, 52, 552. — 50) *Markham R., Smith J. D.*: *Biochem. J.*, 1952, 52, 558.
- 51) *Markham R., Smith J. D.*: *Biochem. J.*, 1952, 52, 568. — 52) *Levene P. A., Harris S. A.*: *J. Biol. Chem.* 1952, 98, 9. — 53) *Loring H. S., Luthy N. S.*: *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, 43, 4215. — 54) *Davidson J. N., Smellie R. M. S.*: *Biochem. J.*, 1952, 52, 594. — 55) *Davidson J. N., Smellie R. M. S.*: *Biochem. J.*, 1952, 52, 599. — 56) *Levine C., Chargaff E.*: *J. Biol. Chem.*, 1951, 192. — 57) *Wade H. E., Morgan D. M.*: *Nature*, 1953, 171, 529. — 58) *Fletcher E., Malpress F. H.*: *Nature* 1953, 171, 838. — 59) *Bandurski R. S., Axelrod B.*: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 405. — 60) *Schmidt G., Thannhauser S. J.*: *J. Biol. Chem.*, 1943, 149, 369.

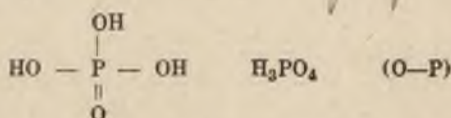
STELLA NIEMIERKO (ŁÓDŹ)

O META- I POLIFOSFORANACH W ORGANIZMACH ŻYWYCH

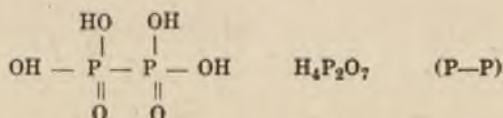
Rola, jaką pełnią związki fosforowe w całokształcie procesów biochemicznych, zwróciła uwagę badaczy nie tylko na organiczne, lecz i na nieorganiczne połączenia fosforu.

Jak wiadomo, nieorganiczne kwasy fosforowe różnią się pomiędzy sobą stopniem uwodnienia i wielkością cząsteczki. Można je sklasyfikować w następujący sposób:

1) Kwas ortofosforowy:



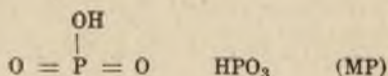
2) Kwasy wielofosforowe, powstające z kondensacji dwóch, trzech i więcej cząsteczek kwasu ortofosforowego i tworzące połączenia łańcuchowe. Najprostszym kwasem wielofosforowym jest kwas pirofosforowy, pochodzący z kondensacji dwóch cząsteczek kwasu ortofosforowego z uwolnieniem jednej cząsteczki wody:



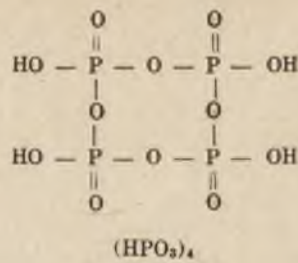
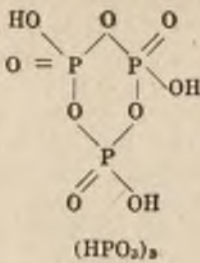
Wielocząsteczkowe połączenia łańcuchowe fosforanów noszą nazwę polifosforanów. Ich wzór ogólny jest:



3) Kwas metafosforowy powstaje przez odłączenie cząsteczki wody z kwasu ortofosforowego:



Metafosforany o powyższym wzorze, powstające z jednej cząsteczki ortofosforanu (kwas jednometafosforowy) nie istnieją. Stwierdzono natomiast występowanie i udowodniono budowę cykliczną dla trój- i czterometafosforanów o następujących wzorach:



Niektórzy badacze opisują ponadto dwumetafosforany oraz ośmiometafosforany (Topley, 1949), inni natomiast zaprzeczają istnieniu tego rodzaju związków (Ebel, 1952). Istnieje również dotychczas kontrowersja co do występowania heksametafosforanu w postaci cyklicznej. Bardzo długo przyjmowano sól Grahama za heksametafosforan pierścieniowy. Według nowszych prac jednak (van Wazer, 1950)* jest to mieszanina polifosforanów o dużym ciężarze cząsteczkowym.

Obecnie przyjęta jest dla wielofosforanowych połączeń cyklicznych nazwa — metafosforany, dla łańcuchowych zaś — polifosforany (Lohmann i inni). Przy bardzo dużej ilości cząsteczek (n) wzór sumaryczny polifosforanów, praktycznie biorąc, nie różni się od wzoru metafosforanów i w obu przypadkach jest (H_nPO₃)_n. Należy jednak zaznaczyć, że nomenklatura wielofosforanowych związków nieorganicznych nie jest ujednostajniona jeszcze i bardzo często polifosforany nazywane są metafosforanami lub polimetafosforanami.

Zidentyfikowanie poli- i metafosforanów napotyka dość duże trudności. Związane jest to z różnorodną polimerią tych związków, labilnością ich, tj. przechodzeniem w ortofosforany, i trudnościami związanymi z oznaczaniem jednych w obecności drugich. Metoda oddzielania orto-, meta- i polifosforanów polega na strącaniu solami Mn i Ba przy ściśle określonym pH (Jones, 1942). W najnowszych czasach zastosowano chromatografię bibulową celem wykrywania omawianych związków (Ebel, 1952; Opińska, 1952).

Występowanie metafosforanów w świecie żywym po raz pierwszy zostało stwierdzone jeszcze w końcu ubiegłego stulecia przez Liebermana i nieco później przez Ascoli. Wykryli oni obecność tego związku w drożdżach. W tym samym mniej więcej czasie zaobserwowano istnienie meta- i pirofosforanu w nasionach bawełny. Przez długi okres czasu nie kontynuowano badań nad znaczeniem tych związków w procesach biochemicznych, dopiero około 1930 r. MacFarlane podjął je na nowo i od tego mniej więcej czasu daje się zauważyć wzrost zainteresowania rolą meta- i pirofosforanów w świecie żywym.

Metafosforany poza drożdżami (Umschweif i Gibayło, 1937; Schmidt i współpr., 1946; Wiame, 1947; Ebel, 1952 i inni) występują także w niektórych pleśniach, jak *Aspergillus oryzae* (Kitasato, 1928)**, *Aspergillus niger* (Mann, 1944; Malngren i Ingelman, 1947—1950), *Neurospora* (Houlahan i Mitchell, 1948) oraz u bakterii: *Corynebacterium diphtheriae* (Ebel, 1952) i *Cyanophyceae* (Ebel, 1952).

U zwierząt Heller i współpracownicy (1950) stwierdzili występowanie pirofosforanu i ślady metafosforanu u samców *Deilephila euphorbiae*, głównie w *ductus ejaculatorius simplex*. Również u owadów, w wydalinach *Galleria mellonella* S. Niemierko i W. Niemierko (1950) wykryli duże ilości metafosforanu, najprawdopodobniej zaś i pirofosforanu (*S. Niemierko* i *A. Wójtczak*, 1952). W tkankach zwierząt wyższych nie stwierdzono dotychczas obecności ani piro-, ani metafosforanów. Fakt wykrycia bowiem pirofosforanów w mięśniach w r. 1928 przez Lohmanna został w późniejszych pracach tego autora i Parnasa obalony.

* Cyt. wg Ebela.

** Cyt. wg Neuberga et al.

Najwięcej badań nad występowaniem i rolą piro- i metafosforanów tyczy się *Aspergillus niger* i drożdży. Mann (1944) wykazał, że z ortofosforanu zawartego w pożywce *Aspergillus* jest zdolny wytworzyć meta- i pirofosforan, przy czym wyraził pogląd, że możliwe się wydaje, iż pirofosforan jest jedynie artefaktem powstającym z metafosforanu w trakcie analiz chemicznych. Mannowi udało się również wykazać, że *Aspergillus* zawiera enzym, który odszczepia grupę ortofosforanową od szeregu związków fosforowych, jak pirofosforan, metafosforan, heksametafosforan, alfa-fosfoglicerol, ester Cori'ch i inne. Mann nie określił wielkości cząsteczki wyosobnionego przez siebie metafosforanu, przypuszczał, że może to być heksametafosforan (o wzorze cyklicznym).

Badania Manna kontynuowali Ingelman i Malmgren (1947—1950). Prace ich poszły w kilku kierunkach. Jednym z głównych zadań, które sobie postawili, było zbadanie, czy metafosfatata występująca w *Aspergillus* rozkłada polifosforany o bardzo dużej cząsteczce i jaki jest ewentualny mechanizm tej reakcji. W tym celu wyżej wymienieni badacze sporządzili syntetyczne polifosforany o długich łańcuchach. Stosując szereg pomiarów fizyko-chemicznych, jak badanie lepkości, oznaczanie współczynnika sedymentacji za pomocą ultrawirowania, określili właściwości otrzymanych produktów, których roztwory wodne okazały się koloidami. Ciężar cząsteczkowy tych związków dochodził do 2 000 000, liczba zaś cząsteczek w łańcuchu wynosiła 15 000—20 000.

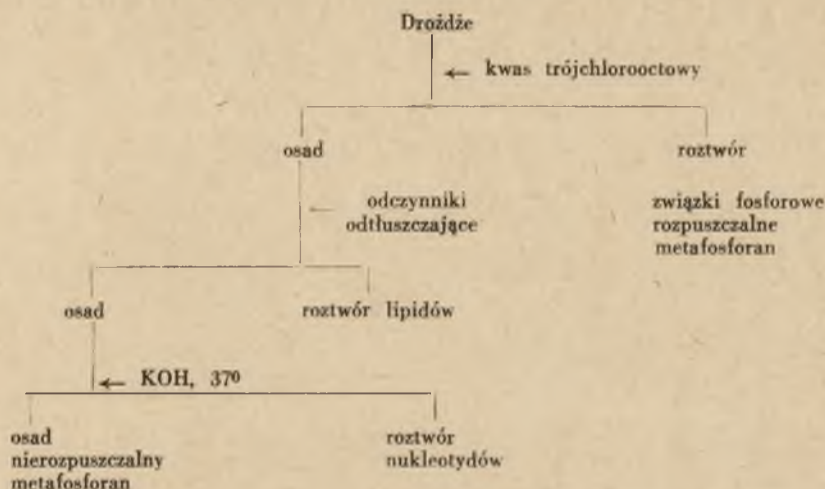
Taki wielkocząsteczkowy polifosforan służył za substrat dla enzymu wyodrębnionego z *Aspergillus* lub *Proteus vulgaris*. Wykazano, że rozpad polifosforanów zachodzi na drodze hydrolitycznego rozszczepienia połączenia —P—O—P— w łańcuchu. Początkowo powstają duże fragmenty, które podlegają stopniowej degradacji. Hydroliza nie zachodzi zatem przez odłączenie grupy fosforanowej z końców łańcucha, jak to ma miejsce przy rozkładzie pirofosforanu. W początkowych etapach enzymatycznej hydrolizy wielkocząsteczkowego polifosforanu nie tworzy się zatem ortofosforan.

Wynik przytoczonych badań nasunął Malmgrenowi i Ingelmanowi myśl o możliwości występowania u pleśni wielkocząsteczkowych polifosforanów. Wyizolowanie takiego związku w postaci niezmienionej nasuwa już *a priori* poważne trudności, wynikające z labilności tego związku z jednej strony, z drugiej zaś z obecności w *Aspergillus* enzymu rozkładającego bardzo szybko polifosforany. Należało więc opracować taką metodę, która pozwoliłaby na usunięcie enzymu i innych substancji organicznych, a nie wywoływałaby rozpadu badanego związku. Zastosowano ekstrakcję przy wysokim pH, przy którym rozpad polifosforanów jest bardzo wolny. Wyciąg sączono przez węgiel aktywny dla zaabsorbowania enzymu i substancji organicznych. Roztwór poddano następnie dializie, odparowano w próżni w niskiej temperaturze i otrzymano substancję rozpuszczalną w wodzie o ciężarze cząsteczkowym 6000—7000. Badanie widma absorpcyjnego wyizolowanego związku fosforowego nie wykazało obecności kwasów nukleinowych. Autorzy wyrażają pogląd, że substancja rodzima występująca w *Aspergillus niger* może mieć jeszcze większy ciężar cząsteczkowy, w czasie bowiem przeprowadzania analiz polifosforan mógł ulec częściowej degradacji.

Badania nad metafosforanami występującymi w drożdżach poszły w nieco innym kierunku niż badania związane z pleśniami. Wielu autorów wykazało zarówno metodami chemicznymi, jak i histochemicznymi, że metafosforan (MP) jest normalnym składnikiem komórki drożdży. Synteza metafosforanu wymaga obecności ortofosforanu w pożywce, jonów potasu oraz glikozy lub innego substratu. Synteza metafosforanu może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych (Wiame, 1947; Schmidt, Hecht, Thannhauser, 1946). Juni, Kamen, Spiegelman, (1948), jak również i inni autorzy zajęli się nie tylko zidentyfikowaniem tego związku za pomocą szeregu reakcji jakościowych, lecz także udało im się wyodrębnić

dwie frakcje metafosforanu o odmiennych właściwościach fizjologicznych. Jedna z nich jest rozpuszczalna w kwasach i przechodzi do roztworu w czasie odbiałczania drożdży kwasem trójchlorooctowym. Drugą znaleziono w frakcji związków fosforowych nierozpuszczalnych w kwasie.

Poniższy schemat ilustruje sposób postępowania *Juni, Kamena* i współpracowników, za pomocą którego wykryli oni obecność dwóch frakcji metafosforanu, dającego charakterystyczne reakcje jakościowe:



Metafosforan z frakcji nierozpuszczalnej w kwasach okazał się związkiem biochemicznie bardziej czynnym niż metafosforan z frakcji rozpuszczalnej w kwasie.

Po dodaniu fosforu radioaktywnego do pożywki już w krótkim czasie można go było wykryć w frakcji metafosforanu nierozpuszczalnego. Gromadzenie się P promieniotwórczego w tej frakcji było kilkakrotnie bardziej intensywne niż we frakcji metafosforanu rozpuszczalnego. Przy braku fosforu w pożywce zawartość metafosforanu rozpuszczalnego ulega małym zmianom, natomiast ilość metafosforanu nierozpuszczalnego wyraźnie spada. W komórce drożdży metafosforan nierozpuszczalny może przekształcać się w ortofosforan. Reakcja ta jest odwracalna i kierunek jej jest zależny od natężenia przemiany w komórce. W obecności glikozy $OP \rightarrow MP$. Przy niskiej temperaturze, gdy natężenie metabolizmu spada, zachodzi reakcja odwrotna, $MP \rightarrow OP$. Jeżeli drożdże, które uprzednio nagromadziły metafosforan, hodować w pożywce bezfosforanowej, to synteza kwasów nukleinowych zachodzi przede wszystkim kosztem frakcji metafosforanu nierozpuszczalnego, a dopiero po wyczerpaniu się jego zmniejsza się ilość metafosforanu rozpuszczalnego.

Pomimo że, jak omówiono wyżej, z drożdży zostały wyodrębnione dwie frakcje metafosforanów, różniące się swą aktywnością fizjologiczną, to jednak budowa metafosforanu z drożdży jest mniej dokładnie poznana niż polifosforanu z pleśni. Według badań *Voigta*, a zwłaszcza *Ebela*, metafosforan drożdży jest polifosforanem wielkocząsteczkowym. *Ebel* opracował specjalną metodykę do wyizolowania tego związku. Polega ona na zastawieniu wymienniczą jonów (*Amberlite IR-100H*), który pozwala na przeprowadzenie nierozpuszczalnych soli barowych polifosforanów w odpowiednie kwasy rozpuszczalne, bez spowodowania znaczniejszej depolimeryzacji. *Ebel* wyraża pogląd, że jego sposobem wyizolowane polifosforany są mało zmienione i bardzo zbliżone do rodzimych. Na podstawie analiz chromatograficznych i oznaczeń potencjometrycznych *Ebel* dochodzi do wniosku, że w drożdżach występuje wiele polifosforanów od trójfosforanu aż do homologu o ciężarze

cząsteczkowym około 1300. Obecności pirofosforanu nie stwierdził. Polifosforany drożdży miałyby więc łańcuchy krótsze niż polifosforany z *Aspergillus*, wyosobnione przez *Ingelmana* i *Malmgrena*. Niemniej *Ebel* przypuszcza, że polifosforany występujące w *Aspergillus* mogą znajdować się również w drożdżach. Ponadto podkreśla on, że w metodzie *Malmgrena* i *Ingelmana*, którzy stosowali dializę, polifosforany o mniejszej cząsteczce dyfundowały przez błonę i w ogóle nie mogły być oznaczone. Nasuwa się w związku z tym pytanie, czy rzeczywiście w komórkach czy to drożdży, czy pleśni znajduje się wiele polifosforanów o różnej wielkości cząsteczki, czy też wskutek techniki przeprowadzania analiz następuje stopniowa degradacja, która doprowadza do powstawania mniejszych fragmentów.

Zasadniczym zagadnieniem związanym z występowaniem polifosforanów w świecie żywym jest wyjaśnienie roli ich w procesach biochemicznych. Jednakże jest to zadanie niezmiernie trudne, wymagające dalszych badań w tym kierunku.

Polifosforany, nazywane często wskutek nieujednostajnionego słownictwa metafosforanami lub polimetafosforanami, są związkami makroergicznymi, zawierającymi wiązania bogate w energię. Z tego więc względu wielu badaczy sądzi, że polifosforany są dostarczycielami energii przy procesach związanych z syntezą nukleoproteidów. Przykładem tej roli polifosforanów mogą służyć przytoczone wyżej doświadczenia *Wiame'a*, w których przy braku ortofosforanu w pożywce kwasy nukleinowe tworzą się kosztem metafosforanów z frakcji nierozpuszczalnej. Na poparcie tej hipotezy można przytoczyć również badania *Lindgrena* (1947) na drożdżach. Stwierdził on, że zawartość w chromozomach wolutyny (która jest według niego identyczna z metafosforanem) zmniejsza się po podziale komórki. *Lindgren* przypuszcza, że jedynie chromozomy pokryte wolutyną są zdolne do podziału.

Według *Perlmana* i *Hermann*a (1938) znane są kompleksowe połączenia kwasu metafosforowego z białkiem, ściślej z dodatnio naładowanymi grupami aminokwasów. Tworzą się kryształki białek z metafosforanem. Powstawanie takich kompleksów *in vitro* (dokonywane na białku jaja kurzego) mogłoby wskazywać, że i w organizmie mogłyby istnieć takie połączenia, które jednak w czasie przeprowadzania analiz wskutek zbyt drastycznych metod analitycznych ulegają rozbięciu. Dowodem popierającym takie przypuszczenie byłoby wykrycie metafosforanu w frakcji związków fosforowych nierozpuszczalnych. *MacFarlane*, *Wiame* wysuwają hipotezę istnienia kompleksów kwasów nukleinowych z polifosforanami. Ostatnio *Ebel* (1952) przytacza dane histochemiczne, według których ziarnistości metachromatyczne występujące w drożdżach znikają nie tylko pod wpływem działania gorącej wody, kwasów, ługu, co byłoby zrozumiałe ze względu na rozpad polifosforanów pod wpływem wymienionych czynników i przechodzenie ich w ortofosforany, lecz również pod wpływem działania rybonukleazy. Zjawisko to *Ebel* stara się wytłumaczyć zakładając, że komórkowe ziarnistości metachromatyczne zawierają polifosforany w połączeniu z kwasem rybonukleinowym. Usunięcie kwasu RN pod wpływem enzymu spowodowałoby rozpad substratu ziarnistości metachromatycznych, a przez to i polifosforanów.

Należy w tym miejscu przytoczyć ostatnie prace *Dalcqa* i *Vakaerta* (1952), według których powstawanie *in vivo* barwy fiołkowej wskutek barwienia błękitem toluidyny (reakcja metachromatyczna) nie jest testem specyficznym dla metafosforanów i dla połączeń sulfonowych, jak to podaje *Wiame* i inni autorzy. Reakcja metachromatyczna według *Dalcqa* i *Vakaerta* wskazywałaby na obecność pewnych składników, które należałoby identyfikować za pomocą jeszcze innych reakcji charakterystycznych.

Na ewentualną rolę meta- i polifosforanów nie tylko u mikroorganizmów, lecz także i u zwierząt mogłaby może wskazywać obecność meta- i polifosfatów u tych ostatnich. Zostały one wykryte nie tylko u szeregu pleśni, drożdży, bakterii, o czym

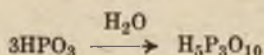
już podano wyżej, lecz ponadto czynność tych enzymów została stwierdzona w narządach zwierząt wyższych, u których ani meta-, ani polifosforanów nie udało się wykryć. *Mattenheimer* (1951) badał działanie wyciągów z wątroby, mięśni, nerek człowieka, szczura, żaby zarówno na określone pod względem chemicznym substraty, jak i na polifosforany wyekstrahowane z drożdży. Ponieważ stwierdził on, że różne polifosforany są w różny sposób rozszczepiane pod wpływem badanych wyciągów, więc stąd wyprowadza wniosek, że nie istnieje jakaś jedna „uniwersalna“ polifosfataza działająca na te skomplikowane związki, jakimi są polifosforany.

Ingelman wykazał, że badane przez niego wyciągi z narządów zwierzęcych nie rozkładają polimetfosforanu wielkocząsteczkowego wyizolowanego z *Aspergillus*. Wydaje się nam, że przyczyną tego jest to, że do rozpadu takiego polifosforanu są niezbędne co najmniej dwa enzymy: jeden powodujący stopniową degradację i drugi doprowadzający rozpad mniejszych fragmentów aż do ortofosforanu. Wskazywałyby na to ostatnio ogłoszone badania *Krishnana* (1952) nad *Penicillium chrysogenum*. Wykazał on, że „metafosfataza depolimeryzująca“ różni się od „metafosfatazy“ odszczepiającej grupę ortofosforanową odmiennym *optimum* pH i różnym wpływem ionów Mg. Natomiast autor ten sądzi, że enzymy tej pleśni odszczepiające OP od ATP, pirofosforanów i metafosforanów są najprawdopodobniej identyczne. Obecność pirofosfatazy również u zwierząt wyższych wykazana została już dawno w wielu narządach, jak mięśnie, śluzówka przewodu pokarmowego, białe ciała krwi i inne (*Roche*, 1950).

Badania *S. Niemierko* i *W. Niemierko* wykazały obecność w ciele gąsienic mola woskowego enzymu lub układu enzymów rozkładających polifosforany z wydaliny tego owada. Z dalszych badań nad tym samym owadem wynika (*S. Niemierko* i *A. Wojtczak*), że w ciele gąsienic *Galleria mellonella* występuje również i pirofosfataza. Próby mające na celu lokalizację tych enzymów w narządach gąsienic wykazały, że wstępują one głównie w przewodzie pokarmowym i cewkach Malpighiego. Na polifosfatazy występujące u mola woskowego wybitnie aktywujący wpływ wywierają jony Mg i Co, w mniejszym stopniu jony Mn; Hg i Ag działają hamująco (dalsze badania w toku).

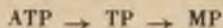
Z wyników badań *Malmgrena* należy sądzić, że polifosfatazy drożdży i pleśni są różnymi enzymami. Fluorek i cyjanek sodu hamują działanie enzymu z pleśni, natomiast cyjanek nie wpływa na czynność enzymu z drożdży, ponadto inne jest *optimum* pH dla działania obu enzymów. Kwas jodooctowy, będący inhibitorem dla bardzo wielu reakcji enzymatycznych, nie wpływa wg *Malmgrena* na czynność polifosfataz zarówno z pleśni, jak i drożdży. Należy natomiast podkreślić, że kwas jodooctowy, podobnie jak NaF i azydek sodu, działa hamująco na syntezę metafosforanu w drożdżach (*Wiame*). Z porównania więc danych *Malmgrena* i *Wiame'a* należałoby sądzić, że procesy syntezy i rozpadu metafosforanu lub ściślej polifosforanu z drożdży są związane prawdopodobnie z udziałem różnych układów enzymatycznych.

Wieloletnie prace *Neuberga* (1950) nad trójfosforanem nieorganicznym TP ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$) nie wykrytym w organizmach żywych wskazują, że enzym z *Aspergillus oryzae* może rozkładać trójfosforan na P—P i O—P. *Neuberg* wyraził pogląd, że w komórkach, w których znajduje się MP, może potencjalnie występować TP. Dotychczas jednak (poza ostatnimi danymi *Ebela*) TP nie stwierdzono. Możliwa jest natomiast synteza *in vitro* TP z MP w środowisku alkalicznym (*Michelson* i *Todd*, 1949)*:

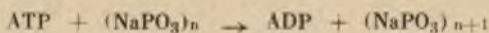


* Cyt. wg *Neuberga et al.*

Na razie nie jest sprawdzona hipoteza *Neuberga*, według której MP powstawałby z ATP poprzez kwas trójfosforowy:

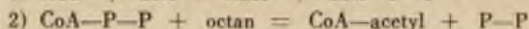
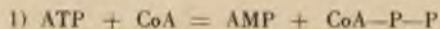


Polifosforany, jako związki makroergiczne, odgrywają najprawdopodobniej rolę akumulatorów energii i grup fosforanowych wykorzystywanych przy tworzeniu się nukleoproteidów. Wskazują na to badania *Lindegrna* i *Wiame'a*, o których była mowa wyżej. *Hofmann-Ostenhof* i *Weigert* (1952) wyrażają pogląd, że rola „metafosforanów polimerycznych“ w drożdżach jest podobna do roli kwasu kreatynofosforowego lub argininofosforowego. Metafosforan polimeryczny tworzyłby się przez przeniesienie grupy fosforanowej z cząsteczki donatora zawierającego wiązanie makroergiczne na cząsteczkę akceptora, którym by był istniejący już metafosforan. Byłoby to nakładanie się monomeru na istniejący już polimer. Donatorem mógłby być ATP. Reakcja zachodziłaby według wyżej wymienionych autorów w sposób następujący:

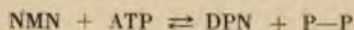


Poglądy te są raczej natury spekulatywnej i nie są poparte wynikami doświadczeń. Na bardziej ogólne znaczenie metafosforanów w reakcjach biochemicznych wskazuje *Heyman* i *Rosenberg* (1950). Wysuwają oni hipotezę, że podczas reakcji enzymatycznej pomiędzy octanem a ATP tworzącą się substancją, działającą silnie acetylująco, jest acetylometafosforan. Byłby to pierwszy produkt pośredniczący przy reakcji pomiędzy ATP i octanem przy przenoszeniu grupy fosforanowej. Początkowo zachodziłaby acetylacja za pomocą metafosforanu, następnie zaś pirofosforanu.

Badania *Lipmanna* i współpracowników (1952) pozwoliły na częściowe wyjaśnienie mechanizmu reakcji pomiędzy ATP i koenzymem A (CoA) i wykazanie tworzenia się pirofosforanu. Na zasadzie wyników doświadczalnych podają oni następujące reakcje:



Na znaczenie pirofosforanów w procesach biochemicznych rzucają pewne światło prace *Cornberga* (1948, 1950). Według prac tego autora enzym wyizolowany i oczyszczony z drożdży katalizuje następującą reakcję zachodzącą w dwóch kierunkach:



gdzie NMN — mononukleotyd nikotynowy (nukleotyd pirydynowy), DPN — nukleotyd dwufosfopirydynowy, tj. koenzym I.

Poniższa tabela ilustruje niektóre wyniki pracy *Cornberga*, wskazujące na powstawanie P—P przy syntezie DPN i znikanie P—P przy powstawaniu ATP.

T a b e l a

Substancja oznaczana	Synteza DPN mikromole/ml			Synteza ATP mikromole/ml		
	0'	60'	Δ	0'	60'	Δ
	NMN	2,50			0,0	
ATP	2,20	1,36	-0,84	0,0	1,02	+1,02
DPN	0,0	0,74	+0,74	1,50	0,61	-0,89
P—P	0,0	0,83	+0,83	1,80	0,79	-1,01
PO ₄ '''	0,11	0,13				

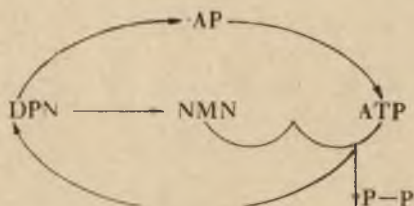
Otrzymane dane wskazywałyby na mechanizm syntezy koenzymu I oraz na pochodzenie i rolę pirofosforanów. Według *Cornberga* gromadzenie się pirofosforanów w niektórych organizmach (drożdże, pleśnie) można byłoby wytłumaczyć przez następujące reakcje zachodzące po sobie:

1) nieodwracalna hydroliza koenzymu I, zachodząca pod wpływem działania pirofosfatazy nukleotydowej: tworzy się mononukleotyd (NMN) i kwas adenilowy (AP);

2) fosforylacja AP do ATP, zachodząca w czasie procesów oddechowych lub w czasie fermentacji;

3) i wreszcie $NMN + ATP \rightarrow P-P + DPN$

Całość tych reakcji przedstawia *Cornberg* jako następujący cykl:



Zupełnie podobny cykl podaje *Cornberg* dla powstawania nukleotydu flawino-adenilowego z mononukleotydu ryboflawinowego.

Z pracami *Cornberga* łączą się hipotezy *Nickersona* i *Mullina* (1948) o mechanizmie przechodzenia fosforanów przez błony komórkowe drożdży dzięki tworzeniu się kompleksowego połączenia (ewentualnie z koenzymem I) na powierzchni komórki z następującą dysocjacją i przechodzeniem fosforanu do wnętrza komórki.

Oprócz prac *Cornberga* na rolę pirofosforanów wskazują także badania *Greena* i współpracowników. Pirofosforan powstawałby jako produkt oksydacyjnej fosforylacji przy utlenianiu kwasów bursztynowego, jabłkowego, α -glutaminowego i innych w układzie cykloforaz przy jednoczesnym znikaniu ortofosforanów.

Dalsze badania powinny wyjaśnić, czy rola polifosforanów ma bardziej ogólne znaczenie dla procesów biochemicznych. Wydaje się, że wykrycie ich u owadów (*Heller, S. Niemierko i W. Niemierko*) może wskazywać na ich znaczenie nie tylko w świecie mikroorganizmów, lecz i w organizmach zwierzęcych.

PIŚMIENNICTWO

- 1) *Ascoli*, cyt. wg *Neuberga*. — 2) *Gross R. J., Taggart J. V., Covo G., Green D. E.*: Studies on the cyclophorase system, VI. The coupling of oxidation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1949, 177, 655. — 3) *Dalcq A.*: La coloration vitale au bleu de toluidine et sa manifestation métachromatique. *CRSB. CXVI.* 1952, 1408. — 4) *Dalcq A., Massart L.*: Aspects physicochimiques de la métachromasie in vivo au bleu de toluidine. *CRSB. CXVI.* 1952, 1436. — 5) *Ebel J. P.*: Recherches sur les polyphosphates contenus dans divers cellules vivantes. I, II, III, IV. *Bull. Soc. Chim. Biol.* XXXIV. 1952, 321, 330, 491, 498. — 6) *Heller J., Karpik St., Zubikowa I.*: Inorganic pyrophosphate in insect tissue. *Nature*, 1950, 166, 187. — 7) *Heyman H. E., Rosenberg T.*: Acetylation of sulphanilamide by acetylmetaphosphate. *Nature*, 1950, 165, 317. — 8) *Hofmann-Ostenhof O., Weigert*: Über die mögliche Funktion des polymerem Metaphosphates als Speicher energiereichen Phosphates in der Hefe. *Naturwissenschaften*, 1952, 39, 303. — 9) *Houlahan M. B., Mitchell H. K.*: The accumulation of acid-labile inorganic phosphate by mutants of *Neurospora*. *Arch. Bioch.*, 1948, 19, 257. — 10) *Ingelman B.*: Isolation of a phosphorus rich substance of high molecular weight from *Aspergillus niger*. *Acta Chem. Scand.*, 1947, 1, 776. — 11) *Ingelman B., Malmgren H.*: Enzymatic breakdown of polymetaphosphate. *Acta Chem. Scand.*, 1947, 1, 422. — 12) *Ingelman B., Malmgren H.*: Investigations of high molecular weight

metaphosphate isolated from *Aspergillus niger*. *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 399. — 13) *Ingelman B.*: Metaphosphate and its enzymatic breakdown, w „the Enzymes“ Sumner and Myrback, 1950. — 14) *Jones L. T.*: Estimation of orto-, piro-, meta- and polyphosphates in presence of one another. *Ind. Eng. Chem.*, 1942, 14, 536. — 15) *Juni E., Kamen M. D., Spiegelman S., Wiame J. M.*: Physiological heterogeneity of metaphosphate in yeast. *Nature*, 1947, 160, 717. — 16) *Juni E., Kamen M. D., Reiner J. M., Spiegelman S.*: Turnover and distribution of phosphate compounds in yeast metabolism. *Arch. Bioch.*, 1948, 18, 387. — 17) *Cornberg A.*: The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 1948, 176, 1476. — 18) *Cornberg A.*: *J. Biol. Chem.* 1950, 182, 779, 795. — 19) *Krishnan P. S.*: Apyrase, pyrophosphatase and metaphosphatase of *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Bioch. and Biophys.*, 1952, 37, 224. — 20) *Lindegren C.*: Function of Volutin (Metaphosphate) in Mitosis. *Nature*, 1947, 159, 63.

21) *Lipmann F., Jones M. E., Black S.*: Studies on the mechanism of the ATP-CoA-acetate reaction including a survey of function of CoA. II-e Congrès Intern. de Biochimie. Symposium sur le cycle tricarboxylique, 1952. — 22) *Malmgren H.*: A contribution to the physical Chemistry of colloid of Metaphosphates. *Acta Chem. Scand.* 2, 147. — 23) *Malmgren H.*: Enzymatic breakdown of polymetaphosphate. IV The activation and the inhibition of the enzyme. *Acta Chem. Scand.*, 1949, 3, 1331. — 24) *Mann T.*: Studies on the metabolism of mould fungi. *Bioch. J.*, 1944, 38, 345. — 25) *Mattenheimer H.*: Die enzymatische Aufspaltung anorganischen Poly- und Metaphosphate durch Organextrakte und Trockenhefe. *Bioch. Z.*, 1951, 322. — 26) *MacFarlane*: *Bioch. J.*, 1930. — 27) *Neuberg C., Grauer A., Mandl I.*: The formation of pyrophosphate by enzymatic breakdown of inorganic triphosphate. *Enzymol.*, 1950, 14, 157. — 28) *Nickerson and Mullin*: Riboflavin enhancement of radioactive phosphate. *Nature*, 1948, 161, 939. — 29) *Niemierko S., Niemierko W.*: Metaphosphate in the excreta of *Galleria mellonella*. *Acta Biol. Exper.*, 1950, 15, 111. — 30) *Niemierko S., Wołczak A.*: Badania nad meta- i pyrofosforatą u *Galleria mellonella*. *Acta Physiol. Pol. Prace II Zjazdu P. T. F.*, 1952.

31) *Opieńska-Blauth J., Madecka-Borkowska I., Borkowski T.*: *Acta Physiol. Polon.* 1952, III, 315. — 32) *Perlman G.*: On the precipitation of crystallized egg albumin metaphosphate. *Bioch. J.*, 1933, 32, 931. — 33) *Perlman G., Herman H.*: On the reaction between metaphosphoric acid and egg albumin. *Bioch. J.*, 1933, 32, 6926. — 34) *Roche J.*: Phosphatases. *The Enzymes*. Sumner and Myrback, 1950. — 35) *Schmidt G., Hecht L., Thannhauser*: The enzymatic formation and the accumulation of large amounts of a metaphosphate in baker's yeast under certain conditions. *J. Biol. Chem.*, 1946, 166, 775. — 36) *Topley*: The condensed phosphates. *Quart. Rev.*, 1949, nr 4. — 37) *Umschweif B., Gibaylo K.*: Zagadnienie występowania pirofosforanu w tkankach zwierzęcych. *Acta Biol. Exper.* XI., 1937, 6. — 38) *Vakaert L.*: Influence de la concentration et du pH sur la métachromasie in vivo au bleu de toluidine des oocytes de *Lebistes reticulatus*, CRSB., CXLVI, 1952, 1643. — 39) *Voigt E. L.*: Über die Darstellung des Hefenphosphates, cyt. wg Mattenheimer. — 40) *Wiame J. M.*: Etude d'une substance polyphosphorée, basophile et métachromatique chez les levures. *Bioch. Biophys. Acta*, 1947, 1, 234.

41) *Wiame J. M.*: The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. *J. Biol. Chem.* 1949, 178, 919. — 42) *Wiame J. M.*: The metachromatic reaction of hexametaphosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, 69, 3146.

STANISŁAW E. KARPIAK (WROCŁAW)

1. O PIROFOSFORANACH U *CELERIO EUPHORBIAE*

Z dotychczasowych badań nad występowaniem nieorganicznego pirofosforanu w organizmach zwierzęcych wynika, że ilość jego w stosunku do całkowitego fosforu jest niewielka. Duże nagromadzenie się nieorganicznego pirofosforanu w tkankach zwierzęcych stwierdzili J. Heller i współpracownicy (1950) (1). Motyle — samce *Celerio euphorbiae*, zawierają fosfor nieorganicznego pirofosforanu w ilości około 1 mg P, co wyraża się stężeniem około 100 mg%. Frakcja zaś fosforu nieorganicznego pirofosforanu stanowi przeciętnie około 30% ogólnej ilości fosforu w ciele motyla.

Stwierdziłem, że w narządach płciowych samca motyla 82% całkowitego fosforu przypada na fosfor hydrolizujący w ciągu 7 minut w 1 n HCl w temp. 100°, a odpowiadający fosforowi nieorganicznego pirofosforanu. Ilość fosforu tej frakcji przeliczona na ciężar narządów płciowych dała wynik 1190,0 mg%, co odpowiada 3250,0 mg% anionu pirofosforanowego.

Cała niemal frakcja pirofosforanowa zawarta jest w *ductus ejaculatorius simplex*, gdyż ilość fosforu 7-minutowej frakcji przedstawiała się następująco: jądro — 2,4 mg%, gruczoły dodatkowe i *ductus ejaculatorius duplex* — 7,8 mg%, zaś *ductus ejaculatorius simplex* — 2044,0 mg%, czyli anionu pirofosforanowego — 5742,0 mg%.

Ductus ejaculatorius simplex daje się podzielić na dwa odcinki, oddzielone przeżęciem. Pierwszy odcinek jest bezbarwny i przejrzysty, drugi zaś, nieco grubszy i znacznie dłuższy (około $\frac{3}{4}$ całej długości przewodu), jest wypełniony białą ziarnistą treścią i waży około 30 mg. Po przeanalizowaniu obu wspomnianych odcinków okazało się, że pirofosforan mieści się w drugim odcinku. Po przeliczeniu na jego ciężar zawartość fosforu 7-minutowej frakcji wnosi 2340,0 mg%, zaś anionu pirofosforanowego — 6573,0 mg%, czyli około 6,6%.

Tego rodzaju stężenie nieorganicznego pirofosforanu należy niewątpliwie do rekordowych w świecie zwierzęcym. Niestety, nie udało się zbadać jeszcze ani pochodzenia tego pirofosforanu, ani też jego funkcji.

2. O WPLYWIE KRZEMU NA OZNACZANIE FOSFORU

Większość metod kolorymetrycznego oznaczania fosforu jest oparta na redukcji kwasu fosforowo-molibdenowego z wytworzeniem błękitu molibdenowego. Błękit ten powstaje jednak również i przy redukcji innych połączeń kwasu molibdenowego, w szczególności kwasu krzemowo- i arsenowo-molibdenowego. Wobec tego jest rzeczą zrozumiałą, że w oznaczaniu fosforu przeszkadza obecność krzemu lub arsenu. Pragnę zatrzymać się nieco nad zagadnieniem wpływu zawartości krzemu na oznaczenie fosforu.

Zważywszy, że kwas krzemowo-molibdenowy daje w warunkach metody Fiske-Subbarowa słabe zabarwienie, zwykle nie bierze go się pod uwagę, zapominając jednak, że czasem ilość jego w materiale biologicznym może być dość duża; w związku z tym błąd oznaczenia fosforu może być znaczny.

Krzem jest pierwiastkiem występującym w całym świecie, zarówno roślinnym jak i zwierzęcym. Według *Wiernadskiego* (1933) Si należy razem z P, K i S do trzeciej dekady pierwiastków, tzn. do grupy pierwiastków, których ilość w materiale biologicznym osiąga od 0,1 do 1%. *Winogradow* (1938) podaje, że zawartość Si w organizmach lądowych przeciętnie wynosi $1,5 \times 10^{-3}\%$, czyli że krzem jest siódmym pierwiastkiem po O, C, H, Ca, N i K. Rośliny mają na ogół krzemu znacznie więcej niż zwierzęta, niemniej jednak, jak stwierdzają *K. King* i *Bett* (1938) (2), krzem występuje we wszystkich narządach i płynach ustrojowych zwierząt. U zwierząt bezkręgowych ilość krzemu jest większa niż u kręgowców. Na przykład *Uvarow* (1948) (3) podaje, że w popiele *Schistocerca gregaria* jest 11,9% SiO₂. Własne wstępne oznaczenia krzemu w poczwarcie motyla wilczomlecza, rozpuszczalnego w kwasach wykazały, że ilość jego wynosi 104 mg%, w poszczególnych zaś częściach ciała zawartość krzemu jest następująca: jelito 242 mg% Si, mięśnie 122 mg%, ciało tłuszczowe 178 mg% oraz hemolimfa 26 mg%.

Bardzo poważnym źródłem krzemianów jest szkło laboratoryjne, szczególnie kiedy pracuje się w środowisku zasadowym, np. hydroliza zasadowa.

Intensywność barwy błękitu molibdenowego, powstającego przez redukcję kwasu krzemowo-molibdenowego, zależy w dużej mierze od jakości używanego czynnika redukującego. Powodem tego jest fakt, że krzem reaguje z kwasem molibdenowym znacznie wolniej niż fosfor, a powstały kwas krzemowo-molibdenowy ulega trudniej redukcji niż kwas fosforowo-molibdenowy. Dlatego też im bardziej czuły jest środek redukujący, tym większy jest błąd oznaczenia fosforu. Przykładem niech służy podana niżej tabela, w której zestawiono wyniki oznaczenia krzemu metodą Fiske-Subbarowa z zastosowaniem amidolu i eikonogenu.

Eikonogen				Amidol			
0,1 mg Si	odpowiada	0,0050 mg P	0,1 mg Si	odpowiada	0,0025 mg P		
0,2 "	"	0,0075 "	0,2 "	"	0,0035 "		
0,3 "	"	0,0100 "	0,3 "	"	0,0050 "		

Ponieważ redukcja kwasu krzemowo-molibdenowego bardzo silnie jest uzależniona od pH środowiska w chwili oznaczania, należy się liczyć z poważnym błędem przy stosowaniu metod oznaczania fosforu, w których środowisko jest mniej kwaśne niż w metodzie Fiske-Subbarowa. Przykładem niech będzie oznaczenie krzemu przy pH = 4,1 metodą Lowry i Lopez (1946). W warunkach tej metody 0,1 mg Si przy użyciu amidolu odpowiada 0,025 mg P, zaś przy użyciu kwasu askorbinoowego — 0,010 mg P. Na tym przykładzie widać, że przesunięcie pH do 4,1 powoduje dziesięciokrotny wzrost intensywności reakcji krzemowej w obecności amidolu.

W poszukiwaniu substancji redukującej, która by w warunkach metody Fiske-Subbarowa nie redukowała kwasu krzemowo-molibdenowego, a jedynie kwas fosforowo-molibdenowy, przeprowadziłem pomyślne próby z metolem. Jeszcze w r. 1935 został on zaproponowany przez *Muellera* (4), jako ewentualny środek redukujący obok amidolu. Okazało się, że metol nie redukuje wcale kwasu krzemowo-molibdenowego w warunkach metody Fiske-Subbarowa i nadaje się do oznaczania fosforu w obecności krzemianów.

Dla przykładu, jak różne mogą być wyniki oznaczania fosforu metodą Fiske-Subbarowa w obecności krzemianów i w zależności od używanego środka reduku-

jącego, podaje wyniki oznaczania fosforu w wyciągu trójchlorooctowym zimującej poczwarki motyla wilczomlecza przy użyciu metolu, amidolu i eikonogenu.

Z przedstawionej tabeli wynika, że największe różnice występują w wartościach nieorganicznego ortofosforanu, przy czym w tym przypadku amidol i eikonogen dały jednakowy wynik dla tej frakcji. Dziwne się wydaje, że przy użyciu metolu frakcje 2-minutowe i 7-minutowe są znacznie większe niż przy zastosowaniu amidolu lub eikonogenu. Pozornie byłoby to sprzeczne z dotychczasowymi stwierdzeniami. Otóż tłumaczyć to można sobie w ten sposób, że podczas hydrolizy zmniejsz-

T a b e l a

	Metol	Amidol	Eikonogen
Ortofosforan nieorg.	38,4 mg ⁰ / ₀ P	66,9 mg ⁰ / ₀ P	66,9 mg ⁰ / ₀ P
P 2-min. hydrol.	10,5 "	5,0 "	5,8 "
P 7-min. hydrol.	16,3 "	2,5 "	3,3 "
P estrowy	33,4 "	24,2 "	41,1 "
P całkowity	98,6 mg ⁰ / ₀ P	98,6 mg ⁰ / ₀ P	117,1 mg ⁰ / ₀ P

sza się ilość krzemianów wskutek ich wypadania, co powoduje zmniejszanie się przyrostu zabarwienia. Potwierdzają to doświadczenia nad zachowaniem się w tych warunkach krzemianów.

Błąd w oznaczaniu fosforu w obecności krzemianów zależy również od czasu odczytywania prób, gdyż kwas krzemowo-molibdenowy ulega redukcji znacznie wolniej niż kwas fosforowo-molibdenowy. I tak np. już po jednej godzinie przyrost intensywności barwy próby może dojść do 30%.

Omawiając zagadnienie wpływu krzemianów na oznaczanie fosforu pragnę zwrócić również uwagę na zagadnienie ich wpływu w zależności od ich jakości. W dotychczasowych badaniach, odnoszących się do zagadnienia występowania związków krzemowych w organizmach, brak danych dotyczących rodzaju spotykanych krzemianów. Dla pełnego opracowania zagadnienia wpływu krzemianów na wyniki fosforowe należałoby więc zbadać różne związki krzemowe, nie tylko najbardziej pospolite w laboratoriach, jak np. szkło wodne lub fluorokrzemian sodu.

Reasumując można stwierdzić, że przy oznaczaniu fosforu należy brać pod uwagę następujące momenty: 1) możliwość występowania krzemianów, 2) ich ilość i jakość, 3) oddziaływanie środowiska w momencie oznaczania fosforu, 4) rodzaj używanej substancji redukującej, 5) czas odczytywania. Przy oznaczaniu fosforu powinno się: 1) pracować w jak najbardziej kwaśnym środowisku, 2) stosować słabe środki redukujące, np. metol, oraz 3) jak najszybciej odczytywać.

PIŚMIENICTWO

- 1) Heller J., Karpiak St., Zubikowa I.: Nature, 1950, 166, 187. — 2) King E., Bett H.: Physiol. Rev., 1938, 18, 329. — 3) Uvarow B. P.: Trans. Roy. Entomol. Soc., London, 1948, 99,1. — 4) Mueller F.: Z. f. physiol. Chem., 1935, 237, 35.

KONIEC SYMPOZJUM PIERWSZEGO

BOLESŁAW SKARŻYŃSKI (KRAKÓW)

STRUKTURA CHEMICZNA TKANEK NOWOTWOROWYCH

Morfologiczne podejście do problemu nowotworów, które panowało wyłącznie w drugiej połowie ubiegłego stulecia, zawiodło pokładane nadzieje. Metody anatomii patologicznej i klasycznej histopatologii doprowadziły do nagromadzenia nadzwyczaj bogatego materiału faktycznego, nie zbliżając jednak nauki do wyjaśnienia istoty nowotworów. Opiszano setki najróżnorodniejszych zmian zachodzących w obrębie komórek nowotworowych, nie znajdując właściwie ani jednej zmiany, która by była ściśle swoista dla nowotworów, a której nigdy nie spotykano by w tkance prawidłowej lub też chorobowo zmienionej, lecz nie cechującej się nowotworowym wzrostem. Równocześnie rozwój biochemii, a szczególnie jej metod analitycznych, otwierał coraz to dalej sięgające możliwości. Dla każdego patologa stawało się jasne, że istoty zmian leżących u podstaw przejścia komórki prawidłowej w nowotworową szukać należy w chemizmie komórki. Przypuszczano, że wykazanie różnic w składzie chemicznym i w mechanizmie procesów chemicznych rozgrywających się w komórce, cechujących komórki nowotworowe, wytłumaczy, na czym polega istota powstawania nowotworów.

Mniej więcej od lat 50 rozpoczynają się systematyczne, coraz liczniejsze badania, mające na celu uchwycenie tych różnic. Dziś piśmiennictwo z tego zakresu jest już bardzo obfite. Poddano gruntownej analizie chemicznej skład tkanki nowotworowej setek różnych guzów ludzkich i zwierzęcych, występujących samorzutnie i wywołanych doświadczalnie. Porównywano wielokrotnie owe dane analityczne, zaczerpnięte z materiału nowotworowego, z wartościami uzyskiwanymi przy analizie tkanki prawidłowej, a mimo to do dziś olbrzymi wkład pracy w tym zakresie nie przyniósł spodziewanych wyników.

Nie ulega wątpliwości, że wiele składników strukturalnych oraz biokatalizatorów występuje w nowotworach w innej proporcji niż w macierzystej tkance prawidłowej. Co więcej, dadzą się nawet wyróżnić pewne prawidłowości, według których przebiegają zmiany struktury chemicznej w toku nowotworowego przekształcania tkanki prawidłowej. Ale do dziś nie udało się z całą pewnością stwierdzić w komórkach nowotworowych obecności jakichś składników chemicznych obcych tkance prawidłowej, podobnie jak ani jeden ze szczegółów struktury chemicznej spotykanej w tkance prawidłowej nie jest obcy w pewnych przypadkach w tkance nowotworowej.

Przyczyną tych dotychczasowych niepowodzeń jest nie tylko niedoskonałość naszych metod analitycznych, np. niemożliwość uchwycenia subtelnych różnic struktury chemicznej między dwoma bardzo zbliżonymi do siebie białkami. Niewątpliwie granice metodyki biochemicznej odgrywają poważną rolę w dotychczasowych znikomych osiągnięciach w zakresie analizy chemicznej nowotworów. Najważniejszą przyczyną są jednak swoiste trudności techniczne związane z badaniem tkanek tego typu.

Prawidłowe tkanki, nawet zbliżone genetycznie i strukturalnie do siebie, mogą już wykazywać znaczne różnice składu chemicznego. Różnice będą większe, jeżeli mamy do czynienia z tkankami o odmiennej budowie i cechującymi się odmiennymi funkcjami fizjologicznymi. Chcąc więc uchwycić różnice struktury chemicznej między tkanką prawidłową a nowotworową trzeba porównywać ze sobą tkanki homologiczne, trzeba równocześnie przeprowadzić analizę tkanki macierzystej i nowotworu, który z tej tkanki powstał. Niestety, pokaźna ilość prac dawniejszych nie spełnia tego zasadniczego warunku. Dlatego dziś te badania mają właściwie tylko znaczenie historyczne.

Ale nawet wówczas, gdy zrozumiano konieczność porównywania ze sobą wyników uzyskiwanych na podstawie rozbioru tkanki macierzystej i powstającego na jej podłożu nowotworu, przeprowadzenie porównania obarczone jest z reguły poważnymi źródłami błędów. Przecież każdy nowotwór poddawany rozbiorowi chemicznemu nie jest pod względem morfologicznym jednolitym tworem. Bardzo często ugrupowania komórek nowotworowych zmieszane są z utkaniem prawidłowym i w dwóch pozornie identycznych guzach stosunek komponenty nowotworowej do tkanki prawidłowej może wykazywać wybitne różnice. Bardzo często próbki tkanki nowotworowej poddawane badaniu zawierają większy lub mniejszy odsetek ognisk martwiczych. Wreszcie w każdym obiekcie badanym, reprezentującym czyste utkanie nowotworowe, stosunek procentowy komórek do zrębu międzykomórkowego może znacznie różnić się procentowo.

Czyż można więc dziwić się, że wyniki oznaczenia jednego i tego samego składnika w takim samym nowotworze, przeprowadzone z jak największą sumiennością w dwóch różnych pracowniach, mogą różnić się znacznie ze sobą? Nawet przy zachowaniu jak najdalej posuniętego krytycyzmu i dokładności w doborze badanego materiału otrzymywać musimy bardzo znaczny rozrzut wyników i dopiero krytyczna ocena bardzo bogatego materiału zebranego w wielu pracowniach może doprowadzić z czasem do ustalenia pewnych średnich wartości, które by wyrażały różnice struktury chemicznej pewnego typu nowotworów i struktury chemicznej homologicznej tkanki prawidłowej.

Na jedno wreszcie trzeba zwrócić szczególną uwagę. Tkanka nowotworowa jest tkanką rosnącą, a tkanki prawidłowe, z którymi najczęściej porównuje się w toku badań chemicznych nowotwory, są tkankami, w których brak wzrostu albo też wzrost jest bardzo ograniczony. Uwzględniając tę okoliczność należałoby właściwie strukturę chemiczną nowotworu porównywać ze strukturą chemiczną jakiejś tkanki szybko rosnącej, np. tkanki regenerującej lub tkanki embrionalnej. Jednak w takich porównaniach, które zresztą niejednokrotnie były podejmowane, napotykałyśmy znowu na inne trudności nie nadające się do omawiania na tym miejscu.

Zatrzymałem się dłużej przy tych wstępnych rozważaniach dlatego, że świadomość rozmaitych trudności, na jakie napotyka chemiczna analiza nowotworów, wyjaśni nam pewien niepokojący fakt. Jak już wspomniałem, chemizm nowotworów jest problemem, któremu poświęcono wiele najlepszych wysiłków i piśmiennictwo dotyczące tego problemu dziś daje się z trudem opanować przez jednego człowieka. Drobną ilustracją tempa, w jakim wzrasta zainteresowanie chemiczną stroną nowotworów, mogą być cyfry podające przeciętną roczną ilość publikacji, dotyczących tylko białek nowotworowych, w kolejno następujących po sobie dziesięcioleciach (1).

1885—95	1896—05	1906—15	1916—25	1926—35	1936—45
0,1	0,2	0,6	1,5	4,3	14,4

Niewątpliwie pokaźna cyfra publikacji z dziedziny chemii nowotworów jest bezwartościowa. Dotyczy to szczególnie prac wykonywanych bezkrytycznie w laboratoriach klinicznych. Ale nawet te badania, prowadzone z odpowiednim kry-

tycызmем, oparte na nienagannej metodyce, doprowadzają przeważnie do sprzecznych wyników. Niewiele znamy faktów z zakresu chemizmu nowotworów, o których moglibyśmy twierdzić, że są ponad wszelką wątpliwość ustalone. Ustalenie tych faktów jest zazwyczaj wynikiem wielu pojedynczych badań, dokonywanych w różnych pracowniach, na różnym materiale, z różnymi wynikami, ale w rezultacie dających wypadkową, która wytrzymuje krytykę i stanowi skromny postęp w naszej dziedzinie wiedzy.

Dlatego z góry muszę zaznaczyć, że obraz, który pragnę przedstawić, rozczaruje wielu zainteresowanych. Wydaje mi się, że przyjdzie mi częściej mówić o problemach niż o faktach (2).

Sprzeczności spotykamy od razu w zakresie danych dotyczących mineralnych składników tkanki nowotworowej. Wszyscy są zgodni co do tego, że nowotwory zawierają więcej wody niż prawidłowa homologiczna tkanka. Ten wzrost zawartości wody wynosi przeciętnie 5—12%. Przyczyną owej hydratacji jest wykazana przez większość badaczy mineralizacja tkanki nowotworowej, przyrost składników mineralnych. Na przykład zawartość popiołu w doświadczalnie wywołanych wątrobiakach szczura jest około 40% wyższa niż w zdrowej macierzystej tkance wątrobowej (3). Natomiast niezupełnie wyjaśnione jest, jakie składniki mineralne biorą udział w tym przyroście popiołu. Znaczna część badaczy zajmujących się tym problemem mówi o pokąźnym wzroście zawartości potasu, a wybitnym spadku zawartości wapnia. Co się tyczy wapnia, to zdaje się nie ulegać wątpliwości, że kation ten znika niemal z tkanki nowotworowej, natomiast sprawa potasu wciąż jeszcze jest otwarta.

Dla przykładu podam tutaj wyniki systematycznych badań prowadzonych przez *Carruthersa* i współpracowników w St. Louis, którzy co kilka dni poddawali analizie naskórek myszy pędzlowany substancjami rakotwórczymi, od chwili rozpoczęcia doświadczenia do chwili powstania nowotworu skóry. Nie zauważyli oni w toku doświadczenia żadnych większych zmian zawartości Na, K i Mg, natomiast szybki i stały spadek Ca, Zn i Fe (4). Doświadczenia te były oparte na nienagannej metodyce, opracowane statystycznie i obejmujące cały okres przemian naskórka prawidłowego poprzez stadium hiperplazji aż do stadium nowotworu. Ale analogiczne doświadczenia, przeprowadzane nad rozwojem eksperymentalnie wywołanego wątrobiaka u szczurów, wykazują odmienny charakter przesunięcia składu mineralnego tkanki w toku kancerogenezy. Widzimy więc, jak trudno uogólniać wnioski, oparte nawet na najsumienniejszych doświadczeniach. A w danym wypadku należy pamiętać o tym, że zmiany w składzie mineralnym tkanki mogą wybitnie wpływać na właściwości fizyczne komórek, na stan białka, na aktywność enzymów. Gdybyśmy dysponowali bardziej jednolitym materiałem doświadczalnym z zakresu składu mineralnego nowotworów, może niejedno zagadnienie stanęłoby przed nami w innym świetle.

W podobne rozbieżności obfituje analiza zawartości glikogenu, tego głównego materiału pędnego komórki. Na ogół panuje przekonanie, że istnieje pewna współzależność między zawartością glikogenu w tkance nowotworowej i szybkością jej wzrostu, wyrażająca się szczególnie dużą zawartością tego wielocukrowca w szybko rosnących partiach guza. Ale skądinąd nawet względnie mało złośliwe nowotwory, rozwijające się z tkanki macierzystej, która pierwotnie zawierała glikogen, cechują się pokąźną zawartością tej substancji i na odwrót (5).

Poważne sprzeczności spotykamy również w bogactwie analitycznych wyników dotyczących zawartości tłuszczowców w guzach. Jedni badacze twierdzą, że zawartość fosforo-tłuszczowców wzrasta w guzach złośliwych proporcjonalnie do wielkości ich wzrostu, inni tej zależności nie widzą, a nawet dopatrują się w guzach zmniejszonej zawartości fosforo-tłuszczowców w porównaniu z tkanką prawidłową. W każdym razie fosforo-tłuszczowce pozostają w jakiejś łączności ze wzrostem nowotwo-

rów, gdyż szybkość rozpadu i resyntezy fosforo-tłuszczowców w guzach doświadczalnych jest znacznie większa niż w tkankach prawidłowych.

Niewątpliwym jest wzrost zawartości cholesterolu w nowotworach. W tym zakresie wszystkie wyniki bardzo licznych doświadczeń są zgodne. Dla przykładu podam kilka cyfr: zawartość cholesterolu w mięśniach macicy (przeliczona na suchą wagę) — 0,78%; w mięśniaku macicy — 0,75%; w mięsaku macicy — 1,66% (*Jowett*) (6). Zdrowa wątroba szczura — 0,93%; hepatom szczura — 1,97% (*Kishi, Fujiwara i Nakahara*) (3). Ale od razu nasuwa się w związku z tymi badaniami jedno zastrzeżenie — martwicze części mięsaka szczura zawierają dwukrotnie więcej cholesterolu niż części żywotne i rosnące. Fakt ten nie jest niespodzianką, gdyż powszechnie wiadomo, że cholesterol osadza się szczególnie łatwo w tkankach mało żywotnych. Ale jeżeli weźmiemy pod uwagę tę okoliczność, że wiele badanych guzów jest usianych drobnymi, trudno dostrzegalnymi ogniskami martwiczymi, łatwo można sobie wyobrazić, do jak błędnych wyników mogą doprowadzać bezkrytyczne analizy.

Zrozumiałe jest, że podstawowa rola białek w kształtowaniu wszystkich zjawisk życiowych musiała skupić na tym typie związków chemicznych uwagę biochemików zajmujących się problemem raka. Porównania zawartości białka w tkance nowotworowej i w homologicznej tkance prawidłowej nie doprowadziły do wykazania znaczących różnic. Ogólna zawartość azotu w wysuszonej tkance wątrobiaków jest tylko nieznacznie wyższa w porównaniu z prawidłową tkanką wątroby szczura (3). Ale wyniki te nie świadczą jeszcze o niczym, gdyż w nowotworach należy się spodziewać nie zmian ilościowych, ale przede wszystkim zmian jakościowych białka. Wielu badaczy zajmujących się kancerologią doświadczalną wypowiada pogląd, że istotą zmian chemicznych właściwych komórce nowotworowej jest zmiana jakości zawartych w niej białek (7).

Analiza wzajemnego stosunku poszczególnych frakcji białkowych w nowotworach była przeprowadzana kilkakrotnie, ale badania te nie przedstawiają większej wartości, ponieważ polegają one na porównaniu białek nowotworu z tkanką prawidłową niehomologiczną, poza tym frakcjonowanie białka w tych przypadkach przeprowadzane było niewłaściwymi metodami. Jedna tylko stosunkowo nowsza praca zasługuje na uwagę. *Hoffman i Schechtman* poddawali elektroforezie wyciągi z wątroby szczurów karmionych dwumetyloamino-azobenzenem. Stwierdzili oni, że w miarę wykształcania się zmian przedrakowych w wątrobie, zmienia się wzajemny ilościowy stosunek poszczególnych elektroforetycznych frakcji białka wątroby (8). Przypuszczalnie zastosowanie elektroforezy bibułowej, wymagającej znacznie mniejszych ilości badanego wyciągu, pozwoli rozszerzyć ten typ badań na znacznie bogatszy materiał.

Innym sposobem podejścia do wykazania jakościowych zmian w białkach nowotworowych była analiza składu aminokwasowego tych białek. W tym kierunku przeprowadzono liczne badania, ale olbrzymia większość wyników pozostawia wiele do życzenia z powodu stosowania niewystarczających metod analitycznych i z powodu porównywania białek nowotworu z białkami nieodpowiednich prawidłowych tkanek (9). Stosunkowo najbardziej wiarygodne są wyniki uzyskane przez *Zbarskiego i Mardaszewę*, które nie wykazują statystycznie uzasadnionych różnic w zawartości kilku aminokwasów w białkach prawidłowych i nowotworowych (10). Zaznaczyć jednak należy, że wszystkie te badania dotyczyły tylko pewnych aminokwasów, jak np. aminokwasy zasadowe, cystyna i cysteina, tryptofan, a więc aminokwasów, które łatwo ilościowo oznaczać. Identyczna zawartość tych aminokwasów w dwóch białkach homologicznych bynajmniej nie mówi o identyczności samych białek. Na przykład albumin osocza ludzkiego i osocza wołu zawiera 6 aminokwasów w identycznych proporcjach, natomiast 7 innych aminokwasów występuje w tych dwóch albuminach w proporcjach zupełnie różnych. Wszystkie 3 aminokwasy zasa-

dowe występują w jednakowych ilościach w hemoglobinach różnych gatunków ssaków, a mimo to mamy przecież do czynienia z odmiennymi białkami.

Mimo tych zastrzeżeń badania wyżej wymienionego typu mogą stanowić podstawę do pewnych wniosków. Np. *Greenstein* twierdzi, że stosunek ilościowy cystyny do cysteiny w różnych białkach jednego i tego samego gatunku zwierzęcego jest w przybliżeniu wielkością stałą i dla każdego gatunku charakterystyczną. Oznaczenie tego stosunku w rozpuszczalnych białkach z tkanek prawidłowych i nowotworowych szczurów i królików nie wykazało żadnej różnicy, co *Greenstein* uważa za jeszcze jeden dowód dawno znanego faktu, że tkanka nowotworowa zachowuje gatunkowe właściwości nosiciela (11). Interesujące byłoby zbadać, jak sprawa ta przedstawia się w nowotworach przeszczepianych z powodzeniem z jednego gatunku zwierzęcego na drugi, np. przeszczepianie nowotworów do przedniej komory oka lub tzw. rak Ehrlicha-Putnoky'ego.

Jedynie w wyjątkowych przypadkach, gdy białko właściwe nowotworowi różni się znacznie od prawidłowych białek, daje się ono wykazać bez trudności. Przykładem takiego białka jest białko Bence-Jonesa, charakterystyczne dla spiczaków. Z reguły jednak jakościowe zmiany białek nowotworowych — jeżeli takie w ogóle zachodzą — są trudne do stwierdzenia. Analiza białek nowotworowych musi iść w kierunku wydzielenia czystych białek lub dokładnie scharakteryzowanych jednolitych frakcji białkowych. Dopiero wówczas, gdy chemik będzie mógł poddać analizie analogiczne czyste frakcje uzyskane z guza i z tkanki prawidłowej, analiza taka może przynieść jednoznaczne wyniki. Dotychczas udało się to osiągnąć w bardzo nielicznych przypadkach. *Kubowitz* i *Ott* (12) uzyskali z jensenowskiego mięsaka szczura i z mięśni szczurów zdrowych krystaliczną dehydrogenazę kwasu mlekowego. To zupełnie jednolite, czyste białko wykazywało identyczne własności fizyczne i chemiczne, mimo różnicy pochodzenia z tkanki prawidłowej i nowotworowej (13).

W r. 1939 znany biochemik *Kögl* wystąpił z rewelacyjnymi wynikami badań, które zdawały się rzucić zupełnie nowe światło na problem białka nowotworowego. Zdaniem *Kögla* część aminokwasów w białku nowotworowym reprezentowana jest nie przez naturalne izomeryony optyczne, a więc aminokwasy należące do szeregu *l*, lecz przez ich antypody optyczne, aminokwasy należące do szeregu *d*. Ponieważ enzymy rozkładające wiązania peptydowe między aminokwasami dostosowane są swoiście do wiązań powstających tylko między *l*-aminokwasami, łańcuchy aminokwasów zawierające *d*-izomeryony są odporne na działanie enzymów proteolitycznych. Tym tłumaczył *Kögl* tendencję tkanki nowotworowej do destruktywnego wzrostu i jej odporność na działanie samoregulacyjnych procesów obronnych ustroju obciążonego nowotworem. Zdaniem *Kögla* powstanie białka nowotworowego byłoby więc wykośleniem prawidłowej struktury przestrzennej aminokwasów, włączanych przez ustrój w cząsteczkę białka (14).

Hipoteza *Kögla* była pozornie oparta na bogatym materiale doświadczalnym i postawiona przez badacza mającego wielki autorytet. Wyzwoliła szereg badań kontrolnych, przeprowadzanych różnorodnymi metodami, niejednokrotnie o wiele bardziej subtelnymi niż metody stosowane przez *Kögla* (15). Niestety nikomu nie udało się potwierdzić pierwotnych wyników. Stwierdzono jedynie, że bardzo drobne ilości *d*-aminokwasów znajdują się prawdopodobnie we wszystkich prawidłowych białkach, ale że w nowotworach ta zawartość domniemanych *d*-aminokwasów nie jest wyższa. Dziś zagadnienie *d*-aminokwasów w białkach nowotworowych uważane jest przez ogół biochemików za sprawę mającą charakter wyłącznie historyczny, chociaż *Kögl* do dziś obstaje przy słuszności swoich twierdzeń (16).

Prace *Kögla* pociągnęły jednak za sobą pewne korzystne konsekwencje zwracając uwagę badaczy na zapomniane i lekceważone w biochemii *d*-izomeryony aminokwasów. Będąc swego czasu przekonany o słuszności wywodów *Kögla*, rozpocząłem

poszukiwania enzymów zdolnych do rozkładu wiązań peptydowych wytworzonych przez *d*-aminokwasy w tkankach nowotworowych i w krwi osobników obarczonych nowotworami. Stwierdzenie obecności takich *d*-peptydaz we krwi chorych na raka zdawało się otwierać nowe możliwości chemicznej diagnostyki nowotworów, okazało się jednak, że owe *d*-peptydazy występują również w tkankach prawidłowych (17). Zagadnienie *d*-peptydaz było przez kilka lat obszerniej rozpracowywane w kilku pracowniach, ale dziś sprawa ta przycichła, chociaż niewątpliwie problem ten zasługuje na baczniejszą uwagę.

Bezpośrednio przed wybuchem wojny najwyższe zainteresowanie biochemików wzbudziły piękne prace *Casperssona* w Sztokholmie i *Brachet* w Brukseli nad przemianą kwasów nukleinowych w komórce. Subtelne metody histochemiczne opracowane przez tych uczonych doprowadziły do stwierdzenia, że kwasy nukleinowe odgrywają zasadniczą rolę w procesie syntezy białek. Kwas dezoksyrybonukleinowy (DRN) zlokalizowany w jądrze komórkowym związany jest z syntezą białek jądra, ale pośrednio wpływa również na syntezę białek cytoplazmy. Od kwasu rybonukleinowego (RN) uzależnione jest znów pomnażanie się białek w cytoplazmie.

Wyniki tych badań zapowiadały zupełnie nowe możliwości podejścia do problemu syntezy białka w komórce nowotworowej i pozwalały rokować nadzieję, że istotnie w przemianie kwasów nukleinowych odsłoni się tajemnica wzrostu nowotworowego. Takie poglądy wyrażał sam *Caspersson*, który zastosował swą technikę do badania komórek nowotworowych wykazując, że komórki te w odróżnieniu od komórek prawidłowych cechują się znacznie wzmoczoną zawartością kwasów nukleinowych, przy czym w nowotworach szybko rosnących szczególnie wzrasta ilość RN (18).

Niestety metoda *Casperssona*, pozwalająca badać zawartość obu odmian kwasów nukleinowych w poszczególnych komórkach, jest metodą technicznie bardzo trudną, którą w chwili obecnej posługuje się zaledwie kilka pracowni. Olbrzymia większość naszych wiadomości o kwasach nukleinowych w guzach opiera się na znacznie uproszczonych metodach histochemicznych lub na metodach klasycznej analizy chemicznej, które dopiero w ostatnich latach należyte wypracowano. Oznaczenie ogólnej ilości kwasów nukleinowych w badanych tkankach jest stosunkowo prostym postępowaniem, ale dokładniejsze oznaczenie stosunku DRN do RN wymaga bardzo szczególnej i żmudnej techniki. Technika ta została jednak w ostatnich czasach tak wysubtelniona, że możliwe jest w odpowiednich warunkach oznaczenie DRN w pojedynczych olbrzymich chromozomach ślinianek *Drosophili*.

Oznaczanie ogólnej ilości kwasów nukleinowych w nowotworach doprowadzało w większości przypadków do stwierdzenia wzrostu ilości tych związków w porównaniu z homologiczną tkanką prawidłową. Bardziej rozbieżne są wyniki badań ilościowego stosunku między DRN a RN. Metodami chemicznymi rozwiązywali to zagadnienie *Davidson* i *Waymouth* (19) oraz *Schneider* (20) stwierdzając zgodnie, że oprócz ogólnego wzrostu zawartości kwasów nukleinowych w wątrobiakach szczonego stosunek obu odmian kwasów nukleinowych przesuwa się na korzyść DRN w porównaniu z prawidłową wątrobą. Do tych samych wyników doszedł *Stowell* (21) badając zawartość kwasów nukleinowych w guzach ludzkich metodą histochemiczną. Podobny wzrost ilości DRN w stosunku do RN zaobserwował *Stowell* w nowotworach skóry wywołanych u myszy metylocholanrenem. Natomiast *Dounce* (22) twierdzi, że zawartość DRN w izolowanych jądrach komórkowych wątrobiaków jest o 50% niższa niż w jądrach prawidłowych komórek wątroby. Wiele podobnych sprzeczności spotykamy we wszystkich sprawach dotyczących kwasów nukleinowych w guzach (23). Prawdopodobnie na tę rozbieżność wyników wpływają zarówno trudności techniczne w oznaczaniu kwasów nukleinowych, jak i różnorodność materiału poddanego badaniu.

Na ogół przyjmuje się, że kwasy nukleinowe należące do jednego i tego samego

typu różnią się między sobą tylko co najwyżej masą cząsteczkową, ale że składowe nukleotydy występują w tych kwasach zawsze w tym samym wzajemnym stosunku 1:1. Systematyczne badania *Chargaffa* wskazują jednak na to, że mamy do czynienia z wieloma różnymi kwasami DRN i RN. Klasyczny stosunek poszczególnych nukleotydów, wyrażających się równymi ilościami każdego z 4 nukleotydów w cząsteczce kwasu, jest raczej ideałem; w rzeczywistości stosunek ten nie wyraża się w liczbach całkowitych. Kwas rybonukleinowy wyosobniony z różnych narządów zwierzęcych cechuje się różnym ilościowym stosunkiem poszczególnych nukleotydowych komponent. Możliwe jest więc, że w toku powstawania komórki nowotworowej zmieniają się nie tylko ilości obu typów kwasów nukleinowych, ale i ich jakości. Według *Chargaffa* (24) w kwasie RN z prawidłowej ludzkiej wątroby stosunek nukleotydu adenilowego do gwanilowego ma się tak, jak 1:3,2, natomiast w kwasie RN z części wątroby zmienionej nowotworowo 1:4,1. W kwasie RN wyosobnionym z nowotworów drobiu stosunek nukleotydów purynowych do pirydyminowych wyraża się cyframi 4,83:3,23. Sprawa zmian jakościowych w strukturze kwasów nukleinowych nowotworów jest więc jeszcze otwarta i może przynieść ciekawe niespodzianki.

Bezpośredni udział kwasów nukleinowych w procesach życiowych komórki nowotworowej udowodniony został w pięknych pracach *Eulera* i *Hevesy'ego* (25). Podawali oni szczerom obarczonym przeszczepialnymi nowotworami nieorganiczny fosforan nacechowany radioaktywnym izotopem fosforu. Po pewnym czasie izotop fosforu dał się wykazać w większości organicznych połączeń kwasu fosforowego, zawartych w organizmie szczura. Najwięcej jednak izotopowego fosforanu znajdowano w kwasach nukleinowych tkanki nowotworowej. Świadczy to o tym, że kwasy nukleinowe w komórkach nowotworowych w bardzo szybkim tempie rozpadają się i resyntetyzują. Szybkość tego przekształcenia się cząsteczek kwasów nukleinowych w komórkach nowotworowych jest kilkadziesiąt razy większa od szybkości przemiany kwasu nukleinowego w innych tkankach szczura. Jednorazowe krótkotrwałe naświetlenie guza promieniami Roentgena redukuje szybkość przemiany kwasów nukleinowych niemal do tych wartości, jakie obserwuje się w tkance prawidłowej. Zresztą z badań innych autorów wynika, że naświetlenie promieniami Roentgena przywraca właściwy nowotworom stosunek DRN do RN do wartości charakterystycznych dla tkanki prawidłowej.

Oczywiście nie można pominąć tutaj faktu, że omówione powyżej zmiany ilościowe i jakościowe kwasów nukleinowych nie są wyłącznie swoiste dla nowotworów. Podobne zmiany opisano w tkankach szybko rosnących, przede wszystkim w tkankach embrjonalnych. O wnioskach, jakie z tego faktu można wyciągnąć, nie będziemy na tym miejscu mówić.

Dotychczas przytoczyłem dane dotyczące ewentualnych zmian ilościowych i jakościowych w zakresie strukturalnych składników komórki nowotworowej. Nie chcę przez to powiedzieć, że białka, kwasy nukleinowe lub fosforo-tłuszczowce są wyłącznie biernymi elementami w budowie komórki, ale ich udział w statycznej strukturze nowotworów wysuwa się na plan pierwszy. Jednak o zachowaniu się komórki decydować będzie zespół reakcji chemicznych, rozgrywających się między składnikami komórki nowotworowej, decydować będzie najogólniej ujęta przemiana materii. O jej charakterze, kierunku, o nasileniu poszczególnych reakcji chemicznych i o ich wzajemnym powiązaniu ze sobą decydować będą przede wszystkim katalizatory zawarte w komórce — enzymy. Wszystko przemawia za tym, że swoiste cechy komórki nowotworowej tkwią w jej dynamicznym charakterze, uwarunkowanym odpowiednim zespołem enzymów, a więc że enzymologia nowotworów może nas zaprowadzić szczególnie daleko w dziedzinę poznania istoty guza.

Poszczególne tkanki ustroju zwierzęcego różnią się przede wszystkim charakterem odbywających się w nich przemian chemicznych uwarunkowanych odpowied-

nim zespołem enzymów. Ilość i jakość poszczególnych komponent enzymatycznych tego zespołu pozwala odróżnić od siebie tkanki, które skądinąd są bardzo zbliżone do siebie pod względem morfologicznym lub też pod względem statycznej struktury chemicznej. Wątroba na przykład zawiera szczególnie duże ilości arginazy i katalazy, błona śluzowa jelita cechuje się dużą zawartością zasadowej fosfatazy i esterazy. Gruczoły chłonne szczególnie obfitują w dezoksyrybonukleinazę, oksydaza cytochromowa jest enzymem w dużym stężeniu występującym w mięśniu sercowym. Dla każdej tkanki prawidłowej można ustalić pewnego rodzaju szablonowy schemat zespołu enzymów, w którym pewne enzymy szczególnie wybitnie są reprezentowane, inne znów występują tylko w drobnych ilościach albo też brak ich zupełnie. Ten schemat może być chemiczną cechą rozpoznawczą jakiejś tkanki prawidłowej.

Nasuują się z kolei zasadnicze pytania. Czy charakter zespołu enzymatycznego tkanki prawidłowej zmienia się przy jej przejściu w tkankę nowotworową? Czy charakter enzymatyczny tkanki nowotworowej jest jej cechą swoistą, nie spotykaną w tkankach prawidłowych? Jasne jest, że udzielenie odpowiedzi na te pytania wymaga żmudnych i systematycznych badań, opartych niejednokrotnie na trudnych metodach enzymologii. Wyjaśnienie tej sprawy wymaga badań zawartości w tkankach prawidłowych i nowotworowych dziesiątków różnych enzymów. Ale wyniki takich badań nie tylko mogą, ale muszą stać się bardzo ważnym krokiem na drodze poznania istoty nowotworów. Świadczą o tym dotychczasowe osiągnięcia w tej dziedzinie, które pozwolę sobie najogólniej scharakteryzować.

Pierwsze badania w tym zakresie, przeprowadzane przez *O. Warburga* niemal 30 lat temu, doprowadziły od razu do osiągnięć stawiających enzymologię nowotworów na czoło problematyki biochemicznej. Dotyczyły one podstawowych procesów życiowych komórki nowotworowej, chemizmu oddychania tej komórki i sposobu zaopatrywania jej w niezbędną do życia energię.

Wiadomo, że w każdej tkance zwierzęcej odbywa się dwójaki rozkład podstawowego materiału energiodajnego, jakim jest glikoza. W obecności tlenu glikoza zostaje spalona na CO_2 i H_2O , w myśl równania: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 \rightarrow 6 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{CO}_2$. Mówimy, że tkanka oddycha pobierając z otoczenia tlen i wydalając CO_2 . W nieobecności tlenu potrzeby energetyczne tkanki pokrywane są przez fermentacyjny rozkład glikozy na kwas mlekowy, wg równania $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2 \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$. Mówimy wówczas o beztlenowym rozpadzie cukru w tkance zwierzęcej, o glikolizie.

Wypracowana przez *Warburga* bardzo pomysłowa metoda pozwala oba te procesy rejestrować ilościowo. Mikrotomowe skrawki tkanki umieszczone w odpowiednim płynie z dodatkiem glikozy zużywają tlen, którego ubytek w atmosferze otaczającej skrawek można śledzić dokładnie. Objętość tlenu zużytego do spalania glikozy w ciągu godziny, wyrażona w mm^3 , przeliczona na mg suchej wagi tkanki, jest wyrazem intensywności oddychania danej tkanki. Określamy ją symbolem Q_{O_2} . Jeżeli jednak ta sama tkanka znajduje się w atmosferze azotu, pokrywa swoje potrzeby energetyczne rozkładając glikozę beztlenowo na drodze glikolizy. Powstaje z glikozy kwas mlekowy, który z węglanu zawartego w płynie odżywczym wypiera CO_2 . Przyrost objętości gazowego CO_2 w środowisku, w którym znajduje się badana tkanka, daje się zmierzyć w mm^3 na mg suchej wagi tkanki i staje się wyrazem ilości powstającego kwasu mlekowego, czyli intensywności glikolizy w warunkach beztlenowych. Określamy go symbolem $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$, którego cyfrowa wartość jest miarą natężenia glikolizy beztlenowej. Jeżeli do tkanki glikolizującej w warunkach beztlenowych doprowadzimy tlen, glikoliza ustaje, a miejsce jej zajmuje oddychanie. Dostęp tlenu hamuje glikolizę.

Odmienne zachowują się tkanki nowotworów złośliwych. W obecności tlenu oddychają, jakkolwiek Q_{O_2} nowotworu często ma niższe wartości od Q_{O_2} tkanki macierzystej. W atmosferze azotu guz glikolizuje, przy czym intensywność gliko-

lizy jest zazwyczaj większa niż w tkance macierzystej. Ale przy dostępie tlenu glikoliza guza tylko maleje w swym natężeniu, lecz nie znika. Tkanka nowotworu cechuje się więc zdolnością do glikolizowania w tlenie. Glikolizę tlenową wyrażamy symbolem $Q_{CO_2}^O$. Przykładem niech będą następujące cyfry:

Wątroba szczura	Q_{O_2} - 12,	$Q_{CO_2}^N$ - 3,	$Q_{CO_2}^O$ - 0,5
Hepatom - 6, - 12, - 6

Wyniki badań *Warburga* odbiły się nadzwyczaj żywym echem w świecie nauki. Po raz pierwszy uchwycono konkretną cechę chemiczną, wyróżniającą tkankę szybko rosnącego nowotworu od tkanki prawidłowej. Co więcej, badania *Warburga* wskazywały na charakter zmian chemicznych zachodzących w toku wykształcania się nowotworu, doprowadzając do wniosku, że w nowotworach zachodzi upośledzenie procesów oddychania. Nowotworowe przekształcenie się tkanki w myśl tych danych doświadczalnych jest przestawieniem właściwego tkankom zwierzęcym tlenowego metabolizmu na drogę fermentacji beztlenowej (26).

Wieloletnia kontynuacja badań *Warburga*, prowadzona w licznych pracowniach, przyniosła pewne rozczarowanie. Pierwotne wyniki zostały potwierdzone; istotne tkanki szybko rosnących nowotworów cechują się wybitną glikolizą tlenową. *Dean Burk* (27) na podstawie olbrzymiego materiału doświadczalnego podaje następujące własności złośliwych nowotworów:

Q_{O_2} - 2 - 10,	$Q_{CO_2}^N$ - 8 - 20,	$Q_{CO_2}^O$ - 0 - 15
---------------------	------------------------	-----------------------

Okazało się jednak, że pewne tkanki prawidłowe odpowiadają tym kryteriom. Glikolizę tlenową wykazują — jakkolwiek w mniejszym stopniu — tkanki embrionalne. Spośród tkanek zwierzęcia dorosłego szczególnie wybitną glikolizą tlenową cechuje się siatkówka i łożysko. Mniej intensywnie, ale nie mniej wyraźnie glikolizuje w obecności tlenu śluzówka jelita i kora mózgowa (28).

Mimo że pierwotne wnioski *Warburga* musiały ulec modyfikacji, znaczenie jego badań jest nader doniosłe. Z badań tych wynika, że w nowotworach zachodzą zmiany w układzie enzymatycznym i że enzymy katalizujące procesy utleniania w komórce nowotworowej nie funkcjonują tak jak w większości komórek prawidłowych. Badania, o których była mowa, nie mówią jednak nic o tym, na czym ta dezorganizacja układu enzymatycznego polega. Sprawę tę mogły wyjaśnić dopiero systematyczne badania poszczególnych enzymów, prowadzone w ciągu ostatnich kilkunastu lat na większą skalę w wielu pracowniach biochemicznych.

Ilościowe oznaczanie poszczególnych enzymów w tkance nowotworowej doprowadza na ogół do wyników zgodnych z poglądami wysnutymi z badań *Warburga* (29). W olbrzymiej większości badanych guzów, zarówno samorzutnych jak i wywołanych doświadczalnie, bardzo zmniejszona jest zawartość oksydazy cytochromowej i cytochromów, a więc czynników odgrywających decydującą rolę w procesach tlenowego rozkładu związków organicznych. Może w mniejszym stopniu, ale wyraźnie zredukowana jest zawartość dehydrogenazy kwasu bursztynowego, a więc również ważnego dla procesów utleniania enzymu. Szczególnie wyraźnie zmniejsza się w tkankach nowotworowych ilość katalazy. Bezpośredni udział tego enzymu w procesach utleniania nie jest jeszcze zupełnie wyjaśniony, ale z wymienionymi powyżej — oksydazą cytochromową i cytochromami — łączy katalazę powinowactwo strukturalne. Wszystkie te 3 składniki komórki są hemoproteidami, wszystkie zawierają jako część składową układ hemu, analogiczny lub identyczny z hemem zawartym w hemoglobinie.

Na jeden fakt należy zwrócić szczególną uwagę. Spadek zawartości tych enzymów hemoproteidowych ujawnia się już w okresie preneoplastycznym i zaznacza

się nie tylko w tkance nowotworowej, lecz i w tkankach zdrowych zwierzęcia obarczonego nowotworem. Przeszczepianie nowotworu na zwierzę zupełnie zdrowe powoduje po krótkim czasie obniżenie się zawartości katalazy i układu cytochromowego nawet w znacznie od guza oddalonych tkankach (30). Należy przyjąć działanie guza na odległość, wpływ jakiegoś czynnika wysyłanego z nowotworu do otoczenia i to czynnika, który działa jeszcze przed pojawieniem się utkania nowotworowego. Jeżeli uwzględnimy towarzyszące często nowotworom anemie i spadek ilości najpospolitszego hemoproteidu — hemoglobiny, to zespół tych faktów odślania szczególnie ważne zagadnienie wybiegające poza ramy mego referatu.

Na ogół te enzymy, które w tkance macierzystej okazują większą aktywność, w rozwijającym się z tej tkanki nowotworze występują w mniejszych ilościach (31). Dla wątroby charakterystyczna jest duża zawartość arginazy i dehydrogenazy *d*-aminokwasów; nowotwory wątroby zawierają tych enzymów niewiele. Błona śluzowa jelita zawiera dużo zasadowej fosfatazy, rak jelita zawiera bardzo mało tego enzymu. Zupełnie znikają enzymy będące wyrazem szczególnego wyspecjalizowania tkanki macierzystej, jak np. pepsyna błony śluzowej żołądka lub esteraza jelita. Wyjątek stanowi zasadowa fosfataza tkanki kostnej i kwaśna fosfataza prostaty, których wzmóżona zawartość we krwi w przypadkach mięsaka kości lub raka sterczu stosowana nawet bywa do celów rozpoznawczych. W tych jednak przypadkach, gdy udawało się przeszczepiać mięsaka kości myszy na inne myszy, bogata zawartość zasadowej fosfatazy znika już w trzeciej lub czwartej generacji transplantatu.

Zmiany schematu enzymatycznego przy powstawaniu nowotworów nie polegają wyłącznie na zmniejszaniu się zawartości enzymów. Aktywność pewnych enzymów wzrasta, szczególnie tych, które w tkance macierzystej zawarte były w małych stężeniach. Tak np. hepatomy cechują się większą aktywnością katepsyny i fosfatazy w porównaniu z prawidłową tkanką wątrobową. Na ogół we wszystkich nowotworach wzrasta znacznie aktywność enzymów związanych z przemianą kwasów nukleinowych oraz z rozkładem białek. Na jedno trzeba zwrócić uwagę z całym naciskiem. Nie stwierdzono dotychczas ani jednego enzymu, który byłby swoistym enzymem dla nowotworów, nieznanym jako składnik tkanki prawidłowej. Nie można wykluczyć tego, że w przyszłości taki enzym lub enzymy zostaną opisane, ale nawet i w takim przypadku nie zmieni to zasadniczego faktu, że metabolizm komórki nowotworowej stanowi wyraz ilościowego, a nie jakościowego odchylenia od normy.

Znamienny jest fakt, że w każdym przypadku wzrostu lub zmniejszenia aktywności enzymów w toku kancerogenezy skrajne wartości nie przekraczają tych, jakie spotykamy w tkankach prawidłowych. Nigdy nie znika całkowicie oksydaza cytochromowa lub dehydrogenaza kwasu bursztynowego, które są enzymami występującymi w każdej komórce zwierzęcej, choć tylko w bardzo drobnych ilościach. Wzrost zawartości fosfatazy w nowotworach wątroby nigdy nie dochodzi do tych maksymalnych stężeń enzymu, jakie spotykamy w śluzówce jelita. Schemat zespołu enzymatycznego nowotworów odpowiada raczej średniej zawartości poszczególnych członów zespołu, wyśrodkowanej z aktywności enzymatycznych różnych tkanek. Można by raczej twierdzić, że podane przeze mnie zmiany w zakresie poszczególnych enzymów są wyrazem tendencji do osiągnięcia pewnego przeciętnego stanu średniego. Szczególnie ważne jest to, że do tego przeciętnego, szablonowego typu zespołu enzymatycznego zdążają zmiany zachodzące we wszystkich rozwijających się nowotworach, bez względu na charakter ich tkanki macierzystej.

W związku z tymi wwodami przyczoce pewien charakterystyczny przykład. Była już mowa o tym, że w olbrzymiej większości guzów redukuje się znacznie aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy kwasu bursztynowego. Znamy jednak wyjątki. Wspomniany już poprzednio *Carruthers*, który od lat systematycznie bada zmiany zachodzące w skórze zwierzęcej poddawanej działaniu metylocho-

lantrenu, stwierdził, że w toku rozwoju w ten sposób wywołanych nowotworów aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynowej znacznie wzrasta w porównaniu z prawidłowym naskórkiem (32). Pamiętać jednak należy, że prawidłowy naskórek zawiera oba wyżej wymienione enzymy w bardzo drobnych ilościach. Pozostaje to w związku z bardzo słabym oddychaniem tej tkanki; naskórek cechuje się szczególnie niskim Q_{O_2} . W toku przekształcenia nowotworowego aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynowej naskórka wzrasta, nie osiągając części aktywności tych enzymów, jaką spotykamy w wielu innych tkankach. W rozwiniętym już nowotworze skóry aktywność tych enzymów leży w rzędzie wielkości, jaki odpowiada aktywności ich we wszystkich nowotworach wywodzących się z innych tkanek. Doświadczenie to może być więc klasycznym przykładem tendencji zmian w zespole enzymatycznym w kierunku osiągnięcia pewnych przeciętnych, właściwych wszystkim nowotworom wartości.

Ten szablon układu enzymów w komórce nowotworowej jest w pewnym stopniu czymś charakterystycznym dla tkanek nowotworowych. Jeżeli na to pozwalają dotychczas zebrane materiały doświadczalne, możemy ryzykować twierdzenie, że wszystkie szybko rosnące nowotwory charakteryzują się pewnym schematem zespołu enzymatycznego, bez względu na pochodzenie i na charakter czynnika wywołającego powstanie guza. Jedyne nowotwory wywołane wirusami, będące zresztą składnikami nowotworami o wyraźnie odmiennym biologicznym typie, odchylają się od tego schematu. Gdybyśmy mieli charakteryzować jakiś nowotwór tylko na podstawie aktywności i jakości zawartych w nim enzymów, to nie byłibyśmy w stanie odróżnić od siebie raka żołądka, raka jelita lub też pierwotnego raka wątroby, mimo że takie odróżnienie tkanek macierzystych nie napotykałoby żadnych trudności. Struktura enzymatyczna komórki tkanki macierzystej ulega zatarciu, ustępując miejsca strukturze zasadniczo właściwej znacznej większości nowotworów. Patologowie mówią o redukcji zróżnicowania tkanki prawidłowej przy jej przekształceniu się w tkankę nowotworową. Odpowiednikiem tych procesów morfologicznych są nowe, naszkicowane przeze mnie zmiany zespołów enzymatycznych, prowadzące od schematów wysoce zróżnicowanych do jednolitego schematu właściwego nowotworom.

Wnioski, do których dochodzimy, oparte są na bardzo bogatym materiale faktycznym, który zawdzięczamy głównie kilku pracownikom od lat systematycznie zajmujących się enzymologią guzów. Związane one są z nazwiskami: *Eulera* w Sztokholmie, *Zbarskiego* i *Mardaszewa* w Moskwie, *Greensteina* w Bethesda w Stanach Zjednoczonych, *Carruthersa* w St. Louis. Niewątpliwie materiał dotychczasowy nie jest wystarczający do ustalenia daleko idących wniosków. Znacznej większości tych badań można by postawić zarzuty, o jakich była mowa na wstępie referatu. Niejednolitość i różnorodność materiału doświadczalnego, wadliwość używanych metod analitycznych, niedostateczny krytycyzm w ocenie wyników — to wszystko z powodzeniem dałoby się zastosować do większości publikacji z zakresu biochemii guzów. Niemniej zbyt wiele faktów powtarza się w tych pracach, aby tłumaczyć je wyłącznie błędem doświadczalnym. Oczywiście dalsze jeszcze liczniejsze badania są konieczne, ale już dziś możemy sformułować pewne wypowiedzi na temat chemizmu tkanki nowotworowej.

Każdy lekarz mógłby po zaznajomieniu się z treścią tego referatu postawić pytanie, jakie praktyczne korzyści dały dotychczasowe badania chemizmu nowotworów? Czy zbliżyły nas choć trochę do celu, jakim jest możliwość skutecznego zwalczania raka? Trzeba wyznać skromnie, że dotychczas praktycznych korzyści brak, ale sądzę, że to nie powinno być powodem do zaniechania dalszych wysiłków, lecz raczej bodźcem do nowych wysiłków. Droga dalszego postępowania jest już w każdym razie wyznaczona.

PIŚMIENICTWO

1) *Toennies G.*: *Cancer Res.*, 1947, 7, 193. — 2) Zestawienie dawniejszego piśmiennictwa dotyczącego chemicznego składu nowotworów znajdzie czytelnik w monografiach: *Euler H.* i *Skarżyński B.*, *Biochemie der Tumoren*, Stuttgart, 1942 i *Stern K. G.*, *Wilhelm G.*: *Biochemistry of Malignant Tumours*, New York, 1943. — 3) *Kishi S.*, *Fujiwara T.*, *Nakahara W.*: *Gann*, 1937, 31, 1, 51, 355, 556; 1938, 32, 469. — 4) *Carruthers C.*: *Canc. Res.*, 1950, 10, 255; 1946, 6, 296; *J. Biol. Chem.*, 1944, 153, 521. — 5) *Brault*: *Bull. Canc.*: 1938, 27, 208. — 6) *Jowett*: *Bioch. J.* 1931, 25, 1921. — 7) *Lavik*: *Canc. Res.*, 1949, 9, 189; *Caspersson T.* i *Santesson G.*: *Studies on Protein Metabolism in the Cells of Epithelial Tumours.*, Stockholm, 1943. — 8) *Hoffman H. E.*, *Schechtman A. M.*: *Canc. Res.*, 1952, 12, 129. — 9) *Wells H. G.* i *Long E. R.*: *Ztschr. Krebsf.*, 1913, 12, 598; *Kocher R. A.*: *J. Biol. Chem.* 1915, 22, 295; *Drummond J. C.*: *Bioch. J.* 1916, 10, 473; 1917, 11, 325; *Schenck E. C.*: *Arch. exp. Path.*, 1934, 175, 401. — 10) *Zbarskij B. J.*, *Zbarskij I. B.*, *Mardaszew S. P.*: *Biochimija*, 1945, 9, 161; *Zbarskij I. B.*, *Debow S.*: *Dokl. Akad. Nauk ZSRR*, 1948, 62, 795; *Zbarskij I. B.*: *Usp. sowr. biol.*, 1946, 22, 219.

11) *Greenstein J. P.*, *Leuthard F. M.*: *J. Nat. Canc. Inst.*, 1945, 5, 111. — 12) *Kubowitz F.*, *Ott P.*: *Bioch. Ztschr.*, 1943, 314, 94. — 13) *Baranowski T.*: doniesienie osobiste. — 14) *Kögl F.*, *Erleben H.*: *Ztschr. physiol. Chem.*, 1939, 258, 57; 1939, 141, 154; 1940, 264, 198, 211; 1943, 277, 521. — 15) *Chibnall A. L.* i wspóprac.: *Biochem. J.*, 1940, 34, 258; *Graff*, *Rittenberg* i *Foster*: *J. Biol. Ch.*, 1940, 133, 745; *Behrens O. K.*, *Lipmann F.* i wspópr.: *J. Biol. Ch.*, 1941, 138, 677; *Abderhalden E.*: *Ztschr. physiol. Chem.*, 1942, 275, 195. — 16) *Kögl F.*: *Experientia*, 1949, 5, 173; *Kögl F.* i wspópr.: *Nature*, 1948, 162, 732. — 17) *Skarżyński B.*: *Ark. Kemi*, 1939, 13 B, Nr 13; *Euler H.*, *Skarżyński B.*: *Ztschr. physiol. Chem.*, 1940, 265, 133; *Skarżyński B.*, *Euler H.*: *Ark. Kemi*, 1940, 14 B, Nr 2, 3 i 11; *Bayerle*, *Podlucky*: *Bioch. Ztschr.*, 1940, 304, 259; 1940, 305, 227; 1941, 307, 341; *Maschmann E.*: *Bioch. Ztschr.*, 1941, 310, 252; 1942, 313, 129; *Bamann*, *Schimke*: *Bioch. Ztschr.*, 1941, 310, 119, 131, 302. — 18) *Caspersson, T.*, *Santesson L.*: *Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumors*, *Acta Radiol. Suppl.*, 1942, 46. — 19) *Davidson J. N.*, *Waymouth Ch.*: *Brit. J. Exper. Path.*, 1944, 25, 164. — 20) *Schneider W. C.*: *Canc. Res.*, 1945, 5, 717.

21) *Stowell R. E.*: *Canc. Res.*, 1945, 5, 283, 295; 1946, 6, 426. — 22) *Dounce A. L.*: *J. Biol. Chem.*, 1943, 151, 235. — 23) *Klein E.*, *Klein G.*: *Nature*, 1950, 166, 832; *Mark D.*, *Ris H.*: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1949, 71, 727; *Price J. M.*, *Laird A. E.*: *Canc. Res.*, 1950, 10, 650; *Petermann M. L.*, *Schneider R. M.*: *Canc. Res.*, 1951, 11, 772; *Roskin G. J.*, *Charłowa G.*: *Doklady A. N. ZSRR*, 1944, 44, 418; *Zilber L. A.*, *Freiman W. B.*, *Zbarskij I. B.*, *Debow S. S.*: *Doklady A. N. ZSRR*, 1947, 65, 97; *Barakina N.*, *Doklady A. N.*: *ZSRR*, 1951, 79, Nr 6. — 24) *Chargaff E.*, *Magasanik B.* i wspópr.: *J. Biol. Chem.* 1950, 186, 51. — 25) *Euler H.*, *Hevesy G.*: *Ark. Kemi*, 1944, 17 A, Nr 30; *Ahlström L.*, *Euler H.*, *Hevesy G.*: *Ark. Kemi*, 1944, 18 A, Nr 13; 1944, 19 A, Nr 9; 1946, 23 A, Nr 1; *Brues A. M.*, *Tracy M. M.*, *Cohn W. E.*: *J. Biol. Chem.*, 1944, 155, 619; *Albert S.* i wspópr.: *Canc. Res.*, 1951, 11, 772. — 26) *Warburg O.*: *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin, 1926. — 27) *Burk D.*: *Cold Spring Harbor Symposia*, 1939, 7, 420; *Burk D.* i wspópr.: *J. Natl. Canc. Inst.*, 1942, 3, 249. — 28) *Crabtree H. G.*: *Bioch. J.*, 1929, 23, 536; *Dickens F.*, *Simer F.*: *Bioch. J.*, 1930, 24, 1301; 1931, 25, 985; *Elliot K. A. C.*, *Greig M. E.*: *Bioch. J.*, 1937, 31, 1021; *Dickens F.*, *Weil-Malherbe H.*: *Canc. Res.*, 1943, 3, 73. — 29) *Euler H.*, *Hellström H.*, *Günther G.*: *Ztschr. physiol. Chem.*, 1938, 255, 159; 1939, 260, 163; *Potter V. R.*: *Energy Transformations and Cancer Problem*, *Advanc. Enzymol.*, 1944, 4, 201; *Cykl referatów Pottera V. R.*, *Olsena R. E.*, *Weinhouse'a* w *Canc. Res.*, 1951, 11, 565 — 591; *Kits*, *Greenberg D. M.*: *Canc. Res.*, 1951, 11, 791; *Potter V. R.*, *Le Page G. A.*, *Klug H. L.*: *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 619; *Potter V. R.*, *Lyle G. G.*: *Canc. Res.*, 1951, 11, 355. — 30) *Adams D. H.*: *Brit. J. Canc.*, 1950, 4, 183; *Euler H.*, *Heller L.*: *Ztschr. Krebsf.*, 1949, 56, 393; *Greenfield R. E.*, *Meister A.*: *Canc. Res.*, 1950, 10, 222.

31) Bogaty różnorodny materiał obejmujący piśmiennictwo dotyczące tego zagadnienia znajdzie czytelnik w monografiach: *Greenstein J. P.*: *Biochemistry of cancer*, New York, 1947 i *Mardaszew S. R.*: *Enzimologia opucholei*, Moskwa 1948. — 32) *Carruthers C.*, *Suntzeff V.*: *Canc. Res.*, 1947, 7, 9; *Arch. Biochem.*, 1948, 17, 261.

STANISŁAW JÓZKIEWICZ (ROKITNICA BYTOMSKA)

CHEMICZNE CZYNNIKI RAKOTWÓRCZE

Historia badania przyczyn powstawania nowotworów datuje się od początku XVIII wieku, kiedy chirurg angielski *Pott* opisał raka moszny u kominiarzy i przypisywał go działaniu sadzy na skórę.

W miarę rozwoju przemysłu, w ciągu XIX stulecia, obserwowano coraz częstsze przypadki raka skóry, szczególnie u pracowników przemysłu smołowego, parafinowego i węglowego. W r. 1837 opisano pierwszy przypadek raka wywołanego przez olej mineralny przy naoliwianiu szpul u pracowników przemysłu przedziałniczego w Anglii (*von Volkmann*).

Te i podobne spostrzeżenia, np. raka wargi u starych rybaków, mających zwyczaj trzymania nasmołowanych sieci w zębach, raka antracenowego i naftowego, doprowadziły do prób wywołania u zwierząt choroby sztucznie, a liczne badania w tym kierunku wytworzyły z czasem pojęcie chemicznych czynników rakotwórczych. Tym mianem obejmujemy dzisiaj nie tylko ciała chemiczne, które wywołują nowotwory złośliwe pochodzenia nabłonkowego, ale i te, które są przyczyną powstawania wszelkich innych nowotworów.

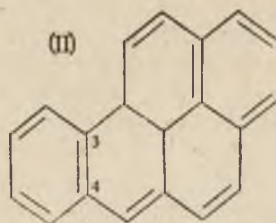
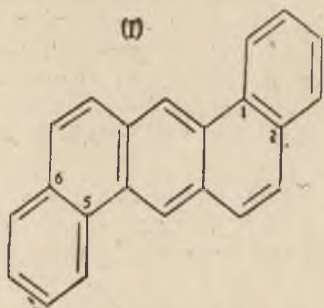
Jeżeli dla czynników rakotwórczych przyjąć za podstawę ich podziału budowę chemiczną lub wyniki ich działania, czy też wreszcie — surowce, z których je można wyodrębnić, to ciała te można sklasyfikować w pewne grupy.

Pierwsza próba *Hanaua* (1889) wywołania raka skóry u szczurów i myszy przez smarowanie skóry smołą pogazowa z węgla brunatnego nie dała wyników dodatnich. Dopiero dwadzieścia lat później udało się Japończykom — *Yamagiwie* i *Ishikawie* wywołać nowotwory złośliwe przez wcieranie smoły pogazowej w uszy królika. W trzy lata później *Tsutsui*, uczeń *Yamagiwy*, wykazał, że podobne zabiegi mogą nawet służyć jako dogodna metoda biologiczna badania smoły rakotwórczej. Prawie równocześnie *Passy* wywołał nowotwory złośliwe smarując skórę myszy eterowym wyciągiem sadzy. Te fakty wyraźnie stwierdzały, że smoła pogazowa ma zdolność wywoływania raka, nie wiadziiano jednak, która frakcja smoły może być tego przyczyną. Pierwsze próby nad destylacją frakcywną smoły i wyizolowaniem czynnych substancji rakotwórczych, wykonane przez *Blocha* i *Dreifussa* w 1921 roku, wykazały, że substancje czynne znajdują się w wysokowrzących frakcjach smoły.

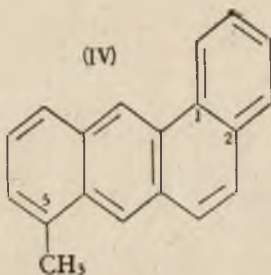
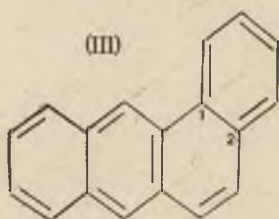
Sztuczne substancje smołowe, uzyskiwane przez *Kenawaya* w roku 1925 drogą przerzucania lub prażenia nierzecznych materiałów, jak węgiel, naftę, skórę, włosy, drożdży, cholesterolu, lub droga przemyszczenia acetyleny i izopreny z wodorem przez silnie oszrony rur, wykazywały także czynność rakotwórczą i to tym wyższą, im wyższa była temperatura reakcji (450—1250°).

W tej pierwszej fazie badań stwierdzono więc, że czynniki rakotwórcze należą do grupy węglowodorów, zbudowanych ze skondensowanych pierścieni aromatycz-

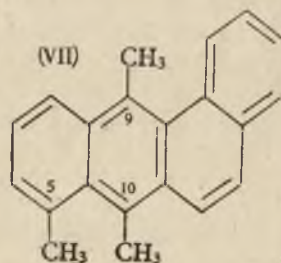
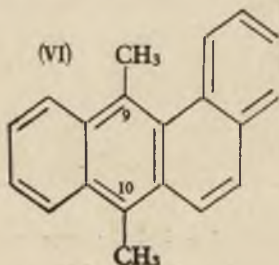
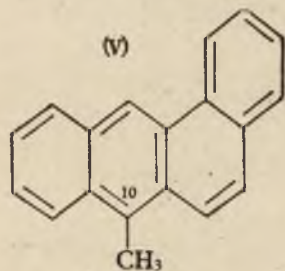
nych. Jest to pierwsza grupa ciał rakotwórczych o znaczeniu historycznym. Pierwszym, wyisobnionym ze smoły, czystym związkiem, wykazującym wyraźne właściwości rakotwórcze był 1,2,5,6-dwubenzooantracen (I) oraz 3,4-benzopiren (II) (Kennaway, Hieger, 1930).



Badania spektrograficzne i preparatywne lat ostatnich wykazały, że 3,4-benzopiren znajduje się w smołe pogazowej w dość znacznych ilościach, dochodzących nawet do 1,5% (Berenblum, Schoental, 1943—45).



Doświadczenia na zwierzętach z użyciem związków homologicznych antracenu pozwoliły na wyodrębnienie drugiej grupy substancji rakotwórczych. Wprawdzie działanie rakotwórcze 1,2-benzooantracenu (III) jest bardzo słabe, wzmaga się ono jednak znacznie przez wstawienie grupy metylowej w pozycji 5 (IV). Wpływ dodatkowego podstawnika na węglu piątym uwidacznia się już zresztą w omawianym uprzednio 1,2,5,6-dwubenzooantracenie (I). Podobne wzmoczenie aktywności



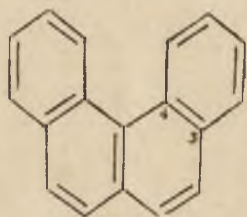
ności rakotwórczej stwierdza się dla pochodnych 1,2-benzooantracenu z dodatkową grupą metylową w pozycji 9 lub 10, z których 10-metylo-1,2-benzooantracen (V) jest najbardziej czynnym związkiem tej grupy. Pozycje 5 i 10 są więc najbardziej uprzywilejowane, skoro pozostałe pochodne metylowe, z grupami CH_3 w innych miejscach cząsteczki 1,2-benzooantracenu, wykazują działanie bardzo słabe albo nie są aktywne w ogóle.

Ze zwiększaniem się ilości grup CH_3 w 1,2-benzoantracenie obserwuje się dalszy wzrost aktywności rakotwórczej, np. 9,10-dwumetylo-1,2-benzoantracenu (VI) lub 5,9,10-trójmetylo-1,2-benzoantracenu (VII) są silnymi ciałami rakotwórczymi tej grupy.

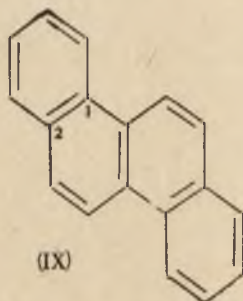
Natomiast pochodne, zawierające ponad trzy grupy metylowe, wykazują znaczny spadek aktywności fizjologicznej. Podstawienie uprzywilejowanych pozycji 5,9 i 10 w 1,2-benzoantracenie innymi grupami, np. grupą nitrową, tlenową lub chlorowcową, powoduje także znaczne wzmoczenie aktywności. Przeciwnie — grupa fenolowa albo uwodorkowanie poszczególnych pierścieni 1,2-benzoantracenu znoszą działanie rakotwórcze zupełnie.

Wynika z tego, że na stopień aktywności ciał rakotwórczych tej grupy wpływają: jakość, ilość i pozycje podstawników, jednym słowem — aktywność jest uwarunkowana pewną jakościową i optymalną konfiguracją samej cząsteczki związku.

Trzecia grupa ciał rakotwórczych obejmuje pochodne metylowe 3,4-benzofenantrenu (VIII) i chryzenu (IX), z których zwłaszcza 2-metylo-3,4-benzofenantren (X) oraz 3,4-dwumetylochryzen (XI) są wybitnymi substancjami rakotwórczymi.

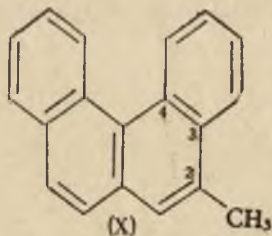


(VIII)

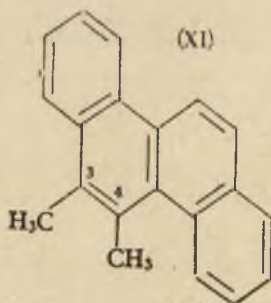


(IX)

Zastąpienie środkowego, sześciowęglowego pierścienia pierścieniem pięciowęglowym powoduje obniżenie czynności rakotwórczej; pochodne fluorenu (XII) wykazują zmniejszoną aktywność.

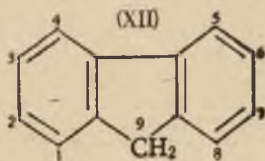


(X)

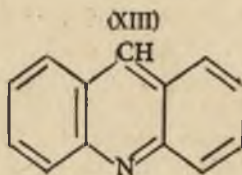


(XI)

Właściwości rakotwórcze należy z kolei rozszerzyć na węglowodory cykliczne, zawierające azot lub siarkę, zwłaszcza na 2-aminopochodne naftalenu, antracenu



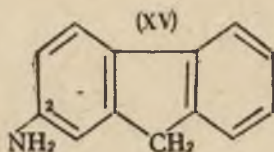
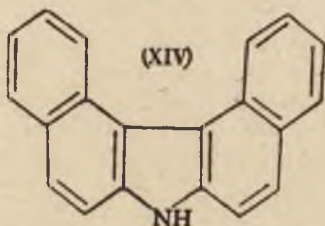
(XII)



(XIII)

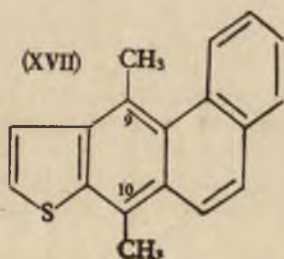
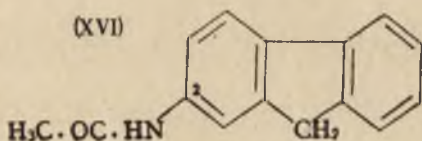
i fluorenu. *Lacassagne* i inni (1945) zwrócili uwagę na metylowe pochodne akrydyny (XIII), substancji macierzystej znanych antyseptyków tryptaflawiny i panflawiny. W działaniu tych pochodnych obserwuje się podobny wpływ pozycji grup metylowych w cząsteczce na wzmoczenie siły rakotwórczej, jaki już opisano dla związków grup poprzednich. Pochodne 1,2-dwumetylowe są wybitnie rakotwórcze, pochodne 3,4-dwumetyloakrydyny przeważnie nie wykazują aktywności.

Ze związków cyklicznych zawierających azot wymienić jeszcze należy 3,4,5,6-dwubenzokarbazol (XIV), uważany za jeden z produktów pośrednich, powodujących raka pęcherza u farbiarzy. Podobnie działają 2-aminofluoren (XV) i 2-acetyloaminofluoren (XVI).



Cechą charakterystyczną tych ostatnich związków jest to, że wywołują one raka nie tylko lokalnie — co jest typowe dla ciał rakotwórczych grup poprzednich — lecz i w narządach wewnętrznych, najczęściej w płucach, wątrobie i pęcherzu moczowym.

Przykładem ciał rakotwórczych zawierających siarkę jest otrzymana przez *Tilaka* (1946) pochodna 9,10-dwumetylo-1,2-benzoantracenu, w której pierścien benzenowy zastąpiono rodnikiem tiofenowym (XVII).



Omówione dotychczas związki występują w produktach suchej destylacji węgla lub otrzymano je syntetycznie. Działanie fizjologiczne tych ciał można wykazać przez pędzlowanie skóry lub wstrzyknięcia podskórne. Pędzlowanie 2—3 razy w tygodniu myszy 0,3% roztworem benzopirenu (II) w eterze lub benzenie, wywołuje nowotwory skóry po 70—100 dniach zabiegów. Jest rzeczą interesującą, iż minimalna ilość tych związków, wyrażająca się niekiedy gamma wartościami, zdolna jest do wywołania efektu fizjologicznego. W ten sposób niektóre z omówionych węglowodorów aromatycznych stają w jednym szeregu z ciałami czynnymi ustroju — witaminami i hormonami.

W miarę rozwoju naszych wiadomości o sterydach stwierdzano, że liczne związki naturalne tego typu — kwasy żółciowe, hormony płciowe — zawierają skondensowany układ pierścieniowy, podobny do układu w węglowodorach rakotwórczych.

Jakkolwiek możliwość powstawania chemicznych ciał rakotwórczych w samym ustroju zwierzęcym była brana pod uwagę już dość dawno, to dopiero wykazanie właściwości rakotwórczych niektórych związków sterolowych stworzyło nowe perspektywy w tym zagadnieniu.

W r. 1933 *Wieland, Dane, Cook i Haslewood* otrzymali, przez odwodorowanie kwasu dezoksychołowego, aromatyczny węglowodór 20-metylocholanren (XVIII).

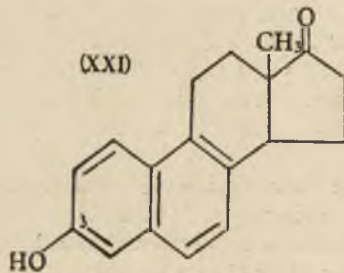
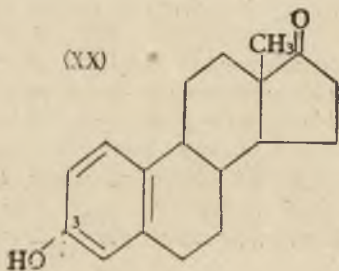
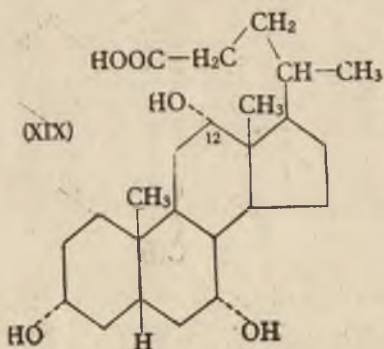
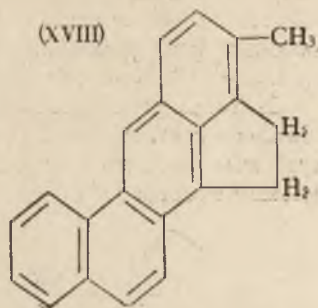
Związek ten o szkielecie steranowym, spokrewniony zatem strukturalnie z ciałami, które w przemianie materii odgrywają różnorodną, ale stale ważną rolę — hormonami płciowymi, hormonami kory nadnercza, witaminami grupy D — okazał się wybitnie rakotwórczy.

Wprawdzie szkielet metylocholanrenu został — jak widać — zaromatyzowany, a przez przyłączenie p.ątego pierścienia — powiększony, ale jego chemiczna łączność ze sterydami została udowodniona przez przeprowadzenie cholesterolu i kwasów żółciowych w 20-metylocholanren (XVIII) w warunkach laboratoryjnych (*Wieland, Cook, Fieser, Windaus, 1933*). Fakt ten, że sterydy, naturalne dla ustroju żywego, mogą być przemienione *in vitro* w węglowodór czynny rakotwórczo, nasunął przypuszczenie, iż podobny proces może zająć *in vivo*. Sterole, kwasy żółciowe, hormony męskie i żeńskie, hormony kory nadnercza mogłyby zatem w procesach patologicznej przemiany materii ulegać degradacji aż do substancji zdolnej do wywołania raka. Przemiana ta polegałaby na wytworzeniu nowego pierścienia, a tym samym na stworzeniu układu wielopierścieniowego charakterystycznego dla węglowodorów rakotwórczych.

Do tej pory nie wiemy na pewno, czy tego rodzaju reakcje zachodzą w ustroju zwierzęcym, można to jedynie przyjąć za wielce prawdopodobne. Faktem jest, że zarówno kwas cholowy (XIX), jak i dezoksychołowy mają grupę hydroksylową na C₁₂ w takiej pozycji, która ułatwia zamknięcie w bocznym łańcuchu.

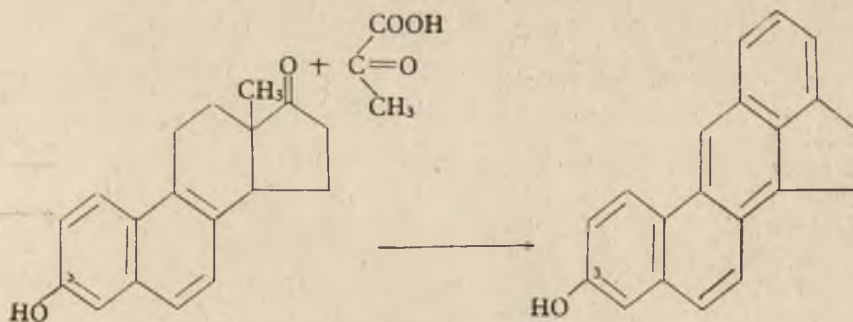
Potwierdzeniem tej hipotezy były doświadczenia *Ghirona i Kennawaya*, którzy powodowali nowotwory tkanki łącznej u myszy przez wstrzyknięcie kwasu dezoksychołowego. Zagadnienie, czy sam kwas dezoksychołowy, czy też produkt jego metabolizmu wywołuje raka, nie jest do tej pory rozstrzygnięte.

Sterydy, a także produkty ich przemiany mają pierścienie uwodorowane. Natomiast uwodorowanie pierścieni aromatycznych w związkach rakotwórczych, otrzymanych syntetycznie, wpływa — jak już wyżej wspomniano — na zanik ich aktywności. Przemiany zatem sterydów w organizmie zwierzęcym musiałyby być związane z aromatyzacją pierścieni dla wywołania czynności rakotwórczej. Na takie możliwości w ustroju żywym wskazują naturalne hormony żeńskie:



estron (XX) i ekwilenina (XXI), substancje z pierścieniami częściowo aromatycznymi.

Układ ekwileniny powstaje najprawdopodobniej z bardziej uwodorowanego układu cyklopentanofenantrenu. Jeżeli uznać tę hipotezę za słuszną, to powstawanie ciał rakotwórczych w organizmach zwierzęcych byłoby spowodowane zaburzeniami w metabolizmie sterydów, z których — w warunkach normalnych powstają hor-



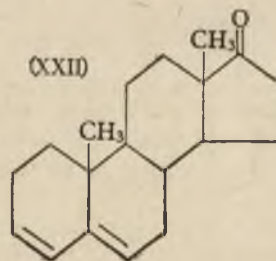
Schemat I

mony płciowe lub hormony kory nadnercza, zaś w warunkach wadliwej przemiany materii — substancje rakotwórcze.

Według *Fiesera* (1941) kondensacja ekwileniny z kwasem pirogronowym (schemat 1) może prowadzić do układu, który byłby zdolny do cyklizacji z wytworzeniem dodatkowego pierścienia aromatycznego. Uwodorowanie związku tak powstałego dałoby układ cholantrenowy.

Ale ten układ stanie się rakotwórczym dopiero po usunięciu grupy OH z węgla trzeciego, która w sterydach — jak skądinąd wiadomo — jest dość trwale związana. Odszczepienie takiej może jednak zachodzić niekiedy w ustrojach zwierzęcych, o czym świadczyłby fakt wyizolowania z moczu samca z nowotworem nadnerczy związku nie mającego grupy wodorotlenowej na węglu trzecim, tzw. Δ -3,5-androstandien-17-onu (XXII).

Fieser (1941) uważa ponadto sterole kory nadnercza za związki macierzyste dla substancji rakotwórczych, występujących w ustroju. Za tą koncepcją przemawiałyby powstawanie raka z komórek kory nadnercza u myszy, którym wkrótce po urodzeniu wycięto jajniki lub jądra. Jest rzeczą charakterystyczną, że równoczesne podawanie dwuetylostilbestrolu tym zwierzętom doświadczalnym zapobiega powstawaniu raka kory nadnercza (*Woolley i Little*, 1946)

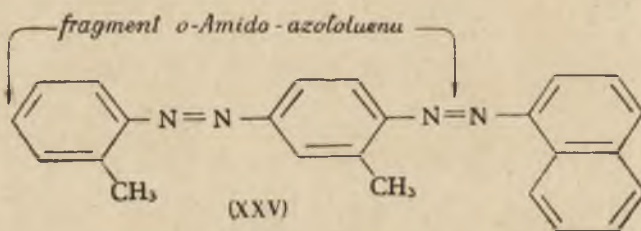
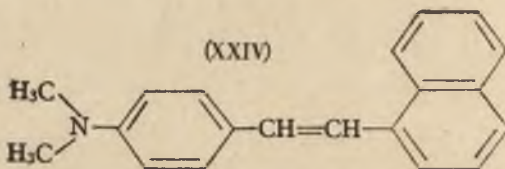
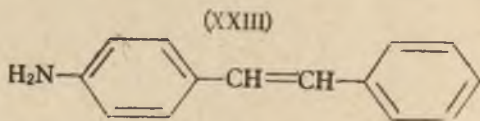


Że jednak i hormony seksualne mogą być związkami rakotwórczymi, wynikać to miało z prac *Lacassagne'a* (1937), który wywołał raka sutka u samców po wstrzyknięciu żeńskiego hormonu płciowego, a więc związku naturalnego w ustroju zwierzęcym. Doświadczenia wspomnianego autora rozwinięto szczególnie w latach ostatnich, stosując naturalne i syntetyczne estrogeny, pod wpływem których wywoływano nowotwory najrozmaitszych narządów (*Burrows i Horning*, 1947).

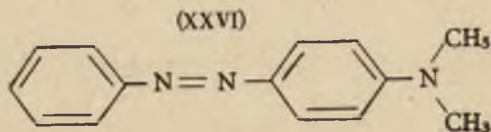
Stwierdzono przy tym, że związki syntetyczne: 5,6-cyklopentano-1,2-benzoantracen i 3,4-benzopiren odznaczają się nie tylko zdolnością rakotwórczą, ale i słabym działaniem estrogennym (*Cook i Doods*). Te obserwacje doprowadziły do syntezy wielu sztucznych estrogenów, wykazujących równocześnie dużą czynność rakotwórczą.

W wyniku badań nad ciałami hamującymi wzrost komórek wykryto nową grupę związków o działaniu rakotwórczym. Punktem wyjściowym w tym przypadku było spostrzeżenie, że wiele węglowodorów aromatycznych o właściwościach rakotwórczych odznacza się przy tym zdolnością hamowania wzrostu. Można było z tego wnioskować, że odwrotnie — pochodne aminostilbenu (XXIII), jako substancje wysoce antywzrostowe, wykażą przy tym własności rakotwórcze. Badania biologiczne potwierdziły słuszność tych wniosków, przy czym szczególnie rakotwórczą w tej dużej grupie związków, okazała się pochodna przedstawiona wzorem XXIV. Wykazano także, że głównym warunkiem aktywności nowotworowej tych związków jest obecność grupy aminowej w położeniu para względem mostka etylenowego.

Znaczna ilość pozostałych związków rakotwórczych należy do barwników azowych. Fischer w 1906 roku wywołał po raz pierwszy nowotwory nabłonka na uchu królika przez wstrzyknięcie czerwieni purpurowej (XXV). Działanie tego barwnika, według późniejszych badań, odnieść należy do obecności w cząsteczce fragmentu *o*-amido-azotoluenu, ciała o znacznym działaniu rakotwórczym. W tej grupie związków zaobserwowano także współzależność między chemiczną budową (wpływ jakości i ilości podstawników) cząsteczki a jej aktywnością biologiczną.

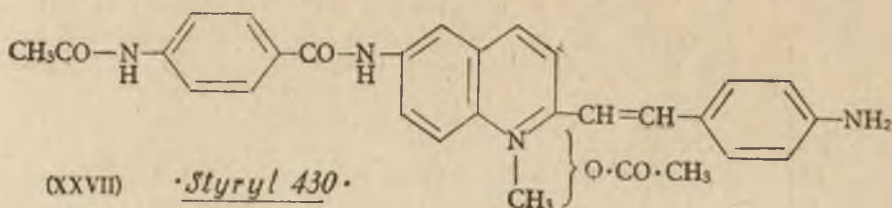


Działanie rakotwórcze barwników azowych jest o tyle godne podkreślenia między innymi, że jeden z nich, tzw. żółcień masłową (XXVI), stosowano do barwienia tłuszczów i margaryny. W doświadczeniach na zwierzętach wywoływało nowotwory wątroby przez zastrzyki tego barwnika.



W badaniach eksperymentalnych, opierając się na analogiach z ciałami rakotwórczymi o znanej już budowie chemicznej, syntetyzuje się z dnia na dzień w laboratoriach całego świata nowe związki o działaniu rakotwórczym. Że istnieje możliwość przypadkowego wykrycia również takich związków organicznych, których struktura chemiczna nie wchodzi w grupy związków wyżej omawianych, świadczy o tym choćby fakt wykazania działania rakotwórczego substancji wykrytej przez *Browninga* (1933). Ten związek, zwany „Styrylem 430“, należy do barwników grupy chinolinowej, o dość skomplikowanej budowie (XXVII).

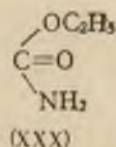
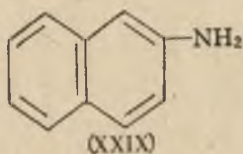
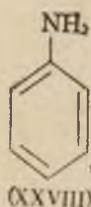
Do związków rakotwórczych, które stoją poza grupami dotychczas opisanymi, należy także anilina (XXVIII) i jej pochodne, których działanie odnosi się do raka anilinowego pęcherza moczowego, zaobserwowanego już przez *Rehna* (1895)



u pracowników przemysłu anilinowego. Rak ten, wywołany działaniem tych związków na błonę śluzową pęcherza, powstaje najczęściej po dwóch, a średnio dopiero po osiemnastu latach pracy w tym zawodzie.

Rak pęcherza może być wywołany ponadto także działaniem beta-naftyloaminy (XXIX).

Na uboczu grup ogólnych stoi wreszcie karbaminian etylu, zwany uretanem (XXX), substancja o działaniu m. in. nasennym, chemicznie spokrewniona z moczynikiem. W ostatnich latach zauważono (*Nettelship, Henshaw, Jaffe*), że uretan, wstrzyknięty w postaci 10% roztworu lub podany w ilości 0,2% wagi pokarmu, wywołuje gruczolaki oskrzeli. Według badań *Larsena* i *Hestona* (1945) działanie rakotwórcze osłabia się w tych pochodnych uretanu, w których podstawiono wodory grupy aminowej lub zastąpiono grupę etylową innymi resztami.



Osobną pozycję wśród czynników rakotwórczych zajmują niektóre pierwiastki, a także ich izotopy oraz pierwiastki promieniotwórcze. Ich działanie wiąże się niejednokrotnie z zagadnieniem raków zawodowych. Z tej racji poświęcono tym czynnikom szczególnie wiele badań.

Niektóre schorzenia wywołane arsenem lub związkami arsenu są znane od dawien dawna. Nowotwory płucne obserwowano u górników zatrudnionych w kopalniach rud arsenowo-kobaltowych. Za przyczynę tzw. choroby reichensteinowskiej* uważa się arsen zawarty w wodzie do picia. Długotrwałe stosowanie środków leczniczych zawierających arsen może być także przyczyną nowotworów. Pomimo obszernych badań nad arsenem i jego właściwościami działanie arsenu nie jest dołądnie wyjaśnione, głównie z powodu trudności w eksperymentowaniu na zwierzętach. Duża toksyczność arsenu i jego związków sprawia, że zwierzęta padają jeszcze przed zakończeniem właściwego doświadczenia. Przypuszcza się, że arsen jest tylko czynnikiem współdziałającym z innymi w powstawaniu nowotworu. Stwierdzono np., że długotrwałe zewnętrzne stosowanie arsenu do celów leczniczych powoduje nadmierną pigmentację skóry. Arsen działa w tym przypadku jako czynnik drażniący, który prawdopodobnie wpływa równocześnie na procesy oksydo-redukcyjne wewnątrz komórki. Uwolnione przy tym pewne ciała chemiczne, m. in. barwniki melaninowe, są być może związkami macierzystymi dla właściwych węglowodorów aromatycznych.

* Od miejscowości kuracyjnej Reichenstein w Sudetach.

Z innych metali o działaniu rakotwórczym na uwagę zasługują: nikiel, wywołujący raka nosa i płuc u pracowników zakładów niklowych, i chrom — przyczyna raka płuc i zatok szczęki górnej u pracowników przemysłu chromowego.

Liczne badania poświęcono działaniu rakotwórczemu pierwiastków radioaktywnych. Długotrwałe oddychanie pyłem zawierającym sole lub emanacje radu powoduje raka płuc u górników z kopalni radu w Joachimstalu. Stwierdzono ponadto, że radioaktywny stront, pluton, cer i prazeodym powodują powstawanie mięsaków kości. W Ameryce znane są przypadki mięsaków kości u młodych pracowników trudniących się malowaniem tarcz zegarowych świecących w ciemności. Sole miedzi i radu znajdujące się w farbie używanej do tego celu wchłaniają się do krwiobiegu tych robotników, mających zwyczaj zwilżania pędzelka językiem.

Przedstawione powyżej przykłady różnych czynników chemicznych, odpowiedzialnych bezpośrednio lub pośrednio za wywołanie złośliwych zmian w tkance organizmu żywego, nie wyczerpują oczywiście wszystkich substancji, mniej lub więcej poznanych dotychczas w ilości około 500. Faktem jest, że rozwój przemysłu wiąże się z poznaniem nowych czynników rakotwórczych i poznaniem nowych odmian raka zawodowego. Poznaje się raka zawodowego w narządach, w których go dotychczas nie widywano, a liczba tych przypadków znacznie wzrasta.

Rodzaj nowotworu, czas trwania okresu wylegania, wiek chorego, zaatakowany narząd — to momenty, które zależą od charakteru czynnika rakotwórczego, od sposobu i nasilenia jego działania i od konstytucji chorego.

Wykryto wprawdzie wiele czynników chemicznych swoście rakotwórczych, zawartych w surowcach i materiałach, ale i sposób produkcji wpływa także na występowanie nowotworów. Tak, np. raka płuc u robotników mających kontakt z solami chromu spotykano wyłącznie w Niemczech, u pracowników zaś fabryk niklu — wyłącznie w Anglii.

Nie ulega wątpliwości, że z postępem metod eksperymentalnych i analitycznych zwiększy się liczba nie znanych nam dotychczas substancji rakotwórczych zawartych w surowcach przemysłowych, a także w materiałach pokarmowych.

Na tym tle staje się jasna konieczność naukowej organizacji przemysłu i akcja zapobiegawcza. Istnieje możliwość rozprzestrzeniania się czynnych dawek ciał rakotwórczych przez powietrze na znaczną odległość od punktu fabrycznego, czego dowiodły badania *Hiegera*, który stwierdził obecność rakotwórczego 3,4-benzopirenu w powietrzu fabrycznych dzielnic Londynu.

Dawki ciał rakotwórczych, potrzebne do powstawania nowotworów, są wogowo znikome. Najmniejsze czynne dawki, np. dwubenzoaetracenu i benzopirenu wynoszą 1,95 gamma, metylocholantrenu zaś 0,2 gamma*.

Zagadnienie najmniejszych dawek czynnych ciał rakotwórczych i wyniki badań, dotyczących ciał o niskiej zdolności rakotwórczej, zostały ostatnio podważone przez badaczy radzieckich, którzy metodą fluorescencyjną stwierdzili w pracowniach doświadczalnych z ciałami rakotwórczymi ślady tych ciał — na narzędziach, szkle, fartuchach itp. Z tych przyczyn wiadomości o właściwościach rakotwórczych odkrywanych niejednokrotnie dla substancji, dotychczas o te właściwości nie podejrzewanych, powinny być brane z dużą dozą ostrożności.

Panuje przekonanie, że siła rakotwórcza niektórych substancji zwiększa się lub zmniejsza w niektórych przypadkach, w zależności od stosowanych równocześnie rozpuszczalników. Z rozpuszczalników, które podwyższają działanie rakotwórcze, można wymienić oliwę, olej sezamowy, parafinę, benzen, cholesterol. Natomiast niektóre tłuszcze zwierzęce mają zdolność hamowania aktywności rakotwórczej. Na przykład — siła rakotwórcza 3,4-benzopirenu, wstrzykiwanego myszom podskórnie, wzrasta przez rozpuszczenie tego związku w 3% roztworze cholesterolu w trój-

* 10⁻⁶ grama.

kaprylinie, zaś zmniejsza się, jeżeli rozpuścić 3,4-benzopiren w trójkaprylinie, zawierającej 1,5% lecytyny.

Przy interpretowaniu wyników podobnych badań zalecana jest także pewna ostrożność. Swego czasu posługiwano się do zastrzyków podskórnych roztworami węglowodorów rakotwórczych w smalcu lub oliwie. Wykazano jednak z czasem, że te rozpuszczalniki mogą same w pewnych warunkach stać się przyczyną powstawania nowotworów złośliwych. Czynne rakotwórczo okazały się tłuszcze ogrzewane powyżej 270°. Nie wiadomo zatem, czy w pewnym stopniu przyczyną raka przewodu pokarmowego nie jest spożywany tłuszcz stapiany w gospodarstwie domowym.

Wysuwa się ostatnio przypuszczenie, że i cholesterol, jeżeli nie jest sam w małym stopniu rakotwórczy, to w każdym razie może być nosicielem małych cząstek rakotwórczych. Rak skóry i „dietetyczny“ rak żołądka łączą obecnie niektórzy badacze z fotochemicznymi lub termicznymi produktami utlenienia cholesterolu.

Badania nad chemizmem związków rakotwórczych wiążą się z zagadnieniem ich przemian i mechanizmu działania w ustroju zwierzęcym.

Działanie rakotwórcze jest funkcją wielu czynników: natury związku rakotwórczego, ilości podawanej substancji, sposobu i czasu podawania, rodzaju zwierzęcia, jego płci i wieku, wrażliwości indywidualnej i miejsca zastrzyknięcia substancji rakotwórczej. Na aktywność rakotwórczą, poza strukturą samego związku, wywierają ponadto wpływ czynniki towarzyszące, jak składniki pobieranego równocześnie pokarmu, ilości osobników żyjących razem i prawdopodobnie jeszcze inne czynniki, dotychczas nie poznane.

Mottram (1945) wykazał, że 3,4-benzopiren był bardziej czynny wówczas, gdy wcierano go w skórę myszy o północy, niż w zabiegach, dokonywanych w południe. Prawdopodobnie słońce było tu czynnikiem hamującym.

Mówiąc o mechanizmie działania, należałoby znać dokładnie drogi przemian każdego z tych tak licznych związków rakotwórczych. Stwierdzenie faktu, że antra-cen hamuje w znacznej mierze utlenianie się benzoaldehydu, nasuwa przypuszczenie, że węglowodory rakotwórcze działają hamująco na normalne procesy oksydacyjne komórki przez zatrucie lub unieczynnianie enzymów ustrojowych. Czynniki rakotwórcze mają także zakłócać drogi normalnej syntezy białka ustrojowego.

Działanie czynników rakotwórczych przyrównuje się do działania enzymów. Jeżeli jednak enzym pasuje do reakcji jak klucz do zamka, to ciało rakotwórcze wciska się w strumień normalnych reakcji życiowych — jak wytrych, zmieniając jego kierunek i wprowadzając je w nowe łożysko.

Działanie hamujące lub przyspieszające niektórych rozpuszczalników, a także różne stopnie osłabiania aktywności rakotwórczej, np. przez stosowanie iperytu i jego pochodnych, zestalonego dwutlenku węgla lub związków chemicznych ze słabo związanym atomem chlorowca, to fakty, które z innymi obserwacjami wskazywałyby na to, że czynnym rakotwórczo nie jest sam związek, lecz dopiero produkt jego metabolizmu.

O metabolizmie związków rakotwórczych wiemy na ogół jeszcze bardzo mało. Skoro weźmiemy pod uwagę, iż większość ciał rakotwórczych to substancje w wodzie nie rozpuszczalne, to należy raczej przypuszczać, że dopiero przemiana na związki rozpuszczalne odsłania właściwości biologiczne. Rozważając metabolizm substancji rakotwórczych pod tym kątem widzenia, trzeba mieć na uwadze, że przemiany tych związków w ustroju mogą zachodzić w kierunku wytwarzania związków aktywnych lub nieczynnych i że związki rakotwórcze mogą ulegać różnym przemianom ustrojowym w zależności od gatunku danego zwierzęcia. I tak np. 1,2,5,6-dwubenzoańtracen (I) przemienia się na inne produkty w organizmie szczura niż u królika, skoro u szczura wywołuje on z reguły powstanie nowotworu, spotykanego u królika na tej drodze doświadczalnej tylko wyjątkowo.

Prawdopodobne zatem jest, że swoista przemiana materii różnych organizmów

w pierwszym przypadku sprzyja, w drugim zaś przeciwstawia się rozwojowi właściwej czynności substancji, uważanej za rakotwórczą. Tak postawiona hipoteza jest podstawą rozległych badań nad losami substancji rakotwórczych, a jej potwierdzenie zbliżyłoby nas bardzo do wyjaśnienia mechanizmu procesów nowotworowych w ustroju. Co więcej, można by wpływać na przebieg funkcji fizjologicznych w pożądanym kierunku i zapobiegać w ten sposób wytwarzaniu się nowotworów.

Procesy utleniania z reguły stanowią pierwszy etap zmian, którym ulegają obce ustrojowi i szkodliwe substancje. Wprowadzenie grup fenolowych w pierścienie aromatyczne jest tego typowym przykładem. Podobnie związki rakotwórcze ulegają przynajmniej w pewnej mierze utlenianiu i są wydalane z ustroju w postaci rozpuszczalnych pochodnych fenolowych. Fenolowa grupa jest zazwyczaj wprowadzana do pozycji alfa rodnika naftalenowego lub do analogicznego położenia w bardziej złożonych węglowodorach, w których naftalen wchodzi w skład szkieletu cząsteczki. Ponieważ nie obserwuje się podstawiania grupą OH w najbardziej czynnych położeniach mezo, należy przypuszczać, że węglowodór łączy się najpierw z enzymem lub jakimiś innymi składnikami komórki — przez węgle 9 i 10, co sprawia, że tylko boczne łańcuchy zostają podatne do zaatakowania (*Weil, Malherbe, 1946*).

Badania nad przemianą antracenu wykazały, że ten węglowodór w ustroju ulega przede wszystkim działaniu nadtlenu wodoru celem przejścia w związki rozpuszczalne (*Fieser, 1941*). Być może zatem, że niektóre węglowodory rakotwórcze przemieniają się w fenole przez stadium np. dioli i ich następne odwodorowanie. Potwierdzeniem tego było wyodrębnienie takich dioli z moczu królików, którym podawano antracen lub naftalen. Wyodrębnione diole miały konfigurację *cis*, a diol z moczu królika był optycznie czynną mieszaniną formy *d* i *l*. W moczu królików u szczurów znajdowano — obok dioli, także monoglikuronidy, co potwierdza z kolei obserwacje z ogólnych detoksykacji ustrojowych.

Przeprowadzono również badania, szczególnie w ZSRR (*Morozenskaja*), nad przemianami, jakim ulegają w ustroju substancje rakotwórcze typu barwników azowych. W związkach azowych wiązanie —N=N— zostaje rozerwane, a powstałe produkty ulegają dalszym zmianom. W moczu królika, któremu podawano dwuaminodwuzobenzen, wykryto p-aminofenol, p-fenyldwuaminę oraz ich pochodne acylowe. Produkty przemian ustrojowych aminostilbenów są analogiczne do produktów utleniania p-aminofenolu.

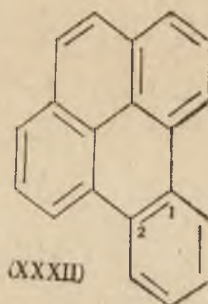
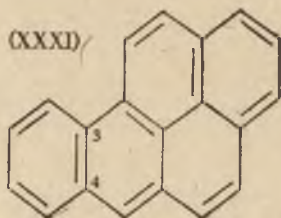
Wydaje się, iż wiele światła na mechanizm i produkty przemian związków rakotwórczych w ustroju rzuca coraz liczniejsze badania substancji wyciągowych z tkanek lub moczu osób zmarłych na raka (*Szadow, ZSRR*).

Jak łatwo zauważyć z podanego przeglądu związków chemicznych, ciała mające różną budowę chemiczną są zdolne do wywoływania chorobowych zmian w komórce, przy czym końcowy wynik biologiczny jest we wszystkich przypadkach jednakowy. Nasuwa się zatem pytanie, czy istnieje jakaś łączność między tymi różnymi związkami, która byłaby przyczyną ich jednakowej czynności biologicznej i czy ta czynność ma związek z budową cząsteczki.

Hipotez na ten temat jest mnóstwo. *Cook* i *Kennaway* (1935) zakładają, że działanie rakotwórcze zależy od budowy związku oraz kształtu i rozmiarów cząsteczki. Dość obszerne badania w grupie aminostilbenu (XXIII) wykazały w dużym stopniu zależność między czynnością biologiczną a budową chemiczną.

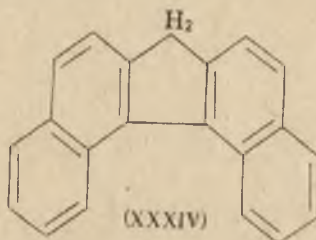
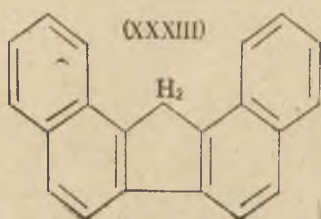
Według *Bergmanna* (1942) koniecznym, choć nie wystarczającym warunkiem czynności jest strukturalna współzależność substancji działających rakotwórczo i receptora komórkowego, z którym wspólnie wytwarzają strukturę rakotwórczą. Potwierdzenie poglądu *Bergmanna* miałyby stanowić przykłady izomerów benzo-pirenu i dwubenzofluorenu, czynnych (XXXI, XXXIII) lub nie wykazujących działania rakotwórczego (XXXII, XXXIV).

Dalszym warunkiem aktywności — według *Bergmanna* — jest obecność mostka etylenowego w cząsteczce związku rakotwórczego z podstawionymi arylami w położeniu *trans*.

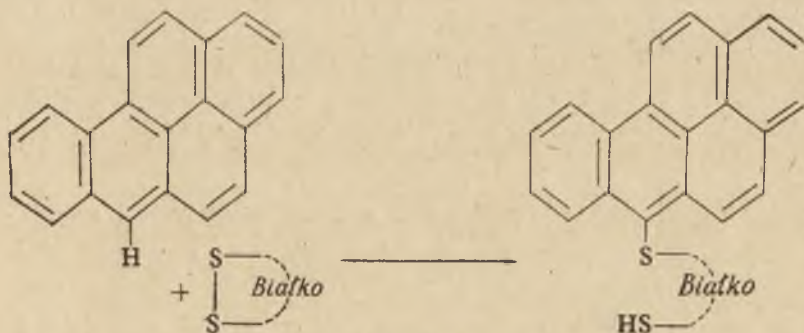


Poglądy *Cooka* i *Bergmanna*, według których wszystkie ciała rakotwórcze mają, w większym lub mniejszym stopniu zbliżyć się do „idealnej” cząsteczki rakotwórczej, nie tłumaczą jednak działania wszystkich substancji rakotwórczych.

Podobnie nie wystarczająca jest hipoteza *Fiesera* (1941), według którego wstępnym etapem działania biologicznego węglowodorów rakotwórczych jest łatwość podstawiania w położeniu mezo. Podstawianie siarką *in vitro*, zachodzące bez trudu, pozwala przewidywać możliwość połączenia między węglowodorem rakotwórczym



a układem S—S cząsteczki białkowej *in vivo*. Rozerwanie wiązania S—S prowadziłoby do przyłączenia węglowodoru rakotwórczego przez siarkę do cząsteczki białka, z równoczesnym wytworzeniem ugrupowania sulfohydrylowego —SH (wg schematu 2).



Schemat 2

Według *Robisona* (1946) działanie rakotwórcze grupy fenantrenowej jest warunkowane podwójnymi wiązaniami przy węglach 9 i 10 układu fenantrenowego. Tę zależność potwierdzili równocześnie francuscy badacze *A. i B. Pullman*, stosując

w swych rozważaniach teoretycznych mechanikę kwantową, dla uzyskania obrazu rozmieszczenia elektronów, odpowiedzialnych za aktywność cząsteczki rakotwórczej.

Tak zwane wiązania π w związkach chemicznych, są słabsze — jak wiadomo — od wiązań σ . Elektrony π tych wiązań, luźniej związane od innych, są właśnie tymi, które warunkują aktywność rozpatrywanego ciała.

Opierając się na współczesnej elektronowej interpretacji wzajemnego wpływu atomów i wynikającym stąd tzw. efekcie mezomerycznym, udało się autorom po skomplikowanych wyliczeniach matematycznych przewidzieć rozmieszczenie elektronów π w cząsteczkach m. in. antracenu i fenantrenu, a więc w typowych układach aromatycznych węglodorów rakotwórczych.

Nagromadzenie się chmur elektronowych w pewnych szczytowych punktach cząsteczki węglodoru nadaje tym punktom szczególną zdolność reaktywną. W cząsteczce fenantrenu istnieją takie dwa szczyty najbardziej aktywne — na węglach 9 i 10, co tym samym potwierdza praktyczne obserwacje *Robisona*.

Przedstawione poglądy, łącznie z hipotezą *Pullman*, tłumaczą w pewnym stopniu działanie rakotwórcze układów wielopierścieniowych. Być może, że dalsze rozważania, oparte na zasadach mechaniki kwantowej, pozwolą w przyszłości na wnikięcie w mechanizm reakcji ustrojowych i rzuca światło na sposób działania innych substancji rakotwórczych — aminostilbenów, barwników azowych i-uretanów.

Na zasadach mechaniki kwantowej jest oparta także hipoteza *Schrödingera* (1944), zmierzająca do wyjaśnienia działania wszystkich chemicznych czynników rakotwórczych.

Pogląd *Schrödingera* można w skrócie przedstawić następująco: Każdy najmniejszy układ posiada pewną oddzielną ilość energii. Przejście z jednego stanu do drugiego jest kwantowane.

Do stanu niższego układ może przechodzić samorzutnie, emitując przy tym pewien nadmiar energii.

Jeżeli natomiast stan lub konfiguracja druga, w którą układ przechodzi, posiada energię większą, to przy tym przejściu układ musi pobrać energię z zewnątrz. Te warunki są spełniane tylko wówczas, kiedy dwie konfiguracje są sobie bliskie.

Inaczej przedstawia się sprawa przy dwóch konfiguracjach zbyt od siebie oddalonych. Wówczas przejście ze stanu o wyższej energii do stanu o niższej nie odbywa się spontanicznie i może zajść tylko przez stan pośredni o energii większej niż energia stanu początkowego i końcowego.

W naszym zagadnieniu oznacza to, że przejście od komórki zdrowej, normalnej, o wyższym poziomie energetycznym (A), do komórki rakowatej, o poziomie niższym (B), zachodzi poprzez jeszcze wyższy poziom energetyczny (X), do którego powstania potrzebna jest pewna energia z zewnątrz.



Przejście z poziomu A do poziomu B wymaga zatem pewnej energii — jak mówimy — „minimum aktywacji“ (Y). Jak długo działać będzie energia mniejsza od tego „minimum“, zachodzić będą wprawdzie pewne zmiany, ale wrócą one do stanu normalnego (A).

Natomiast — dostarczenie z zewnątrz energii wyższej lub co najmniej równej owemu „minimum aktywacji“, wywoła przejście stanu A do stanu B, a w naszym przypadku — od stanu komórki normalnej do rakowatej. Na dostarczaniu tego „minimum aktywacji“ polegać ma właśnie rakotwórcze działanie czynników chemicznych.

Odwrotnie — przejście od stanu niższego B (komórki rakowatej) do stanu

wyższego A (komórki zdrowej), wymagałoby energii większej od minimum aktywności Z. O ile jednak większej — to niewiadoma, której rozwiązanie dałoby klucz do zwalczania nowotworów.

Promienie X, gamma, ultrafioletowe i pewne związki chemiczne to dotychczas znane czynniki, które mogą być uważane za źródła takich ilości energii, jakie są potrzebne co najmniej do zahamowania dalszego wzrostu komórek nowotworowych.

Prace *Boylanda* i *Weigerta* (1947) nad działaniem 3,4-benzopirenu zdają się wskazywać, że głównym motorem działania rakotwórczego nie jest sam węglowodór, lecz właśnie energia, która się wyzwala w toku przemian tego związku w ustroju żywym.

PIŚMIENNICTWO

- 1) *Angewandte Chemie* (1940), tom 53, 337, 342, 345, 352, 356, 363, 368. — 2) *Billig E. S., Pogosienc E. E.*: *Usp. Sow. Biol.*, 1948, T. XXV. — 3) *British Medical Bulletin: Chemical Carcinogenesis*, vol. 4 Nr 5, 6, 1947. — 4) *Dobrowolskaja-Zawadzka W., Rudali G.*: *Compt. Rend. de la Soc. de Biol.* 1950, 782. — 5) *Euler H. v.*: *Chimija* 6, 1952, 253. — 6) *Greenstein*: *Biochemistry of Cancer*, 1947. — 7) *Lacassagne A.*: *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1948, 705. — 8) *Nasitowski W.*: *Press. Med.* 1949, 1053. — 9) *Pullman A. B.*: *Experientia*, vol. II/9, 364, 1946. — 10) *Zbarskij B. J.*: *Sow. Med.* 1947, Nr 7, 1—4.

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI (KRAKÓW)

BIOCHEMICZNA DIAGNOSTYKA RAKA

Oba poprzednie referaty dotyczyły ważnych problemów z zakresu biochemii nowotworów, których ewentualne rozwiązanie odsłoni szerokie perspektywy, ale które dotychczas jeszcze bardzo luźno wiążą się z bezpośrednim zastosowaniem osiągnięć laboratoryjnych w praktyce lekarskiej. Przeciętny lekarz zdaje sobie sprawę z tego, że nie można spodziewać się w bliższej przyszłości wyjaśnienia istoty raka na drodze badań chemicznych, ale spodziewa się przynajmniej tego, iż biochemik ułatwi mu walkę z nowotworami. Klinicysta ceni sobie wysoko korzyści, jakich dostarcza mu laboratorium chemiczne w rozpoznaniu różnych schorzeń, spodziewa się więc, że i rozpoznanie raka będzie ułatwione mu przez pracownię chemiczną. Przecież wczesne rozpoznanie właściwego nowotworu stanowi już poważny krok na drodze skutecznego leczenia. Dlatego — jak o tym doświadczenie poucza — klinicyści jeszcze bardziej domagają się od chemików metod, które by pozwoliły na stwierdzanie istnienia nowotworów już wtedy, gdy klasyczne kliniczne metody badawcze zawodzą.

Pozornie mogłoby wydawać się nieprawdopodobne, że organizm zwierzęcy, rozporządzający tak mistrzowsko wyspecjalizowanymi zdolnościami samoobrony i samoregulacji, nie potrafi zmobilizować przeciw tkance nowotworowej jakichś reakcji możliwych do zarejestrowania w laboratorium. Można by również spodziewać się, że nowotwór, którego wzrost rujnuje organizm swego nosiciela, jest źródłem jakichś szczególnych związków chemicznych, które nie powinny ująć uwagi chemika lub serologa. W rzeczywistości rozumowanie takie okazuje się nietrafne. Być może, że istnieje samoobrona ze strony obciążonego nowotworem ustroju, ale jeżeli tak jest, to reakcje obronne muszą mieć inny charakter niż te, które zwykliśmy codziennie obserwować. W przypadkach nowotworu mamy do czynienia nie z ciałem obcym, komórką obcogatunkową lub też substancjami chemicznymi obcymi organizmowi nosiciela, lecz mamy do czynienia z własnymi komórkami ustroju, zasadniczo cechującymi się tymi wszystkimi właściwościami, jakie cechują komórki prawidłowe.

Próby stwierdzenia jakichś zmian chemicznych lub fizyko-chemicznych w komórkach lub cieczach ustrojowych, które by świadczyły o rozwijaniu się nowotworu w badanym organizmie, podejmowane były już co najmniej od 50 lat (1). Istotnie, w ciągu tego czasu opisano takich zmian wiele i na tej podstawie obmyślono liczne chemiczne metody rozpoznawcze dla nowotworu. Niektóre z nich w olbrzymiej większości przypadków raka dają istotnie dodatnie wyniki, ale nie znamy takiej, która by była dodatnia w 100% badanych przypadków, a co gorsze, niemal każda z nich wypada dodatnio w pewnym odsetku przypadków, w których nowotworu nie ma.

Przez długi czas pokładano wielkie nadzieje w metodach serologicznych (2).

Można byłoby spodziewać się powodzenia tych metod, gdyby tkanka nowotworowa była czymś dla ustroju gospodarza obcym. Ponieważ jest tkanką własną, można co najwyżej oczekiwać w komórkach nowotworowych jakichś swoistych antygenów, które tylko przy bardzo wysubtelnionej metodyce postępowania dałyby się uwydatnić. Wiele danych przemawia za tym, że takie swoiste dla nowotworów antygeny są istotnie w tkance rakowej zawarte. Szczególnie rozległe badania prof. *Hirszfelda* i jego współpracowników (3) oraz kilku innych wybitnych serologów dowodzą egzystencji takich antygenów ponad wszelką wątpliwość, ale wykazywanie tych antygenów oraz właściwych im przeciwciał wymaga tak subtelnej metody serologicznej, że jej zastosowanie na szeroką skalę jest niemożliwe. Ponadto i w tym wypadku swoistość odpowiednich odczynów serologicznych może okazać się względną.

Niemniej poznano kilka zjawisk zachodzących w surowicy osobników ze złośliwymi nowotworami dających się rejestrować metodami chemicznymi. Zjawiska te są wyrazem jak gdyby pewnego rodzaju serologicznej samoobrony organizmu.

Przede wszystkim należy zwrócić uwagę na tzw. enzymy obronne wykryte przez *Abderhaldena* (4). Według *Abderhaldena* nie tylko białka obce ustrojowi, ale nawet prostsze związki chemiczne wyzwalają powstawanie enzymów swoiście dostosowanych do rozkładu tej obcej substancji na prostsze związki.

Między innymi *Abderhalden* stwierdził, że już we wczesnym stadium raka i mięsaka pojawiają się w surowicy krwi enzymy proteolityczne, które swoiście rozkładają białko danego nowotworu. Na przykład obronna proteinaza, powstająca na skutek rozwoju raka płuc, rozkłada białko raka pochodzącego tylko z płuc, a nie rozkłada np. białka raka macicy. Nawet nowotwory przerzutowe wywołują powstawanie odrębnych enzymów obronnych. Zasadniczo wykonanie odczynu *Abderhaldena* jest względnie proste. Mieszaniej badanej surowicy z odpowiednim substratem dializuje się wobec wody destylowanej, do której przechodzą małodrobinowe produkty rozkładu białka nowotworowego. Za pomocą reakcji ninhydrynowej wykrywa się w dializacie produkty hydrolizy. Obecność ich jest dowodem rozkładu danego białka przez enzym obronny. Oczywiście odczyn przeprowadza się z równoczesną kontrolą. Obronne enzymy *Abderhaldena* są wydzielane do moczu, skąd mogą być wytrącane acetonem, powtórnie rozpuszczone w fizjologicznym roztworze soli i używane do wykonania odczynu.

Ta pozornie prosta metoda przy zastosowaniu na większą skalę napotyka duże trudności, przede wszystkim w przygotowaniu odpowiedniego substratu, oddzieleniu tkanki nowotworowej od śladu tkanki zdrowej oraz w uwolnieniu substratu od ciał dających reakcję z ninhydryną. Kolekcjonowanie czystych morfotycznie tkanek wymaga dużych zasobów technicznych i odpowiednich umiejętności. Odczyn *Abderhaldena* daje około 80% wyników pozytywnych u chorych cierpiących na raka.

Pewną analogię do odczynu *Abderhaldena* stanowi odczyn opisany przez *Fuchsa* (4), polegający na występowaniu albo zanikaniu w surowicy chorych na raka pewnych enzymów proteolitycznych, skierowanych przeciw białku osobnika chorego na raka lub przeciw białku embrionalnemu.

Za podstawę opracowania odczynu posłużył *Fuchsowi* fakt, że niektóre surowice mają zdolność rozpuszczania włóknika pochodzącego od osobników cierpiących na raka i pewne choroby infekcyjne, przy czym włóknik musi być pobrany z osocza innego osobnika. Surowica osobnika zdrowego nie rozpuszcza włóknika drugiego osobnika zdrowego, ale rozpuszcza włóknik luetyka, gruźlika lub cierpiącego na raka. Włóknik zostaje również nietknięty, jeśli włóknik i surowica pochodzą od dwu osób, ale obu cierpiących na raka. Jeśli zaś włóknik pochodzi od osobnika zdrowego lub gruźlika, a surowica pobrana jest od osobnika obciążonego nowotworem, włóknik ulega rozpadowi i reakcja wypada dodatnio.

W ciągu dalszych swoich badań, przy których bardzo wydatnie współpracowali

prof. *Kowarzyk* i prof. *Zakrzewski*, *Fuchs* zauważył, że po zmieszaniu surowicy pochodzącej od osoby cierpiącej na raka z włóknikiem osobnika również cierpiącego na raka może wystąpić zmniejszenie reszty azotowej. Zamiast hydrolizy włókniaka obserwuje się więc syntezę wielkomolekularnych połączeń azotowych z ciał prostszych zawartych w surowicy. *Fuchs* tłumaczył to zjawisko przyjmując, że w substracie znajdują się antygeny nowotworowe, a w surowicy odpowiednie nowotworowe przeciwciała. Reakcją pozytywną obronną nazywa ubytek reszty azotowej ze środowiska reakcji, reakcją pozytywną — przyrost reszty azotowej. Występowanie pierwszego czy drugiego typu reakcji zależy tylko od tego, czy w surowicy przeważają nowotworowe antygeny, czy nowotworowe przeciwciała.

Teoretyczne wytłumaczenie procesów zachodzących w toku reakcji *Fuchsa* jest trudne. Być może, że nowe osiągnięcia biochemii, dotyczące plazminy i fibrynolizy, zmusiłyby *Fuchsa* do całkowitej rewizji jego poglądów. Zagadnienie mógłby wyjaśnić jedynie bliski współpracownik *Fuchsa*, prof. *Kowarzyk*, który z takim powodzeniem pracuje w dalszym ciągu w tej dziedzinie. Techniczne wykonanie tego bardzo subtelnego odczynu jest trudne i to może częściowo tłumaczy, dlaczego odczyn *Fuchsa* nie miał powodzenia. Ocena wartości tego odczynu przez różnych badaczy jest bardzo rozbieżna.

W latach przedwojennych dosyć duże zainteresowanie wzbudził odczyn opisany przez *Freunda* i *Kamner* (4), polegający na zdolności surowicy osobników zdrowych do rozkładania komórek nowotworowych. Surowica chorych na nowotwory zdolności tej nie posiada. Zjawisko to tłumaczył *Freund* w dosyć zawiły sposób, przyjmując egzystencję jakichś hipotetycznych, swoistych związków chemicznych, od których miałyby zależeć cytoliza komórek nowotworowych. Odczyn ten kontrolowany był w wielu pracowniach, u nas podobno z powodzeniem stosował go *Wachtel* w Krakowie. Na ogół ocena tego odczynu wypadła niekorzystnie. Nawet ci badacze, którym udało się powtórzyć wyniki *Freunda*, stwierdzali pokaźny odsetek wyników ujemnych w klinicznie stwierdzonych przypadkach raka.

Zarówno rozwój tkanki nowotworowej, jak i jej wpływ na tkanki zdrowe powodują zmiany ilościowe różnych enzymów w organizmie zwierzęcym. Zmienia się ilość niektórych enzymów zawartych w krwi i fakt ten został w różnorodny sposób wykorzystany do celów rozpoznawczych.

Pośród tych metod enzymatycznych na pierwszy plan wysuwa się oznaczanie fosfatazy w krwi (5). Poziom obu fosfataz, to znaczy zasadowej i kwaśnej, wzrasta znacznie w surowicy w okresie przerzutów raka, przy czym fosfatazy te wykazują zwiększoną aktywność w porównaniu z fosfatazą wziętą z surowicy prawidłowej przy dodaniu takiego aktywatora, jak np. jony magnezu. Prawidłowa fosfataza zasadowa zwiększa swoją aktywność po dodaniu chlorku magnezu o ok. 6%, natomiast fosfataza w czasie rozwoju raka o ok. 42%.

Wzrost zawartości fosfatazy zasadowej krwi jest szczególnie charakterystycznym objawem dla nowotworów kości, specjalnie przy powstawaniu przerzutów. Wartości tej fosfatazy mogą wzrastać wówczas o kilkaset procent i dlatego badanie jej poziomu ma niewątpliwie dużą wartość rozpoznawczą.

Fosfataza kwaśna wzrasta bardzo wybitnie w przypadkach raka sterczu, a szczególnie przy powstawaniu przerzutów tego nowotworu. Zdaniem niektórych badaczy, badanie fosfatazy kwaśnej ma decydujące znaczenie przy różnicowaniu między przerzutami raka sterczu do kości i nienowotworowymi schorzeniami kości. Techniczna strona oznaczenia zawartości fosfatazy jest względnie prosta (6), szczególnie przy zastosowaniu jako substratu estru fosforowego fenoloftaleiny, wprowadzonego do pracowni chemicznej przez *Talalaya*.

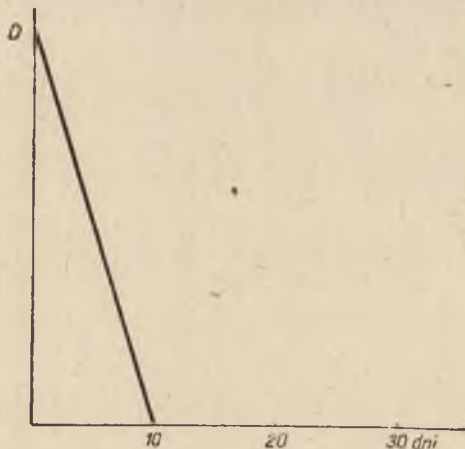
W początkowych stadiach rozwoju raka wzrasta znacznie poziom lipazy w surowicy (7), natomiast w ciągu dalszego rozwoju nowotworu poziom tego enzymu spada znacznie poniżej wartości normalnej. *Rona* zróżnicował występujące w surowicy

lipazy na zasadzie ich wrażliwości na różne substancje chemiczne. Tak np. lipaza trzustkowa jest wrażliwa na działanie chininy, lipaza surowicy — na chininę i atoksyl. *Bernhard* stwierdził, że w przypadku raka lipaza odporna na działanie atoksylu występuje w dużych ilościach w surowicy i że wraz z rozwojem raka zmniejsza się poziom ogólnej ilości lipaz. Zaznaczyć należy, że lipaza odporna na działanie atoksylu pochodzi z samego nowotworu. Poziom lipazy atoksylod odpornej zmniejsza się wraz z rozwojem nowotworu, ale jej poziom jest stale znacznie wyższy niż w warunkach prawidłowych. Po usunięciu nowotworu poziom lipaz wraca do stanu prawidłowego.

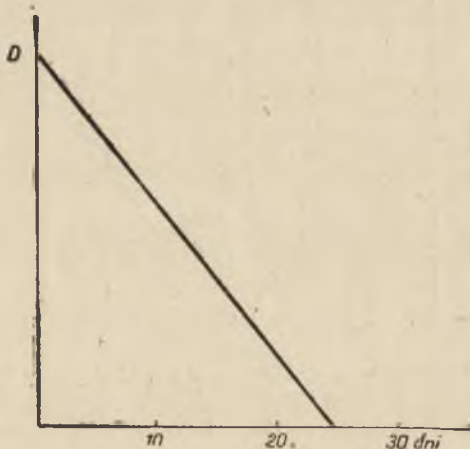
Wykonanie oznaczenia lipazy polega na zmieszaniu surowicy badanej z roztworem trójmasłanu glicerolu w odpowiednim buforze i w obecności atoksylu. Po odpowiednim czasie inkubacji pozostały roztwór masłanu oznacza się stalagmometrycznie. Metoda ta daje ogólnie ok. 65% wyników zgodnych z obserwacją. U osobników zdrowych odczyn wypadła dodatnio w 10%, ponadto wynik pozytywny obserwuje się w niektórych procesach patologicznych nienowotworowych, jak przerost sterczu i inne. Znamienne jest, że właśnie te jednostki chorobowe zaliczane są do tzw. schorzeń blastofilnych, a więc okazujących tendencję do zwyrodnienia nowotworowego.

W 1949 roku *Menkès* (8) zaobserwował, że surowica osób z rozwijającym się nowotworem — w odróżnieniu od surowicy prawidłowej — posiada zdolność rozkładu pentoz do kwasu mlekowego. Wykonanie odczynu polega na zmieszaniu badanej surowicy z roztworem arabinozy i oznaczeniu kwasu mlekowego, wytworzonego podczas reakcji (9). Co do diagnostycznej wartości tego odczynu zdania są podzielone. Liczni autorzy twierdzą, że odczyn ten nie jest swoisty i że nie ma żadnego znaczenia diagnostycznego, gdyż szereg infekcyjnych schorzeń daje wyniki podobne. *Steen* (10) natomiast badając szczury, u których wywołano mięsaka przez wstrzyknięcie metylocholantrenu, otrzymał w 90% wyniki prawidłowe.

Pewne związki chemiczne w obecności siarczku lub siarkowodoru zamieniają hemoglobinę zawartą w erytrocytach na sulfohemoglobinę dającą się identyfikować spektroskopowo. Znikanie sulfohemoglobiny z krwiobiegu jest związane ze stanem oporności erytrocytów. Sulfohemoglobina jest dopiero wtedy wydalana z ustroju, gdy erytrocyt ulega rozpadowi. Dlatego też zanikanie sulfohemoglobiny może być miarą wewnątrznaczyniowej oporności erytrocytów, z tym zastrzeżeniem, że sulfohemoglobina nie jest równocześnie stale produkowana w ustroju skutkiem jakiegoś procesu patologicznego, np. chronicznego zatrucia.



Ryc. 1. Znikanie sulfohemoglobiny u myszy chorej z *ca mammae* \pm 9 dni.



Ryc. 2. Znikanie sulfohemoglobiny u myszy zdrowej \pm 19 dni.

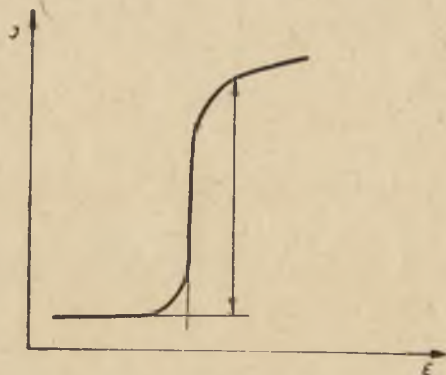
Dod i współpracownicy (11) wykazali, że znikanie sulfohemoglobiny z krwio-biegu jest znacznie szybsze w przypadku rozwijającego się raka, niż to ma miejsce w warunkach prawidłowych. Badania te wykonano na zwierzętach doświadczalnych wywołując eksperymentalnie przemijającą sulfohemoglobinemię. Sulfohemoglobinemię wywołuje się przez podskórne wstrzyknięcie zawiesiny p-aminopropiofenonu i siarczku wapnia w oleju sezamowym. Następnie przez oznaczanie spektrofotometryczne krwi obserwuje się w ciągu szeregu dni znikanie sulfohemoglobiny. Różnice w znikaniu sulfohemoglobiny w przypadku myszy zdrowych i myszy z rozwijającym się rakiem ilustrują przedstawione wykresy.

U myszy zdrowych sulfohemoglobina znika całkowicie dopiero po mniej więcej około 19 dniach, zaś u myszy z wywołanym doświadczalnie rakiem sulfohemoglobina znika już po 9 dniach. Nie jest mi wiadome, czy metoda ta była stosowana u ludzi i z jakimi wynikami. W każdym razie stosowana u zwierząt doświadczalnych ma dawać dobre wyniki.

Oprócz zmian w zawartości poszczególnych enzymów zachodzących we krwi chorych na raka mogą występować zmiany polegające na pojawianiu się we krwi jakichś nowych związków o charakterze nienzymatycznym. Substancje te mogą być albo zidentyfikowane bezpośrednio jako takie, albo w następstwie pewnych zmian fizyko-chemicznych spowodowanych obecnością tych ciał w surowicy.

Taką zmianą fizyko-chemiczną dosyć charakterystyczną dla surowic osób obarczonych nowotworami jest obniżenie potencjału oksydoredukcyjnego surowicy, dające się dokładnie rejestrować za pomocą polarografii (14).

W czasie przepływu prądu elektrycznego przez roztwór elektrolitu powstaje w pewnych warunkach prąd skierowany przeciwnie, nazwany prądem polaryzacyjnym. Siła elektromotoryczna prądu powodującego elektrolizę musi osiągnąć odpowiednią wartość, aby przewyższyć przeciwnie skierowany prąd polaryzacji i rozładowania oraz aby przeprowadzić rozdział jonów. Dla każdego rodzaju jonów ta siła rozdzielająca elektrolizującego prądu jest stałą wielkością charakterystyczną. Napięcie tego prądu jest tym większe, im kation danego metalu lub cząsteczka związku są bardziej elektroujemne. Typowa krzywa polarograficzna ma początkowo przebieg równoległy do osi napięć, po osiągnięciu tzw. napięcia depolaryzacji krzywa wznosi się prawie pionowo ku górze, osiąga pewną wysokość i zaczyna znów biec poziomo. Odcinek pionowy krzywej zwie się falą polarograficzną i wysokość tej fali jest funkcją stężenia badanej substancji.



Ryc. 3. Krzywa polarograficzna (schemat).

Odpowiedni przyrząd do badania powyżej przedstawionej zależności skonstruował *Heyrovsky* i nazwał go polarografem (13). Nie polaryzującą anodę przyrządu stanowi duża masa rtęci na dnie naczynia elektrolitycznego. Natomiast idealnie polaryzującą się katodę stanowi tzw. kroplowa elektroda rtęciowa, z której ze stałą szybkością wypływają maleńkie kropelki rtęci do badanego roztworu. Zaletą elektrody kroplowej jest to, że przy badaniu wystarcza minimalna ilość próbki, aby wystąpił proces katodowy na powierzchni kropelki rtęci. Powierzchnia takiej elektrody jest zawsze czysta, gdyż ciągle się odnawia, a opada-

jąca kropla zabiera z sobą ewentualne zanieczyszczenia.

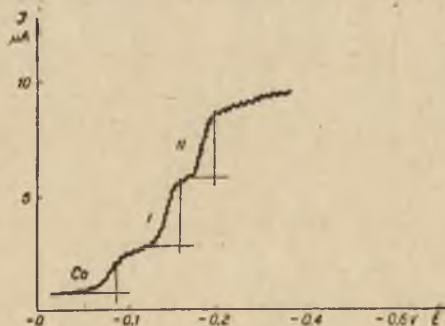
Natężenie powstającego w czasie oznaczania prądu rozładowania rejestruje się za pomocą galwanometru lusterkowego na papierze światłoczułym albo też za po-

mocą odpowiedniego mechanizmu piórkim na zwykłym papierze. Oznaczenie polarograficzne przy pewnej wprawie i odpowiednim urządzeniu trwa zaledwie dwie do trzech minut. Stężenie badanej substancji, potrzebnej do oznaczenia, mieści się w granicach jednego mikrograma; jest to metoda nie tylko jakościowa, ale i ilościowa, za pomocą której można otrzymać absolutne wartości stężenia badanych substancji.

Waldschmidt-Leitz w roku 1934 (12) spostrzegł, że w surowicach ludzi cierpiących na raka występuje znaczne obniżenie ilości grup sulfhydrylowych, występujących w cysteinie i zredukowanym glutationie, w porównaniu z surowicami osobników zdrowych. Znajdująca się w surowicy cysteina i SH-glutation dadzą się oznaczyć polarograficznie dlatego, że wodór grupy SH, zwłaszcza w obecności nieznacznej ilości soli metali ciężkich, jak kobalt i nikiel, łatwo jest redukowany na powierzchni katody, a prąd redukcji stoi w prostym stosunku do stężenia cysteiny w roztworze. Na krzywej polarograficznej będziemy mieli najpierw odpowiednio wysoką falę polarograficzną odpowiadającą soli dodanego kationu, a później falę cysteiny, której wysokość będzie zależała od stężenia tej substancji w roztworze. Grupy SH wbudowane w cząsteczki białka dają się również oznaczyć w ten sposób.

Na powyżej omówionej zasadzie opiera się polarograficzna analiza surowic nowotworowych, opracowana po raz pierwszy przez *Brdičkę* (4) w roku 1934. *Brdička* w ciągu swoich badań spostrzegł, że jeśli białko surowicy zostanie przed oznaczeniem zdenaturowane, to fala polarograficzna charakterystyczna dla cysteiny znacznie wzrasta, co wskazywałoby na odtworzenie grup sulfhydrylowych i dwusiarczkowych podczas denaturacji, zamaskowanych dotychczas w cząsteczce białka. Ten wzrost fali polarograficznej cysteiny po denaturacji białka jest wielokrotnie wyższy w przypadku surowic prawidłowych w porównaniu z surowicami nowotworowymi i ten fakt stanowi charakterystyczną cechę odróżniającą surowicę nowotworową w badaniu polarograficznym. Denaturację białka *Brdička* przeprowadzał za pomocą pepsyny w środowisku kwasu solnego, następnie dodawał roztworu soli kobaltu i przeprowadzał oznaczenie polarograficzne.

W niedługim czasie po ogłoszeniu prac przez *Brdičkę*, *Meyer* i *Waldschmidt-Leitz* (15) spostrzegli bardzo interesujący fakt, a mianowicie, że jeśli zdenaturowane białko surowicy zostanie usunięte z roztworu za pomocą kwasu sulfosalicylowego, a przesącz podda się oznaczeniu w polarografii, to fala polarograficzna cysteiny w przypadku przesączu surowic nowotworowych jest bez porównania wyższa niż w przypadku analogicznie otrzymanych przesączów surowic prawidłowych. Różnica w fali polarograficznej jest tak wybitna, że modyfikacja ta okazała się diagnostycznie znacznie pewniejsza niż metoda pomiaru zdenaturowanego białka. W przesączu po odbiałczeniu znajduje się wysokomolekularna substancja, polarograficznie aktywna, która nie zawiera siarki i jej chemiczny charakter nie jest dotychczas wyjaśniony. *Waldschmidt-Leitz* utrzymuje, że jest to bezsiarkowy mukoid, wypadający pod działaniem rozcieńzonego alkoholu, i że ta właśnie substancja, czynna polarograficznie, jest charakterystyczna dla surowic nowotworowych. *Brdička* natomiast twierdzi, że substancja ta posiada grupy sulfhydrylowe i że w surowicy występuje na skutek wadliwej przemiany białkowej w czasie rozwijającego się nowotworu. Diagnostyka raka za pomocą polarografii jest



Ryc. 4. Krzywa polarograficzna cysteiny.

bardzo wszechstronnie i szczegółowo opracowana. Polarografia posiada doskonałe znaczenie rozpoznawcze, lecz i tu, niestety, nie jest pozbawiona błędów, jak zresztą wszystkie inne metody. Wyniki pozytywne uzyskuje się również przy wielu innych schorzeniach nienowotworowych o charakterze zapalnym, a niejednokrotnie wynik dodatni otrzymuje się także przy badaniu surowic osób zupełnie zdrowych.

Wybitny wzrost fosfatydów surowicy chorych na raka w porównaniu z surowicą osób zdrowych posłużył *Dannmeyerowi* (16) w 1937 roku do opracowania metody diagnostycznej. Naświetloną uprzednio surowicę światłem ultrafioletowym ekstrahuje się benzenem, w którym rozpuszczają się wszystkie fosfatydy. Następnie w czystym benzenie zanurza się dwie elektrody połączone z elektrometrem i włącza się napięcie ok. 1,5 V. Benzen, będąc dielektrykiem, uniemożliwia powrót struny elektrometru do punktu zerowego. Z kolei elektrody elektrometru zanurza się do roztworu badanego. Struna elektrometru opada do pewnego poziomu, ale nie wraca do punktu zerowego wskutek tego, że w roztworze wytwarza się pewne przeciwnapięcie (tzw. potencjał resztkowy), które jest spowodowane obecnością fosfatydów rozpuszczonych w benzenie. Różnica odczytu elektrometru przy badaniu czystego benzenu i ekstraktu surowicy jest miarą ilości fosfatydów w próbce badanej.

Przedstawiona wyżej metoda daje ok. 80% wyników zgodnych z obserwacją kliniczną, jakkolwiek jest stosunkowo mało znana i stosowana w pracowniach klinicznych.

Była już dziś o tym mowa, że tkanka nowotworowa posiada dużą zdolność wiązania fosforu w swoich komórkach. Okoliczność tę starano się początkowo wykorzystać w leczeniu raka. Wstrzykiwano dożylnie fosfor radioaktywny, który gromadził się w tkance nowotworowej, wydzielając cząsteczki beta, oraz działał niszcząco na otaczającą tkankę. Rezultaty tej metody leczenia okazały się jednak niezadowolające, chociażby z tego względu, że natężenie promieniowania konieczne do zahamowania wzrostu nowotworu było zbyt szkodliwe dla całości ustroju i powodowało martwicę tkanek zdrowych.

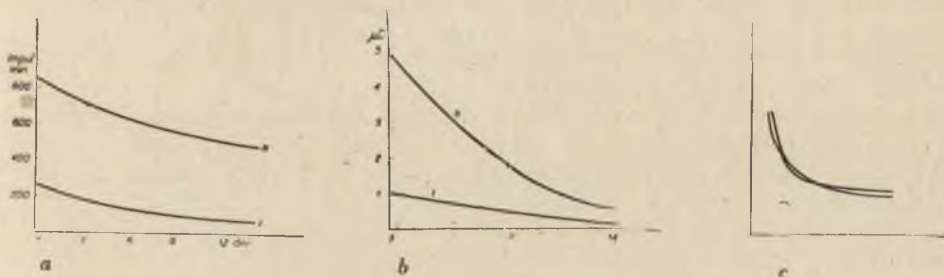
Zdolność retencji fosforu w tkance nowotworowej została wykorzystana przez *Cramera* i *Pabsta* (17) do opracowania metody diagnostycznej. Wstrzykiwali oni podskórnie fosforan z radioaktywnym fosforem o natężeniu promieniowania ok. 250 μ C, po czym po pewnym czasie oznaczali natężenie radioaktywności różnych okolic ciała za pomocą licznika G—M. Stosując miniaturowe liczniki wpuszczali je wraz z sondą do żołądka i dwunastnicy, do przetyku, tchawicy, oskrzeli i w ten sposób wykrywali raki umiejscowione w dość głęboko położonych narządach.

Cramer i *Pabst* oznaczali najpierw współczynnik aktywności, tzn. stopień powinowactwa fosforu do różnych tkanek zdrowych, i następnie przez porównanie z tkankami nowotworowymi oceniali zdolność retencji radiofosforu przez te tkanki. Wykresy radioaktywności narządów zdrowych i narządów z rozwijającym się rakiem przedstawione są na ryc. 5a, b, c. Izotopowa metoda wykrywania raka daje największy odsetek wyników pozytywnych, jakkolwiek i ta metoda nie jest pozbawiona błędów. Wyniki podobne do tych, jakie daje tkanka nowotworowa, dają różne procesy zapalne skór z wytworzeniem tkanki granulacyjnej oraz owrzodzenia goleni. Drugą niedogodnością tej metody są trudności techniczne związane ze specjalną aparaturą, a najważniejszą może jest trudność w uzyskaniu odpowiednich izotopów.

Wymienione przeze mnie metody, mniej lub bardziej niedoskonałe, dające mniejszy lub większy procent błędów, są w każdym razie oparte na pewnych konkretnych przesłankach i związane z określonymi zmianami w surowicy, zachodzącymi w toku rozwoju nowotworu. Wszystkie jednak wymagają pewnych technicznych środków, niejednokrotnie nawet tak skomplikowanych, jak licznik Geiger-Müllera lub polarograf, nic więc dziwnego, że zastosowanie ich ogranicza się do dobrze urządzonych laboratoriów klinicznych. Natomiast wśród szerokiego ogółu lekarzy z wielkim powodzeniem spotykały się najróżnorodniejsze odczyny empi-

ryczne, polegające na obserwowaniu zmian zachodzących w surowicy po potraktowaniu jej odpowiednimi odczynnikami, np. reakcja Bendiena, polegająca na dodawaniu do surowicy mieszaniny kwasu octowego i kwasu wanadowego, odczyn Botelha, który przed dwudziestu kilku laty i w Polsce miał licznych zwolenników, odczyn Kahna i szereg innych analogicznych reakcji. Pojawianie się strątu białkowego w danych warunkach miało być dowodem obecności raka, brak odpowiedniego zmętnienia był wyrazem odczynu ujemnego. Żadna z tych reakcji nie wytrzymała prób krytyki, dziś mają one tylko wartość historyczną.

Nie wiadomo, jaki los spotka metodę, która dopiero w ostatnich latach znalazła zastosowanie, opartą na obserwacjach dokonanych 15 lat temu przez dr *Glassa*



Ryc. 5 a. — I — krzywa normalna. II — krzywa dla *carcinoma mammariae*. b — I — *carcinoma* jądra królika. II — jądro zdrowe. c — *mastopathia cystica*.

w Warszawie. Podstawą tej metody jest oznaczenie temperatury koagulacji cieplnej białek surowicy. *Glass* (18) odróżnia proces koagulacji cieplnej od zachodzącego procesu flokulacji, np. w próbie Weltmanna, i zjawisko to tłumaczy wewnątrzcząsteczkowym uwodnieniem białek surowicy, głównie frakcji albuminowej. Próbę wykonuje się w ten sposób, że odpowiednio rozcieńczoną surowicę umieszcza się w łaźni wodnej o temperaturze 80, 83, 89 i 95° na jedną minutę. Po tym czasie próbówki wytrząsa się i osad zbija na dno, a następnie dodaje się roztworu siarczynu magnezu lub soli kuchennej. Jeśli surowica nie wykazuje żadnego zmętnienia, określa się ją jako „niekoagulującą“, jeśli natomiast osad po dodaniu elektrolitu nie odrywa się od dna, lecz pozostaje w dalszym ciągu zbity, surowicę określa się jako „koagulującą“.

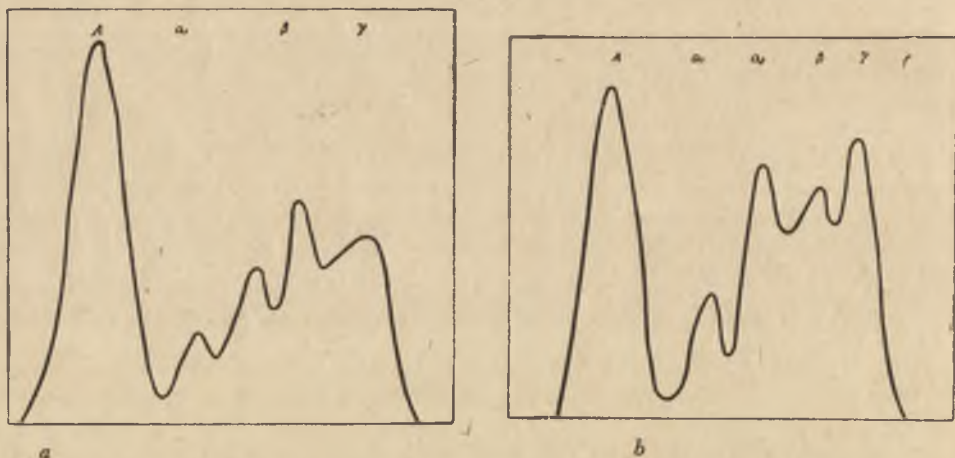
W wielu stanach patologicznych, łącznie z nowotworem złośliwym, temperatura koagulacji cieplnej jest wyższa w porównaniu z wartościami uzyskanymi przy badaniu surowie prawidłowych.

W roku 1949 *Huggins* (18) i współpracownicy opisali nową technikę oznaczania temperatury koagulacji cieplnej. Czas ogrzewania przedłużyli do 30 minut w temperaturze 100°, przy czym do roztworu dodawali określoną ilość soli kwasu jodooctowego, oznaczając najmniejszą ilość jodooctanu, która zapobiega koagulacji badanej surowicy. W przypadku różnych typów nowotworów ogólnie metoda ta daje zaledwie ok. 50% wyników pozytywnych.

Wszystkie te reakcje strątowe, podobnie zresztą jak stosowane na klinikach w innych przypadkach odczyny Takata-Ary, Weltmanna, Wuhrmanna itd., są wyrazem zmiany struktury fizyko-chemicznej mieszaniny białek surowicy, spowodowanej przesunięciem prawidłowego ilościowego stosunku zachodzącego między poszczególnymi frakcjami białek. Dziś zmiany te dają się uchwycić o wiele dokładniej i scharakteryzować o wiele lepiej przez zastosowanie metody elektroforezy. Metoda ta wykorzystuje różnice szybkości wędrowania różnych białek surowicy w polu elektrycznym. Sądzę, że nie ma potrzeby omawiania na tym miejscu szczegółów tej metody. W pierwotnej swej postaci metoda ta jest technicznie dosyć trudna i wy-

maga kosztownej aparatury. Pozwala jednak dosyć dokładnie oznaczać procentowy udział poszczególnych frakcji białek surowicy w ogólnej ilości białka. Wiadomo, że metoda ta oddaje dziś klinikom nieocenione usługi, wykazując zmiany struktury mieszaniny białek surowicy w różnych schorzeniach. Nic więc dziwnego, że próbowano ją zastosować jako metodę rozpoznawczą w przypadku schorzeń nowotworowych. Dotychczas zebrany materiał nie jest obfity, a wyniki dosyć rozbieżne. Z reguły stwierdza się zmniejszenie ogólnej ilości białek ze specjalną redukcją frakcji albuminowej i w większości przypadków z wyraźnym wzrostem frakcji alfa₂-globulinów (19). Po radykalnej operacji obraz elektroforetyczny surowicy wraca do normy. Zmiana, która najdłużej utrzymuje się po operacji, jest zmniejszenie ilości albuminów. Nie spotyka się dotychczas żadnych przypadków hipalbuminemii, w których po usunięciu przyczyny albuminy wracałyby tak powoli do wartości prawidłowych, jak w przypadkach z powodzeniem operowanego raka (20). Materiał dotychczas zebrany nie wystarcza do wysnuwania uzasadnionych wniosków o wartości elektroforezy jako metody rozpoznawczej. Być może, że zastosowanie elektroforezy w postaci tzw. elektroforezy bibułowej (21), będącej metodą prostszą i o wiele tańszą, ułatwi zgromadzenie większych ilości danych (ryc. 6a i b). O zastosowaniu elektroforezy do rozpoznawania szczególnych nowotworów cechujących się produkcją swoich białek, jak np. szpiczak, mówić nie będę, gdyż są to rzeczy już ogólnie znane.

Omówione przeze mnie metody nie wyczerpują jeszcze listy wszystkich prób chemicznych stosowanych do rozpoznawania nowotworów. Wyszczególnione zostały



Ryc. 6. Wykresy z elektroforezy bibułowej. *a* — krzywa prawidłowa, *b* — krzywa w przypadku raka przelyku.

tylko te, które wzbudziły żywsze zainteresowanie, były bardziej rozlegle kontrolowane i których wyniki przynajmniej w większości przypadków pokrywają się z rozpoznaniem klinicznym. Być może, że niektóre z tych metod przy ich dokładniejszym i bardziej systematycznym opracowaniu staną się wartościowym, pomocniczym środkiem przy stawianiu rozpoznania w schorzeniach nowotworowych. Niestety, jak już to podkreślałem, nie ma metody 100% pewnej, jak również nie ma metody, która by nie dawała pozytywnych wyników w schorzeniach nienowotworowych. Charakter biologiczny nowotworów stanowi powód, dla którego wyszukanie absolutnie swoistych metod rozpoznawczych dla raka wydaje się bardzo mało prawdopodobne. Tak jak histopatolog przy badaniu napotyka przypadki, w których mikroskop nie jest w stanie dać mu absolutnej odpowiedzi na to, czy badana tkanka jest

nowotworem złośliwym, czy nie, tak i chemik musi spotykać takie przejściowe sytuacje, w których granica między nowotworowym a nienowotworowym chemizmem ustroju jest zatarta.

PIŚMIENNICTWO

- 1) *Wolff J.*: Die Lehre von der Krebskrankheit, 1907. — 2) *Bauting B.*: Proc. Roy. Soc. Med., 1938, 32, 245. — 3) *Hirszfeld L.* i współpr.: Z. immun. Forsch., 1930, 67, 286; *ibid.*, 1932, 75, 193. — 4) *Euler H., Skarżyński B.*: Biochemie der Tumoren, Stuttgart, 1942. — 5) *Kay J.*: Biol. Chem., 1930, 89, 235. — 6) *Huggins Ch., Talalay P.*: Biol. Chem., 1945, 159, 399. — 7) *Bernhard F.*, Z. Krebsforsch., 1933, 38, 450. — 8) *Menkès*: Med. et Hyg., 1949, 158, 369; Bull. Acad. Suisse Sci. Med., 1949, 5, 280. — 9) *Rolf, Danncell, Willy König*, Z. Krebsforsch.: 1952, 58, 374. — 10) *Stephen N., Steen J.*: National Cancer Instit., 1950, 11, 61.
- 11) *Kenneth S. Dod* i współpr.: J. National Cancer Instit., 1951, 11, 1093. — 12) *Waldschmidt-Leitz*: Ing. Chem., 1938, 51, 224. — 13) *Heyrovsky, Böttger*: Physikalische Methoden der analytischen Chemie, 1936, II, 1939, III. *Heyrovsky, Shikata*: Rec. Trav. Chim. Pays Bas, 1925, 44, 496. — 14) *Brdička*: Bioch. Z., 1934, 272, 104. — 15) *Waldschmidt-Leitz, Mayer Z.*: Physiol. Chem., 1939, 261, 1. — 16) *Dannmeyer F.* i współpr.: Acta Path. et Microbiol. Scand., 1937, 14, 24. — 17) *Cramer H., Pabst H. W.*, Z. Krebsforsch.: 1952, 58, 163. — 18) *George B., Glass J.*: The Amer. J. Med., 1950, 8, 745. — 19) *Leutscher J. A.*: Physiol. Rev., 1947, 27, 621. — 20) *Petermann H. L., Karnofsky D. A., Hogness K. R.*: Cancer, 1948, 1, 100—119. — 21) *Ostrowski W., Mikucki A.*: Acta Physiol. Pol., 1952, III, 277.

WPLYW HORMONÓW NA NOWOTWORY

I. WSTĘP

Do powstania i rozwoju raka * konieczny jest cały zespół czynników, wśród których niewątpliwie odgrywają rolę hormony i pewne składniki pokarmowe.

Wspólnym rysem wszystkich nowotworów złośliwych jest szybki i złośliwy wzrost. Za kryterium złośliwości przyjmuje się zdolność dawania przerzutów i możliwość transplantowania. Nowotwór transplantowany zachowuje właściwości nowotworu pierwotnego. Zmiana komórki normalnej w nowotworową jest nieodwracalna. Komórka, która raz stanie się komórką nowotworową, właściwości tej nie traci i może pozostawać w ustroju przez dłuższy czas w stanie utajenia — wzrost nowotworu wybucha nagle. Przyjmuje się również, że tkanka nowotworowa nie ma funkcji fizjologicznej, a jedynym jej zadaniem staje się autonomiczny wzrost, nie podlegający ogólnym regulacjom ustrojowym.

Wszystkie czynniki wywołujące nowotwory określa się jako czynniki rakotwórcze. Dla otrzymania nowotworów eksperymentalnych nie wystarcza sam czynnik rakotwórczy, musi jeszcze współdziałać cała grupa czynników warunkujących wrażliwość gospodarza i jego tkanek.

Nie znamy jak dotąd żadnego czynnika rakotwórczego wywołującego nowotwór u wszystkich zwierząt i w różnych narządach. Natomiast każdy z poznanych czynników rakotwórczych daje zmiany nowotworowe określonych narządów u wrażliwych zwierząt. Umieszczenie nowotworu jak i jego powstanie w dużej mierze zależy od sposobu podania czynnika rakotwórczego, wieku zwierzęcia, stanu metabolicznego jego tkanek, pożywienia i wielu innych czynników.

Nowotwory eksperymentalne można otrzymać przez transplantowanie tkanki rakowej lub podawanie jej przesączów (*sarcoma Rous* u kur), przez stosowanie pewnych wirusów, syntetycznych związków chemicznych, hormonów lub nawet różnych czynników fizycznych.

Najistotniejszą cechą nowotworów, niezależnie od ich etiologii, jest szybki i niezależny wzrost. Wzrost tkanki normalnej jest jedną z jej funkcji życiowych, a zatem w warunkach prawidłowych musi podlegać w organizmach wielokomórkowych systemowi ogólnych regulacji ustrojowych.

Funkcje ustroju zależne są od ciał czynnych, do których zalicza się enzymy, witaminy i hormony. Hormony stanowią w tym systemie układ nadrzędny. Zaburzenia w stanie hormonalnym ustroju wpływają na procesy enzymatyczne i w ten sposób zmieniają tok przemian komórki. Nie znamy działania poszczególnych hormonów na enzymy. Prawdopodobnie pewne hormony hamują aktywność jednego lub kilku enzymów, a inny hormon znosi to działanie. Tak wygląda w każdym

* Słowa rak używam nie w znaczeniu anatomo-patologicznym, ale dla ogólnego określenia nowotworów złośliwych.

razie pierwszy poznany *in vitro* mechanizm działania hormonów na aktywność heksokinazy. Wyciąg z przedniego płata przysadki hamuje jej aktywność, a insulina znosi to działanie (*Colovick, Cori, Stein* — 12).

Czy zaburzenia w systemie ogólnych regulacji ustrojowych, a więc i hormonów mogą stać się przyczyną zmiany normalnego wzrostu komórki we wzrost nowotworowy i czy komórka nowotworowa staje się zupełnie niezależna od normalnych regulacji, czy też w pewnej mierze im podlega? Odpowiedź na to pytanie, poza zrozumieniem mechanizmu wzrostu, może dać również środek do zwalczania nowotworów. Przez odpowiednie pokierowanie stanem korelacji ustrojowych można by nie dopuścić do powstania komórki nowotworowej lub zatrzymać wzrost nowotworu.

Hormony niewątpliwie wpływają na rozwój tak raka spontanicznego, jak i nowotworów eksperymentalnych. Otrzymano nowotwory przez podawanie hormonów sterolowych, szczególnie estrogenów i pewnych hormonów przedniego płata przysadki. Hormony działają rakotwórczo tylko na narządy pozostające pod ich wpływem i to o ile są stosowane przez długi czas i w sposób ciągły — *Lacassagne* (54), *Dodds* (20), *Lipschütz* (62), *Huggins* (40), *Twombly* (84), *Hertz* (38). Opóźniają one lub przyspieszają rozwój i częstość występowania niektórych nowotworów spontanicznych u zwierząt i ludzi. Przykładem może być działanie estrogenów i androgenów w leczeniu raka sutka u myszy i raka gruczołu krokowego u ludzi, jak też wpływ kortykosteroidów na białaczki i nowotwory układu limfatycznego (*Pearson, Eliel* 74).

Wszystkie poznane dotąd syntetyczne związki rakotwórcze hamują wzrost tkanki normalnej, jak i nowotworowej. Przez adaptację komórki normalnej do czynnika hamującego wzrost powstaje komórka nowotworowa o wzroście niezależnym. Według *Spiegelmana* (80) zmiana ta jest spowodowana adaptacją enzymatyczną w komórce. W ten sposób hormony hamujące wzrost komórki mogą stawać się ciętami rakotwórczymi.

Z drugiej strony hormony pobudzając tkankę czynią ją wrażliwą na działanie toksyn i cięt rakotwórczych (*Lettrée* 58, *Boylard* 10). W tym przypadku hormony nie są czynnikami rakotwórczymi, ale współdziałają w powstaniu nowotworu. W ostatnim dziesięcioleciu opisano liczne nowotwory o etiologii wirusowej tak u roślin, jak i u zwierząt (9, 89). Stwierdzono zależność między pewnymi hormonami, szczególnie hormonami kory nadnercza i hormonu adrenokortykotropowego, a infekcjami wirusowymi. Zagadnienie wpływu hormonów na rozwój raka o etiologii wirusowej sprowadza się zatem do poznania udziału hormonów w odporności i wrażliwości gospodarza na infekcję.

Działanie hormonów na nowotwory może polegać:

- 1) na aktywacji lub hamowaniu wzrostu nowotworu;
- 2) na hamowaniu wzrostu komórki normalnej, która przez adaptację enzymatyczną staje się nowotworową;
- 3) na stworzeniu warunków miejscowych dla działania czynnika rakotwórczego przez kierowanie stanem czynnościowym komórki.

Analizując wpływ hormonów na nowotwory *in vivo* nie wolno wnioskować wedle zasady: *post hoc, ergo propter hoc*. Wprowadzając hormon, zmieniamy cały układ wewnątrzwydzielniczy i wpływamy na całość procesów ustrojowych. Wynik działania hormonu zależy nie tylko od danego hormonu, ale od wydolności całego systemu regulacji. Odmiennie efekty działania rakotwórczego danego hormonu u różnych zwierząt lub nawet u tego samego gatunku mogą być uwarunkowane różnicami w aktywowaniu i inaktywowaniu hormonu w tkankach.

Wynika stąd, że zagadnienie związku między hormonami a wzrostem nowotworowym jest natury bardzo skomplikowanej. Należy specjalny nacisk położyć na powtarzalność wyników i zastosować jak najdalej idącą ostrożność w ich interpretowaniu.

II. WPLYW HORMONÓW STEROLOWYCH NA POWSTAWANIE I ROZWÓJ NOWOTWORÓW

1. Hormony sterołowe

Hormony sterołowe powstają w korze nadnerczy, w gruczołach płciowych i w łożysku. Synteza ich w gruczołach jest pobudzana przez hormony przedniego płata przysadki. Aktywność biologiczna kory nadnerczy i gruczołów płciowych zależy od wydzielania hormonów przez przysadkę i odwrotnie, wydzielanie przez przysadkę zależy od stężenia hormonów sterołowych we krwi. Kortykosteroidy, progesteron, cis-testosteron hamują wydzielanie przez przysadkę hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i wywołują atrofię kory nadnerczy; testosteron nie ma wpływu, a estrogeny pobudzają wydzielanie ACTH. Estrogeny i androgeny hamują wydzielanie gonadotropiny (tylakentryny), hormonu tyreotropowego i wzrostowego, pośrednio zatem, przez przysadkę, wpływają na wzrost ciała i na ogólną przemianę materii.

Androgeny i estrogeny wpływają na przemianę białkową, dając dodatni bilans azotowy, w przeciwieństwie do hormonów kory nadnercza, które pobudzają glikoneogenezę i dają ujemny bilans azotowy.

Hormony płciowe spełniają w ustroju różne funkcje. Poza działaniem ogólnym poprzez przysadkę wpływają bezpośrednio na wzrost i przemiany pewnych narządów. Narządami szczególnie wrażliwymi na działanie hormonów płciowych są wszystkie narządy związane z drugorzędnymi cechami płciowymi, jak macica, gruczoł piersiowy, pochwa, pęcherzyki nasienne, gruczoł krokowy, a poza tym układ limfatyczny i kościec.

Mechanizm działania estrogenów na wzrost i metabolizm tkanek jest nieznan. Hormony płciowe wywołują zmiany w macicy związane z cyklem rujowym, który polega na kolejnym pobudzaniu i hamowaniu wzrostu błony śluzowej. Wykazano, że estrogeny *in vitro* hamują mitozę w hodowli fibroblastów (*Lettrée* 57), a androgeny są bez wpływu. Duże dawki estrogenów wywołują u myszek nienormalności w podziale limfocytów (*Santisteban* i współprac. 77). U zwierząt po kastracji zmniejsza się aktywność niektórych enzymów w narządach docelowych dla hormonów płciowych i wraca do normy po podaniu estrogenów lub androgenów (*Meyer, McShan* 64). Hormony płciowe wpływają na rozmieszczenie i aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej w macicy, pęcherzykach nasiennych, gruczole krokowym i kościach (*Atkinson* 3). *Kochakian* (50) łączy wpływ hormonów płciowych na aktywność fosfataz z ewentualnym udziałem tych czynników w syntezie białka.

W r. 1944 *Fishman* stwierdził, że u myszek po kastracji spada w macicy aktywność beta-glikuronidazy (28). Podanie estrogenu zwiększa jej aktywność w macicy, a nie zmienia w wątrobie (27). *Kerr* i *Levy* (45, 46) potwierdzili spostrzeżenia *Fishmana* i stwierdzili ponadto, że u młodych myszek (1 do 15 dni życia) beta-glikuronidaza jest o wiele bardziej aktywna niż u starszych. Łączą oni to ze zwiększoną zdolnością tkanek do wzrostu. Stężenie jej wzrasta w komórkach gruczołowych w czasie wydzielania i w tkankach rosnących. Szczególnie dużo beta-glikuronidazy znajduje się w tkance rakowej, stwierdzono ją też w płynie opłucnowym i otrzewnowym u chorych na raka (*Fishman* 2, 26, 27). *Fishman* postawił hipotezę (25), że enzym ten syntetyzuje glikuronidy estrogenu, jako pierwszy etap użytkowania ich w tkankach, a zwiększona ilość beta-glikuronidazy odpowiada zwiększonej aktywności estrogenów i innych steroli.

Estrogeny *in vitro* zmniejszają oddychanie skrawków wątrobowych i tkanek nowotworowych przez hamowanie enzymów oksydoredukcyjnych (dehydrogenazę bursztynową, jabłkową, szczawioowo-octową i oksydazę cytochromową), nie wykazano jednak podobnego działania *in vivo* (64).

Kora nadnerczy wytwarza hormony sterolowe regulujące gospodarkę solną, wodną i białkową w ustroju. W korze zależnie od płci, wieku i gatunku zwierzęcia powstają również hormony płciowe. Przy zachowanej przysadce można przez usunięcie jednego nadnercza, przez różne czynniki toksyczne lub bodźce fizyczne wywołać przerost kory nadnercza, któremu towarzyszy zanik grasicy, inwolucja tkanki limfatycznej i limfopenia we krwi. U zwierząt z usuniętą przysadką działa tak samo podawanie ACTH. Długie podawanie ACTH, tak jak i długotrwały wysiłek prowadzą do zupełnego zniknięcia z kory nadnerczy cholesterolu, witaminy C i do ustania syntezy hormonów. Synteza hormonów sterolowych w korze nadnercza zwierząt bezprzysadkowych przebiega tak wolno, że tylko w warunkach optymalnych wystarcza do utrzymania życia. Zwierzęta takie giną przy każdym wysiłku wymagającym zwiększonej produkcji hormonów korowych.

Niewydolność kory daje zespół wieloobjawowy, obejmując niewydolność przewodu pokarmowego, układu krążenia, zaburzenia wydalania przez nerki, osłabienie siły i zmniejszenie masy mięśniowej, spadek wagi ciała, przerost tkanki limfatycznej i grasicy, zmniejszoną odporność na infekcje, urazy i wszelkie zmiany w otoczeniu. Od śmierci chroni wyciąg z kory nadnercza, progesteron lub obecność tkanki luteinizującej, natomiast podawanie estrogenów znacznie pogarsza stan zwierzęcia.

ACTH i kortyna utrzymują w normie odporność zwierzęcia na pewne infekcje bakteryjne, ale równocześnie znacznie zmniejszają odporność na niektóre infekcje wirusowe.

2. Eksperymentalne nowotwory wywołane estrogenami

Estrogeny — tak naturalne jak i syntetyczne — podawane przez długi okres czasu i w dużych dawkach wywołują u niektórych zwierząt nowotwory różnych narządów.

Ze wszystkich gryzoni najwrażliwsze na rakotwórcze działanie estrogenów są myszki, choć i u nich podatność na zmiany nowotworowe zależy od szczepu hodowlanego. Znacznie mniej wrażliwe są szczury i świnki morskie, a prawie zupełnie odporne są chomiki. U psów, małą, kotów nie otrzymano nowotworów po stosowaniu estrogenów lub innych hormonów sterolowych.

Nowotwory wywołane estrogenem nie powstają w miejscu wprowadzenia, rakotwórcze działanie objawia się tylko w narządach, których czynność kontrolowana jest przez hormony płciowe.

Rakotwórcze działanie estrogenów przeważnie jest znoszone przez równoczesne podawanie androgenów, progesteronu lub kortyny.

U myszy ze szczepów podatnych na raka otrzymano przez podawanie estrogenów u obu płci raka sutka, w pewnych przypadkach raka nadnerczy, nowotwory gruczołów płciowych (55, 53), nowotwory przysadki (17, 18), białaczkę limfatyczną i nowotwory węzłów limfatycznych (29, 30). U szczepów opornych na raka opisano zmiany nowotworowe w pęcherzu moczowym i raka szyjki macicy (54).

U szczurów otrzymano nowotwory gruczołów płciowych i układu limfatycznego.

U świnki morskiej wywołano włókniaki macicy i jamy brzusznej (60). Zmiany te nie są złośliwe i ustępują samoistnie po odstawieniu estrogenów.

Ostatnio *Kirkman* (49) otrzymał złośliwy nowotwór nerki u chomików po jednorazowym założeniu plomby podskórnej z dwuetylostilbestrolu. Po 250 dniach od założenia plomby rozwijał się złośliwy nowotwór nerki, ale tylko u samców. U samców kastrowanych i u samiczek estrogeny nie wywołują zmian w nerce. Cholesterol podawany równocześnie z estrogenem chronił samce od zmian nowotworowych.

2-acetylo-aminofluoren podawany równocześnie z estrogenem wywołuje złośliwy nowotwór przysadki (5).

3. Nowotwory spontaniczne

a. Rak sutka u myszy

Spontaniczny rak sutka jest powszechną chorobą dojrzałych samiczek, daje często przerzuty do płuc, ulega bardzo rzadko regresji i daie się transplantować; ma wiele podobieństwa do raka gruczołu piersiowego u kobiet.

W etiologii raka sutka u myszek mają znaczenie co najmniej dwie grupy czynników: czynnik infekcyjny i odporność gospodarza. Badania nad rakiem sutka prowadzono od początku XX wieku w wielu pracowniach na całym świecie, a mimo to właściwy czynnik infekcyjny uchodził uwadze aż do odkrycia przez *Bittnera* w 1936 r. (7) czynnika „incytującego“, znajdującego się w mleku myszek karmiących.

Przez długi czas uważano, że rak sutka u myszek jest uwarunkowany czynnikiem dziedzicznym i hormonalnym. Hodowle myszek podzielono na szereg szczepów różniących się pomiędzy sobą częstością występowania raka sutka. W pewnych szczepach rak sutka występuje w 100%, w innych jest chorobą rzadką. *Bittner* stwierdził, że myszki szczepów wrażliwych, o ile nie są karmione przez matki, nie zapadają na raka sutka. Dalsze intensywne prace nad czynnikiem *Bittnera* prowadzone w kilku pracowniach (*Bittner* 8, *Dmochowski* i *Passy* 21, 73, *Graff* 33, *Andervant* 1) stwierdziły, że jest on specyficznym wirusem, niszczącym po 30-minutowym ogrzewaniu w 60°, i że da się izolować z tkanek szczepów myszek wrażliwych na raka oraz stale występuje w dużych ilościach w tkance rakowej. Przenoszony jest przez mleko również i matek zdrowych i może pozostawać nawet przez 9 pokoleń w stanie utajonym zachowując zdolność samomnożenia się, nie dając zmian nowotworowych u gospodarza.

Z drugiej strony zebrano bardzo duży materiał świadczący o tym, że sam wirus nie wystarcza do wywołania zmian nowotworowych. Z poznanych czynników warunkujących powstanie raka sutka wysuwają się na pierwszy plan hormony.

Już z początkiem XX wieku prace *Loeba* (56, 63) wykazały, że usunięcie jajników u młodych myszek chroni je w znacznym stopniu przed wystąpieniem raka sutka. *Cori* (13) potwierdził doświadczenia *Loeba* nad wpływem owariektomii na częstość występowania raka u myszek. Następnie stwierdzono, że podawanie estrogenów znacznie zwiększa częstość występowania raka sutka (*Goormaghtich* 32), a testosteron chroni od jego powstawania (*Jones* 44). Przez długotrwałe podawanie dużych dawek estrogenów lub przez wszczepienie jajników młodym kastrowanym samcom otrzymano u nich raka sutka (*Murray* 70, *Lacassagne* 53). *Woolley* (86) wykazał, że gonadektomia w pierwszych dniach życia nie tylko nie chroni myszki przed wystąpieniem raka sutka, ale nawet znacznie przyspiesza wystąpienie raka u samiczek i wywołuje raka sutka u samców. Sekcja tych zwierząt wykazywała zawsze zmiany w nadnerczach i to zależnie od użytego szczepu myszek, porzawszy od hiperplazji nodularnej do typowych zmian rakowych, a często również zmiany nowotworowe w przednim płacie przysadki. U myszek poddanych wczesnej gonadektomii narządy związane z drugorzędowymi cechami płciowymi wykazywały stopień pobudzenia odpowiadający działaniu hormonów płciowych, tak estrogenów, jak androgenów. Hormony te są wydzielane przez raka nadnercza.

Po odkryciu rakotwórczego działania estrogenów w raku sutka przypuszczano, że poznanie mechanizmu działania syntetycznych, cyklicznych węglowodorów i syntetycznych estrogenów wyjaśni w pełni mechanizm rakotwórczego działania naturalnych hormonów płciowych. Olbrzymia ilość prac nad rakotwórczym działaniem hormonów sterolowych nie dała właściwie żadnych praktycznych ani teoretycznych rezultatów. Ogłaszane prace pełne często grubych błędów eksperymentalnych zaciemniały obraz i stwarzały coraz silniejsze sugestie o rakotwórczym działaniu hormonów płciowych, które ciągle jeszcze nurtują w poglądach licznych klinicy-

stów. Pewnym drogowskazem w interpretowaniu zależności raka sutka u myszek od hormonów płciowych stały się prace *Woolleya* (86), które omówię szerzej przy nowotworach wywołanych hormonami przysadki. Stwierdził on, że znaczenie hormonów w powstawaniu i rozwoju nowotworów nie jest związane z naturą danego hormonu i z jego strukturą chemiczną, a zależy od jego funkcji biologicznej i od wpływu, jaki on wywiera na cały układ wewnątrzwydzielniczy. Przez zmianę stanu hormonalnego można u myszy przyspieszyć lub opóźnić rozwój nowotworu i wpłynąć na jego umiejscowienie.

b. Rak gruczołu piersiowego u kobiet

Etiologia raka gruczołu piersiowego u kobiet jest nieznana. Mechanizm hormonalny regulujący wzrost gruczołu piersiowego u kobiet niewątpliwie wymaga oprócz hormonów płciowych jeszcze hormonów nadnerczy i przysadki. Opierając się na doświadczeniach na zwierzętach i na statystyce klinicznej uznano, że zaburzenia funkcji jajników są przyczyną raka piersi u kobiet. Nie stwierdzono jednak nigdy zmian w wydzielaniu hormonów w moczu; wydzielanie gonadotropiny i estrogenów nie odbiega od przyjętych norm dla danego wieku. Jediną zmianą, jaką stwierdzono u chorych na raka gruczołu piersiowego, jest znacznie zwiększony poziom beta-glikuronidazy we krwi (27).

Zaczęto stosować terapię hormonalną, która nie dała jednak spodziewanych rezultatów. Leczenie stosuje się w przypadkach nie nadających się do operacji albo w celach profilaktycznych po zabiegu operacyjnym. *Twombly* (84) na podstawie dużego materiału klinicznego podaje, że tylko 50% kobiet leczonych hormonami płciowymi odpowiada na to leczenie. Na ogół u młodych kobiet otrzymuje się poprawę przez podawanie dużych dawek androgenów, a u starszych — estrogenów. U młodych kobiet estrogen przeważnie pogarsza stan. Hormony płciowe, androgeny i estrogeny szczególnie dobry efekt leczniczy dają w przerzutach do kości tak raka piersi, jak tarczycy, łagodzą ból, powodują lepsze wapnienie przerzutów, co stoi prawdopodobnie w związku ze specyficznym pobudzeniem osteoblastów.

c. Rak gruczołu krokowego

Przerost i rak gruczołu krokowego są chorobą występującą tylko u ludzi. Częstość raka gruczołu krokowego znacznie zwiększa się z wiekiem. Już w XIX stuleciu zwrócono uwagę na to, że u kastratów nie zdarza się rak gruczołu krokowego. Przypuszczano, że zaburzenia w wydzielaniu hormonów przez gruczoły płciowe są czynnikiem etiologicznym tak w łagodnym, jak i w złośliwym przeroście gruczołu krokowego.

Zastosowano leczenie raka gruczołu krokowego przez operacyjne usuwanie jąder i stwierdzono niewątpliwą efekt leczniczy. Ustępowały momentalnie bóle od przerzutów nowotworowych do kości i znacznie poprawiał się ogólny stan chorego. Po dość krótkim czasie jednak następował nawrót choroby i stan szybko się pogarszał. Operacyjne leczenie raka gruczołu krokowego nie zyskało wielu zwolenników i zaniechano operacji, jako metody zbyt drastycznej.

Rozległe badania *Hugginsa* (40, 41, 42, 43) nad wpływem hormonów płciowych na gruczoł krokowy, przeprowadzone na dużym materiale zwierzęcym, ustaliły zależność gruczołu krokowego i jego funkcji, jak też aktywności enzymów od hormonów płciowych. Wzrost gruczołu krokowego, wydzielanie i stężenie fosfatazy kwaśnej ściśle zależą od androgenów i estrogenów. Działanie tych hormonów jest antagoniistyczne. Usunięcie jąder wywołuje zanik gruczołu krokowego, zmniejszenie wydzielania i znaczny spadek aktywności fosfatazy kwaśnej. Podawanie testosteronu znosi efekt kastracji i zwiększa stężenie fosfatazy kwaśnej nie tylko w gruczole krokowym, ale również w surowicy, w płynie nasiennym i w moczu. Działanie

testosteronu jest hamowane przez estrogeny. Pewni autorzy uważają fosfatazę kwaśną za drugorzędną cechę płciową, gdyż aktywność jej wzrasta w miarę osiągnięcia dojrzałości płciowej. Charakterystyczny jest bardzo znaczny wzrost stężenia fosfatazy kwaśnej w surowicy u chorych na raka gruczołu krokowego, a brak zmian w normalnie niskim poziomie fosfatazy przy łagodnym przeroście gruczołu (*Gutman* 36). Oznaczanie tego enzymu we krwi służy za próbę diagnostyczną dla raka gruczołu krokowego, jak też daje wygodną i pewną metodę śledzenia przebiegu zmian nowotworowych w tym gruczole.

Hormony płciowe poza działaniem bezpośrednim na gruczoł krokowy wpływają również na niego pośrednio przez przysadkę mózgową. Estrogeny i androgeny hamują wydzielanie gonadotropiny, co pociąga za sobą zanik gruczołów płciowych i pośrednio wpływa na prostatę. Przez podawanie dużych dawek estrogenów otrzymuje się zanik jąder i zanik prostaty, spadek wydzielania 17-ketosteroidów i gonadotropiny w moczu. Podawanie dużych dawek androgenów wywołuje również zanik jąder i przerost gruczołu krokowego. U zwierząt nie otrzymano nigdy raka gruczołu krokowego nawet przez długotrwałe podawanie dużych dawek androgenów, a tylko u psów wywołano przerost gruczołu krokowego.

Na podstawie tych danych doświadczalnych *Huggins* w 1940 r. (42) zastosował w leczeniu raka gruczołu krokowego duże dawki estrogenów, podawane przez dłuższy okres czasu, z wynikiem niespodziewanie dobrym. Leczenie hormonalne *Hugginsa* stało się na ówczesne czasy rewelacją. Poprawa występowała wprawdzie wolniej niż po zabiegu operacyjnym, ale trwała dłużej. Poza tym jest to leczenie tanie i wygodne, gdyż można podawać syntetyczne estrogeny doustnie; nie daje ono żadnych powikłań i nie pociąga za sobą przykrych dla chorego konsekwencji kastracji.

Po leczeniu hormonalnym występują z reguły nawroty zupełnie odporne na dalsze leczenie. Nawrót choroby po kastracji jest zupełnie niewrażliwy na stosowanie estrogenów i odwrotnie, nawrót po leczeniu hormonalnym nie reaguje na zabieg operacyjny. Leczenie raka gruczołu krokowego estrogenami jest jedną z najbardziej konkretnych zdobyczy zastosowania hormonów w leczeniu i profilaktyce chorób nowotworowych.

d. Białaczki limfatyczne i nowotwory węzłów limfatycznych

Spontaniczne białaczki limfatyczne i nowotwory węzłów limfatycznych występują często w pewnych szczepach hodowlanych myszy, a w innych szczepach zdarzają się bardzo rzadko. Zmiany nowotworowe układu limfatycznego są pospolitą chorobą u ptaków i dają bardzo dużą śmiertelność w hodowlach kur (*lymphomatosis* ptaków). Spontaniczna białaczka limfatyczna u myszy i *lymphomatosis* ptaków są infekcjami wirusowymi nabytymi w życiu płodowym. *Gross* (35) wykazał, że myszki niezależnie od szczepu użytego można zarazić białaczką limfatyczną tylko w pierwszych dniach życia przez podanie wyciągu lub przesączu z komórek białaczkowych otrzymanych z tkanek myszy chorych. Po siedmiu dniach życia myszki stają się zupełnie odporne na infekcję. Znane są liczne infekcje wirusowe, na które wrażliwość szybko spada z wiekiem (76).

Istnieją liczne podobieństwa pomiędzy białaczką i rakiem sutka u myszek. Analogie nie ograniczają się tylko do charakteru infekcyjnego, ale odnoszą się również do wpływów hormonalnych. W obu przypadkach infekcja przypada na pierwsze dni życia, a zmiany nowotworowe rozwijają się dopiero u myszek dojrzałych i dają się w pewnym stopniu kierować czynnikami hormonalnymi. Przytoczę fakty:

1. Usunięcie jajników u dojrzałych myszek opóźnia występowanie lub zmniejsza częstość białaczki limfatycznej. Długie podawanie estrogenów przyspiesza i zwiększa częstość białaczki (30).

2. Usunięcie jąder przyspiesza występowanie zmian białaczkowych, a podawanie androgeny chroni od nich (30).

3. Usunięcie nadnerczy przyspiesza wystąpienie białaczki i znacznie zwiększa wrażliwość myszy na implantowanie nowotworów układu limfatycznego (Sturm 81).

4. Podawanie hormonów kory nadnercza lub ACTH chroni przed transplantowaniem białaczki i nowotworów układu limfatycznego, a u zwierząt chorych zmniejsza uszkodzenia lokalne i przedłuża życie (Woolley 87, Murphy 71, 72).

Estrogen jest silnym czynnikiem leukemicznym, a androgeny i kortykosteroidy działają antagonistycznie. Moon (65) stwierdził, że długie podawanie estrogenów zwierzętom zarówno zdrowym, jak i ze zmianami nowotworowymi w układzie limfatycznym, wywołuje nienormalności podziału w limfocytach tkankowych. Adrenalectomia zwiększa wrażliwość zwierząt na estrogen (Seley 79).

Segal i Leblond (78) stwierdzili inwolucję całej tkanki limfatycznej po podaniu ACTH u zwierząt normalnych i brak zmian u zwierząt z usuniętym nadnerczem. W 1945 r. Heiman i Kendall (37) badali wpływ ACTH i kortyzonu na przebieg spontanicznej i eksperymentalnej białaczki u myszy i szczurów. Stwierdzili, że ACTH lub kortyzon działają tak samo łitycznie na układ limfatyczny u zwierząt zdrowych, jak i u zwierząt ze zmianami nowotworowymi. Woolley (87) podaje, że ACTH lub kortykosteroidy znacznie zmniejszają uszkodzenia miejscowe i przedłużają życie chorej myszy. Działanie tych hormonów jest tylko czasowe.

Usunięcie z diety ryboflawiny działa na wzrost nowotworów układu limfatycznego tak jak podawanie kortykosteroidów. Zwierzęta trzymane na diecie bez witaminy B₂ stają się odporne na przeszczepianie nowotworu. Emerson (24) podawał szczurom z implantowaną limfosarkomą kortyzon i dietę bez ryboflawiny, spodziewając się szybszej regresji nowotworu. Podzielił zwierzęta na trzy grupy, którym podawał:

- 1) 0.5 do 1 mg kortyzonu dziennie i dietę bez ryboflawiny,
- 2) tylko dietę bez ryboflawiny,
- 3) 1 mg kortyzonu i dietę z dodaniem ryboflawiny.

Stwierdził, że dodanie ryboflawiny do diety znosi prawie zupełnie efekt leczniczy kortyzonu. Wszystkie myszki z grupy 3 ginęły z powodu szybko postępujących zmian nowotworowych. Natomiast w grupie 1 efekt leczniczy był o wiele szybszy niż w grupie 2. Już po dwóch dniach występowała znaczna poprawa, po czterech dniach guz nie dawał się namacać. Śmiertelność była jednak bardzo duża. Emerson tłumaczy to toksycznym działaniem szybko resorbującej się nekrotycznej tkanki nowotworowej. Nieliczne myszki, które przeżyły leczenie kortyzonem i ograniczeniem witaminowym, stawały się zupełnie odporne na ponowne transplantowanie limfosarkomy.

Pearson i Eliel (74) zebrali duży materiał kliniczny działania ACTH i kortyzonu w leczeniu białaczki u ludzi. W przypadkach opisanych przez autorów stosowano bardzo duże dawki ACTH, od 100 do 200 mg dziennie przez parę miesięcy aż do wystąpienia zespołu Cushinga. Stwierdzili czasowe znaczne zmniejszenie nacieków białaczkowych w wątrobie, śledzionie i węzłach limfatycznych. Po wyraźnej poprawie, tak w zmianach miejscowych, jak i w ogólnym stanie chorego, występuje szybki nawrót, znaczne pogorszenie stanu i zejście śmiertelne. Poprawę otrzymuje się nie we wszystkich białaczkach. Na leczenie kortyzonem lub ACTH najlepiej reaguje ostra białaczka limfatyczna i agranulocytarna. Bardzo słabo odpowiadają chroniczne białaczki, a białaczki szpikowe są zupełnie odporne.

W Klinice Wrocławskiej stwierdzono podobny efekt leczniczy ACTH (preparat wrocławski) w leczeniu różnych białaczek. Podawano ACTH tylko przez kilka dni i stwierdzano w ostrych białaczkach limfatycznych szybkie zmniejszanie się nacieków białaczkowych w wątrobie i śledzionie, znaczną poprawę stanu ogólnego,

pomimo braku poprawy obrazu krwi. Zastosowanie transfuzji wraz z podawaniem ACTH dało szybką poprawę obrazu krwi, znaczny wzrost ciałek czerwonych i spadek limfocytów do normy (*Gibiński 31*).

4. Wpływ kortykosteroidów i ACTH na rozwój nowotworów

Badania nad wpływem kortykosteroidów na wzrost nowotworów datują się zaledwie od paru lat. W 1942 r. *Kuizenga (52)* znalazł, że podawanie kortyzonu młodym szczurom zatrzymuje ich wzrost. Obserwacja ta wzbudziła zainteresowanie, czy hormony kory nadnerczy nie będą w podobny sposób wpływać na wzrost nowotworów. Mechanizm działania hormonów korowych w tym przypadku jest działaniem pośrednim, gdyż polega na hamowaniu wydzielania hormonu wzrostowego. Stwierdzono, że kortykosteroidy działają również bezpośrednio hamująco na wzrost pewnych tkanek. Szczególnie wrażliwa jest na działanie tych hormonów tkanka limfatyczna. *Green (34)* stwierdził działanie hamujące kortyzonu *in vitro* na mitozę komórek w hodowli fibroblastów. Znane jest również lecznicze działanie kortyzonu we wszystkich ranach związanych ze znacznym bujaniem tkanki ziarninowej. Kortyzon podany miejscowo wywołuje ścięczenie nitek fibroblastów.

Baker i Whitaker (4) opisał hamujący wpływ kortyzonu na wzrost raka skóry, wywołanego metylocholanrenem.

Zebrano duży materiał doświadczalny dotyczący stosowania kortyzonu w różnych nowotworach, tak eksperymentalnych, jak i spontanicznych. Stosowanie kortyzonu lub ACTH dawało prawie zawsze poprawę ogólnego stanu, jednakże wpływ hamujący na wzrost nowotworów stwierdzono jedynie przy nowotworach wychodzących z układu limfatycznego (*82*).

III. WPŁYW HORMONÓW PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI NA POWSTAWANIE I ROZWÓJ NOWOTWORÓW

1. Hormony przedniego płata przysadki

Płat przedni przysadki wytwarza hormony o naturze ciał białkowych: hormon wzrostowy, dwie gonadotropiny, hormon adrenokortykotropowy, laktotropowy i tyreotropowy. Wydzielanie hormonów przez przysadkę zależy od różnych czynników, a między innymi i od stężenia innych hormonów we krwi. Ustala się zatem równowaga w wydzielaniu hormonów, regulowana przez zużycie hormonów w tkankach i ich stężenie we krwi. Zwiększony poziom estrogenów we krwi hamuje wydzielanie gonadotropiny, a równocześnie pobudza wydzielanie ACTH, który podwyższa poziom hormonów korowych. Kortykosteroidy hamują wydzielanie hormonu wzrostowego i tyreotropowego. Tak więc zmiana stężenia jednego hormonu we krwi odbija się na całym układzie wewnątrzwydzielniczym, wpływając za pośrednictwem przysadki na syntezę innych hormonów.

Usunięcie przysadki wywołuje atrofię gruczołów wewnątrzwydzielniczych i na odwrót, usunięcie któregośkolwiek gruczołu wewnątrzwydzielniczego wywołuje zmiany morfologiczne i funkcjonalne w przysadce. Tak na przykład po usunięciu gruczołów płciowych powstają w przysadce komórki kastracyjne, a podawanie dużych ilości estrogenów lub androgenów prowadzi do zaniku gruczołów płciowych, wywołanego zmianami funkcjonalnymi i morfologicznymi przysadki.

2. Nowotwory jąder i jajników

Biskind (6) w r. 1944 otrzymał eksperymentalnie nowotwór jajnika wszczepionego do trzustki u dojrzałej i kastrowanej samicy szczura. Transplantowany jajnik nie wywołuje cyklu rujowego, a po paru miesiącach rozwijają się w nim zmiany

nowotworowe. Natomiast jajnik wszczepiony do pochwy zachowuje funkcję biologiczną i nie powstają w nim zmiany nowotworowe. Estrogen wydzielany przez jajnik wszczepiony do trzustki lub śledziony jest od razu inaktywowany przez wątrobę, tak że poziom jego we krwi jest zbyt mały, by wywołać ruję. Doświadczenia *Biskinda* zwróciły uwagę na rolę wątroby w inaktywowaniu estrogenów u gryzoni. Prace (*Twombly*, 84) z napiętynowanym dwuetylostilbestrolem wykazały, że do 80% podanego estrogenu wydziela się do 24 godzin z żółcią, a tylko 20% z moczem. Stwierdzono, że estrogen nie nagromadza się w żadnej tkance i jest wychwytywany z krwi przez wątrobę. U małp i prawdopodobnie u ludzi inaktywacja i wydzielanie estrogenów z żółcią nie ma takiego znaczenia jak u gryzoni. U małp jajnik wszczepiony do trzustki nie traci funkcji biologicznej, pobudza nadal cykl rujowy i nie powstaje w nim nowotwór (*van Wageningen* 85).

Nowotwory gruczołów płciowych transplantowanych do trzustki powstają przez trwałe obniżenie poziomu estrogenu we krwi i zwiększone przez to wydzielanie gonadotropiny, która pobudza przeszczepiony jajnik do stałej i nadmiernej pracy. Jajnik drażniony przez hormon przysadkowy przerasta, a po paru miesiącach wzrost jego staje się wzrostem nowotworowym. Przyczyną nowotworu jest w tym przypadku zaburzenie równowagi w układzie jajnik — przysadka, wywołane spadkiem poziomu estrogenów we krwi.

Prace *Biskinda* potwierdzili *Li* i *Gardner* (59, 60), którzy otrzymali podobne nowotwory u myszek. Stwierdzili oni ponadto, że podawanie kastrowanym dojrzłym myszom estradiolu lub testosteronu chroni je przed powstawaniem nowotworu w gruczole przeszczepionym do trzustki lub śledziony.

Już w 1936 r. *Cramer* (17, 18, 19) zwrócił uwagę na centralne znaczenie przysadki w powstawaniu nowotworów po długim podawaniu estrogenów. Stwierdził on, że u myszy, którym podawał duże ilości estrogenu, przysadka wykazywała zmiany histologiczne i ulegała przerostowi, a inne gruczoły stawały się atroficzne. Pobudzające działanie estrogenu na przysadkę można zahamować przez podawanie androgenów. Stwierdzono, że zmianom nowotworowym w gruczolach płciowych stale towarzyszą zmiany morfologiczne w korze nadnerczy, w przysadce, w tarczycy, a często i w innych gruczolach wewnątrzwydzielniczych.

3. Nowotwory nadnerczy

Inny ciekawy efekt zaburzenia równowagi hormonalnej pomiędzy wydzielaniem przysadki i gruczołów płciowych podaje *Woolley* (86). O tych pracach wspominałam wyżej omawiając wpływ hormonów sterolowych na rozwój raka sutka u myszek. *Woolley* otrzymał raka nadnerczy, czynnie wydzielającego hormony płciowe u pewnych szczepów myszy poddanych gonadektomii w pierwszych dniach życia. U wszystkich myszy, niezależnie od szczepu, wczesna gonadektomia wywołuje przerost kory nadnercza, która przyjmuje na siebie funkcję wydzielną usuniętych gruczołów płciowych i funkcji tej nie traci nawet wtedy, gdy rozwinię się rak. *Woolley* udowodnił, że istotnie etiologia tych zmian polega na zaburzeniu stanu hormonalnego wywołanego usunięciem gruczołów płciowych. Jednorazowe założenie plombki podskórnej z dwuetylostilbestrolem w drugim tygodniu życia u myszy kastrowanych zaraz po urodzeniu chroni myszki przed wystąpieniem zmian nowotworowych w nadnerczach. Podobnie działa androgen, natomiast progesteron, cis-testosteron i dezoksykortykosteron są zupełnie nieczynne.

4. Nowotwory gruczołów wewnątrzwydzielniczych u ludzi

Z obserwacji klinicznych znane są złośliwe nowotwory gruczołów płciowych, aktywnie wydzielające hormony. Szczególnie dużo androgenów wydzielają nowotwory wychodzące z komórek interstycjalnych jąder. Zwiększone wydzielanie

17-ketosteroidów w moczu dają nie tylko nowotwory jąder, ale także nowotwory jajników i kory nadnercza.

Bardzo złośliwy nowotwór jąder, jakim jest nabłoniak kosmówkowy, wydziela duże ilości gonadotropiny kosmówkowej. Stwierdzenie jej obecności w moczu pozwala na kliniczne zróżnicowanie pomiędzy stosunkowo łagodnym i podatnym na leczenie *seminoma* a bardzo złośliwym i zupełnie odpornym na leczenie nabłoniakiem.

Długotrwałe podawanie ACTH wywołuje przerost kory nadnercza i zespół objawów odpowiadający chorobie Cushinga. Choroba Cushinga łączy się zawsze ze zmianami w komórkach bazofilnych przysadki, wydzielających ACTH, i jest przeważnie spowodowana nowotworem nadnercza, czynnie wydzielającym hormony korowe.

Znane są również złośliwe nowotwory tarczycy, dające rozległe przerzuty do kości, silnie wiążące jod. Powstawanie hormonu w nowotworze złośliwym i jego przerzutach zależy tak samo od hormonu tyreotropowego, jak i w normalnych komórkach tarczycy.

5. Nowotwory wywołane hormonem wzrostowym

Pierwsze doświadczenia nad wpływem hormonu wzrostowego na nowotwory podjął *Moon* (66) w 1950 r. W kilku przypadkach otrzymał on limfosarkomę płuc u dorosłych szczurów, którym podawał przez 485 dni duże dawki krystalicznego hormonu wzrostowego. U wszystkich szczurów stwierdził przerost tkanki limfatycznej i powiększenie wzrostu ciała. W dalszych pracach wykazał *Moon* wraz ze współpracownikami, że przez podawanie dużych ilości krystalicznego hormonu wzrostowego można wywołać u innych zwierząt zmiany nowotworowe różnych gruczołów wewnątrzwydzielniczych (67, 68). U wszystkich tych zwierząt występują równocześnie zmiany histologiczne w przednim płacie przysadki i często gruczolaki (51). U zwierząt pozbawionych przysadki hormon wzrostowy nie wywołuje zmian nowotworowych w gruczołach wewnątrzwydzielniczych (69).

Doświadczenia *Moona*, które wymagają jeszcze dalszego potwierdzenia, wskazywałyby na zasadniczą rolę przysadki w mechanizmie powstawania nowotworów w gruczołach wewnątrzwydzielniczych. Ważne jest również stwierdzenie, że hormon wzrostowy, czynnik regulujący wzrost somatyczny zwierząt, w pewnych warunkach staje się czynnikiem wywołującym wzrost nowotworu.

IV. DYSKUSJA I STRESZCZENIE

Prace *Loeba*, *Lacassagne'a*, *Lipschütza* i wielu innych badaczy udowodniły, że istnieje zależność pomiędzy rakiem sutka myszy a hormonami płciowymi i że u pewnych zwierząt estrogeny podawane przez długi okres czasu w dużych dawkach wywołują raka różnych narządów. Od samego początku próby wytłumaczenia mechanizmu rakotwórczego działania estrogenów napotykały na wiele sprzeczności i niejasności.

Przypuszczano pierwotnie, że estrogeny, hormony normalnie powstające w jajnikach, są takimi samymi związkami rakotwórczymi jak benzopireny, aminostilbeny lub aminofluoreny (14, 15, 16). Rakotwórcze działanie folikulinę tłumaczono zatem analogią w budowie skondensowanych pierścieni sterolowych i rakotwórczych węglowodorów cyklicznych. Działanie rakotwórcze estrogenów nie pokrywało się jednak z działaniem rakotwórczym różnych syntetycznych związków. Nie umiano wytłumaczyć sobie, dlaczego estrogeny działają w pewnych przypadkach rakotwórczo, a w innych zatrzymują rozwój nowotworów. Tak rakotwórczy, jak i leczniczy efekt otrzymuje się tylko przez stosowanie dużych dawek i w sposób ciągły.

Również fakt, że podawanie hormonu antagonistycznego znosi działanie estrogenu, nie pokrywał się z teorią o rakotwórczym działaniu struktury sterolowej. Poza tym raki estrogenowe otrzymywano tylko u niektórych gryzoni i tylko w pewnych narządach i to zależnie od gatunku zwierzęcia, a nawet od szczepu hodowlanego. Uznano więc, że wrażliwość na rakotwórcze działanie estrogenów jest związana z cechami dziedzicznymi.

Tymczasem okazało się, że na rozwój raka można wpływać nie tylko hormonami, ale również różnymi czynnikami zmieniającymi środowisko wewnętrzne ustroju. Doświadczenia *Tannenbauma* (83) nad wpływem ograniczeń kalorycznych diety na rozwój nowotworów wykazały, że nowotwory dają się zatrzymać w swoim rozwoju przez trzymanie zwierząt na diecie ubogiej kalorycznie. Brak pewnych witamin zmniejsza również częstość występowania raka i hamuje jego rozwój. To samo stwierdzono dla innych składników dodatkowych pożywienia (11, 90). Przypuszczano, że ograniczenia dietetyczne stoją w związku z zaburzeniami w syntezie i metabolizmie hormonów w tkankach i poprzez zmianę stanu hormonalnego wpływają na rozwój nowotworu.

Równocześnie gromadziły się fakty przemawiające za etiologią wirusową pewnych spontanicznych nowotworów. Obecnie znamy liczne nowotwory wywołane przez wirusy (9, 89). W etiologii raka sutka u myszy hormony są czynnikiem nie mniej ważnym od specyficznego wirusa, gdyż są czynnikiem warunkującym rozwój nowotworu. Rakotwórcze działanie estrogenów w raku sutka u myszy sprowadza się do wpływu, jaki wywierają na metabolizm tkanki. Tkanka tylko w pewnym stanie metabolicznym staje się wrażliwa na wirus. Badania wyświetlające mechanizm powstawania odporności gospodarza na infekcje wirusowe to droga, na której obecnie usiłuje się rozwiązać problem nowotworów i ich zwalczanie.

Wrażliwość komórki na infekcje wirusowe jest uwarunkowana przez działanie witamin, hormonów i przez całą grupę czynników nieznanych, wśród których wiek zwierzęcia gra ważną rolę.

Pinkerton (75) stwierdził, że usunięcie tiaminy z diety zmienia *psittacosis* przebiegającą w postaci infekcji utajonej bez widocznych zmian patologicznych w śmiertelną chorobę z rozległymi nekrozami tkanek.

Wykazano, że kortykosteroidy zwiększają szybkość mnożenia się pewnych wirusów, jak też wpływają na podatność gospodarza na zarażenie się niektórymi wirusami. *Kilbourne* i *Horsfall* (48) stwierdzili, że jeden zastrzyk 2,5 do 5 mg kortyzonu wywołuje u dorosłej myszy nie wrażliwej na wirus *Coxsackie* zupełny spadek odporności i wrażliwość na infekcję taką jak u bardzo młodych myszy.

Wykazano, że testosteron i ACTH znacznie zwiększają szybkość mnożenia się wirusa grypy i mumpsu w płucach myszy (33). *Kilbourne* i *Horsfall* (47) znaleźli, że podanie 1 do 5 mg kortyzonu do worka omocznego embriona kury bezpośrednio przed zaszczepieniem wirusem grypy lub mumpsu zwiększa szybkość mnożenia się wirusa w porównaniu do hodowli wirusa w embrionie kontrolnym od 120 do 470%.

Opisano również wirusy, które zależnie od warunków pobudzają wzrost komórki lub wywołują jej destrukcję. Najważniejszym czynnikiem poznanym jest wiek zwierzęcia. Tak np. wirus fibromy u młodych królików, podawany w małych dawkach, wywołuje pojedyncze lub rozsiane włókniaki, a w dużych dawkach śmiertelną chorobę połączoną z destrukcją tkanek. U dorosłych zwierząt, niezależnie od dawki, wirus ten powoduje jedynie nowotwór w miejscu wstrzyknięcia (22).

Nie wiadomo, jaki jest mechanizm działania hormonów na mnożenie się wirusów u zwierząt, nie wiadomo, czy wszystkie z poznanych infekcji takiemu działaniu podlegają. Poznane fakty pozwalają jednak na przypuszczenie, że hormony mogą mieć udział w aktywacji utajonego wirusa nowotworowego, a to szczególnie hor-

mony sterolowe, których związek z odpornością i wrażliwością gospodarza jest najlepiej poznany.

Piękne prace *Duran-Reynalsa* (23) wykazały, że wirus ospy u ptaków może stać się czynnikiem etiologicznym dla powstawania raka, o ile na zmianę ospową zadziała się bodźcem mechanicznym lub metylocholanem. Związek rakotwórczy tak zmienia komórkę, że wirus, który wywołuje słabą proliferację tkanki, staje się wirusem wywołującym nowotwór złośliwy.

W świetle etiologii wirusowej nowotworów działanie rakotwórcze związków chemicznych da się sprowadzić do roli czynników wpływających na stan czynnościowy komórki, to znaczy do czynników warunkujących rozwój nowotworu.

Inną możliwość tłumaczenia znaczenia estrogenów w powstawaniu raka dały prace *Cramera*, *Biskinda*, *Moona*. Opisano szereg nowotworów wychodzących z układu wewnątrzwydzielniczego, dla powstania których jedynym znanym i stosowanym czynnikiem etiologicznym jest stan zaburzonej równowagi hormonalnej. Wprowadzenie jednego hormonu może wywołać zaburzenia tylko przy labilności mechanizmów regulujących wzajemne wydzielanie różnych hormonów. Hormony sterolowe schodzą do rzędu czynników wywołujących zaburzenia w wydzielaniu hormonów w przysadce, która wysuwa się obecnie na plan pierwszy.

Znaczenie płata przedniego przysadki w powstawaniu i rozwoju nowotworów występuje wyraźnie w badaniu mechanizmu powstawania eksperymentalnych nowotworów gruczolów wewnątrzwydzielniczych. Gruczoł wewnątrzwydzielniczy drażniony przez czas dłuższy i w sposób ciągły przez hormon tropowy przysadki ulega hipertrofii, która z czasem przechodzi w hiperplazję, a w pewnych przypadkach we wzrost nowotworowy. Hormon przysadki przez stałe trzymanie gruczolu podrzędnego w stanie pobudzenia staje się czynnikiem etiologicznym dla powstawania nowotworu.

Tak więc pierwotna koncepcja o rakotwórczym działaniu estrogenów rozszerza się na całość regulacji hormonalnych. *Hertz* (38) ostatnio podnosi centralne znaczenie przysadki w etiologii nowotworów i uważa, że zmiany morfologiczne i funkcjonalne przysadki są przyczyną wzrostu patologicznego i nowotworowego, tak jak prawidłowo funkcjonująca przysadka jest warunkiem wzrostu normalnego.

Eksperymentalne otrzymanie nowotworów złośliwych, czynnie wydzielających hormony, wskazuje na to, że przemiany w tkance nowotworowej nie są zupełnie niezależne od ogólnych regulacji ustrojowych, w każdym razie pozostają w tkance nowotworowej wychodzącej z gruczolu wewnątrzwydzielniczego pod działaniem hormonów przysadki.

Stwierdzenie zależności wzrostu nowotworów od stanu hormonalnego ustroju ma znaczenie nie tylko teoretyczne, ale i praktyczne. Przez odpowiednie pokierowanie stanem hormonalnym ustroju może w przyszłości stanąć się możliwe zatrzymanie rozwoju raka lub niedopuszczenie do jego powstania. Na razie terapia hormonalna nowotworów nie ma większego znaczenia i nie wychodzi poza krótkotrwały efekt, jaki otrzymuje się przez stosowanie ACTH, kortyzonu lub estrogenów w pewnych białaczkach limfatycznych, raku gruczolu krokowego i raku gruczolu piersiowego.

PIŚMIENNICTWO

- 1) *Andervant H. B.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 1004. — 2) *Anlyan A. J., Fishman W. H.*: 1947, *J. Biol. Chem.* 169, 449. — 3) *Atkinson W. B., Engle R. T.*: 1947, *Endocrinology* 40, 327. — 4) *Baker B. L., Whitaker W. L.*: 1950, *Endocrinology* 46, 544. — 5) *Bielschowsky F.*: 1947, *Brit. Med. Bull.* 4, 382. — 6) *Biskind M. S., Biskind G. R.*: 1944, *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 55, 176. — 7) *Bittner J. J.*: 1936, *Science*, 84, 162. — 8) *Bittner J. J.*: 1947, *Harvey Lectures*: 42, 221. — 9) *Black L. M.*: 1949, *Survey of Biological Progress* 1, 155. — 10) *Bovland E.*: 1950, *Biochimica et Biophysica Acta* 4, 293.
- 11) *Burk D., Winsler R. J.*: 1944, *Vitamins and Hormones* (Ed. *Harris R. S., Thiemann K. V.*): 2, 306. — 12) *Colovick S. P., Cori G. T., Slein M. W.*: 1947, *J. Biol. Chem.* 168,

583. — 13) *Cori C. F.*: 1927, *J. Exptl. Med. (Am.)* 45, 983. — 14) *Cook J. W., Hieger J., Kennaway E. L., Mayneord W. V.*: 1932, *Proc. Roy. Soc. London (B.)* 111, 455. — 15) *Cook J. W., Hieger J., Kennaway E. L., Mayneord W. V.*: 1932, *Proc. Roy. Soc. London B.* 111, 485. — 16) *Cook J. W., Dodds E. C.*: 1933, *Nature (Brit.)* 131, 205. — 17) *Cramer W., Horning E. S.*: 1936, *Lancet*, 231, 1056. — 18) *Cramer W., Horning E. S.*: 1936, *Lancet*, 230, 247. — 19) *Cramer W., Horning E. S.*: 1938, *Lancet*, 234, 72. — 20) *Dodds E. C.*: 1944, *Vitamins and Hormones* Ed. *Harris R. H.* and *Thiemann K. V.*, 2, 353.

21) *Dmochowski L., Passey R. D.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 1035. — 22) *Duran-Reynals F.*: 1945, *Cancer Research*, 5, 25. — 23) *Duran-Reynals F.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 977. — 24) *Emerson G. A., Wurtz E., Ganetti M. E.*: 1950, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4839. — 25) *Fishman W. H.*: 1947, *Cancer Research* 7, 808. — 26) *Fishman W. H.*: 1947, *J. Biol. Chem.* 169, 7. — 27) *Fishman W. H.*: 195, *The Enzymes* (Ed. *Sumner and Myrbäck*) 1, 635. — 28) *Fishman W. H., Fishman L. W.*: 1944, *J. Biol. Chem.* 152, 487. — 29) *Gardner W. U.*: 1947, *Cancer Research* 7, 37. — 30) *Gardner W. U., Dougherty T. F., Williams W. L.*: 1944, *Cancer Research* 4, 73.

31) *Gibiński K., Baranowski T., Meibaum-Katzenellenbogen W., Bogdanikowa B., Kowalówna B.*: 1952, *Pol. Tyg. Lek.* 7 nr 33/34, 1. — 32) *Goormaghtigh M., Amerlinck A.*: 1930, *Comp. Rend. Soc. Biol.* 103, 527. — 33) *Graff S., Heideberger M., Haagensen C. D.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 1012. — 34) *Green H. N.*: 1950, *Brit. Med. J.* 1, 1165. — 35) *Gross L.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 1184. — 36) *Gutman E. B., Sprowle E. E., Gutman A. B.*: 1936, *Am. J. Canc.* 28, 485. — 37) *Heilman F. R., Kendall E. C.*: 1945, *Endocrinology* 37, 147. — 38) *Hertz R.*: 1951, *Cancer Research* 11, 393. — 39) *Horsfall Jr. F. L.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 926. — 40) *Huggins C.*: 1945, *Physiol. Rev.* 28, 281.

41) *Huggins C., Hodges C. V.*: 1941, *Cancer Research*, 1, 293. — 42) *Huggins C., Scott W. W., Hodges C. V.*: 1941, *J. Urol.* 46, 997. — 43) *Huggins C., Stewens R. A.*: 1940, *J. Urol.* 43, 705. — 44) *Jones E. E.*: 1941, *Cancer Research* 1, 787. — 45) *Karanairatnam M. C., Kerr L. M. H., Levy G. A.*: 1949, *Biochem. J.* 45, 496. — 46) *Kerr L. M. H., Campbell J. G., Levy G. A.*: 1949, *Biochem. J.* 44, 488. — 47) *Kilbourne E. O., Horsfall F. L. Jr.*: 1951, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 76, 116. — 48) *Kilbourne E. C., Horsfall F. L. Jr.*: 1951, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 77, 135. — 49) *Kirkman H., Bacon R. L.*: 1950, *Cancer Research* 10, 122. — 50) *Kochakian C. D.*: 1946, *Vitamins and Hormones* (Ed. *Harris R. S.* and *Thiemann K. V.*) 4, 256.

51) *Koneff A. A., Moon H. D., Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M.*: 1951 *Cancer Research* 11, 113. — 52) *Kuizenga M. H., Nelson J. W., Ingle D. J.*: 1943, *Am. J. Physiol.* 139, 499. — 53) *Lacassagne A.*: 1932, *Comp. Rend. Ac. Sci. Paris*, 195, 630. — 54) *Lacassagne A.*: 1939, *Erg. der Vitamin- und Hormonforschung* (Ed. *Mellanby E., Ružicka L.*): 2, 258. — 55) *Lacassagne A.*: 1935, *C. R. Soc. Biol.* 120, 833. — 56) *Lathrop A. E. C., Loeb L.*: 1916, *J. Canc. Res.* 1, 1. — 57) *Lettrée H.*: 1943, *Z. physiol. Chem.* 278, 201. — 58) *Lettrée H., Lettrée R., Pflanz Ch.*: 1951, *Naturwissenschaft* 38, 70. — 59) *Li M. H., Gardner W. U.*: 1947, *Science* 105, 13. — 60) *Li M. H., Gardner W. U.*: 1947, *Science* 106, 270.

61) *Lipschütz A.*: 1946, *J. Clin. Endocr.* 6, 196. — 62) *Lipschütz A.*: 1950, *Steroid Hormones and Tumors* (*Williams and Wilkins*, Baltimore Maryland). — 63) *Loeb L.*: 1919, *J. Med. Research* 40, 417. — 64) *Meyer R. K., McShan W. H.*: 1950, *Recent Progress in Hormone Research* (Ed. *Pincus G.*): 5, 465. — 65) *Moon H. D.*: 1950, *Cancer Research* 10, 238. — 66) *Moon H. D., Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M.*: 1950, *Cancer Research* 10, 297. — 67) *Moon H. D., Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M.*: 1950, *Cancer Research* 10, 364. — 68) *Moon H. D., Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M.*: 1950, *Cancer Research* 10, 549. — 69) *Moon H. D., Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M.*: 1951, *Cancer Research* 11, 535. — 70) *Murray W. S.*: 1928, *J. Canc. Res.* 12, 18.

71) *Murphy J. B.*: 1944, *Cancer Research* 4, 622. — 72) *Murphy J. B., Sturm E.*: 1944, *Science* 99, 303. — 73) *Passey R. D., Dmochowski L., Reed L., Astbury W. T.*: 1950, *Biochim. et Biophys. Acta* 4, 391. — 74) *Pearson O. H., Eliel L. P.*: 1951 cytowane wedle *Ann. Rev. Biochem.* 20, 343. — 75) *Pinkerton H.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 874. — 76) *Sabin A. B.*: 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 936. — 77) *Santisteban G. A., Scheebeli G. L., Dougherty T. F.*: 1950, *Cancer Research* 10, 238. — 78) *Segal G., Leblond C. P.*: 1942, *Am. J. Roentgenolog.* 47, 302. — 79) *Seley E. H.*: 1946, *J. Clin. Endocrin.* 6, 117. — 80) *Spiegelman D. S.*: 1950, *The Enzymes* Ed. *Sumner and Myrbäck*, 1, 267.

81) *Sturm E., Murphy J. B.*: 1943, *Science* 98, 568. — 82) *Sugiura K., Stock C. C., Dobriner K., Roids C. P.*: 1950, *Cancer Research* 10, 244. — 83) *Tannenbaum A., Silverstone H.*: 1949, *Cancer Research* 9, 607. — 84) *Twombly G. H., Schoenewaldt E. F.*: 1951, *Cancer* 4, 296. — 85) *van Wagenen G., Gardner W. U.*: 1950, *Endocrinology* 46, 265. — 86) *Woolley G. W.*: 1950, *Recent Progress in Hormone Research* (Ed. *Pincus G.*) 5, 383. — 87) *Woolley G. W.*: 1950, *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* 74, 286. — 88) *Endocrinology of Neoplastic Diseases*. Ed. *Twombly G. H.* 1947. — 89) *Viruses as Causative Agents in Cancer*, 1952, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 54, 869. — 90) *Nutrition in Relations to Cancer*, 1947, *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 49, 1.

BOLESŁAW SKARŻYŃSKI (KRAKÓW)

WPLYW ODŻYWIANIA I SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH NA ROZWÓJ NOWOTWORU

Autonomia komórki nowotworowej jest jej najbardziej znamioną cechą, dominującą we wszystkich rozważaniach teoretycznych dotyczących raka. Niezależność guzów nowotworowych od fizjologicznych czynników regulacyjnych czyni z nich właśnie owe niezwykle patologiczne twory, wobec których załamują się schematy myślenia biologa i patologa oparte na klasycznej koncepcji harmonijnego współdziałania i wzajemnego przystosowywania się tkanek ustroju. W rzeczywistości owa autonomia nowotworów ma jednak niezbyt szerokie granice. Zależność rozwijającego się nowotworu od środowiska zewnętrznego, stwarzanego dla guza przez organizm nosiciela, jest niejednokrotnie dosyć znaczna. Słyszeliśmy już tutaj, że czynniki hormonalne wywierają na kancerogenezę poważny wpływ i że rozwój nowotworu bynajmniej nie przebiega niezależnie od działania, jakie na komórki nowotworowe wywierają chemiczne czynniki regulacyjne. Do tkanki nowotworowej docierają wraz z krwią nosiciela przeróżne związki chemiczne, które przecież w ten lub inny sposób muszą wpływać na procesy życiowe komórki guza.

Nowotwory nie są oddzielone od środowiska, w którym się rozwijają, jakimś ochronnym pancierzem. Środowisko to musi na nie wywierać wpływ i modyfikacja środowiska w sensie tworzenia warunków niesprzyjających powstawaniu i rozwojowi nowotworów jest jedną z dróg, które mogą doprowadzić do skutecznej walki z rakiem. Ponieważ fizyko-chemiczna struktura tego środowiska uzależniona jest w znacznej mierze od sposobu odżywiania się nosiciela nowotworu, zagadnienie wpływu odżywiania na rozwój nowotworów poruszane było już od dosyć dawna. Początkowo traktowane niesystematycznie i dorywczo zagadnienie to stanowiło w ciągu ostatnich kilkunastu lat temat szeregu prac doświadczalnych, które w dziedzinę problematyki raka wnoszą nowe, ustalone już fakty.

O wpływie jakościowych i ilościowych różnic odżywiania człowieka na zapadalność na raka myślało wielu statystyków, analizując odpowiednie cyfry uzyskane z list zgonów, statystyk szpitalnych i protokołów sekcyjnych. Rozważania te, jakkolwiek oparte przeważnie na niedostatecznym materiale, doprowadzały z reguły do wniosku, że rak jest bardziej pospolitym schorzeniem u ludzi dobrze odżywionych, szczególnie u otyłych, niż u osobników niedożywionych. Szczególną wartość mają cyfry zebrane w r. 1929 przez *Dublina*, który na podstawie 192 000 kart rejestracyjnych jednego z największych amerykańskich towarzystw ubezpieczeniowych doszedł do wniosku, że zapadalność na raka u osób o normalnej wadze ciała wynosi w jego materiale 111 na 100 000. Natomiast u ludzi, których waga ciała przekraczała więcej niż o 23% wagę prawidłową, zapadalność ta wynosi 143 na 100 000, a u osób o wadze ciała 85% wagi prawidłowej zapadalność wyraża się cyfrą 95 na 100 000 (1).

Innego rodzaju materiału dostarczają dane statystyczne dotyczące częstości występowania pierwotnego raka wątroby. Jak wiadomo, na Archipelagu Malajskim i wśród Murzynów w południowej Afryce ta postać raka jest najpospolitszą spośród wszystkich lokalizacji nowotworów; u Murzynów Bantu reprezentuje pierwotny rak wątroby około 40% wszystkich nowotworów. Ludzi białych, żyjących w tych samych warunkach klimatycznych, cechuje zapadalność na raka wątroby taka sama, jaka jest charakterystyczna dla warunków europejskich. Przez długi czas myślano o wpływie konstytucji, o czynnikach rasowych itd., ale statystyki amerykańskie wykazały, że zapadalność na raka wątroby u Murzynów w Ameryce nie różni się od zapadalności osobników białych. Dziś wszyscy badacze zajmujący się tym zagadnieniem przyjmują, że przyczyną tak znacznej częstości pierwotnego raka wątroby u Murzynów południowo-afrykańskich jest sposób odżywiania się, przy czym decydujący wpływ w tym wypadku ma wywierać nie obecność jakichś szkodliwych czynników w diecie, ale szczególnie wzajemny stosunek białka, tłuszczu i witaminów zawartych w pokarmie (2).

Z chwilą odkrycia chemicznych związków rakotwórczych poczęły mnożyć się coraz to bardziej prace doświadczalne, mające na celu wyjaśnić problem wpływu sposobu odżywiania zwierząt na zapadalność ich na chemicznie wywołane nowotwory. W okresie przedwojennym prace te były liczne, nie brak było również doświadczeń idących w tym kierunku wykonywanych w Polsce, ale wszystkie te badania mają dziś tylko wartość historyczną. Przeprowadzane były na ilościowo niewystarczającym materiale, nie wytrzymywały kryteriów statystycznych, oparte były na stosowaniu karmy o nieznanym składzie. Późniejsze badania przeprowadzane bardziej sumiennie doprowadzały z reguły do wykazania bezpodstawności wniosków wyciąganych z tych pierwotnych prac.

Niemniej, już lata przedwojenne przyniosły również szereg sumiennych badań wskazujących na pewien wpływ diety na występowanie nowotworów. Znany badacz amerykański, *Strong*, któremu nauka zawdzięcza wyhodowanie pewnych homozygotycznych szczepów myszy, cechujących się stałą, liczbowo określoną zapadalnością na raka sutka, zaobserwował, że wiek myszy, w którym pojawiały się najczęściej samorzutne nowotwory, zmienił się z chwilą, gdy przeniósł się ze swą hodowlą z Uniwersytetu Ann Arbor w stanie Michigan do New Haven w stanie Connecticut. Przyczynę tej zmiany znalazł w odmiennej karmie, którą podawano myszom. Podjął więc doświadczenia na wielką skalę, karmiąc setki mysz z jednego i tego samego szczepu karmą o odmiennym charakterze. W ciągu kilku lat zebrał bogaty materiał, który poddany statystycznej analizie wykazał ponad wszelką wątpliwość, że charakter karmy wpływa na częstość występowania samorzutnych nowotworów. Na przykład myszy pochodzące z słynnego szczepu CBA karmione zwykłą handlową karmą ginęły w 75—80% na nowotwory, natomiast karmione dietą, której podstawą była mąka owsiana, wykazywały występowanie nowotworów zaledwie w 4% ogólnej ilości hodowanych zwierząt (3).

Badania *Stronga* są na ogół pomijane w piśmiennictwie amerykańskim, a przecież mają one doniosłe ogólnobiologiczne znaczenie. Częstość występowania samorzutnych nowotworów i wiek zwierzęcia, w jakim nowotwory pojawiają się, jest uważany przez klasycznych genetyków amerykańskich za charakterystyczną, niezmienną cechę dziedziczną, która w homozygotycznych szczepach mysz ma być uwarunkowana odpowiednią kombinacją genów. Sumienne i oparte na bogatym materiale statystycznym badania *Stronga* wykazują, że ta cecha dziedziczna daje się zdecydowanie zmodyfikować działaniem czynników zewnętrznych. Dla nas ważne jest to, że badania *Stronga* wykazały po raz pierwszy na bogatym materiale doświadczalnym możliwość wywierania wpływu na powstawanie samorzutnych nowotworów przez jakościowe zmiany pożywienia.

W r. 1940 rozpoczął *Tannenbaum* w Chicago badania, które po szeregu lat

doprowadziły do ustalenia pewnych bardzo ciekawych faktów. Hodował on serię myszy pochodzących z jednego i tego samego szczepu na trzech typach karmy. Jeden stanowiła zwykła wypróbowana pełnowartościowa dieta laboratoryjna, z której zwierzęta korzystały do woli. Druga seria myszy otrzymywała tę samą karmę, ale w ilościach wydzielonych, nie odpowiadających całkowicie potrzebom zwierzęcia. Trzecia seria otrzymywała w dowolnych ilościach karmę z wybitnie zredukowaną zawartością węglowodanów, a więc dietę pod względem kalorycznym niepełnowartościową. W ten sposób hodowano myszy z homozygotycznych szczepów, obarczonych wielką częstością samorzutnych guzów, zarówno raka sutka, jak i raka płuc oraz białaczki. Poza tym w ten sam sposób hodowano myszy, których skórę pędzlowano czynnikami rakotwórczymi. Doświadczenia powtarzano wielokrotnie i zebrano materiał wytrzymujący próbę krytyki statystycznej.

Wyniki badań *Tannenbauma* były jednoznaczne. Ograniczenia kaloryczne karmy redukowały znacznie częstość samorzutnie występujących guzów, ponadto przedłużały znacznie wiek zwierząt, w którym zachodziło masowe pojawianie się nowotworów. Okres utajonego działania substancji rakotwórczych był również znacznie przedłużony, a poza tym częstość dodatnich wyników pędzlowania skóry substancjami rakotwórczymi znacznie malała. Natomiast ograniczenie dowozu kalorii nie wywierało żadnego wpływu na rozwój nowotworu, który się już pojawił. W tym wypadku redukcja doprowadzanych z pokarmem kalorii raczej ułatwiała występowanie charłactwa nowotworowego (4).

Analogiczne badania, choć nie tak rozległe, powtarzano również w innych pracowniach, zawsze z tym samym zgodnym wynikiem — niedobór kalorii utrudnia powstawanie nowotworów, natomiast nie wywiera żadnego wpływu na jego rozwój (5).

Wy tłumaczenie tego ciekawego zjawiska nie jest łatwe. Początkowo przypuszczano, że przyczyną opóźnienia występowania nowotworów jest niedostateczny dowóz energiodajnej glikozy do pierwotnego ogniska nowotworowego. Dokładniejsza doświadczalna analiza wskazała jednak na udział innych czynników. Niedobór kaloryczny obniża znacznie czynność gruczołów dokrewnych, szczególnie gruczołów płciowych i przysadki. Smutne obserwacje z obozów koncentracyjnych i z getta warszawskiego wskazują szczególnie dobitnie na ten fakt. Zmiany czynności tych gruczołów dokrewnych w następstwie ograniczenia dowozu kalorii zostały u zwierząt doświadczalnych wykazane niezbitnie. Warunki, jakie stwarzała myszom *Tannenbaum*, powodowały pewnego rodzaju kastrację i hipofizektomię. Te okoliczności dostatecznie tłumaczą redukcję występowania samorzutnych guzów sutka u mysz podczas kalorycznego głodowania. Czy w ten sam sposób można wytłumaczyć zahamowanie występowania nowotworów skóry spowodowanych metylocholantrinem, tego nie wiadomo i problem ten powinien być dalej śledzony.

Szereg badań przeprowadzano nad wpływem redukcji ilości białka w pokarmie na występowanie nowotworów. Zdawało się, że właśnie ograniczenie samego budulca komórkowego, jakim są aminokwasy zawarte w białku pokarmowym, powinno w jakiś sposób działać na przebieg rozwoju nowotworów. Zarówno badania *Tannenbauma*, jak innych specjalistów w zakresie tego problemu, np. *Kline'a* i *Rusha*, nie wykazały jednak żadnego wpływu ilości białka zawartego w karmie na częstość występowania nowotworów sutka, na szybkość powstawania nowotworów doświadczalnych i na rozwój nowotworów przeszczepionych.

W świetle naszej znajomości biologii nowotworów, a szczególnie ich przemiany materii, nowotwory cechują się jednokierunkowym charakterem przemiany białkowej. Zawartość białek w tkankach prawidłowych jest wyrazem równowagi dynamicznej między bezustannie przebiegającymi procesami syntezy białka z aminokwasów krążących w ustroju i procesami rozkładu białka na pojedyncze aminokwasy. Zasób wolnych aminokwasów w ustroju zwierzęcym stanowi pulę, z której

tkanki dorosłe zabierają w jednostce czasu tyle aminokwasów, ile ich równocześnie do tej puli oddają. Tkanka nowotworowa korzysta z tej puli jednostronnie, wybierając aminokwasy, ale ich nie oddając. Jakkolwiek białka nowotworu również ustawicznie ulegają rozpadowi i resyntezie, to jednak aminokwasy powstałe w toku rozpadu nie wracają do ogólnej puli aminokwasowej ustroju, lecz zostają od razu wbudowane w nowopowstające białka nowych komórek. Pięknie ilustrują ten charakter przemiany białkowej nowotworów doświadczenia *Le Page'a* i *Pottera* (6), którzy posługiwali się dodatkiem glikokolu nacechowanego radioaktywnym węglem do karmy myszy obarczonych przeszczepialnym nowotworem. Nawet w stanie zupełnego głodowania zwierzęcia izotopowy glikokol wbudowany był przede wszystkim w białko nowotworowe. Można więc z całą pewnością twierdzić, że nawet przy zupełnym braku białka w pokarmie nowotwór będzie rósł kosztem aminokwasów powstających z białka tkanek prawidłowych.

Wspomnieć należy o doświadczeniach polegających na karmieniu zwierząt doświadczalnych dietą, w której dwa typowe egzogenne aminokwasy — cystyna i lizyna, reprezentowane były w niewystarczających dla potrzeb ustroju ilościach (*White* i *Andervant*, 7). W pewnych seriach doświadczeń dieta cechująca się niedoborem cystyny lub lizyny istotnie hamowała występowanie samorzutnych nowotworów lub też nowotworów wywoływanych czynnikami rakotwórczymi. Powtórzenie tych badań w innych pracowniach wykazało jednak, że zwierzęta na tak spreparowanej karmie traciły apetyt, jadły znacznie mniej, a więc że obserwowane efekty były spowodowane nie niedoborem egzogenego aminokwasu, ale niedoborem kalorycznym.

Doświadczenia te mogą służyć jako przykład źródeł omyłek, które tak często nasuwają się w toku doświadczalnych badań nad tumorami.

Z domniemaną rolą aminokwasów w rozwoju nowotworów logicznie wiąże się bardzo ciekawy problem, zaktualizowany w onkologii dopiero w latach ostatnich. Wiadome jest, że niedobór choliny, szczególnie przy nadmiarze cystyny w pokarmach, jest co najmniej jednym z czynników warunkujących powstanie marskości wątroby. Ponieważ marskość wątroby — zdaniem anatomopatologów — wiąże się z zagadnieniem pierwotnych nowotworów wątroby, a przez niektórych uważana jest za pewnego rodzaju stan przednowotworowy, udział choliny w kancerogenezie został poddany doświadczeniom. *Copeland* i *Salmon* karmiąc szczury przez wiele miesięcy dietą zawierającą tylko minimalne ilości choliny stwierdzili u 40 spośród 69 szczurów guzy (8). U szczurów hodowanych na identycznej diecie z dodatkiem choliny żadnych nowotworów nie było. Podobne doświadczenia przeprowadzono z analogicznym wynikiem i w innych pracowniach. Nowotwory w ten sposób wywołane cechowały się różną lokalizacją: najczęściej występowały w płucach, w węzłach chłonnych i w wątrobie. Szczególnie równoczesne ograniczenie dowozu białka ułatwia występowanie nowotworów związanych z niedoborem choliny. Niektórzy badacze twierdzą, że w ogóle przewlekłe niedożywienie jest jednym z czynników współdziałających w powstawaniu pierwotnego raka wątroby na tle zmian o charakterze marskości.

Cholina jest jednym z ważnych elementów w tzw. procesach transmetylacji w ustroju zwierzęcym, wynikiem których jest powstawanie związków cechujących się odpowiednio związaną grupą metylową. Tymina, metylopuryna wchodząca w skład kwasu dezoksyrybonukleinowego, powstaje najprawdopodobniej endogenie w ustroju zwierzęcym przy udziale choliny. Możliwe jest więc, że niedobór choliny pociąga za sobą utrudnienie syntezy tyminy, co w dalszej konsekwencji ogranicza syntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego. Może to zakłócić prawidłowy wzajemny stosunek obu kwasów nukleinowych i w ten sposób wyzwolić zaburzenia metabolizmu komórki, doprowadzające ostatecznie do przekształcenia nowotworowego. Oczywiście jest to tylko śmiała hipoteza, ale nie ulegające wątpliwości powstawanie

nowotworów i to rozmaicie zlokalizowanych w następstwie niedoboru choliny zmusza do poważnego zastanowienia się nad tym problemem.

Ubocznie zaznaczyć należy, że uretan, związek silnie hamujący procesy transmetylacji, jest również substancją powodującą u mysz powstawanie nowotworów płuc.

Doniosta rola witaminów w metabolizmie komórek była powodem, dla którego wpływ nadmiaru lub niedoboru poszczególnych witaminów na kancerogenezę był niezliczoną ilość razy doświadczalnie badany. Większość tych badań, szczególnie dawniejszych, nie odpowiada kryteriom, jakie stosujemy do ścisłych doświadczeń tego typu. Ale nawet w tych licznych wypadkach, gdy badania nad wpływem witaminów na wzrost nowotworów były przeprowadzane z zachowaniem wszelkich wymogów ścisłości, uzyskane w różnych pracowniach wyniki są tak rozbieżne, że wysnucie jakichś jednoznacznych wniosków jest niemal niemożliwe. Dla przykładu omówię w krótkości problem roli witaminu A w kancerogenezie.

Witamin A jest niezbędny dla prawidłowej regeneracji naskórka i nabłonków i brak jego uzewnętrznia się przede wszystkim w postaci charakterystycznej metaplastji i zrogowacenia tych tkanek. Ewentualna rola witaminu A w procesach życiowych innych narządów (poza siatkówką) do tej pory jest bliżej nieznaną. Główne zapasy witaminu A w ustroju zwierzęcym nagromadzone są w wątrobie. Znikają one jednak z wątroby nie tylko wówczas, gdy w wątrobie rozwijają się nowotwory pod wpływem swoiście działających azozwiązków, ale nawet i w tym wypadku, gdy do ustroju wprowadzane są węglowodory rakotwórcze (9). Pociągnęło to za sobą przypuszczenie, że węglowodory rakotwórcze wypierają witamin A z jego połączeń z białkiem w prawidłowych komórkach, zmieniając w ten sposób fizjologiczne właściwości białka i torując drogę dla odpowiedniego wywołania zaburzenia metabolizmu komórki (10). Niemniej nie stwierdzono jednoznacznie żadnego wpływu niedoboru albo nadmiaru witaminu A na rozwój nowotworów zlokalizowanych w narządach wewnętrznych.

Oczywiście, należało się spodziewać, że ewentualna rola witaminu A w powstawaniu nowotworów może dotyczyć głównie nowotworów skóry, wywołanych chemicznymi czynnikami rakotwórczymi. Stadium przedrakowe w tych przypadkach wyraża się wybitną hiperplazją naskórka i jego zrogowaceniem, a więc stanem cechującym awitaminozę A. Wraz z *Ahlström* przeprowadzałem swego czasu doświadczenia nad wpływem awitaminozy A na powstawanie nowotworów skóry szczurów pędzlowanych benzopirenem. Na dosyć bogatym materiale, bo liczącym przeszło 70 zwierząt, mogłem stwierdzić, że niedobór witaminu A skraca okres utajonego działania benzopirenu i że zwiększa częstość dodatnich wyników (11). Podobne rezultaty osiągnięto również później w kilku innych pracowniach. W piśmiennictwie dotyczącym tego problemu znajduje się jednak również kilka sumiennie wykonanych prac, w których takiego wpływu awitaminozy A nie stwierdzono. Przyczyny tych sprzeczności mogą być różne, choćby stan rezerwy witaminu A w tkankach szczura w czasie przebiegu doświadczeń, ale tego dyskutować teraz nie będę. Chciałem tylko zwrócić uwagę na trudności nasuwające się w toku takich badań.

Ubocznie muszę zauważyć, że awitaminoza A może powodować w nabłonkach zmiany zdecydowanie przypominające stan przedrakowy i przez to stać się przyczyną bardzo przykrych omyłek. W roku 1913 *Fiebiger* w Kopenhadze wywołał po raz pierwszy doświadczalnie nowotwory błony śluzowej żołądka szczurów, podając im jaja obleńca *Spiroptera*. Badania te były swego czasu wielką sensacją, a *Fiebiger* otrzymał za nie nagrodę Nobla. Nikt jednak nie był w stanie powtórzyć doświadczeń *Fiebiger*a, a dokładniejsze badania wykazały, że rzekomy rak śluzówki żołądka szczura był prawdopodobnie metaplastją błony śluzowej tej części żołądka, która u szczura pokryta jest nabłonkiem płaskim, spowodowaną niedoborem witaminu A (12).

Udział witaminów grupy B w strukturze cząsteczek różnych enzymów musiał nasunąć myśl o tym, że zmiany ilości tych witaminów wprowadzanych do ustroju zwierzęcego powinny modyfikować rozwój nowotworów. Piśmiennictwo dotyczące tego zagadnienia jest obfite (13); każdy z witaminów B był badany jako czynnik wpływający na powstawanie i wzrost nowotworów doświadczalnych. Większość tych badań doprowadziła do wniosków negatywnych. Ani hiperwitaminozy — ani hipowitaminozy B nie zmieniają częstości występowania nowotworów samorzutnych ani też nie modyfikują okresu utajonego działania czynników rakotwórczych na skórę. Ewentualne wyniki dodatnie albo ujawniały się jako błąd doświadczalny, albo pozostają faktami wyjątkowymi, nie dającymi się uogólniać. Na ogół wszystkie nowotwory zawierają znacznie mniej poszczególnych witaminów B niż tkanka prawidłowa, ale ponieważ wiadomo, że każde prawidłowo odżywiane zwierzę zawiera w większości swych tkanek pewien nadmiar witaminów B, mogące ulegać dosyć znacznej redukcji bez uszkodzenia fizjologicznej funkcji tkanki, zmniejszenie zawartości witaminów w toku kancerogenezy nie może być zmianą istotną dla metabolizmu guza nowotworowego. Spotykamy jednak pewien wyjątek — doświadczalnie wywołane nowotwory wątroby, których rozwój jest zdecydowanie uzależniony od pewnych witaminów.

Już pierwsi badacze japońscy, którzy odkryli rakotwórczy wpływ barwników dwuazowych na tkankę wątrobową, stwierdzili zależność powstawania nowotworów od charakteru karmy podawanej myszom lub szczurom. Diety o pewnej kombinacji składników pozwalały na ujawnienie się nowotworu już po upływie względnie krótkiego czasu, inne rodzaje karmy nie dopuszczały w ogóle do powstania guza wątroby (14). Fakt, że dodatek suszonej wątroby lub drożdży szczególnie wybitnie hamował pojawianie się nowotworów wątroby, spowodowanych dwumetyloaminoazobenzenem, nasuwał przypuszczenie, że czynnikiem przeciwdziałającym substancji rakotwórczej jest jakiś witamin B.

Dalsze badania wykazały, że w drożdżach znajdują się dwa czynniki chemiczne wpływające na występowanie guzów wątroby. *Kensler* stwierdził, że czynnikiem hamującym jest witamin B₂ — ryboflawina, natomiast biotyna przyspiesza powstawanie nowotworów. Ponieważ biotyna jest tym witaminem, którego zawartość w tkankach ulega względnie najsłabszej redukcji w toku rozwoju nowotworu, przez czas jakiś upatrywano w biotynie ważny czynnik ułatwiający wzrost nowotworowy. Próbowano wyciągać z tego konsekwencje praktyczne usuwając biotynę z diety chorych na raka przez równoczesne podawanie awidyny, która uniemożliwia wchłanianie biotyn z przewodu pokarmowego do krwi. Postępowanie takie nie dało żadnego wyniku, podobnie jak bezowocne pozostawały próby hamowania wzrostu nowotworów doświadczalnych przez ograniczenie podaży biotyny z pokarmami (15). Niemniej pobudzenie wzrostu nowotworów wątroby przez biotynę zostało wyraźnie stwierdzone w toku doświadczeń, podobnie jak niezaprzeczony jest hamujący wpływ ryboflawiny na powstawanie wątrobiaków po podawaniu dwuazowych barwników. Pamiętać jednak należy o tym, że wywołane czynnikami chemicznymi nowotwory wątroby stanowią pewnego rodzaju odrębny typ nowotworów, wyraźnie różniący się właściwościami biologicznymi od samorzutnych raków sutka lub płuc spotykanych u zwierząt doświadczalnych i od mięsaków i raków wywołanych działaniem węglowodorów rakotwórczych.

Rozległe badania nad mechanizmem działania barwników dwuazowych na wątrobę, pociągającym za sobą występowanie nowotworów tego narządu, doprowadziły do wniosku, że istotnym momentem w tym mechanizmie jest zahamowanie pewnych procesów utleniania. Być może, że substancje te porażają funkcje pewnych enzymów, niezbędnych dla prawidłowego metabolizmu komórki wątrobowej. Ponieważ ryboflawina wchodzi w skład koenzymów szeregu enzymów utleniających, niedobór tego witaminu ułatwia działanie barwnika dwuazowego lub jego aktyw-

nych pochodnych, natomiast nadmiar ryboflawiny przeciwstawia się temu działaniu. Koncepcja współzawodnictwa metabolitów zbliżonych do siebie strukturalnie, lecz nie równoważnych z punktu widzenia funkcji fizjologicznych, okazała się bardzo owocna dla tłumaczenia mechanizmu działania biologicznego wielu związków chemicznych. Być może, w ten sposób należy tłumaczyć rolę ryboflawiny w ułatwianiu lub hamowaniu występowania nowotworów wątroby w następstwie działania barwników dwuazowych. Większą trudność sprawia wyjaśnienie udziału biotyny w powstawaniu nowotworów wątroby, gdyż dotychczas nie wykazano roli biotyny w przebiegu procesów utleniania w komórce. Niemniej antagonizm między ryboflawiną a biotiną w procesie powstawania doświadczalnych nowotworów wątroby jest faktem nie ulegającym wątpliwości.

Antagonizm ten tłumaczy paradoksalne wyniki różnych doświadczeń nad wpływem odżywiania na rozwój doświadczalnych nowotworów wątroby, stanowiących wymowną ilustrację trudności, na jakie badania tego typu napotyka. Na przykład badacze amerykańscy twierdzą, że doświadczalne nowotwory wątroby występują u szczurów o wiele szybciej przy karmieniu zwierząt ryżem brązowym niż przy karmieniu ryżem białym, natomiast badacze japońscy dochodzą do wręcz przeciwnych wyników. Ryż brązowy zawiera więcej biotyny i ryboflawiny niż ryż biały. Teoretycznie należałoby się spodziewać, że karma oparta na używaniu ryżu brązowego powinna sprzyjać powstawaniu nowotworów, ale zawiłe stosunki wytwarzające się skutkiem antagonizmu między tymi dwoma witaminami, skomplikowane jeszcze przez zmienną zawartość witaminów w innych dodatkach do karmy, czynią dla badacza sytuację w toku doświadczenia trudną do rozstrzygnięcia. Niewątpliwie zawartość siarki, choliny i zawartość białka w karmie stosowanej w toku doświadczenia wpływa modyfikująco na ostateczny efekt niedoboru lub nadmiaru biotyny lub ryboflawiny. Dodatek suszonych drożdży do karmy, odpowiadający 15% ogólnej ilości karmy, niemal całkowicie hamuje rakotwórcze działanie dwumetyloaminoazobenzenu, natomiast jeżeli dieta składa się w 50% z suszonych drożdży, częstość występowania nowotworów wątroby jest znaczna. W pierwszym wypadku nadmiar ryboflawiny doprowadzony z drożdżami wystarcza jako czynnik przeciwdziałający dwumetyloaminoazobenzonowi, w drugim — zwierzę dostaje więcej jeszcze ryboflawiny, ale również znacznie więcej biotyny, której działanie ułatwiające powstawanie nowotworów przeważa wówczas nad hamującym działaniem ryboflawiny.

Przytoczone powyżej przykłady ilustrują trudności wyłaniające się w toku doświadczeń nad wpływem odżywiania na powstawanie doświadczalnych nowotworów wątroby i trudności, na jakie napotyka właściwe komentowanie wyników, a przecież doświadczalne nowotwory wątroby są właśnie tym typem nowotworów, w których warunki wpływające na przebieg procesu rakowacenia dają się jeszcze względnie łatwo kontrolować. Sytuacja staje się o wiele bardziej zawiła, gdy mamy do czynienia z doświadczalnymi nowotworami powodowanymi przez rakotwórcze węglowodory aromatyczne albo z tzw. samorzutnymi nowotworami sutka i płuc lub też samorzutnie występującymi białaczkami u zwierząt. Nie należy więc dziwić się, że mimo bogatego materiału zebranego w toku doświadczeń o wpływie odżywiania na powstawanie nowotworów wiemy bardzo niewiele. Niemniej wpływ ten niewątpliwie istnieje. czego zresztą należało się spodziewać. Autonomia tkanki nowotworowej jest tylko względna. Nowotwór wyłamuje się spod wpływu czynników regulujących harmonijne współdziałanie wszystkich tkanek żywego ustroju. Ale styka się ze swym otoczeniem, ze swym środowiskiem zewnętrznym, jakim jest dla nowotworu odżywcza ciecz międzykomórkowa, wobec czego skład chemiczny tego środowiska musi na rozwój nowotworów wywierać również pewien wpływ. Na razie jesteśmy dopiero we wstępnym stadium dociekań mogących określić wpływ modyfikacji, jakim ulegają ciecze tkankowe skutkiem zmian odżywiania, na powstawanie i rozwój nowotworów.

PIŚMIENICTWO

1) *Dublin L. I.*: Bull. New York Acad. Med., 1932, 8, 687; *Keys A.*: Biology of Human Starvation, Vol. II, 1950, 1050. — 2) *Besman C. S.*: Afric. Journ. Med. Sci., 1941, 6, 145; *Kennaway E. I.*: Canc. Res., 1944, 4, 571. — 3) *Strong L. C.*: Am. J. Canc., 1937, 30, 527; 1937, 31, 13; 1933, 32, 80, 227. — 4) *Tannenbaum A.*: Am. J. Canc., 1940, 33, 335; Canc. Res., 1942, 2, 460; 1944, 4, 673; 1945, 5, 609. — 5) *Visscher M. B.*, *Ball Z. B.*, *Barnes R. H.*, *Sivertsen I.*: Surgery, 1942, 11, 48; *White F. R.*, *White J.*, *Mider G. B.*, *Kelly M. G.*, *Heston W. E.*: J. Nat. Canc. Inst., 1944, 5, 43; *Rush H. P.*, *Johnson R. O.*, *Kline B.*: Canc. Res., 1944, 4, 704; 1945, 5, 431. — 6) *Le Page G. A.*, *Potter V. R.*, *Busch H.*, *Heidelberger C.*, *Harlbert R. B.*: Canc. Res., 1952, 12, 153. — 7) *White J.*, *Mider G. B.*: J. Nat. Canc. Inst., 1941, 2, 95; *White J.*, *Andervant H. B.*: J. Nat. Canc. Inst., 1943, 3, 449; *White J.*, *Mider G. B.*, *Heston W. E.*: J. Nat. Canc. Inst., 1944, 4, 409. — 8) *Copeland D. H.*, *Salmon W. D.*: Am. J. Path., 1946, 22, 1059; *Engel R. W.*, *Copeland D. H.*, *Salmon W. D.*: Ann. N. Y. Acad. Sci., 1947, 49, 49. — 9) *Goerner A.*, *Goerner M. W.*: Am. J. Canc., 1939, 37, 518; *Baumann C.*: J. Nutr., 1941, 21, 431. — 10) *Baumann C.* i wspó:pr.: J. Biol. Chem., 1942, 142, 597.

11) *Euler H.*, *Ahlström L.*, *Skarzyński B.*: Arkiv f. Kemi, 1943, 17 A, Nr 29. — 12) *Fridericia L. S.*, *Gudjónsson S.*: Am. J. Canc., 1940, 39, 61; *Brunschwig A.*, *Rasmussen R. A.*: Canc. Res., 1941, 1, 341; *Passy R. D.*, *Leese A.*, *Knox J. L.*: Intern. Kongr. Krebsf., 1937, 2, 83. — 13) *Burk D.*, *Winzler R. J.*: Vitamins a. Hormones, 1944, 2, 305. — 14) *Antopol W.*, *Unna K.*: Canc. Res., 1942, 2, 694; *Gyorgy P.* i wspó:pr.: Proc. Soc. Exp. Biol. 1941, 47, 41; *Kensler C. J.*, *Sugiura K.* i wspó:pr.: Science, 1940, 91, 623; *Orr J. W.*, J. Path. 1940, 50, 393. — 15) *Kensler C. J.* i wspó:pr.: Science, 1941, 93, 308; *Du Vigneaud V.* i wspó:pr.: Science, 1942, 95, 174; *Burk D.* i wspó:pr.: Canc. Res., 1943, 3, 130; *Kensler C. J.*: Ann. N. Y. Acad. of Sci., 1947, 49, 29.

KONIEC SYMPOZJUM DRUGIEGO

R. L. M. Syngé z Rowett Institute w Bucksburn (Aberdeenshire, Szkocja) otrzymał w r. 1952 nagrodę Nobla za prace z zakresu chromatografii. Jest wybitnym uczestnikiem Ruchu Pokoju w Wielkiej Brytanii. Brał już udział w Kongresie Intelktualistów we Wrocławiu (1948), zaś w r. 1952 odwiedził Polskę powtórnie i w dn. 26. IX. wygłosił na zaproszenie Polskiej Akademii Nauk wykład o chromatografii. Poniżej podajemy przekład streszczenia wykładu, które prof. Syngé przygotował dla „Postępów Biochemii“ (Red.).

R. L. M. SYNGE

ZASADY CHROMATOGRAFII

(Streszczenie autorskie wykładu wygłoszonego w Warszawie 26. IX. 1952 r.)

Chociaż obecnie istnieje wiele podręczników z zakresu chromatografii, większość z nich traktuje przedmiot ten raczej empirycznie i dlatego pożądane było przedstawienie niżej podanych zasad bez szerszego omawiania możliwości ich zastosowania praktycznego. Takich możliwości istnieje obecnie bardzo wiele*.

Chromatogram jest to w zasadzie ciało z porowatego, nieelastycznego, rozdrobionego materiału (faza stała), przez które przepływa płyn (faza ruchoma). Rozdzielenie ciał rozpuszczonych w roztworze zależy od różnic w stanach równowagi przy ich rozdzieleniu pomiędzy fazą stałą i ruchomą albo od mechanizmu fizykochemicznego, określającego te stany równowagi. Określając to jako proces przeciwny, można zastosować do chromatogramu pojęcie „wysokości równowaznej półce teoretycznej“ („height equivalent to a theoretical plate“ — HETP). Skoro rozdział równowag następuje na izotermie prostej, można przy wywoływaniu elucyjnym obliczyć zasięg stref (frakcyj). Szybkość przesuwania się strefy w stosunku do przepływu rozpuszczalnika, jak stwierdzono, zależy jedynie od wygięcia izotermi odpowiadającej, podczas gdy poszerzanie się strefy, przy schodzeniu w dół kolumny, zależy od HETP.

Izotermi nieliniowe można wyprowadzić matematycznie, przyjmując, że $HETP = 0$. Dają one szerokie wstęgi o jednym brzegu ostrym, a drugim niewyraźnym.

W badaniach nad substancjami dającymi izotermi liniowe uzyskiwano często HETP o wiele węższe niż 1 mm, co tłumaczy wielką zdolność rozdzielczą chromatogramów w porównaniu z kolumnami frakcjonującymi i aparatami do ekstrakowania cieczyw — płynami.

Według *Tiseliusa* można metody stosowane w chromatografii sklasyfikować następująco:

1. Wywoływanie przez elucję. Mieszaninę analizowaną przepuszczamy przez kolumnę i traktujemy świeżym rozpuszczalnikiem. Metoda ta była wielkim odkryciem *M. S. Cweta*; poprzedni badacze, a szczególnie *Schönhein*, jak się zdaje stosowali jedynie analizę frontalną. Wywoływanie elucyjne prowadzi do zupełnego rozdzielenia substancji i było szeroko używane, szczególnie w zastosowaniu do substancji trudniejszych do rozdzielenia.

2. Analiza frontalna. Mieszaninę analizowaną wprowadza się do kolumny sposobem ciągłym. Zupełny rozdział substancji nie następuje, ale różne składniki mieszaniny wykazują różne, dające się wykryć tą metodą fronty. Jest to metoda użyteczna dla badań analitycznych mieszanin o nieznanym składzie, których składniki dają izotermi krzywe lub wykazują nieodwracalne powiązania z fazą

* Patrz: *L. Tiselius*, Endeavour 1952 No 1.

stałą. Jest to jedyna dotąd forma chromatografii szeroko stosowana w procesach przemysłowych, znana jako „metoda pasemkowa“ przy zmiękczeniu wody, odbarwianiu węglem aktywnym, oczyszczaniu gazów itp.

3. Wywoływanie przez wypieranie. Wprowadza się tu mieszaninę analizowaną do kolumny, wywoływanie zaś następuje za pomocą roztworu substancji, która kompetytywnie przemieszcza substancje podlegające rozdzielaniu — do fazy stałej. Dla uzyskania dobrych wyników trzeba, ażeby substancje, które mają być rozdzielone za pomocą tej metody, konkurowały ze sobą w procesie zajmowania miejsca w fazie stałej. Substancje te uzyskuje się z kolumny w stanie czystym, lecz brak wyraźnych przerw utrudnia uzyskanie wysokiej wydajności czystego materiału. Niemniej jednak duże ilości materiału, który może być rozdzielony, w stosunku do rozmiarów kolumny czynią metodę tę wielce obiecującą dla zastosowania jej w skali przemysłowej, szczególnie tam, gdzie chodzi o bardziej wartościowe materiały chemiczne.

4. Zasada wypierania za pomocą nośników (*Carrier displacement*). Mieszaninę analizowaną wprowadza się do kolumny, a wywoływanie następuje przez zadawanie serią roztworów substancji, które mają powinowactwo do fazy stałej, pośrednie pomiędzy powinowactwami każdej ze substancji wymagających rozdzielania. Tu więc pojedynczy człon serii substancji, które mają być rozdzielone, wydziela się (wolny od wszystkich innych składników mieszaniny) w łączności z frontem każdego kolejno wypierającego roztworu. Pożądane jest, ażeby substancje analizowane dawały się łatwo oddzielać od roztworu przemieszczającego (*displacing agent*) po chromatografowaniu (np. do analizy substancji nielotnych dobrze jest używać jako czynnika przemieszczającego — substancji lotnych). Zasadzie tej zawdzięcza się wiele sukcesów chromatografii. Dopiero jednak teoretyczne jej wyjaśnienie doprowadziło do uzyskania ważnych zastosowań.

Wszystkie powyższe zasady zostały sformułowane bez powoływania się na naturę zjawisk fizyko-chemicznych warunkujących stany równowagowe rozdziału. Mogą one być różne, a wiele z nich może działać równocześnie. Adsorpcja na powierzchniach stałych, rozdział między fazami płynnymi, wymiana jonowa, tworzenie kompleksów i innego typu mechanizmy rozważano pokrótce, dyskutując ich dobre i złe strony. Dla opisywania chromatogramów wskazane jest przytoczenie terminologii proponowanej przez *Moora* i *Steina* (*Ann. Rev. Biochem.* 1952, 21, 521), gdzie stany fizyczne ruchomej i stałej fazy użyte są do określenia rodzaju chromatografii, a więc: chromatografia płynno-stała, płynno-płynna, płynno-żel, gazowo-stała, gazowo-płynna itp. Specjalny nacisk trzeba położyć na prawdopodobną możliwość zastąpienia spektrometrii masowej, jako metody analitycznej kontrolującej przebieg procesów przemysłowych, które stosują substancje lotne, przez różne rodzaje chromatografii gazowej.

Chromatografia dowiodła już swej użyteczności przy rozdzielaniu wszelkiego typu związków o niskim ciężarze cząsteczkowym. W toku opracowywania tych metod zdobyto wiele wiadomości, które po usystematyzowaniu pozwolą na wyjaśnienie oddziaływań fizycznych zachodzących wśród mniejszych cząsteczek i tym sposobem będą mogły stworzyć podstawę do zaatakowania podstawowego problemu biochemii, tj. fizycznej podstawy specyficzności działań pomiędzy cząsteczkami wielkocząsteczkowymi. W chwili obecnej biochemicy potrzebują lepszych metod dla rozdzielania większych drobin. Chromatografia większych cząsteczek przedstawia różne trudności, między innymi następujące:

1. Przy wzrastającej masie cząsteczkowej, jak to teoretycznie i doświadczalnie wykazał *Bronsted*, staje się coraz trudniej dobrać taki system dwufazowy, w którym następowaloby mniej więcej równomierne rozdzielanie (między obie fazy) tak

dużych cząsteczek. Raczej system wieloskładnikowy przy dokładnym kontrolowaniu temperatury zdaje się dawać pewne nadzieje.

2. Liczne adsorbenty i sorbenty, nadające się doskonale do chromatografii małych cząsteczek, posiadają pory o wymiarach molekularnych, które nie przepuszczają drobin większych.

Trudności te można by obejść, przynajmniej częściowo, stosując adsorbenty nieporowate łącznie z płynami wieloskładnikowymi (adsorpcja wysalająca itp.), wieloskładnikowe systemy płyn-płyn oraz elektrokinetyczne ultrasączenie. Te nieliczne wyniki, jakie otrzymano na tym polu, są jednak wystarczające dla wykazania, że chromatografia rokuje wielkie nadzieje na pomyślne dokonanie rozdzielania cząsteczek większych.

Podczas niedawnej swej wizyty w Polsce spotkał się prof. Straub z pytaniami o dokładny przepis swojej metody oznaczania kwasu adenozynotrójfosforowego, która była ogłoszona tylko w jęz. węgierskim. Chcąc ulostępnić tę ważną metodę czytelnikom polskim przysłał nam prof. Straub tłumaczenie niemieckie, którego polski przekład zamieszczamy (Red.).

M. KRAMER, E. PETTKO I F. B. STRAUB

MIKROMETODA OZNACZANIA KWASU ADENOZYNOTRÓJFOSFOROWEGO

Dotychczas rozporządzano tylko jedną metodą oznaczania kwasu adenozynotrójfosforowego (ATP): w trójchlorooctowym wyciągu tkankowym oznaczano tę ilość ortofosforanu, która przyrasta w ciągu 7-minutowej hydrolizy w 1 n-kwasie w temperaturze 100° C. Metoda ta opiera się na fakcie, iż w przeciągu 7 minut wszystkie wiązania pirofosforanowe ulegają hydrolizie. Metodę tę można stosować tylko wtedy, gdy obok ATP są niewielkie ilości fosforanów tak nieorganicznych, jak też ulegających hydrolizie. Poza tym minimalna zawartość ATP, pozwalająca na użycie tej metody, wynosi około 0,2 mg.

Przy oznaczaniu ilościowym związanego w aktywie ATP powstaje problem specyficznego oznaczania niewielkiej jego ilości przy stosunkowo dużej zawartości fosforanu nieorganicznego. Celem rozwiązania tej trudności opracowano niniejszą metodę. Zaletą jej jest zwiększona w stosunku do poprzedniej metody specyficzność oraz możliwość oznaczania małych ilości. Tak np. niniejszym sposobem można oznaczyć zawartość ATP w 0,1 ml krwi, podczas gdy stosując dawną metodę trzeba by użyć 6—10 ml. Ujemną stroną naszej metody jest to, iż nie nadaje się do analiz rutynowych, ponieważ każdorazowo należy sporządzać świeże preparaty białka.

Zasada metody: pod wpływem ATP spada lepkość aktomiozyny, równocześnie jednak ATP ulega rozkładowi przez aktomiozyn, co w efekcie daje charakterystyczny przebieg w miarę czasu wzrostu lepkości w stosunku do wartości wyjściowej. Najpierw oznacza się lepkość jako funkcję czasu używając kilku znanych ilości ATP, następnie przez interpolację oznacza się zawartość ATP w odpowiednio przygotowanych ekstraktach. Przedstawiają to krzywe na ryc. 1.

Roztwory:

1. Roztwór miozyny B w 0,5 M KCl
2. Roztwór KCl, zawierający 3 M KCl i 0,2 M bufor fosforanowy o pH = 7,7. Stosunek fosforanu pierwszorzędowego do drugorzędowego wynosi 1:9.
3. 0,05 M MgCl₂.

Roztwór 1 sporządza się następująco: zdekapiowanego królika szybko obdiera się ze skóry, po czym umieszcza na 10—15 min. w naczyniu napełnionym wodą

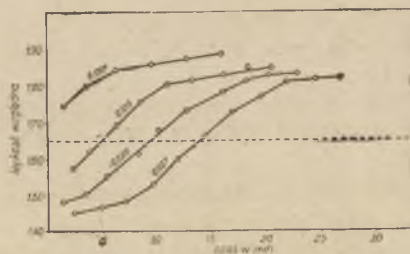
* Roztwór Webera: 0,6 M KCl, 0,01 M Na₂CO₃ i 0,04 M NaHCO₃.

z lodem. Mięśnie oddziela się od kości i umieszcza między kawałkami lodu, następnie suszy ręcznikiem i przepuszcza przez zwykłą maszynkę do mielenia mięsa z sitkiem o małych dziurkach. Na 100 g masy mięśniowej bierze się 100 ml roztworu Webera * i oziębiając miesza przez 20 min. Mieszaninę odstawia się na 24 godz., po czym wiruje. Jeżeli w międzyczasie mięśnie silnie nabrzmieją, należy przed odwirowaniem rozcieńczyć je $\frac{1}{2}$ —1 obj. roztworu Webera. Lepki roztwór, powstały po odwirowaniu, wlewa się do 10 objętości wody destylowanej, pod wpływem czego strąci się miozyn B (zarówno przy oznaczaniu miozynu B, jak i przy sporządzaniu pozostałych roztworów należy używać wody przedestylowanej tylko z naczyń szklanego). Strącony miozyn B należy odwirować, osad rozcieńczyć niewielką ilością wody i przemyć, kilkakrotnie odwirowując. W ten sposób zostaną usunięte rozpuszczalne w wodzie białka, w pierwszym rzędzie miokinaza, która może przeszkadzać przy oznaczaniu.

Do przemytego miozynu B dodaje się taką ilość stałego KCl, aby powstał 0,5 M roztwór KCl. Części nierozpuszczalne należy odsączyć przez warstwę waty i usunąć. Otrzymany w ten sposób roztwór można przechowywać przez 8—10 dni w temperaturze 0° C.

Przygotowanie materiału do badania. Materiał należy przygotować w ten sposób, aby obecny w nim ATP przeprowadzić w neutralny roztwór wodny, możliwie nie zawierający soli i całkowicie pozbawiony jakiegokolwiek enzymu rozkładającego ATP. Jednak sposób przygotowania materiału zależy od jego charakteru. W przypadku tkanki mięśniowej postępowano następująco: około 0,1—2,0 g mięśni szybko zważono i rozrtało z niewielką ilością proszku szklanego i dokładnie dziesięcioma objętościami 4% zimnego kwasu trójchlorooctowego. Roztwór odwirowano, płyn zobojętniono stałym NaHCO_3 w obecności czerwieni fenolowej jako indykatora. Jeżeli do doświadczenia używano mięśni świeżych, roztwór taki zawierał 0,2—0,4 mg ATP w jednym ml. Odpowiednio przygotowuje się około 10-krotne rozcieńczenie i oznaczenie przeprowadza się w 1 ml tak rozcieńczonego roztworu.

Do oznaczania ATP we krwi należy stosować aceton. 0,1 ml krwi miesza się wstrząsając z 2 ml czystego acetonu i pozostawia na 1—2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie odwirowuje się, aceton odlewa, a osad pozostawia do obeschnięcia, po czym rozprowadza się go 2 ml wody i po 10 minutach znowu wiruje. Do oznaczenia zawartości ATP we krwi używa się około 1 ml odstałego roztworu w następujących warunkach pomiaru.



Ryc. 1. Krzywe wzorcowe dla ATP. Liczby obok krzywych pokazują w mg ilość użytego do oznaczenia ATP.

Przebieg pomiaru. Lepkość roztworu mierzy się wiskozymetrem Ostwalda w temperaturze 0° C. Objętość między dwiema kreskami wiskozymetru powinna wynosić 0,8 ml, długość kapilary 20 cm, czas wypływu 0,5 M roztworu KCl przy 0° C (przy użyciu 2,5 ml płynu) około 50—70 sekund. Czas wypływu zależy oczywiście od odpowiedniego wymiaru kapilary.

Przez rozcieńczenie roztworu miozynu B 0,5 M roztworem KCl uzyskuje się oznaczenie tej ilości miozynu B, która po uzupełnieniu tymże roztworem KCl do łącznej objętości 2,5 ml wskazuje wartość względnej lepkości otrzymanego roztworu 1,8—2,1. Przygotowuje się podstawowy roztwór miozynu B w buforowej mieszaninie soli. Roztwór ten przygotowuje się w ten sposób, by 1,25 ml płynu uzupełniony do łącznej objętości 2,5 ml, miał końcowe stężenie 0,5 M KCl i względną

lepkość 1,8—2,1. Na przykład, jeżeli okaże się, że 0,5 ml miozynu B trzeba rozcieńczyć 2,0 ml 0,5 M roztworu KCl, aby uzyskać wartość względnej lepkości około 1,8—2,1, wtedy mieszaninę badaną należy sporządzić następująco:

5 objętości miozynu B
2,5 objętości roztworu drugiego (KCl plus bufor)
5 objętości 0,5 M roztworu KCl

W mieszaninie tej ilość drugiego roztworu jest zawsze stała ($\frac{1}{5}$ części), podczas gdy stosunek roztworu miozynu B do 0,5 M roztworu KCl zmienia się zależnie od stężenia miozynu B w porównaniu do podanych wyżej przykładów. Z tej ilości mieszaniny bierze się jednorazowo do viskozymetru 1,25 ml. Do roztworu ochłodzonego do temperatury 0° C dodaje się 0,25 ml roztworu trzeciego ($MgCl_2$) i natychmiast 1 ml odpowiednio rozcieńczonego zobojętnionego i oziębionego roztworu ATP. Całość zostaje wymieszana za pomocą dmuchania przez kapilarę viskozymetru, po czym uruchamia się stoper mierząc czas doświadczenia. W odpowiednich odstępach czasu z pomocą innego stopera mierzy się kilkakrotnie lepkość mieszaniny. Otrzymane wartości lepkości w zależności od czasu przedstawia się graficznie w układzie współrzędnych (p. rycina). Przed oznaczaniem należy najpierw wykalibrować miozyn B wobec znanej ilości ATP. Przeprowadza się to w ten sposób, że wykonujemy oznaczenie, np. z 0,01, 0,02 i 0,03 mg ATP. W badanych roztworach oznaczenie przeprowadza się w ten sam sposób. Otrzymane wyniki oblicza się następująco: wykreśla się krzywe, następnie przy wartości średniej odległości między najwyższą i najniższą wartością lepkości przeciąga się linię prostą i punkty przecięcia pojedynczych krzywych lepkości, zależnych od czasu, oznacza się przez liniową interpolację.

U w a g i. Ponieważ lepkość zależy w dużym stopniu od temperatury, ważne jest, aby naczynie, w którym umieszczony jest viskozymetr, było całkowicie, aż do dołu napełnione kawałkami lodu. Do kontroli tego należy używać cylindra miarowego o pojemności jednego litra jako kąpeli wodnej. Oznaczenie opiera się na fermentacyjnym rozszczepieniu ATP, dlatego jest szczególnie ważne, aby pH i stężenie soli były całkowicie identyczne. Szczególne znaczenie ma obecność jonów Mg, ściślej biorąc przewaga ich nad jonami Ca. Przy podanej koncentracji jonów Mg rozszczepianie ATP jest powolniejsze i jony Ca obecne w tkance nie przeszkadzają w oznaczeniu.

S p e c y f i c z n o ś ć m e t o d y. Nie jest dotąd znana żadna substancja, oprócz ATP, zdolna do zmniejszania lepkości miozynu B (aktomiozynu) i jednocześnie rozkładana przez niego. Fosforan nieorganiczny (w dostatecznie większym stężeniu niż ATP) wpływa na spadek lepkości, sam jednak nie ulega rozszczepieniu, skutkiem czego zachodzący spadek lepkości w tym wypadku jest trwały. Metafosforany powodują zmniejszenie lepkości tylko przy stosunkowo wysokiej koncentracji. Adenozynodwufosforan (ADP) przeszkadza tylko w tym wypadku, kiedy miozyn B nie jest należycie oczyszczony i pozostaje w nim znaczna ilość miokinazy. Przy oznaczaniu ATP w tkankach okazało się, że otrzymywaliśmy niewłaściwe wyniki, jeżeli obok ATP były obecne stosunkowo duże ilości ADP, ponieważ nie można otrzymać miozynu B całkowicie wolnego od miokinazy. W wypadku świeżych tkanek nie ma to jednak miejsca.

PIŚMIENNICTWO

Banga I., Szent-Györgyi A.: Studies from the Inst. Med. Chem. Szeged, 15 (1941).



Lombardi

2/19/54

Cena zł 16,90

