



Stamm

WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI urodził się w Sanoku 8 maja 1895 roku. Z okazji 65-lecia urodzin grono przyjaciół i uczniów postanowiło złożyć Mu wraz z najlepszymi życzeniami bieżące swe prace. Tak powstał obecny zeszyt, który mimo że przekracza znacznie objętość normalnych dwóch zeszytów naszego czasopisma, nie zdołał pomieścić wszystkich prac. Część później nadesłanych prac znajdzie pomieszczenie z odpowiednią adnotacją w 4 zeszycie bieżącego tomu. Niechaj te stronicie będą wyrazem wdzięczności i przywiązania, jakie żywią dla swego Nauczyciela Jego uczniowie, i serdecznej przyjaźni, którą zaskarbił sobie wśród szerokiego kręgu przyjaciół i kolegów.

Za redakcyjną stronę niniejszego numeru przyjęli odpowiedzialność niżej podpisani, którzy do swych osobistych życzeń dołączają życzenia od reprezentowanych przez siebie: Acta Biochimica Polonica (I.M.), Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (B.S.) i Komitetu Biochemicznego (J.H.).

Józef Heller
Irena Mochnacka
Bolesław Skarżyński

Warszawa, w maju 1960.

R. NIEMIRO

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM ***IV. USTALENIE DAWKI TRUJĄCEJ MALEINIANU *IN VIVO* I *IN VITRO****Zakład Chemii Fizjologicznej AM**i Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Gdańsk**Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

Kwas maleinowy znany jest jako inhibitor grup sulfhydrylowych [13]. Z tym wiąże się jego hamujący wpływ na oddychanie tkanek [14, 16], a także wywołanie aminoacydury [1, 2]. Celem tej pracy jest porównanie wpływu maleinianu na aminoacydurię u szczurów z jego hamującym działaniem na oddychanie skrawków nerkowych, a także na enzymatyczną aktywność homogenatu nerki. Dlatego w pierwszej części pracy wyznaczono minimalną dawkę wywołującą aminoacydurię; w drugiej określono stężenia maleinianu hamujące oddychanie skrawków nerek; w trzeciej zaś zbadano wpływ tego związku na aktywność dehydrogenazy kwasu α -ketoglutazarowego oraz dehydrogenazy kwasu bursztynowego nerki szczura.

METODY

Do doświadczeń użyto białych szczurów w wieku 4—7 miesięcy, wagi 160—220 g. Szczury, u których badano wpływ maleinianu na aminoacydurię, karmiono dietą mleczną drożdżową bez witaminu E [2]. Szczury te trzymano pojedynczo w klatkach metabolicznych pozwalających na ilościowe zbieranie moczu bez domieszek kału i pokarmu. Mocz zbierano raz na dobę [1]. Maleinian podawano szczurom we wstrzyknięciach dootrzewnowych jako 1 M sól sodową sporządzoną z kwasu maleinowego zobojętnionego wodorotlenkiem sodowym pod kontrolą pH-metru.

Do badań *in vitro* służyły nerki usuwane w uspieniu chloroformowym szczurom pozostającym na tej samej diecie mleczno-drożdżowej. Skrawki

* Poprzednie doniesienia: [1, 2, 3].

cięto brzytwą i do czasu inkubacji pozostawiano je w płynie Krebsa-Ringera buforowanym fosforanami o pH 7,4 z dodatkiem glikozy. Następnie po osuszeniu bibułą ważono je na wadze torsyjnej i przenoszono do naczynek Warburga w ilości 50 ± 2 mg. Homogenaty nerkowe robiono z dziesięciokrotną ilością płynu Krebsa-Ringera buforowanego fosforanami o pH 7,4 [11] w homogenizatorze Potter-Elvehjem chłodzonym wodą z lodem. Do naczynek Warburga dawano ilości homogenatu odpowiadające 100 mg świeżej tkanki i płyn Krebsa-Ringera buforowany fosforanami o pH 7,4. Glikozę dodawano jako 10% roztwór, α -ketoglutaran i bursztynian jako 0,2 M roztwory sporządzone przez zobojętnienie odpowiednich kwasów wodorotlenkiem sodu pod kontrolą pH-metru, maleinian sodu i arsenin sodu jako 0,033 M roztwory [5]. Maleinian sodu 0,033 M i 0,33 M sporządzano przez rozcieńczenie 1,0 M roztworu.

Zużycie tlenu mierzono w aparacie Warburga. Używano naczynka z jednym z bocznym ramieniem i naczynkiem centralnym. Dwutlenek węgla pochłaniano przez dodanie do naczynka centralnego 0,2 ml 10% wodorotlenku potasowego. Oznaczenia robiono w temperaturze 38° i $80-85$ wahań na minutę.

Azot α -aminowy oznaczano metodą Yemma i Cockinga [17].

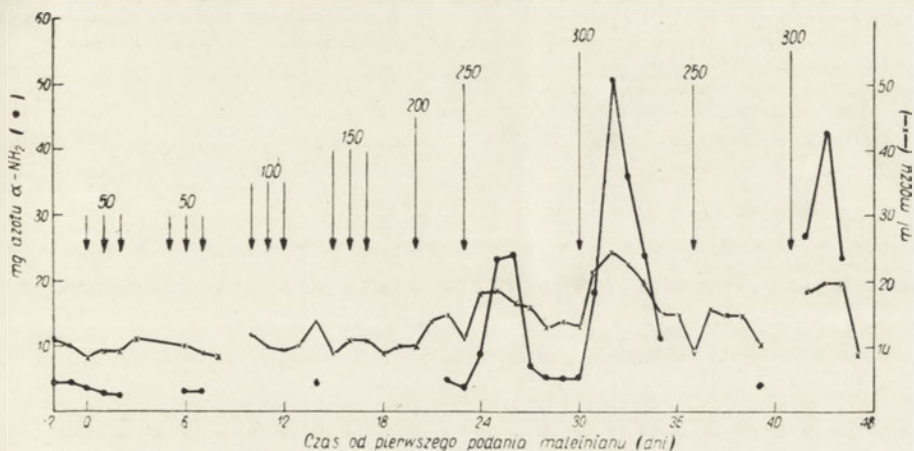
WYNIKI

Wpływ wielokrotnego podawania wzrastających dawek maleinianu

Podawany *in vivo* kwas maleinowy powoduje uszkodzenie nerek, wątroby i jąder dające się wykryć histopatologicznie [6], a także aminoacydurię [9, 1, 2]. Działa on hamująco na oddychanie takich tkanek, jak mięśnie i mózg [7, 16]. Nie można jednak wykluczyć [12, 15], że jest on także metabolitem ustrojów zwierzęcych. Sacks [15] na podstawie badań na ludziach i psach z piętnowanym $2-^{14}\text{C}$ -maleinianem przyjmuje możliwość utleniania go do CO_2 . Harrisonowie [9] przypuszczają, że w działaniu maleinianu na szczury ma miejsce rozwijająca się oporność (resistance) na kwas maleinowy.

Następujące doświadczenie miało na celu zbadanie, o ile wielokrotne podawanie wzrastających dawek maleinianu może wpłynąć na przesunięcie dolnej granicy dawki wywołującej aminoacydurię. Doświadczenie to przeprowadzono na czterech szczurach wagi 160—200 g. Trzy szczury, którym początkowo nie podawano maleinianu, służyły jako kontrola. Maleinian sodu podawano dootrzewnowo zaczynając od dawek 50 mg/kg wagi szczura. Mierzono ilość wydalanego moczu i azotu α -aminowego. Wyniki przedstawiono na rysunku 1.

Trzynastokrotne podanie maleinianu w dawce od 50 do 200 mg/kg wagi w przeciągu trzech tygodni jest bez wpływu na ilość wydalanego azotu α -aminowego. Kilkakrotnie dzień po dniu podawanie maleinianu na-



Rys. 1. Wpływ wielokrotnego dootrzewowego podawania wzrastających dawek maleinianu na (×) dobową ilość wydalanego moczu oraz (●) ilość mg azotu α -aminowego wydalanego na dobę. Wartości średnie obliczone z danych dla czterech szczurów. Strzałki wskazują ilość podanego maleinianu w mg/kg wagi szczura

wet w wyższych dawkach, jak 150 mg/kg wagi, wskazuje na brak kumulowania się działania tej trucizny. Do wywołania zmian w moczu potrzebne jest odpowiednie stężenie kwasu maleinowego w ustroju. Taką dawką, zarówno u szczurów kontrolnych, jak i „przyzwyczajanych“, jest 250 mg/kg wagi. U trzech szczurów kontrolnych, którym podano jednorazowo dawkę 250 mg/kg wagi, w następnym dniu od podania maleinianu ilość wydalanego azotu α -aminowego wynosiła 21,6; 8,8; 9,1 mg na dobę, a w drugim dniu od podania kwasu 30,0; 13,4; 3,8 mg na dobę. Porównanie tych wartości z danymi na rysunku 1 wskazuje, że „przyzwyczajanie“ szczurów jest bez wpływu na graniczną dawkę wywołującą aminoacydurię. Podawanie dawek 250 mg/kg i 300 mg/kg w odstępach 6—7-dniowych wywołuje każdorazowo ponowne zwiększenie wydalania moczu i azotu α -aminowego.

U szczurów „przyzwyczajanych“ i kontrolnych oznaczono oddychanie skrawków nerkowych w obecności maleinianu (Tabl. 1). Nie stwierdzono różnic w inhibicji oddychania skrawków nerkowych szczurów „przyzwyczajanych“ (traktowanych maleinianem) i kontrolnych. Zarówno wydalanie azotu α -aminowego, jak i oddychanie skrawków nerkowych u szczurów wielokrotnie traktowanych wzrastającymi dawkami kwasu maleinowego i szczurów kontrolnych nie dają podstawy do przypuszczenia istnienia „przyzwyczajania“ bądź „oporności“ szczurów na kwas maleinowy.

T a b l i c a 1

Wpływ maleinianu na oddychanie skrawków nerkowych szczurów uprzednio traktowanych kwasem maleinowym

Każde naczynko zawierało około 50 mg skrawków nerkowych w płynie Krebsa-Ringera buforowanym fosforanami o pH 7,4 i substrat (glikoza) 0,2 ml 10% (obj/wag). Końcowa objętość 2,5 ml. Zużycie O₂ mierzone w 38° przy 80 wahańciach na minutę w ciągu 1 godziny

Nr szczura	QO ₂		% hamowania	QO ₂		% hamowania
	kontrola	maleinian 2 × 10 ⁻² M		maleinian 4 × 10 ⁻² M		
	Szczury uprzednio traktowane maleinianem*					
5	13,3	7,3	45	7,2	46	
6	19,0	9,0	53	8,1	57	
7	16,4	7,7	53	7,3	56	
8	15,9	5,9	63	7,4	54	
	Szczury kontrolne**					
1	13,7	5,1	63	4,6	66	
2	14,2	6,1	57	—	—	
3	14,4	5,5	62	4,7	67	

* Każdy ze szczurów tej grupy otrzymał w ciągu 60 dni przed doświadczeniem osiemnastokrotnie kwas maleinowy w kolejno wzrastających dawkach, od 50 do 500 mg/kg wagi.

** Otrzymały jednorazowo dawkę maleinianu 250 mg/kg wagi, 45–50 dni przed zabiciem.

Wpływ kwasu maleinowego na oddychanie skrawków nerkowych

Weil-Malherbe [16] wykazał dla skrawków mózgowych efekt hamujący przy stężeniu kwasu maleinowego w środowisku rzędu 10⁻² M.

Rysunek 2 i tablica 2 przedstawiają wpływ różnych stężeń kwasu maleinowego na oddychanie skrawków nerkowych inkubowanych z glikozą. Stężenie graniczne, hamujące w około 4/5 oddychanie skrawków nerko-

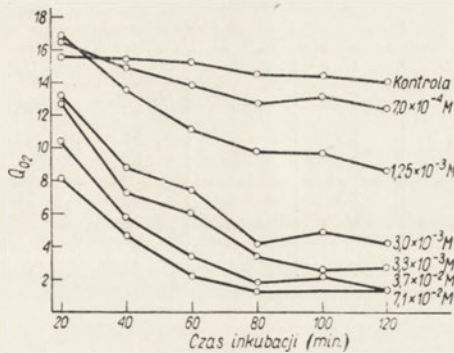
T a b l i c a 2

Wpływ maleinianu na oddychanie skrawków nerkowych szczura

Skład i warunki doświadczenia jak podano w tablicy 1. Liczby ze znakiem minus oznaczają pobudzenie oddychania, a liczby dodatnie procent zahamowania

Maleinian, końcowe stężenie (M)	Liczba doświadczeń	Procent hamowania oddychania po minutach					
		20	40	60	80	100	120
3,3 × 10 ⁻⁴	2	-6,5	—	-6,5	-6	-6	0
7,0 × 10 ⁻⁴	14	-2,4	2,3	5,5	11,2	11,7	13,2
1,25 × 10 ⁻³	14	-3,1	10	21,5	33	32	37,5
3,0 × 10 ⁻³	3	8,5	41	46	62	65	68
3,3 × 10 ⁻³	3	17,5	54	58	75	80	87
3,7 × 10 ⁻²	1	33	61	74	84	75	91
7,1 × 10 ⁻²	1	43	68	83	89	75	90

wych szczura, waha się od 3×10^{-3} do $3,3 \times 10^{-3}$ M. Wyższe stężenia powodują dalszy spadek oddychania, jednakże w stopniu niewiele wyższym od „stężeń granicznych“. Podczas gdy stężenie $3,3 \times 10^{-3}$ M w porównaniu z $1,25 \times 10^{-3}$ M daje wzrost inhibicji o około 50%, to stężenie



Rys. 2. Wpływ maleinianu na oddychanie skrawków nerkowych. Warunki doświadczenia jak podano w tablicy 1. Końcowe stężenie maleinianu w poszczególnych próbach podano na rysunku

$3,7 \times 10^{-2}$ M w porównaniu z $3,3 \times 10^{-3}$ M tylko o około 5%. Nawet przy dużych stężeniach kwasu maleinowego w środowisku nie można całkowicie zahamować oddychania.

Wpływ kwasu maleinowego na niektóre etapy cyklu kwasów trójkarboksylowych

Spadek zużycia tlenu wywołany inhibitorami wiąże się głównie z systemami związanymi z cyklem kwasów trójkarboksylowych. Na podstawie pracy Fahmy i Walsh'a [5] zbadano wpływ maleinianu na dwa etapy cyklu Krebsa, a mianowicie: α -ketoglutaran \rightarrow bursztynian oraz bursztynian \rightarrow fumaran.

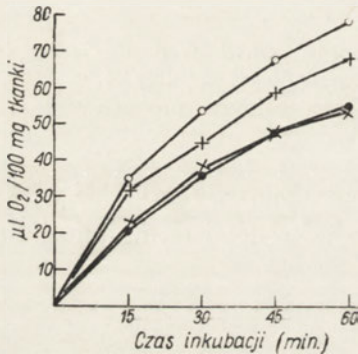
Do doświadczeń używano nerek homogenizowanych w płynie Krebsa-Ringera buforowanym fosforanami o pH 7,4. Wpływ kwasu maleinowego na etap α -ketoglutaran \rightarrow bursztynian (Tab. 3) badano oznaczając zużycie tlenu przez homogenat w obecności 0,033 M-malonianu sodu [5]. Rysunek 3 przedstawia przykładowe wyniki doświadczalne dla jednego szczura, podczas gdy dane tablicy 3 są wartościami średnimi z pięciu (względnie dla wyższych stężeń maleinianu z dwóch) szczurów. Stężenie maleinianu w granicach $3,3 \times 10^{-3}$ M do $1,25 \times 10^{-2}$ M niemal całkowicie hamuje utlenianie α -ketoglutaranu.

Tablica 3

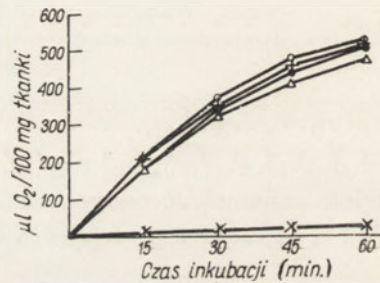
Wpływ maleinianu na utlenianie kwasu α -ketoglutarowego do bursztynowego

Każde naczynko zawierało homogenat nerki szczura (100 mg tkanki) w płynie Krebsa-Ringera buforowanym fosforanami o pH 7,4, α -ketoglutaran sodu (0,02 M), malonian sodu (0,033 M) oraz maleinian sodu tam, gdzie to zaznaczono. Całkowita objętość 2,5 ml. Zużycie O_2 mierzono w 38° przy 80 wzniciach na minutę

Maleinian sodu (M)	Liczba dośw.	$\mu l O_2/100$ mg tkanki po minutach					
		15	30	45	60	90	120
—	5	28	50	60	75	155	184
$1,25 \times 10^{-3}$	5	26	46	57	73	137	164
$3,30 \times 10^{-3}$	5	20	35	46	54	93	111
$1,25 \times 10^{-2}$	2	20	32	40	51	—	—
Oddychanie endogenne	5	17	29	38	50	77	90



Rys. 3. Wpływ maleinianu na zużycie O_2 przez homogenat nerki w obecności α -ketoglutaranu. Warunki doświadczenia jak podano w tablicy 3; (O) homogenat + α -ketoglutaran; (+) homogenat + α -ketoglutaran + maleinian $1,25 \times 10^{-3}$ M; (●) homogenat + α -ketoglutaran + maleinian $3,3 \times 10^{-3}$ M; (x) homogenat



Rys. 4. Wpływ maleinianu na utlenianie bursztynianu przez homogenat nerki szczura. Każde naczynko zawierało homogenat nerki (100 mg tkanki) w płynie Krebsa-Ringera buforowanym fosforanami o pH 7,4 arsenin sodu 0,0033 M, bursztynian sodu 0,02 M, ewentualnie i maleinian sodu. Końcowa objętość płynu, 2,5 ml, 38° 80 wznicięć na minutę. (O) kontrola bez maleinianu, (+) maleinian $1,25 \times 10^{-3}$ M, (●) maleinian $1,25 \times 10^{-2}$ M, (Δ) maleinian $3,3 \times 10^{-2}$ M, (x) bez substratu, oddychanie endogenne

Wpływ kwasu maleinowego na etap bursztynian \rightarrow fumaran badano mierząc zużycie tlenu przez homogenat nerkowy w obecności 0,0033 M-arseninu sodu. Jak podaje Green, Loomis i Auerbach [8] arsenin hamuje system cykloforazowy poza etapem fumaran \rightarrow jabłczan.

Z wyników podanych na rys. 4 widać, że praktycznie biorąc maleinian w stężeniach niemal całkowicie hamujących utlenianie α -ketoglutaranu jest bez wpływu na utlenianie bursztynianu. Nawet przy wysokich stężeniach maleinianu, sięgających $3,3 \times 10^{-2}$ M, hamowanie nie przekracza 10%.

DYSKUSJA

Dawka kwasu maleinowego, wywołująca aminoacydurię u szczurów, znajduje swoje odzwierciedlenie w stężeniach granicznych zarówno hamujących oddychanie skrawków nerkowych z dodatkiem glikozy, jak i hamujących utlenianie α -ketoglutaranu w homogenatach nerkowych szczura. Jeżeli dla uproszczenia przyjmiemy, że kwas maleinowy rozprzestrzenia się mniej więcej równomiernie w tkankach szczura, to dawka 300 mg/kg wagi w przeliczeniu na 1 kg wody szczura odpowiada stężeniu maleinianu między 3×10^{-3} a 4×10^{-3} M. Ten rząd wielkości odpowiada w przybliżeniu granicznym wartościom stężeń kwasu maleinowego, które hamują zarówno oddychanie skrawków, jak i utlenianie kwasu α -ketoglutazarowego w homogenatach nerkowych.

Z badań ElHavary'ego [4] na szczurach wynika, że kwas maleinowy powoduje we krwi wzrost poziomu kwasu α -ketoglutazarowego, a w mniejszym stopniu pirogronowego. ElHavary podawał szczurom dwukrotnie wyższe dawki aniżeli w obecnej pracy. Doświadczenia tej pracy, jak i pracy ElHavary'ego, wydają się wskazywać na zatrucie przez kwas maleinowy oksydatywnych dekarboksylacji. Być może, że uszkodzenie tak węzłowych punktów dla gospodarki energetycznej, jak utlenianie kwasu pirogronowego i α -ketoglutazarowego wiąże się przyczynowo z uszkodzeniem mechanizmów reabsorpcyjnych kanalików nerkowych. To przypuszczenie zdają się potwierdzać inne zjawiska występujące po podaniu kwasu maleinowego, jak zwiększone wydalanie moczu, fosfaturia i glikozuria [9]. Działanie trujące kwasu maleinowego na oksydatywne dekarboksylacje związane jest przypuszczalnie z inaktywacją grup -SH. Wiadomo bowiem [13], że kwas maleinowy tworzy w warunkach fizjologicznych addycyjne połączenia z drobnocząstkowymi związkami sulfhydrowymi, jak glutation, cysteina i kwas tiooctowy. Znaczenie kwasu maleinowego jako inhibitora grup -SH potwierdzają prace Morgana i Friedmana [14] nad glioksalazą oraz Angielskiego i Rogulskiego [3] nad osłaniającą rolą BALu, glutationu i cysteiny w zatruciach maleinianem. Być może w systemie dekarboksylacji oksydatywnej chodzi o blokowanie kwasu liponowego bądź koenzymu A. Istnienie szeregu układów, dla których grupy -SH są nieodzownym czynnikiem prawidłowego funkcjonowania, każe myśleć raczej o wielokierunkowym trującym działaniu kwa-

su maleinowego. W jakim stopniu uszkodzenie oksydacyjnych dekarboksylacji wpływa na powstawanie aminoacydurii i innych objawów zatrucia maleinianem, trudno w tej chwili ocenić.

Inhibicja dehydrogenazy bursztynianowej w zatruciu maleinianem raczej nie ma znaczenia. Hamowanie dehydrogenazy bursztynianowej uzyskane w pracach [10, 14] odnosiło się do stosunkowo wysokich stężeń kwasu maleinowego, rzędu 10^{-1} M, to jest stężenia, które w warunkach *in vivo* jest dawką śmiertelną dla szczura.

Harrisonowie [9] przypuszczają, że w działaniu maleinianu na szczury ma miejsce rozwijająca się oporność (resistance) na kwas maleinowy. Doświadczenia z wielokrotnym podawaniem maleinianu w dawkach nie wywołujących, później zaś w dawkach wywołujących aminoacydurię nie dają podstaw do przypuszczenia istnienia przyzwyczajania bądź oporności szczurów na kwas maleinowy.

STRESZCZENIE

Badano wrażliwość szczurów na kwas maleinowy. Testem *in vivo* było wydalanie azotu α -aminowego z moczem; *in vitro* zaś hamowanie oddychania skrawków i homogenatów nerkowych. Minimalna dawka kwasu maleinowego, wywołująca aminoacydurię u szczurów karmionych mleczną dietą, wynosi 250 do 300 mg/kg wagi szczura, co w przeliczeniu na 1 kg jego wody odpowiada stężeniu między 3×10^{-6} do 4×10^{-3} M. Wielokrotne podawanie kwasu maleinowego szczurom w dawkach subminimalnych jest bez wpływu na dawkę minimalną wywołującą aminoacydurię. Minimalne stężenie, hamujące oddychanie skrawków nerkowych z glikozą jako substratem, wynosi $3,3 \times 10^{-3}$ M. Kwas maleinowy w stężeniach hamujących utlenianie kwasu α -ketoglutazarowego jest bez wpływu na utlenianie kwasu bursztynowego.

L I T E R A T U R A

- [1] Angielski S., Niemiro R., Makarewicz W., Rogulski J., *Acta Biochim. Polon.* 5, 431, 1958.
- [2] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* 6, 295, 1959.
- [3] Angielski S., Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* 6, 411, 1959.
- [4] ElHavary M.F.S. *Biochem. J.* 61, 348, 1955.
- [5] Fahmy A. R., Walsh E. O'F., *Biochem. J.* 58, 231, 1954.
- [6] Fitzung O. G., Nelson A. A. *J. Am. Pharm. Assoc.* 36, 217, 1947.
- [7] Gözsy B., Szent-György A. *Z. Physiol. Chem.* 224, 1, 1934.
- [8] Green D. E., Loomis W. F., Auerbach V. H. *J. Biol. Chem.* 172, 389, 1948.
- [9] Harrison H. E., Harrison H. C. *Science* 120, 606, 1954.
- [10] Hopkins F. G., Morgan E. J., Lutwak-Mann C. *Biochem. J.* 32, 1829, 1938.

- [11] Krebs H. A. *Z. Physiol. Chem.* **217**, 191, 1933.
[12] Laki K. *Z. Physiol. Chem.* **236**, 31, 1935.
[13] Morgan E. J., Friedman E. *Biochem. J.* **32**, 733, 1938.
[14] Morgan E. J., Friedman E. *Biochem. J.* **32**, 862, 1938.
[15] Sacks W. *Science* **127**, 594, 1958.
[16] Weil-Malherbe H. *Biochem. J.* **32**, 2257, 1938.
[17] Yemm E. W., Cocking E. C. *Analyst.* **80**, 209, 1955.

AMINOACIDURIA INDUCED WITH MALEIC ACID

IV. THE TOXIC DOSE OF MALEINATE *IN VIVO* AND *IN VITRO*

S u m m a r y

The susceptibility of rats to maleic acid has been examined. The excretion of urine α -amino nitrogen was considered as a test *in vivo*, and inhibition of respiration of the kidney slices and homogenates was used as a test *in vitro*. The minimal dose of maleic acid causing the aminoaciduria in the rats fed with milk diet was found to be 250 to 300 mg./kg. body weight, what corresponded to 3×10^{-3} up to 4×10^{-3} M calculated per 1 kg. of body water.

Manifold administration of maleic acid at subminimal doses had no effect on the minimal dose of maleic acid causing the aminoaciduria. The minimal concentration of maleic acid depressing the respiration of kidney slices, with glucose as the substrat, was found to be 3.3×10^{-3} M. The concentration of maleic acid inhibiting the oxidation of α -ketoglutarate was without any effect on the succinate oxidation.

Otrzymano 23.9.1959 r.

B. SKARŻYŃSKI, T. W. SZCZEPKOWSKI and MIROSLAWA WEBER

INVESTIGATIONS ON THE OXIDATION OF THIOSULPHATE IN THE ANIMAL ORGANISM *

Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Kraków
(Department of Physiological Chemistry, Medical Academy, Cracow)
Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Although the occurrence of thiosulphate in animal urine had been shown almost a century ago by Schmiedeberg [7], for a long time little importance was attached to this discovery. The investigators, whose interest was aroused by this fact, considered the urinary thiosulphate to be formed by microorganisms in the animal intestinal tract [4, 6], they did not nevertheless exclude the possibility of its production in animal tissues. Fromageot [2] was the first to demonstrate experimentally that thiosulphate is formed from the sulphur of amino acids metabolized in animal tissues. More detailed studies on the origin of thiosulphate excreted by animals were rendered difficult by the rather complicated, not sensitive and accurate enough methods then available for the determination of this substance. The application of triethylenediamine nickel (II) nitrate to determination of thiosulphate has solved this difficulty. Using this procedure Gast *et al.* [3] confirmed the conclusions of Fromageot, that thiosulphate is a constant constituent of human urine. Since the quantity of thiosulphate excreted with urine corresponds to only a small part of the sulphur metabolized, this compound might be considered to be only a side product.

It seems, however, that this interpretation of the role of thiosulphate in the metabolism of sulphur may not be correct. It has been known for long that thiosulphate is not only formed in the animal organism, but that it may be also oxidized to sulphate. This second ability of the animal organism was first demonstrated by Trachtenberg in 1861 [12], and later confirmed by other investigators. The problem was studied more exten-

* This research was supported by financial aid from the Biochemical Committee of the Polish Academy of Sciences.

sively by Pirie [5] who investigated the oxidation of thiosulphate by liver slices *in vitro*, and determined the oxygen consumption and the amount of sulphate formed. Since the oxidation of thiosulphate by animal organism is proved the question arises, whether thiosulphate may not be a mere side product, but an important intermediate metabolite, which is further rapidly oxidized and is only excreted with the urine in very small quantities. Unfortunately, our knowledge of the metabolism of thiosulphate is still very limited. Nothing certain is known about the mechanism of its oxidation, and only recently some light seems to have been thrown on the mechanism of its formation by the work of Sörbo [10].

For several years we have been investigating the metabolism of autotrophic sulphur microorganisms. While studying *Thiobacillus thioparus* which utilizes the oxidation of thiosulphate as its sole source of energy, we came to the conclusion that only the outer sulphur atom of thiosulphate is involved in the metabolic process [8]. We have also been able to demonstrate [9] that the oxidation of thiosulphate does not include a tetrathionate stage, but that thiosulphate reacts with some unknown receptor forming a compound of the type X-S-SO₃. The hydrolytic cleavage of this compound leads in turn to the formation of sulphate containing the inner sulphur atom of thiosulphate, while the outer sulphur atom undergoes further metabolism. In the light of these facts, we considered the possibility that in the animal body thiosulphate may be metabolized similarly.

METHODS

Sodium thiosulphate labelled with ³⁵S in the inner position (S-³⁵SO₃)⁼, and thiosulphate labelled in the outer position (³⁵S-SO₃)⁼, furnished by the Radiochemical Centre in Amersham were used. The purity of these products was tested by chromatography, and only a slight contamination with trithionate was found. The radioactive preparation was diluted by adding analytical grade thiosulphate.

Experiments were carried out on albino rats weighing about 200 g. fed on wheat and water *ad libitum*. The solution of radioactive thiosulphate was injected subcutaneously by means of an accurately calibrated syringe. After the injection the rats were kept in separate metabolic cages placed on mesh screens over porcelain trays. At determined time intervals the urine was collected quantitatively from the trays into calibrated flasks, and distilled water was added to a final volume of 50 ml.

For the measurement of radioactivity 0.2 or 0.4 ml. of the diluted urine or faeces was transferred to bakelite planchets lined with filter paper, and dried with an infra-red lamp. The radioactivity of the sample was then measured by means of a counter with a thin mica-window (1.7 mg./cm.²). The activity of the solution injected i.e. the radioactivity introduced into the animal body was measured in the same way using 10 μ l. of the solution.

The determination of thiosulphate was carried out by the method of Spacu and Spacu [11] as modified for urine by Gast *et al.* [3]. To 5 ml. of the diluted urine 5 ml. of absolute alcohol and about 100 mg. of triethylenediamine nickel (II) nitrate were added. The mixture was left to stand in a refrigerator at -5°C for 12 hours, whereupon the precipitate formed was centrifuged. After discarding the supernatant, the precipitate was dissolved in 4 ml. of water, added with 0.5 ml. of acetic acid and titrated with 0.01 N-iodine. From the amount of iodine used the thiosulphate content in the precipitate was calculated.

It should be mentioned that in these conditions both sulphate and thiosulphate are precipitated with the triethylenediamine nickel complex. Although the presence of sulphate in the precipitate does not influence the result of thiosulphate titration, the radioactivity of the solution is due to the radioactivity of the sulphate as well as the thiosulphate precipitated. This activity was estimated in 0.4 ml. of the solution obtained after titration, transferred to a filter paper lined bakelite planchet, and dried by an infra-red lamp.

In order to determine the radioactivity and specific activity of the thiosulphate excreted with the urine it was necessary to separate the former from the sulphates. To the titrated solution barium nitrate *in substantia* was added to precipitate the sulphates. Since thiosulphate after titration with iodine is converted to tetrathionate, it is not precipitated by the barium ion. After centrifuging off the barium sulphate precipitate the supernatant was decanted and its radioactivity was again measured. The result obtained represented the radioactivity of only the tetrathionate formed from thiosulphate. From the thiosulphate content determined chemically and its radioactivity the specific activity was estimated and expressed in the number of impulses per minute per mg.

The radioactivity of the faeces was determined by transferring an aliquot of the aqueous suspension to bakelite planchets, drying by an infra-red lamp, and counting the number of impulses.

Sulphate was determined by the benzidine method of Cuthbertson and Tompsett [1]. The samples of urine which had already been diluted to a final volume of 50 ml. were further tenfold diluted. To a 1 ml. sample

of this dilution, 7 ml. of water and 2 ml. of 20% trichloroacetic acid were added, and after thorough stirring the mixture was centrifuged. To 2.5 ml. of the supernatant 5 ml. of freshly prepared 0.5% benzidine solution in acetone was added. After one hour the benzidine sulphate precipitate was centrifuged the supernatant discarded and the sediment washed three times with acetone. Traces of acetone were evaporated and the sediment was dissolved in 1 ml. of 1N-hydrochloric acid. To this solution 0.5 ml. of 0.1% sodium nitrite solution prepared immediately before use was added, and after one minute 2.5 ml. of 15% sodium hydroxide and 2.5 ml. of 10% sodium hydroxide solution containing 1% thymol. All the reagents should be freshly prepared.

In the original method of Cuthbertson and Tompsett the coloured solutions obtained were compared with standard solutions prepared immediately before colorimetric estimation. In our investigations 30 minutes after adding the reagents the extinction was determined in a Coleman colorimeter, at 520 m μ . The sulphate content was estimated from a standard curve.

RESULTS

The experiments, carried out by the described methods, allowed the determination of the following data:

(1) the radioactivity excreted in the urine at determined time intervals in relation to the total radioactivity introduced, (2) the radioactivity

Table 1

Excretion of radioactive sulphur from thiosulphate in rat urine after subcutaneous injection of 100 mg. Na₂S₂O₃ · 5 H₂O/100 g. body-weight

Time after injection (hrs)	Per cent of the dose			
	³⁵ S — SO ₃ =		S — ³⁵ SO ₃ =	
	range	average (5 animals)	range	average (5 animals)
0 — 6	36.2—67.5	48.2	61.6—92.5	85
6 — 24	4.6—19.7	10.1	5.6—34.6	13
24 — 48	0.4—2.8	1.1	0.6—2.1	1.5
48 — 72	0.3—1.3	0.7	0.3—1.4	0.8
72 — 96	0.3—1.2	0.6	0.2—0.7	0.4
96 —120	0.2—1.1	0.4	0.01—0.9	0.3

excreted in the faeces, (3) the amount of thiosulphate excreted in the urine, (4) the specific activity of thiosulphate, (5) the amount of sulphate excreted in the urine.

Table 2

Excretion of thiosulphate in rat urine after subcutaneous injection of 100 mg. Na₂S₂O₃ · 5 H₂O/100 g. body-weight

Normal content of thiosulphate in rat urine reaches a value of 0.3 mg./24 hours

Time after injection (hrs)	Milligrams range	Milligrams average (8 animals)	Per cent of the dose	
			range	average (8 animals)
0—6	36.8—63.5	48.8	18.4—31.7	24.4
6—24	2.3—6.5	4.2	1.1—3.2	2.1
24—48	0.2—0.4	0.3	normal	normal

The radioactivity found in the faeces was insignificant as compared with the activity of the urine, we therefore neglected it in our calculations.

Table 1 shows the percentage of the radioactivity introduced in the form of isotopic sulphur excreted in urine. There is a definite difference in the rate of excretion of radioactive sulphur depending on the position of the radioactive sulphur atom in the thiosulphate. If the outer sulphur atom was labelled, then, during the first 24 hrs after injection, about 60% of the radioactivity was excreted in the urine, and even after 120 hrs had elapsed, about 40% of the radioactive sulphur still remained in the organism. When thiosulphate was labelled in the inner position, 98% of the radioactivity was excreted in the urine within 24 hrs, and after

Table 3

Specific activity of thiosulphate excreted in rat urine after subcutaneous injection of 100 mg. Na₂S₂O₃ · 5 H₂O/100 g. body-weight

Experiment	Time after injection (hrs)	Specific activity (counts./min./mg)	Thiosulphate excreted (mg.)
Outer- ³⁵ S	III ₁	0	—
	„	0—6	46.4
	„	6—24	6.8
	VI ₁	0	—
	„	0—6	63.0
	„	6—24	6.2
	VI ₂	0	—
	„	0—6	51.0
	„	6—24	2.5
Inner- ³⁵ S	III ₁	0	—
	„	0—6	39.0
	„	6—24	3.0

120 hrs the radioactive sulphur was practically completely eliminated. The above facts demonstrate that the metabolic pathways of the outer and the inner sulphur of thiosulphate in the animal organism are different.

The data given in Table 2 show that during the first 6 hrs a considerable part of the administered thiosulphate is excreted in the urine. That this excreted thiosulphate is actually the thiosulphate which was introduced, is shown by the fact that its specific radioactivity during the first hours of the experiment is equal to the specific activity of the thiosulphate injected. After 6 hrs the excretion of thiosulphate rapidly diminishes and its specific activity also decreases. This indicates dilution by endogenously formed thiosulphate (Table 3). After 48 hrs the thiosulphate content in

Table 4

Excretion of sulphate in rat urine after subcutaneous injection of 100 mg. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ labelled in outer or in inner sulphur, per 100g. body-weight

Normal content of $\text{SO}_4^{=}$ averaged 9 mg./24 hours

Time after injection (hrs)	mg. $\text{SO}_4^{=}$ range (7 animals)	mg. $\text{SO}_4^{=}$ average (7 animals)
0 — 6	14—40	22.3
6 — 24	43—97.4	70.0
24 — 48	10—32	20.0
48 — 72	10—16	13.3
72 — 96	8—15	10.0
96 —120	8—10	8.9

the urine returns to normal (Table 2). Thus it must be concluded that within 24 hrs about 75% of the injected thiosulphate enters into the metabolic processes. The excretion of thiosulphate as determined by chemical methods is of course the same, regardless of the position of the labelled sulphur.

Table 5

Percentage of metabolized labelled sulphur (the amount injected minus that excreted as unchanged thiosulphate) in excreted sulphate, after injection of 100 mg. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/100\text{ g. body-weight}$

Time after injection (hrs)	^{35}S outer ($^{35}\text{S}\text{-SO}_3$) $^{=}$		^{35}S inner ($\text{S}\text{-}^{35}\text{SO}_3$) $^{=}$	
	range	average (5 animals)	range	average (5 animals)
0— 6	7.3—39.2	14.7	53.1—97.0	81.7
6—24	4.2—22.2	11.4	3.0—42.5	16.8
Total		26.1		98.5

The main metabolite of the thiosulphate introduced into the animal organism is sulphate, as shown by the results of chemical determinations presented in Table 4. The correlation between the amount of sulphate excreted and the interval of time elapsing after the injection of thiosulphate was similar for both types of labelled thiosulphate. On the other hand (Table 5), the radioactivity of the excreted sulphate showed marked differences depending on the position of the radioactive sulphur in the thiosulphate molecule. Radioactive sulphur introduced into the animal organism in the form of the $-SO_3$ group is almost completely metabolized after 24 hrs to sulphate and excreted in the urine. During the same time, only about 26% of radioactive sulphur introduced as the sulphide group in thiosulphate is oxidized to sulphate. The remainder is probably incorporated into organic compounds and converted into unidentified metabolites.

DISCUSSION

The results obtained shed some new light on the mechanism of sulphate metabolism in animal tissues, and also suggest certain hypotheses relating to this problem. It is evident that thiosulphate is quickly metabolized throughout the animal tissues, the main product being sulphate. The presented data show that within 24 hrs after the injection of a considerable dose of thiosulphate only about 1/4 is excreted unchanged, while the rest is metabolized.

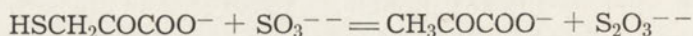
Both the outer and inner sulphur atoms in thiosulphate are oxidized but in the different rate. It has been shown (Table 5) that, if thiosulphate labelled with ^{35}S in either the outer or inner position is used, after 24 hrs the inner sulphur is almost completely oxidized to sulphate, whereas the outer sulphur oxidizes during the same time only in 25%.

The above facts lead to the conclusion that the mechanism of oxidation of thiosulphate by autotrophic sulphur microorganisms, as previously formulated by us, is also valid in the case of animal tissues. In the animal organism as well as in microorganisms the inner sulphur of thiosulphate is not directly involved in the metabolic processes of the cell, but is oxidized at once to sulphate. Only the outer sulphur atom enters into intermediate sulphur metabolism of the tissues.

The results of our experiments also prove that the animal organism possesses a remarkable ability of metabolizing and oxidizing thiosulphate. Only 1/4 of large doses of thiosulphate introduced is eliminated in unchanged form, while 3/4 enter into metabolic processes. It is apparent that thiosulphate is a substance which is not foreign to the animal organism, and cannot be considered to be a mere by-product of

metabolism. We believe that the suggestion that thiosulphate is formed in much larger amounts than has hitherto been supposed, judging by the small quantities eliminated in the urine is well founded. It may possibly be an important metabolite in the oxidation of sulphur, undergoing, however, further rapid oxidation to sulphate.

In connection with our hypothesis the investigations of Sörbo should be mentioned [10], who demonstrated that thiosulphate is a product of enzymatic reaction between mercaptopyruvic acid and the sulphite derived from cysteinsulphinic acid, according to the following equation:



Although both mercaptopyruvic acid and cysteinsulphinic acid are known to be metabolites of cystine and cystein, the further fate of the sulphur of these compounds has as yet not been elucidated. According to Sörbo, in endogenously formed thiosulphate, the sulphite group of cysteinsulphinic acid is the source of the inner sulphur atom. This is the same sulphur which in our experiments was directly and quickly oxidized to sulphate. Hence we admit the hypothesis according to which thiosulphate is a normal intermediate product in the metabolic chain leading from the sulphur of cystine and cystein to inorganic sulphate.

The fate of the outer sulphur atom in thiosulphate which remains in the body is still unknown, and the present experiments did not elucidate this problem. This might perhaps be possible by using autoradiography, and our preliminary experiments seem to indicate that, with the outer sulphur of injected thiosulphate, organic sulphur compounds are formed.

The authors acknowledge the technical assistance of Mgr. B. Stachurska.

SUMMARY

Metabolic pathways of radioactive thiosulphate were investigated when administered subcutaneously to rat. Thiosulphate with outer sulphur labelled ($^{35}\text{S-SO}_3$) was applied as well as that with the inner one ($\text{S-}^{35}\text{SO}_3$)⁻. The metabolic pathways of these two sulphur atoms were found to differ considerably. The inner sulphur was excreted almost completely as sulphates in urine within 24 hours. The oxidation of the outer sulphur to sulphates was not so quick, and its considerable percentage was retained in the rat organism after 24 hours.

When thiosulphate was administered subcutaneously to rat at dose of 100 mg. of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ per 100 g. of body weight, about 30 per cent

of this dose was excreted within 24 hours as thiosulphate, which was estimated chemically in urine. The specific activity of the excreted thiosulphate decreased with time elapsed, what indicated that it was diluted with endogenous thiosulphate. These experiments throw some new light on the rôle of thiosulphate in the sulphur metabolism in animals.

REFERENCES

- [1] Cuthbertson D. P., Tompsett S. L., *Biochem. J.* **25**, 1237, 1931.
- [2] Fromageot C., Royer A., *Enzymologia* **11**, 361, 1945.
- [3] Gast J. H., Arai K., Aldrich F. L., *J. Biol. Chem.* **196**, 875, 1952.
- [4] Neuberg C., Rubin O., *Biochem. Z.* **67**, 82, 1914.
- [5] Pirie N. W., *Biochem. J.* **28**, 1063, 1924.
- [6] Rothera C. H., *J. Physiol.* **32**, 175, 1904.
- [7] Schmiedeberg O., *Arch. Heilk.* **8**, 422, 1867.
- [8] Skarżyński B., Ostrowski W., Krawczyk A., *Bull. de l'Acad. Polonaise de Sc. Cl. II*, **5**, 159, 1957; Ostrowski W., Krawczyk A., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 249, 1957; Skarżyński B., Ostrowski W., *Nature* **182**, 933, 1958; Ostrowski W., Skarżyński B., Szczepkowski T. W., *Nukleonika* **3**, 85, 1958.
- [9] Skarżyński B., Szczepkowski T. W., *Nature* **183**, 1413, 1959.
- [10] Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 324, 1957.
- [11] Spacu G., Spacu P., *Z. anal. Chem.* **89**, 192, 1932.
- [12] Trachtenberg W., Zur Frage die Neutralisation überschüssiger Alkalien im Blut, Dissertation, Dorpat 1861 — see Lasch, W., *Biochem. Z.* **97**, 1, 1919.

BADANIA NAD UTLENIANIEM TIOSIARCZANU W USTROJU ZWIERZĘCYM

Streszczenie

Badano przemiany radioaktywnego tiosiarczanu wprowadzonego podskórnie do organizmu szczura. Stosując tiosiarczan znakowany w pozycji zewnętrznej ($^{35}\text{S-SO}_3$)⁻ i wewnętrznej ($\text{S-}^{35}\text{SO}_3$)⁻ stwierdzono, że drogi metaboliczne siarki zewnętrznej i wewnętrznej tiosiarczanu wykazują znaczne różnice. Siarka wewnętrzna ulega w ciągu 24 godzin prawie całkowitemu wydaleniu z moczem w postaci siarczanów. Utlenienie siarki zewnętrznej do siarczanów odbywa się wolniej i zostaje ona po upływie 24 godzin w znacznym procencie zatrzymana w organizmie szczura.

Po podskórnym podaniu do organizmu szczura 100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /100 g masy ciała, około 30% dawki wydalą się w ciągu 24 godzin jako tiosiarczan, który oznaczano chemicznie w moczu. Aktywność właściwa wydalonego tiosiarczanu maleje wraz z upływem czasu, co świadczy o jego rozcieńczaniu w puli endogennego tiosiarczanu. Przeprowadzone doświadczenia rzucają nowe światło na rolę tiosiarczanu w metabolizmie siarki w organizmie zwierzęcym.

Otrzymano 22.10.1959 r.

P. POSZWIŃSKI, K. ZAKRZEWSKI i ZOFIA MAY

**ZAPOBIEGANIE DENATURACJI CIEPLNEJ ALBUMIN OSOCZOWYCH
PRZEZ DODATEK KAPRYLANU SODU***Dział Preparatów Krwiopochodnych i Zakład Biochemii Instytutu Hematologii
w Warszawie*

Niektóre aniony kwasów tłuszczowych i związki podobne mają własność zapobiegania termicznej denaturacji albumin. Najlepiej przed denaturacją cieplną albumin chronią aniony wyższych kwasów tłuszczowych i acetylo pochodne aromatycznych aminokwasów [3]. Dodatek do albumin kaprylanu sodu lub acetylotryptofanu pozwala na bezpieczne ogrzewanie przez okres 10 godzin w temp. 60°, co jak dotychczas wydaje się być jedynym skutecznym sposobem niszczącym wirusa *hepatitis*.

Jakkolwiek badano dużo związków chroniących albuminy przed denaturacją cieplną [12], mechanizm działania ochronnego tych związków jest nadal niejasny. Wydaje się, że poznanie mechanizmu chronienia albumin przed denaturacją rzuciłoby światło na sam proces denaturacji.

Doświadczenia przedstawione w pracy niniejszej dążyły do wyjaśnienia mechanizmu wstępnego etapu denaturacji albumin osocza w oparciu o badanie działania na siebie albumin i kwasu kaprylowego. Otrzymane wyniki wskazują, że mechanizm działania kaprylanu nie polega na zapobieganiu wtórnej agregacji już zdenaturowanych białek, lecz rzeczywiście hamuje samą denaturację. Poza tym wysuwa się przypuszczenie, że rolę decydującą w zapoczątkowaniu denaturacji odgrywają niektóre grupy kationowe, a zwłaszcza łańcuchy boczne arginy.

MATERIAŁY I METODY

Albuminy otrzymano jako frakcję V według metody Cohna. Wszystkie badania prowadzono na jednej porcji albumin (seria 6/57) uprzednio dializowanej wobec wody destylowanej i następnie wysuszonej ze stanu zamrożonego. Badano 10% (wag./obj.) roztwory albumin.

Odczynniki wymienione w części doświadczalnej były chemicznie czyste i dodawano je rozpuszczone w 1 ml wody destylowanej tak, że stężenie białka w danej serii badań było jednakowe.

Pomiary lepkości wykonywano przy pomocy wiskozymetru według Ubbelohde, a w doświadczeniu przedstawionym na rysunku 5 w wiskozymetrze Höpplera. Wiskozymetry połączono z ultratermostatem, pozwalającym utrzymać temperaturę z dokładnością do $\pm 0,05^\circ$. Roztwory do pomiarów w wiskozymetrze według Ubbelohde ogrzewano w zatopionych ampulkach, celem zapobieżenia zmianom objętości w czasie ogrzewania.

Używano ogólnie przyjętych oznaczeń: lepkość roztworu η , lepkość rozpuszczalnika η_0 , lepkość właściwa $\eta_{sp} = \eta/\eta_0 - 1$, lepkość zredukowana η_{sp}/c , lepkość wewnętrzna $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$, stężenie c w gramach na 100 ml roztworu.

Pomiary elektroforezy swobodnej przeprowadzono w aparacie Tiselius Focal B w buforze weronalowym $I = 0,1$, $pH = 8,6$ w temp. 2° , w świetle białym. W doświadczeniu przedstawionym na rysunku 4 użyto buforów $I = 0,1$: weronalowy $pH 8,6$; fosforanowy $pH 6,3$; octanowy $pH 5,0$ i $4,3$.

WYNIKI BADAŃ

A. Wpływ ogrzewania na lepkość roztworów albumin

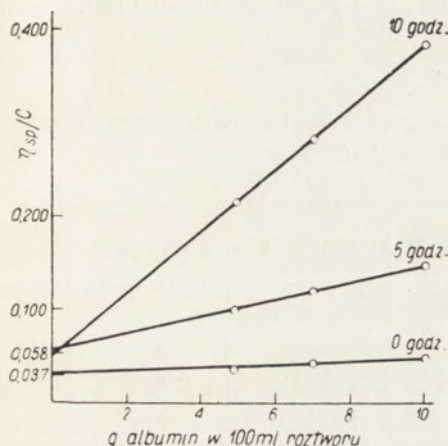
Ogrzewanie roztworów białek powoduje ich denaturację, objawiającą się między innymi wzrostem lepkości. Celem bliższego scharakteryzowania zmian lepkości roztworów albumin w toku ogrzewania wykonano pomiary lepkości 10% roztworów albumin (w 5% glukozie) po ogrzewaniu ich w temperaturze 60° przez 5 i 10 godzin. Za kontrolę służył taki sam roztwór nieogrzewany. Roztwory te rozcieńczono i z obliczonych lepkości zredukowanych otrzymano proste, pozwalające ekstrapolować wartości lepkości wewnętrznej roztworów ogrzewanych i nie ogrzewanych. Wyniki podano na rysunku 1. Widać, że lepkość wewnętrzna wzrasta nieznacznie, podczas gdy lepkość zredukowana rośnie bardzo silnie.

B. Stabilizująca rola kaprylanu sodu

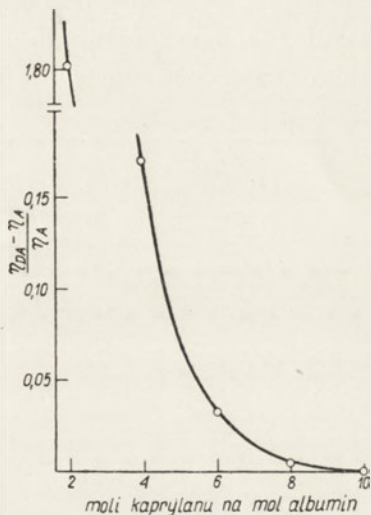
Kaprylan zapobiega wzrostowi lepkości ogrzewanych roztworów albumin, przy czym efekt jest zależny od stężenia kaprylanu.

Na rysunku 2 pokazano, jak wzrasta lepkość ogrzewanych roztworów albumin ponad lepkość roztworu nie ogrzewanego w zależności od stosunku molarnego kaprylanu do albumin.

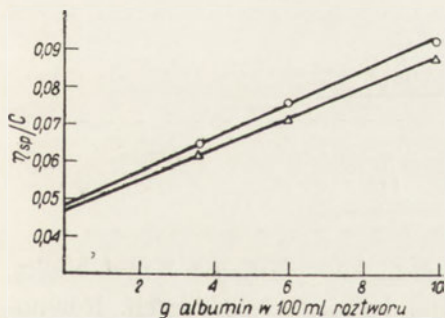
Albuminy ogrzewane z dodatkiem kaprylanu w stosunku 7 moli kaprylanu na 1 mol albumin wykazują prawie niezmienną lepkość wewnętrzną i nieznacznie przesuniętą lepkość zredukowaną, jak to widać na rysunku 3.



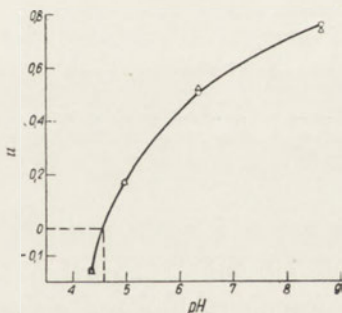
Rys. 1. Lepkość zredukowana roztworów albumin w 5% glukozie ogrzewanych 0, 5 i 10 godz. w 60°C



Rys. 2. Krzywa wzrostu lepkości 10% roztworów wodnych albumin ogrzewanych z dodatkiem różnych ilości kaprylanu. η_A lepkość roztworu nie ogrzewanego, η_{DA} lepkość roztworu ogrzewanego 10 godz. w 60°C



Rys. 3. Lepkość zredukowana 10% roztworów wodnych albumin z dodatkiem 7 moli kaprylanu na 1 mol białka. (Δ) nie ogrzewane; (○) ogrzewane 10 godz. w 60°C



Rys. 4. Punkt izoelektryczny 10% roztworów wodnych albumin z dodatkiem 4 moli kaprylanu na 1 mol albumin; (Δ) nie ogrzewane; (○) ogrzewane 10 godz. w 60°C. u = 10⁻⁵ cm²/wolt • sek.

Analiza elektroforetyczna roztworów albumin ogrzewanych z różnymi ilościami kaprylanu wskazuje również na zależność pomiędzy stężeniem

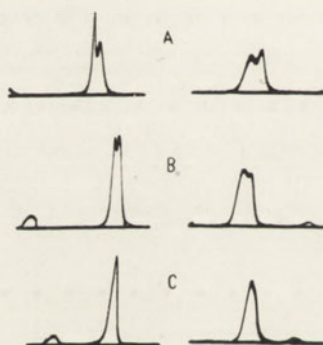
kaprylanu a zmianami molekularnymi, zachodzącymi w wyniku ogrzewania. Albuminy, ogrzewane z różnymi stężeniami kaprylanu, dializowano wobec buforu weronalowego $I = 0,1$, pH 8,6. Wyniki przedstawione w tabelicy 1 wraz z charakterystycznymi obrazami elektroforetycznymi wskazują na obecność drugiej komponenty białkowej w tych układach, w których stężenie kaprylanu jest niższe niż 4 mole na 1 mol białka.

T a b l i c a 1

Ruchliwość elektroforetyczna 10% wodnych roztworów albumin ogrzewanych 10 godz. w temp. 60° z dodatkiem kaprylanu

Bufor weronalowy $I = 0,1$, pH = 8,6

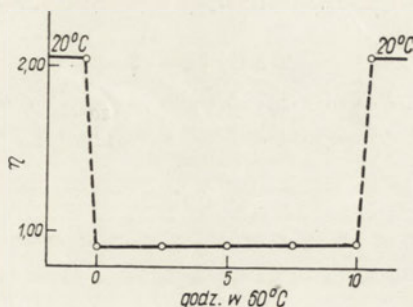
Ilość moli kaprylanu na mol białka	$u = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{wolt} \cdot \text{sek.}$		$\frac{u_{DA}}{u_A}$	Obraz elektroforetyczny
	I komp. A rodzima	II komp. DA zdenatur.		
1	0,779	0,673	0,86	A
2	0,767	0,673	0,88	B
4	0,764	brak	—	C
6	0,783	„		
8	0,757	„		
10	0,785	„		



Dla albumin, ogrzewanych wobec 4 moli kaprylanu na 1 mol białka, wyznaczono ruchliwości elektroforetyczne w różnych buforach. Równolegle badano preparat nie ogrzewany w identycznych buforach. W obu przypadkach punkt izoelektryczny jest jednakowy (Rys. 4).

Wszystkie pomiary lepkości wykonywano po ochłodzeniu ogrzewanych roztworów do temperatury 20°. Można więc było podejrzewać, że kaprylan nie tyle hamuje denaturację cieplną, co powoduje, że denaturacja staje się odwracalna i białko po ochłodzeniu przybiera postać ro-

dzimą. Celem wykluczenia tej alternatywy przeprowadzono doświadczenie, w którym mierzono lepkość roztworu w aktualnej temperaturze ogrzewania. Wyniki przedstawione na rysunku 5 wykazują, że albuminy w obecności kaprylanu nie zmieniają lepkości w toku ogrzewania.



Rys. 5. Lepkość 10% roztworu wodnego albumin z dodatkiem 7 moli kaprylanu na 1 mol białka mierzona w temp. 20° i 60°

C. Grupy czynne w procesie denaturacji

Grupy sulfhydrylowe mogą powodować reakcję łańcuchową z mostkami -S-S- cząsteczki białka, co mogłoby uwarunkować denaturację [2]. Zablockowanie tych grup przy pomocy *p*-chlorortęciobenzoenu (*p*CMB) powinny więc zahamować, względnie opóźnić, ten proces. Doświadczenie przedstawione w tabelicy 2 wykazuje, że dodatek *p*CMB do roztworu albumin przyspiesza ich denaturację w czasie ogrzewania.

Tablica 2

Lepkość 10% wodnych roztworów albumin ogrzewanych w temp. 60° z dodatkiem *p*-chlorortęciobenzoenu

Czas ogrzewania w 60° (min.)	Moli <i>p</i> CMB na mol albumin		Kontrola
	0,3	1,0	
0	2,12	2,05	2,20
10		3,98	3,17
30	4,13		3,27

Powinowactwo albumin do anionów tłuszczowych uwarunkowane jest znaczną ilością grup kationowych w łańcuchach bocznych cząsteczki. Możliwe więc jest, że związanie kaprylanu przez albuminy prowadzi do zmniejszenia reaktywności niektórych grup kationowych tego białka, odpowiedzialnych za procesy denaturacji i agregacji. Gdyby tak było,

to dodatek do roztworu białka związków o strukturze zbliżonej do domniemanych grup kationowych powinien uwarunkować „konkurencję” o kaprylan między białkiem a wprowadzonymi związkami. W rezultacie białko ogrzewane w takim układzie powinno wykazywać wzrost lepkości charakterystyczny dla mniejszej ilości kaprylanu.

T a b l i c a 3

Wpływ niektórych aminokwasów zasadowych i zasad azotowych na denaturację cieplną 10% roztworów wodnych albumin z dodatkiem 4 mole kaprylanu na 1 mol białka

η_{DA} lepkość roztworu ogrzewanego, η_A lepkość roztworu nie ogrzewanego

4 mole aminokwasu na 1 mol kaprylanu	$\eta_{DA} - \eta_A$	$\frac{\eta_{DA} - \eta_A}{\eta_A} \cdot 100$
asparagina	0,47	24
lizyna	0,34	17
glutamina	0,46	22
arginina	0,67	35
kontrola	0,31	16

4 mole zasady na 1 mol kaprylanu		
amoniak	0,53	26
mocznik	0,74	35
hydroksylamina	3,21	147
hydrazyna	3,02	138
kontrola	0,32	15

Do 10% roztworu albumin, zawierającego 4 mole kaprylanu na 1 mol białka, dodawano aminokwasy: asparaginę, lizynę, glutaminę i argininę oraz zasady: amoniak, hydroksylaminę, hydrazynę i mocznik, w stosunku: 4 mole aminokwasu lub zasady na 1 mol kaprylanu, czyli 16 moli aminokwasu czy zasady na 1 mol białka. Wyniki podaje tablica 3. Widać, że najwyraźniejszy efekt cofania ochronnego działania kaprylanu wywiera spośród aminokwasów arginina, a spośród zasad hydroksylamina i hydrazyna.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Mierzenie lepkości umożliwia śledzenie przebiegu denaturacji we wczesnych jej stadiach. Drobne nawet różnice asymetrii cząsteczki oraz zmiany stopnia interakcji cząsteczek między sobą i roztworem wyraźnie odbijają się na lepkości roztworu.

Po 10-godzinnym ogrzewaniu w temp. 60° wykazują badane roztwory albumin tylko nieznaczny wzrost lepkości wewnętrznej w porównaniu

do roztworu nie ogrzewanego, mimo iż ich lepkości zredukowane wzrastają bardzo silnie. Podane w pracy lepkości wewnętrzne $[\eta]$ są funkcjami stężeń wagowych i można je wyrazić jako lepkość wewnętrzną $[v]$ zależną od stężeń objętościowych

$$[v] = [\eta] \frac{100}{V},$$

gdzie V oznacza cząstkową objętość właściwą. Stosując ostatnie wyrażenie $[v]$ do funkcji Simhy [5] otrzymuje się stosunek osiowy J cząsteczki.

I tak dla lepkości wewnętrznych odczytanych z rysunku 1

$$[\eta] = 0,037 \text{ dla albumin nie ogrzewanych, } [v] = 4,8,$$

$$[\eta] = 0,058 \text{ dla albumin ogrzewanych, } [v] = 7,7,$$

przyjmując, że V wynosi w przybliżeniu 0,75. Wstawiając te dane do funkcji Simhy dla cząsteczek o kształcie dysku otrzyma się odpowiednio:

$$J \cong 5,0 \text{ dla albumin nie ogrzewanych,}$$

$$J \cong 10,0 \text{ dla albumin ogrzewanych.}$$

A więc zaobserwowany wzrost lepkości wewnętrznej odpowiada tylko dwukrotnemu zwiększeniu stosunku osiowego cząsteczki, jeżeli przyjmujemy, że nie nastąpiła zmiana w uwodnieniu cząsteczki. Wynikałoby z tego, że w zastosowanych warunkach denaturacji cieplnej dochodzi w niewielkim stopniu do rozfałdowania cząsteczki lub powstawania trwałych agregatów międzycząsteczkowych. Pomimo tego, że lepkość wewnętrzna roztworów ogrzewanych przez 5 i 10 godzin jest prawie jednakowa, uderzające są znacznie wyższe wartości lepkości zredukowanej roztworu ogrzewanego przez 10 godzin, niż roztworu ogrzewanego przez 5 godzin. Świadczy to o narastaniu sił interakcji międzycząsteczkowej w miarę ogrzewania albumin.

Dodatek kaprylanu sodu rzeczywiście hamuje powstawanie tych oznak denaturacji. Stosunek 8—10 moli na 1 mol albuminu jest wystarczający, aby lepkość takich roztworów albumin nie zmieniała się pod wpływem ogrzewania. Przy nieco niższych stężeniach kaprylanu zachodzą zmiany, ale są one nieznaczne.

Zjawiska denaturacji badane na podstawie analizy elektroforetycznej wykazują, że przy stosunku molowym 2 : 1 i poniżej kaprylanu do białka pojawia się nowa komponenta białkowa. Podobne wyniki znaleźli Mackay i Martin [9], stosując acetylotryptofan. Dla wyższych stężeń kaprylanu analiza elektroforetyczna nie wykazuje obecności komponenty białkowej, a punkt izoelektryczny roztworów ogrzewanych i nie ogrzewanych jest jednakowy. Wynikałoby z tego, że pomiar lepkości jest czulszą metodą badania denaturacji niż śledzenie zmian elektroforetycznych.

Powyższe spostrzeżenia są zgodne z poglądami wielu autorów, według których aniony kwasów tłuszczowych hamują denaturację cieplną albu-

min. Jednakże Losiewa i Cyperowicz [8], stosując pomiar rozpuszczalności w punkcie izoelektrycznym, jako kryterium denaturacji, wykazali, że ilość białka wytrąconego w podwyższonej temperaturze w obecności kaprylanu i nonylanu jest większa niż w nieobecności tych anionów. Wobec tego, można by mniemać, że hamowanie przyrostu lepkości ogrzewanych roztworów albumin po ochłodzeniu jest wynikiem denaturacji odwracalnej spowodowanej przez kaprylan.

Ustalenie, który z tych poglądów jest słuszny, jest ważne dla prawidłowej interpretacji doświadczeń, zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu stabilizującego działania kaprylanu. Doświadczenie przedstawione na rysunku 5 wykazuje, że lepkość roztworu albumin z dodatkiem kaprylanu, osiągnięta po 30 minutach ogrzewania (tj. po czasie potrzebnym, aby roztwór osiągnął temperaturę 60°) nie ulega dalszym zmianom w czasie następnych 600 minut ogrzewania. Gdyby w czasie ogrzewania następowała denaturacja, należałoby się spodziewać, że lepkość roztworu będzie się zwiększać. Tak jednak nie jest. Lepkość pozostaje na niezmiennym poziomie, a po ochłodzeniu wraca do wartości wyjściowej. Doświadczenie to wskazuje, że kaprylan rzeczywiście hamuje denaturację cieplną albumin, a nie cofa denaturacji cieplnej białka.

Eksperymenty przedstawione w części C rzucają światło na mechanizm działania kaprylanu, a równocześnie na mechanizm denaturacji cieplnej albumin. Denaturacja cieplna albumin mogłaby polegać na tym [6], że jedyna wolna grupa SH cząsteczki białka zyskiwałaby, na skutek rozluźnienia struktury całej cząsteczki, dostateczną swobodę do zaatakowania mostków -S-S- własnej lub sąsiedniej cząsteczki. Kaprylan, wiążąc się z cząsteczką albumin, dostarczałby dodatkowych wiązań usztywniających cząsteczkę [10] i w ten sposób ograniczałby łatwość reagowania grupy SH w podwyższonej temperaturze. Gdyby tak było, to zablokowanie grupy SH przez pCMB powinno co najmniej zwolnić proces denaturacji. Doświadczenie z tablicy 2 jednoznacznie wskazuje, że tak nie jest. Doświadczenie to świadczy o tym, że w pierwszym okresie denaturacji cieplnej grupy SH nie odgrywają istotnej roli. Nie wyłącza to możliwości, że w końcowym etapie denaturacji grupy te mają rolę decydującą, gdyż, jak to wykazał Jensen i współpracownicy [4], ich zablokowanie uniemożliwia ostateczną żelifikację.

Wielu autorów jest zdania, że działanie hamujące denaturację cieplną albumin przez kaprylan polega na wiązaniu go przez grupy kationowe cząsteczki albumin. Cząsteczka albumin charakteryzuje się znaczną ilością grup kationowych, mając w swoich łańcuchach bocznych 59 reszt lizyny, 24 reszt argininy i 15 reszt histydyny oraz 44 grup kwaśnych amidów [11]. Grupy te z jednej strony decydują o wiązaniu anionów tłuszczowych [7],

z drugiej mogłyby w czasie ogrzewania nabierać zwiększonej reaktywności i tworzyć wiązania intermolekularne i intramolekularne, rozpczynając proces denaturacji.

Pomimo obecności w cząsteczce albumin tak znacznej ilości grup kationowych, tylko niewielka ich ilość bierze udział w zapoczątkowaniu denaturacji pod wpływem ogrzewania, skoro już 10 cząsteczek kaprylanu na 1 cząsteczkę albumin całkowicie hamuje ten proces. Dodanie do roztworu któregoś z aminokwasów, odpowiedzialnego za ten stan rzeczy, powinno by cofnąć omawiany efekt kaprylanu. W wyniku bowiem „konkurencji“ o kaprylan między aminokwasem zasadowym, znajdującym się w cząsteczce białka, a dodanym do roztworu, pewna ilość kaprylanu zostanie odciągnięta od cząsteczki albumin. Doświadczenie, przedstawione na tablicy 3, w którym jako aminokwasów zasadowych użyto lizyny, asparaginy, glutaminy i argininy, pozwala sądzić, że tak jest w rzeczywistości i że zwłaszcza arginina jest wybiórczym konkurentem o kaprylan.

Szczególnie wyraźnie uwypukla się efekt kationowych grup azotowych, gdy zamiast aminokwasów zasadowych do roztworu dodano związków takich, jak amoniak, mocznik, hydrazyna i hydroksylamina. Widać z tablicy 3, że wyraźnie wybiórczy efekt ma hydrazyna i hydroksylamina. Efekt ten nie jest skorelowany ze stałą dysocjacji, gdyż ta, wyrażona jako $-\log K$, wynosi dla hydroksylaminy 7,97, hydrazyny 5,8, mocznika 13,8 i NH_4OH 4,75. Zestawienie wyników otrzymanych w tych doświadczeniach, w których działanie kaprylanu było odwracalne, potwierdzają przypuszczenie, że punktem zaczepienia kaprylanu są dysocjujące grupy NH_2 , a zwłaszcza — być może — taki ich układ steryczny, jak na reszcie guanidynowej argininy.

Mechanizm początkowej fazy denaturacji cieplnej albumin sprowadzałyby się zatem do zwiększenia reaktywności grupy guanidynowej jednego z łańcuchów bocznych reszt argininy. Interesujące jest, że już około 8 moli kaprylanu na 1 mol albumin hamuje denaturację, a więc że tylko niewielki odsetek grup kationowych musi być zablokowany, by wstrzymać postęp denaturacji.

Uwolnienie w toku denaturacji grupy guanidynowej może prowadzić do powstania nowej grupy kationowej, która w konsekwencji mogłaby powodować zmniejszenie elektroforetycznej ruchliwości anionowej cząsteczki. W rzeczywistości różnica pomiędzy ruchliwością albumin zdenaturowanych i rodzimych odpowiada przyrostowi jednej grupy kationowej¹.

¹ Ładunek netto można obliczyć z ruchliwości elektroforetycznej wg Gorina [1]: $v = 10,3 u$ (dla albumin rodzimych), przyrost ładunku netto: $v_1 - v_2 = 10,3 (u_1 - u_2)$; w danym przypadku dla stosunku molowego kaprylanu do albumin:

$$1 : 1 \quad v_1 - v_2 = 10,3 (0,779 - 0,673) = 1,09$$

$$2 : 1 \quad v_1 - v_2 = 10,3 (0,767 - 0,673) = 0,97.$$

Jednakże zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej na skutek denaturacji może mieć miejsce również bez zmian w ładunku cząsteczki i być wynikiem jedynie wzrostu jej asymetrii. Według rozważań Gorina [1] stosunek R — ruchliwości cząsteczki cylindrycznej do ruchliwości kuli o tym samym ciężarze cząsteczkowym zależy od stosunku osiowego $1/2a$ cząsteczki cylindrycznej i wynosi:

$$\begin{array}{ll} \text{dla } 1/2a = 5 & R_5 = 0,65, \\ \text{,, } 1/2a = 10 & R_{10} = 0,53; \end{array}$$

zwiększenie się więc asymetrii cząsteczki, charakteryzujące się wzrostem stosunku osiowego z 5 na 10 zmniejszy ruchliwość elektroforetyczną do $0,53 : 0,65 = 0,814$ pierwotnej wartości. Z doświadczeń przedstawionych na tablicy 1 widać, że w obu przypadkach, w których stwierdzono obecność frakcji zdenaturowanej, ruchliwość jej wynosi około 0,86 ruchliwości białka rodzimego.

Za prawdopodobieństwem tej drugiej alternatywy przemawiają także wyniki pomiaru lepkości wewnętrznej, przedstawione na rysunku 1, sugerujące podwojenie stosunku osiowego z 5 na 10.

Przedstawione rozważania wykazują, że w początkowym stadium denaturacji cieplnej albumin następuje rozluźnienie struktury cząsteczki, co powoduje, iż grupa guanidynowa argininy nabywa zwiększonej reaktywności i tworzy wiązanie z sąsiednią cząsteczką albuminy, dając dimer. Kaprylan zaś uniemożliwiałby zwiększenie reaktywności grupy guanidynowej argininy.

STRESZCZENIE

1. Ogrzewany 10% roztwór albumin wykazuje wzrost lepkości wewnętrznej, odpowiadającej zwiększeniu się stosunku osiowego cząsteczki z 5 na 10. W pomiarach elektroforetycznych ogrzewanych 10% albumin z dodatkiem kaprylanu sodu w ilości 1 i 2 mole na 1 mol białka stwierdza się obecność drugiej komponenty, której zmniejszona ruchliwość wskazuje także na zwiększenie się stosunku osiowego z 5 na 10.

2. Kaprylan sodu rzeczywiście hamuje denaturację cieplną albumin, a nie jest czynnikiem stwarzającym warunki denaturacji odwracalnej.

3. Z badanych aminokwasów: lizyna, asparagina, glutamina i arginina, ta ostatnia posiada najsilniejszy efekt cofający stabilizację cieplną albumin kaprylanem. Podobny efekt wywiera amoniak i mocznik, a bardzo silnie działają hydrazyna i hydroksylamina.

4. Stabilizujące działanie kaprylanu jest wynikiem wiązania go przez grupy guanidynowe reszt argininy, znajdujących się w łańcuchach bocznych cząsteczki albumin.

5. Wstępne stadium denaturacji cieplnej albumin polega na uaktywnieniu grup guanidynowych reszt argininy w podwyższonej temperaturze i ich zdolności tworzenia w tym stanie dimerów przez wiązanie się z drugą cząsteczką.

L I T E R A T U R A

- [1] Alexander A. E., Johnson P. *Colloid Science*, str. 333, Clarendon Press, Oxford, 1946.
- [2] Anson M. L. *Adv. Protein Chem.* 2, 361, 1945.
- [3] Ballou G. A., Boyer P. D., Luck J. M., Luen F. G. *J. Clin. Invest.* 23, 454, 1944.
- [4] Jensen E. V., Hospelhorn V. D., Tapley D. F., Huggins C. *J. Biol. Chem.* 185, 411, 1950.
- [5] Kabat E. A., Mayer M. M. *Experimental Immunochemistry*, str. 400, C. C. Thomas Springfield, Illinois, 1948.
- [6] Kauzmann W. w *Symposium on the Mechanism of Enzyme Action*, (wyd. W. D. McElroy i B. Glass) str. 103, John Hopkins Press, Baltimore, 1954.
- [7] Klotz I. M., Triwush H., Walker, *J. Am. Chem. Soc.* 70, 2935, 1948.
- [8] Losiewa A. L., Cyperowicz A. S. *Kolloid. Žurn.* 19, 222, 1957.
- [9] Mackay M. E., Martin N. H. *Biochem. J.* 65, 284, 1957.
- [10] Tevesi J. D., Murray J. J. *J. Biol. Chem.* 194, 823, 1952.
- [11] Tristram S. R. w *The proteins*, vol. 1, part. 1, str. 215, Acad. Press, New York, 1953.
- [12] Waugh D. F. *Adv. Protein Chem.* 9, 325, 1954.

THE PREVENTIVE EFFECT OF CAPRYLATE ON HEAT DENATURATION OF SERUM ALBUMIN

S u m m a r y

1. The increase of the intrinsic viscosity of heated 10% human albumin solutions corresponds, according to Simha, to the increase of the axial ratio from 5 to 10. Moving-boundary electrophoresis of heated 10% human albumin solutions with sodium caprylate (1 and 2 moles of caprylate added per 1 mole of protein) shows the presence of a second component. Its mobility, according to Gorin, corresponds also to the increase of the axial ratio from 5 to 10.

2. Sodium caprylate does not act as denaturing agent. In fact, its addition to solutions of human albumin prevents their heat denaturation.

3. This stabilization is inhibited by addition of amino acids: lysine, glutamine, asparagine and arginine. The last one is the most effective. Ammonia and urea act in a similar way. Much greater is the effect of hydrazine and hydroxylamine.

4. The stabilization is probably due to caprylate bonds with guanidine groups of arginine rests present in side-chains of the albumin molecule.

5. In the introductory step of heat denaturation of human albumin the guanidine groups of arginine rests are activated, and there exists the possibility of forming dimers with another albumin molecule.

Otrzymano 30.10.1959 r.

W. DRABIKOWSKI

THE BINDING OF ATP BY NATIVE AND BY MODIFIED PROTEINS

*Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw
(Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa)
Kierownik: prof. dr W. Niemierko*

It has been shown in previous papers [8, 9] that various proteins can easily bind adenosine triphosphate (ATP). The amount of ATP present in the protein precipitate, after coagulation by heating or by treatment with ethyl alcohol at different pH, was considered as the extent of the ATP binding. The results obtained indicated that the concentration of the nucleotides in the solution exhibited some influence upon the amount of ATP bound by the protein. To obtain more details concerning this phenomenon experiments were performed in the present study in which the ratio of the amount of ATP bound by the precipitated protein to the amount of ATP which remained in the solution was measured, and the number of ATP molecules bound by one molecule of serum albumin at different pH was estimated.

The previous experiments have shown [8, 9] that the binding ability of proteins is the greatest at pH values below the isoelectric point. Its diminution with the increase of pH suggested that the cationic groups of the protein molecule take part in this process. More detailed examination of this problem was now performed by using proteins modified in various ways. Beside this, an attempt was made to show which groups in the molecule of the nucleotides take part in the binding with proteins.

A preliminary communication of some of the results obtained has been presented at the 4th International Congress of Biochemistry in Vienna [10].

MATERIAL AND METHODS

ATP, as a barium salt, was prepared from rabbit muscle according to the method of Szent-György [32]. Before use it was converted into a sodium salt by using Amberlite IR120. The determined ratios of

ΔP_{10} to ribose and to adenine were about 1.90. Inosine triphosphate (ITP) was obtained from the ATP by the method of Kleinzeller [17].

The human serum albumin used in experiments was the fifth fraction of Cohn¹. Acetylation of albumin was carried out according to Fraenkel-Conrat [14] using acetic anhydride. The acetylated protein was purified by dialysis and lyophilized. Deamination was carried out as described by Philpot and Small [25]. The reaction product was dialysed. The precipitate formed during dialysis was discarded and the solution lyophilized. Esterification was carried out at room temperature in methanol solution in the presence of 0.01 N-HCl according to Fraenkel-Conrat [13]. The reaction product was lyophilized.

In order to block the guanidyl groups albumin was treated with formaldehyde according to Olcott [24] and dialysed. In those experiments which were performed in acid medium formaldehyde was not removed from the solution and the examination of ATP binding was done in its presence.

For guanidination a commercial preparation of casein was used. Guanidination was carried out according to Schütte [30] and Roche *et al.* [29] using S-methylisourea².

The reaction product was precipitated at isoelectric point, suspended in water, neutralised by addition of NaOH and dialysed against 0.01% NaHCO₃. A similar procedure was carried out with the control casein with the omission of the action of S-methylisourea.

In experiments with modified proteins a procedure identical with those described in the previous papers was used [8, 9]. Solutions of serum albumin, ATP and acetate buffer were mixed and, if no precipitate was formed, either ethanol was added (usually 0.5 vol.) at 0°, or the solution was heated on a water bath at 100°. The precipitate was separated by centrifugation, washed with a buffer solution and treated with 0.6 N-HClO₄ in order to liberate the bound nucleotide. The quantity of the nucleotide was determined with "Unicam" spectrophotometer. The molar extinction coefficient of ATP at 259 m μ was taken after Bock *et al.* [3] as 15.4×10^3 and for ITP at 249 m μ as 13.9×10^3 [16].

To establish the maximum number of moles of ATP bound by one mole of serum albumin the following procedure was employed. After centrifugation of the coagulated protein a sample of the supernatant was adjusted to pH 7 with phosphate buffer and the amount of ATP was determined in the presence of the unprecipitated albumin by measuring the light absorption at 259 m μ and at 280 m μ .

¹ This preparation was kindly supplied by Institute of Haematology, Warszawa.

² This preparation was obtained in our laboratory by dr. W. Szer.

The nucleotide concentration can be calculated by means of the following equation (cf. [1]).

$$C_{\text{nucl.}} = \frac{{}_bD \times {}_aE_2 - {}_aD \times {}_bE_2}{{}_bE_1 \times {}_aE_2 - {}_aE_1 \times {}_bE_2},$$

where E_1 is the molar extinction coefficient of ATP, E_2 the molar extinction coefficient of albumin and D the estimated optical density. The letters a and b indicate the corresponding values for the wavelength 259 $m\mu$ and 280 $m\mu$, respectively. To simplify the above equation the ratio of the extinction of serum albumin at 280 $m\mu$ to the extinction at 259 $m\mu$ (${}_bE_2$ to ${}_aE_2$) was determined experimentally. After substituting the numerical value of this ratio and the values of the extinction coefficient for ATP the following simplified formula was obtained:

$$\mu\text{moles ATP} = \frac{{}_bD \times 0.823 - {}_aD}{-12.85} \times \text{volume of the sample (for 1 cm. cell)}$$

The possibility to use the simplified equation was tested with known amounts of ATP and of serum albumin.

The concentration of proteins were determined by the biuret method according to Gornall *et al.* [15].

RESULTS

Table 1 shows the results of one series of experiments in which varying amounts of ATP were added to albumin solutions and the protein was precipitated at pH 3.6 and 4.7 by addition of alcohol³.

The data from Table 1 are presented in Fig. 1 as the logarithmical relationship between the amount of bound nucleotide in μmoles (x) per gram albumin (m) and the concentration of the free nucleotide (C).

The character of the curves indicates that the binding of ATP by coagulated protein resembles the adsorption isotherm. According to Klotz [20] the maximum number of molecules of a substance (n), which may be bound by one protein molecule can be established using the equation:

$$\frac{r}{C} = kn - kr,$$

where r is the number of moles of the substances bound in given conditions by one mole of protein, C the concentration of the free

³ At pH 3.6 serum albumin could be coagulated by alcohol only when the concentration of ATP was not less than 200 μmoles per g. protein. On the other hand at concentrations of ATP above 350 μmoles per g. albumin the protein precipitated at pH 3.6 even without addition of alcohol. The presence of alcohol, however, did not change the binding.

Table 1

The binding of ATP by serum albumin

Exper. No. 42. The reaction mixture contained 20 mg. serum albumin, various amounts of ATP, and acetate buffer (final $\mu = 0.1$). Final volume 6 ml. Coagulation with 3 ml. of ethanol at 0° (see footnote p. 129)

Final pH	ATP added		Supernatant		Precipitate				$\frac{r}{C}$
	μ moles	μ moles per g. albumin	albumin mg. per ml.	ATP μ moles per ml. * (C)	albumin mg. (m)	ATP μ moles (x)	μ moles ATP per g. albumin $\left(\frac{x}{m} \cdot 10^3\right)$	moles ATP per 1 mole albumin** (r)	
3.6	5.5	275	0.8	0.3	15.2	3.7	241	16.2	58
„	8.3	413	0	0.4	20.0	5.8	292	20.1	50
„	11.0	550	0	0.7	20.0	7.2	357	24.2	37
„	13.8	685	0	1.1	20.0	7.5	373	25.7	25
„	16.5	825	0	1.4	20.0	8.4	420	29.6	21
4.7	5.5	275	0	0.7	20.0	1.3	67	4.8	6.9
„	8.3	413	0	1.1	20.0	1.7	85	6.0	5.5
„	11.0	550	0	1.5	20.0	2.2	110	7.4	5.0
„	13.8	685	0	1.9	20.0	2.4	118	8.2	4.3
„	16.5	825	0	2.3	20.0	2.6	130	9.1	3.8

* The amount of ATP was determined in the supernatant after addition of alcohol but the concentration of ATP was calculated for the initial volume of solution (6 ml).

** The mol. wt. of serum albumin was accepted as 69000.

substance and k a constant. If the values of r are plotted against $\frac{r}{C}$ the intercepts of the curves on the ordinate give n .

As can be seen from Fig. 2 the maximum number of ATP molecules bound by one molecules of serum albumin is at pH 3.6 and pH 4.7 about 35 and 13 respectively.

The results with acetylated and with deaminated serum albumin are presented in Fig. 3 and 4. As can be seen the binding ability of acetylated, as well as, of deaminated protein is highly decreased.

A number of experiments were also carried out using formaldehyde as an agent for blocking functional groups in the protein molecule. In acid medium formaldehyde in high concentrations (final concentration about 10%) reduced the ability of protein to bind ATP by over 50%. As it is known, however, [28], formaldehyde reacts in acid medium with various functional groups. A selective blocking of guanidyl groups can be obtained by using formaldehyde at pH 11 [24]. As can be seen from Fig. 5 such treatment also reduces the ability of the proteins to bind nucleotides.

The results of all the experiments with acetylated and formaldehyde treated protein indicate that both the ϵ -amino and the guanidyl groups take part in the binding with the nucleotides. In order to determine the difference in the affinities of these groups to ATP the ϵ -amino groups of lysine were converted into the guanidyl groups using S-methylisourea. During guanidination of serum albumin according to Roche *et al.* [29] this protein coagulated, however, and became insoluble. Therefore the experiments with guanidination were carried out with casein.

The results of these experiments, presented in Fig. 6, show that the change of amino groups into guanidyl groups has no influence on the binding ability of the protein.

In order to investigate the role of carboxyl groups serum albumin was esterified with methyl alcohol. As can be seen from Fig. 7. the binding

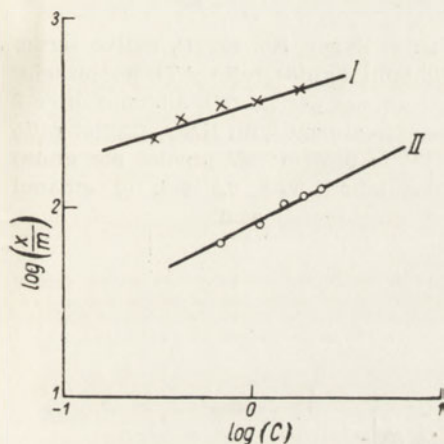


Fig. 1. Logarithmical relationship between the amount of free and protein bound ATP. (I), at pH 3.6; (II), at pH 4.7. $\frac{x}{m}$ micromoles of bound ATP (x) per g. serum albumin (m), C , the concentration of free ATP in μ moles. For experimental data see Table 1

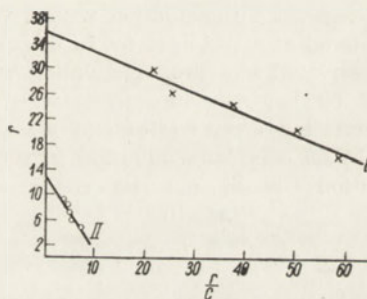


Fig. 2. The establishment of maximum number of moles ATP bound by serum albumin, (I) at pH 3.6; (II), at pH 4.7. v , moles bound ATP per one mole of albumin, C , the concentration of free ATP in μ moles. For experimental data see Table 1

ability of esterified albumin is increased. This result is probably connected with the shifting of the isoelectric point towards a higher pH⁴.

⁴ ATP preparations (Light) used in the experiments with the modified proteins contained considerable amounts of ADP and AMP. As has been shown previously [9] these nucleotides differ somewhat in their affinity to proteins. It may be supposed, however, that the extent of binding by the modified proteins was changed in the same degree towards all the nucleotides.

Figures 3 to 7. The binding of ATP by modified proteins. The reaction mixture contained about 20 mg. protein, 6–7 μ moles ATP, and acetate buffer, final $\mu = 0.1$, final volume 4 ml. (I), native proteins, (II), modified proteins

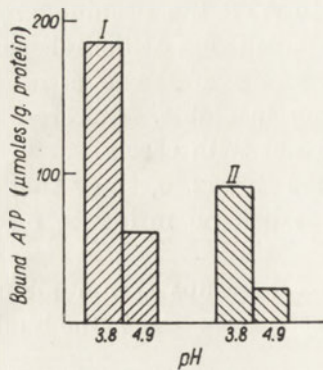


Fig. 3. Exper. No. 50 (I), native serum albumin (initial ratio ATP to protein: 237 μ moles per g.) (II), acetylated albumin (initial ratio ATP to protein: 215 μ moles per g.). Coagulation with 2 vol. of ethanol at 0°. (At pH 4.9, in the case of acetylated albumin, coagulation was made by heat, because there was no precipitation after addition of alcohol. At pH 5.8 acetylated albumin in these conditions could not be coagulated at all)

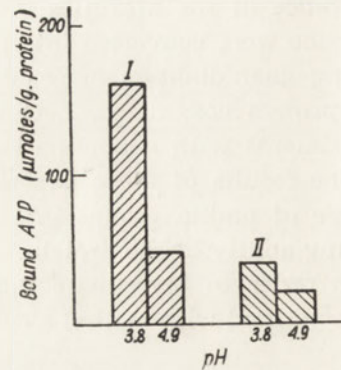


Fig. 4. Exper. No. 49. (I), native serum albumin (initial ratio ATP to protein: 283 μ moles per g.) (II), albumin after 2 hour treatment with HNO₂ (initial ratio ATP to protein: 292 μ moles per gram) Coagulation with 0.5 vol. of ethanol at 0°

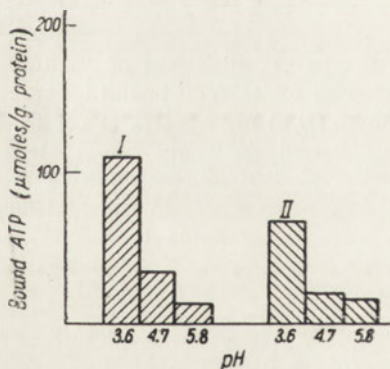


Fig. 5. Exper. No. 43. (I), native serum albumin (initial ratio ATP to protein: 185 μ moles per gram). (II), formaldehyde treated albumin (initial ratio ATP to protein: 160 μ moles per gram). Coagulation with 2 vol. of ethanol at 0°

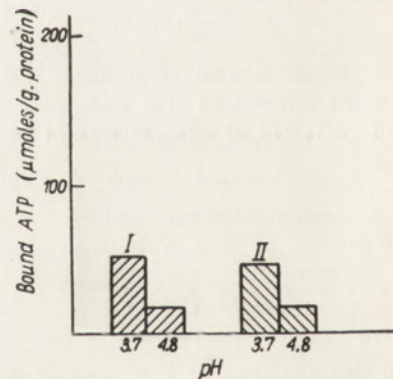


Fig. 6. Exper. No. 40. (I), native casein (initial ratio ATP to protein: 152 μ moles per gram). (II), guanidinated casein (initial ratio ATP to protein: 114 μ moles per gram). Coagulation at 0° without ethanol

To elucidate the influence of amino groups of adenine ring in the nucleotide molecule upon its affinity to proteins the binding of ATP and

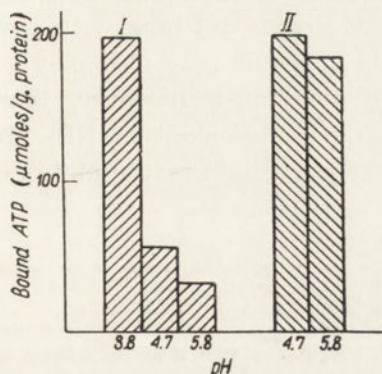


Fig. 7. Exper. No. 44. (I), native serum albumin (initial ratio ATP to protein: 305 μ moles per gram), (II), esterified albumin (initial ratio ATP to protein: 280 μ moles per gram). Coagulation with 2 vol. of ethanol at 0°. (At pH 3.6 there was no precipitation of esterified albumin either after alcohol adding, or by heating

ITP were compared. As can be seen in Table 2⁵ no difference was found between the binding properties of the investigated nucleotides.

DISCUSSION

As has been shown earlier [8, 9], ATP can be bound by proteins precipitated in various ways. The coagulation of proteins in the acidic medium occurs much easier in the presence of ATP. Thus, as has been shown in the present paper, at pH ranges below the isoelectric point, ATP in high concentration (above 350 μ moles per gram protein) causes a direct precipitation of serum albumin without an additional procedure.

The relationship between the free and the protein bound nucleotides, observed in the present investigation, is in accordance with the adsorption isotherm. This does not indicate, however, that the process of binding is one of adsorption, as similar relationship were obtained with the binding of nucleotides [10] and some other substances [5, 20] with proteins which were not coagulated and remained in the solution.

The results of the present experiments with removal or blocking of various functional groups in the protein molecule indicate that the cationic groups of the protein (chiefly the ϵ -amino group of lysine and the guanidyl group of arginine) are of fundamental importance in binding with ATP.

Similar changes in the ability of modified proteins to form complexes with dyes were observed by several authors [11, 19, 21, 33].

⁵ In these experiments an ATP preparation purified on Dowex 2 column and highly pure preparation of ITP (Nutritional Biochemicals Corporation) were used.

The results of the previous investigation [9] indicated that the phosphate groups in the nucleotide molecule are the chief sites of binding with proteins. Some observation, however [18, 22, 27], which show that small amounts of adenine and adenosine can bind with protein indicate that other sites in the nucleotide molecule may also play some role in the binding process. It can be mentioned, however, that as established in the present investigation, the replacement of NH_2 group by OH group in the purine ring has no effect on the binding ability.

Table 2

The binding of ATP and ITP by serum albumin

Exper. No. 57. The reaction mixture contained 11 mg. serum albumin, 2.42 μmoles nucleotide and acetate buffer (final $\mu = 0.1$). Final volume 2 ml. Coagulation with 1 vol. of ethanol at 0° . The quantity of the nucleotide was calculated from the spectrophotometric determination of purines (see text) and determination of ribose according to Mejbaum [23a]

Initial ratio of nucleotides to serum albumin (μmoles per g. protein)			Nucleotides found in the precipitate (μmoles per g. albumin)		
ATP	ITP	total	pH		
			3.6	4.7	5.8
220	—	220	156	59	13
—	220	220	158	58	13
110	110	220	161	57	15

A similar situation is observed in the case of nucleoproteins. Several authors [6, 7, 12, 31, 34, 35] give experimental evidence that a salt type bound, already postulated by Przyłęcki [26], between the negatively charged phosphate residues of the nucleic acid and the cationic groups of the proteins is of fundamental importance. On the other hand some authors [2, 4, 23] have shown that the purine and pyrimidine rings of the nucleic acids also take part in the formation of nucleoproteins.

One can suppose that a participation of adenine in the binding of ATP with proteins is not to be excluded. It seems, however, that the salt type linkages with heteropolar bonds between cationic protein side chains and anionic nucleotide residues are the most important.

I wish to thank Prof. W. Niemierko for advices and criticism in the course of this work and Mrs. A. Jurowska for technical assistance.

SUMMARY

The binding of ATP by native and modified proteins has been investigated. The maximum number of ATP molecules bound by one molecule of coagulated serum albumin at pH 3.6 and 4.7 was 35 and 13 respectively. The relationship between the free and the bound ATP resembles the adsorption isotherm.

The modified proteins show some differences in the binding capacities. Acetylated serum albumin binds only 25 - 30% ATP of the control. After deamination the binding ability is reduced to 50%. The blocking of guanidyl groups by formaldehyde diminishes the ATP binding up to 35 - 40%. Guanidination has no influence on the binding, whereas esterification increases it considerably. ITP is bound by serum albumin to the same extent as ATP.

It is suggested, that in the investigated complexes ATP is probably bound by their phosphate groups with cationic groups of proteins, mainly guanidyl and ϵ -amino groups.

REFERENCES

- [1] Beaven G. H., Holiday E. R., *Adv. Protein Chem.* **7**, 320, 1952.
- [2] Blouth E. R., Asadourian A., *Biochim. Biophys. Acta* **13**, 161, 1954.
- [3] Bock R. M., Ling Nan Sing, Morell S. A., Lipton S. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 253, 1956.
- [4] Brachet J. in *Progress in Biophysics* **3**, 195, 1953.
- [5] Bull H. B., *Ann. Rev. Biochem.* **21**, 189, 1952.
- [6] Chargaff E., Elson D., Shigenra H. T., *Nature* **178**, 682, 1956.
- [7] Davison P. F., Butler J. A. V., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 568, 1956.
- [8] Drabikowski W., *Acta Physiol. Polon.* **8**, 314, 1957.
- [9] Drabikowski W., *Acta Biol. Exper.* **18**, 223, 1958.
- [10] Drabikowski W., *Comm. of 4th Intern. Congr. of Biochemistry Vienna*, p. 25, 1959.
- [11] Ehrenpreis S., Maurer P. H., Sri Ram J., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 78, 1957.
- [12] Feughelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stockes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Barklay R. K., Hamilton L. D., *Nature* **175**, 834, 1955.
- [13] Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S., *J. Biol. Chem.* **161**, 259, 1945.
- [14] Fraenkel-Conrat H. in *Amino acids and proteins*, ed. D. H. Greenberg, p. 532, 1951, C. Thomas, Illinois.
- [15] Gornall A. G., Bardanill C. J., David M. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 751, 1949.
- [16] Kaplan N. O. in *Methods in Enzymology*, eds. S. P. Colowick & N. O. Kaplan **3**, 873, 1957.
- [17] Kleinzeller A., *Biochem. J.* **36**, 729, 1942.
- [18] Klotz I. M., Urquhart J. M., *J. Biol. Chem.* **173**, 21, 1948.
- [19] Klotz I. M., Urquhart J. M., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1597, 1949.

- [20] Klotz I. M., in *The Proteins*, eds. H. Neurath & K. Bailey, vol. 1A, p. 727, 1953. Acad. Press N. Y.
- [21] Klotz I. M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **14**, 97, 1950.
- [22] Leventhal D. E., *Thesis Univ. of Illinois*, Univ. Microf. Ann. Arbor. Mich., 1953.
- [23] Manoiłow S. E., Orłow B. A., Setkina O. N., *Biochimia* **13**, 336, 1948.
- [23a] Mejbaum W., *Z. physiol. Chemie* **258**, 117, 1939.
- [24] Olcott A. S., Fraenkel-Conrat H., *Chem. Rev.* **41**, 151, 1947.
- [25] Philpot J. L., Small P. A., *Biochem. J.* **32**, 542, 1938.
- [26] Przylęcki S. J., in *Die Methoden der Fermentforschung*, eds. E. Bamann & K. Myrbäck, vol. 1, p. 432, 1941. G. Thieme, Leipzig.
- [27] Przylęcki S. J., Grynberg M. Z., *Biochem. Z.* **251**, 248, 1932.
- [28] Putman F. W. in *The Proteins*, eds. H. Neurath & K. Bailey, vol. 1B, p. 893, 1953. Acad. Press., N. York.
- [29] Roche J., Mourgue M., Baret R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 85, 1954.
- [30] Schütte E., *Z. physiol. Chemie* **279**, 59, 1943.
- [31] Stern K. G., *Exp. Cell. Res. Suppl.* **2**, 1, 1952.
- [32] Szent-Györgyi A., *Chemistry of muscular concentration*. 1947. Acad. Press N. York.
- [33] Teresi J. D., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 3972, 1950.
- [34] Vendrely R., Vendrely C., *Nature* **172**, 30, 1953.
- [35] Znamienskaja M. P., Bielozierskij A. N., Gawriłowa L. D., *Biochimia* **22**, 765, 1957.

WIĄZANIE ATP PRZEZ BIAŁKA RODZIME I ZMODYFIKOWANE

Streszczenie

Maksymalna liczba cząsteczek ATP wiązanych przez cząsteczkę koagulowanego albuminu surowicy wynosi 35 przy pH 3,6 a 13 przy pH 4,7. Zależność między wolnym a związanym ATP przypomina izotermę adsorpcji.

Białka zmodyfikowane wykazują różnice w zdolności wiązania. Acetylowany albumin surowicy wiąże jedynie 25 - 30% ATP w porównaniu z rodzimym. W wyniku dezaminacji zdolność wiązania jest zredukowana do 50%. Blokowanie grup guanidylowych formaldehydem obniża wiązanie nukleotydów do 35 - 40%. Guanidynacja białek nie ma wpływu na wiązanie, podczas gdy estryfikowanie podwyższa je znacznie. ITP jest wiązane przez albumin surowicy w takim samym stopniu jak ATP.

Sugeruje się, że w badanych połączeniach ATP jest prawdopodobnie wiązane swoimi grupami fosforanowymi z zasadowymi grupami białek, głównie grupami guanidylowymi i ϵ -aminowymi.

Otrzymano 9.12.1959 r.

JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH, HALINA KOWALSKA i ALINA DOBRZAŃSKA

AMINOACYDURIA U NOWORODKÓW W PIERWSZYM TYGODNIU ŻYCIA

Zakład Chemii Fizjologicznej i Klinika Pediatryczna AM, Lublin

Kierownik Zakładu: prof. dr J. Opieńska-Blauth

Kierownik Kliniki: prof. dr W. Klepacki

Pierwszy tydzień w życiu dziecka stanowi jego wstępny okres rozwoju i adaptacji fizjologicznej do nowych warunków życia. Dla pierwszego tygodnia charakterystyczny jest znaczny wzrost diurezy i zapotrzebowania pokarmowego. Dlatego dane odnośnie azotu aminowego w moczu są dla tego okresu fizjologicznego szczególnie interesujące. Na podwyższony azot aminowy w moczu niemowląt w pierwszym roku życia wskazywali już Simon [17] w 1911 i Goebel [9] w 1923 r. Podobne badania w moczu noworodków i starszych niemowląt przeprowadzali Berger [1], Homolka [10], Huisman [11], Loeb [12], Stroeder [19] i inni [4].

Rozwój i postęp metod chromatograficznych umożliwił wykrywanie i oznaczanie poszczególnych aminokwasów w moczu i we krwi. Obecnie nie tylko azot aminowy i indeks aminowy, ale szczegółowo oznaczony skład aminokwasowy w moczu i we krwi służą za wskaźniki diagnostyczne dla wielu jednostek chorobowych. Obraz aminokwasowy moczu i surowicy u niemowląt w wieku od kilku godzin do 8 miesięcy podają Woolf i Normann [20].

Brak ujednostajnionej metody badań i sposobu interpretacji wyników stanowi poważną przeszkodę dla prawidłowej diagnostyki klinicznej [14]. Dlatego podejmując temat zbadania aminoacydurii u noworodków w pierwszym tygodniu życia uznaliśmy potrzebę przeprowadzenia niektórych badań kontrolnych specjalnie w celu wykazania wpływu metody badań na wyniki oznaczeń składu aminokwasowego w moczu.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Badano mocze dobowe 5 noworodków płci męskiej od 1—7 dnia życia, kilkunastu noworodków w dowolnych dniach pierwszego tygodnia życia, 5 noworodków przedwcześnie urodzonych, w kilku pierwszych tygodniach

Tablica 1

Częstość występowania aminokwasów w moczu noworodków w pierwszych 7 dniach życia

Chromatografowano podane w tablicy ilości moczu dobowego.
Przykładowo podano wyniki jednej z serii doświadczeń

Noworodek B

Częstość występowania aminokwasów w 7 dniach	Aminokwasy powtarzające się	Suma aminokwasów powtarzających się
Mocz nieodsolony, 25 μ l		
7-krotnie	Gly, Glu, Ala	3
6- „		nie wykazano
5- „	Asp, „B”	2
4- „		nie wykazano
3- „	Tau, Hypro, His, Cy ₂ S ₂	4
2- „	„Val”	1
1- „	Ser, GluNH ₂ , α -NH ₂ Butt, Pro	4
0- „	Thr, Lys, β -NH ₂ Ibutt, „Leu”, Tyr, AspNH ₂ , CH ₃ His, Cit, Arg	9
Mocz odsolony, 25 μ l		
7-krotnie	Gly, Glu, Ala, Tau	4
6- „		nie wykazano
5- „	His	1
4- „	GluNH ₂ , Thr, Lys, Hypro, Tyr, Cy ₂ S ₂ , „B”	7
3- „	Ser, Asp	2
2- „	α -NH ₂ Butt, Pro	2
1- „	„Val”, β -NH ₂ Ibutt, AspNH ₂ , Arg	4
0- „	„Leu”, CH ₃ His, Cit	3
Mocz odsolony 300 μ l		
7-krotnie	Gly, Glu, Ala, Tau, „Val”, Asp, „B”	7
6- „	Thr, Hypro, Tyr, His	4
5- „	GluNH ₂ , Pro, Cy ₂ S ₂	3
4- „	Ser, Lys	2
3- „	„Leu”	1
2- „	β -NH ₂ Ibutt, AspNH ₂ , Cit	3
1- „	α -NH ₂ Butt, Arg	2
0- „	CH ₃ His	1

życia, kilkumiesięcznych niemowląt oraz mocze dzieci starszych i dorosłych zdrowych. Mocze zbierano do próbek i zabezpieczano tymolem.

Badano również w kilku przypadkach skład aminokwasowy surowic noworodków z pierwszego tygodnia życia.

Azot całkowity oznaczano klasyczną metodą Kjeldahla, azot aminowy metodą Spiera i Pashera [18].

Tablica 2

Częstość występowania aminokwasów w moczu noworodków w pierwszym tygodniu życia

Mocz odsolony, do chromatografii użyto 1/5000 objętości dobowego moczu. Przykładowo podano dwa wyniki z serii doświadczeń

Noworodek D

Częstość występowania aminokwasów w 7 dniach	Aminokwasy powtarzające się	Suma aminokwasów powtarzających się
7-krotnie	Gly, Glu, Ala, Tau, Thr, Lys, Hypro, "B"	8
6- "	Ser, Tyr, Cy ₂ S ₂	3
5- "	"Val", β-NH ₂ Ibutt, Pro, His, Asp, Arg	6
4- "	GluNH ₂ , "Leu", His	3
3- "	AspNH ₂ , Cit	2
2- "	α-NH ₂ Butt	1
1- "		nie wykazano
0- "		nie wykazano

Noworodek E

7-krotnie	Gly, Glu, Ala, Tau, Lys, Hypro	6
6- "	Thr, Asp	2
5- "	Ser, Pro, His, "B"	4
4- "	GluNH ₂ , "Val", α-NH ₂ Butt, Cy ₂ S ₂	4
3- "	Tyr, Arg	2
2- "	β-NH ₂ Ibutt, "Leu"	2
1- "	CH ₃ His, AspNH ₂	2
0- "	Cit	1

Skład aminokwasowy moczu i odbiałzonej surowicy oznaczano dwukierunkową chromatografią bibułową w układach fenol-woda (7:3) i propanol-woda (7:3). Wywoływano zimnym testem ninhydrynowym (0,2% roztwór ninhydryny w acetonie) [15].

W celu przekonania się, w jakim stopniu przygotowanie moczu do chromatografii aminokwasów może mieć wpływ na ich wykrywanie, przeprowadziliśmy badania składu aminokwasowego w próbach tego samego odsolonego na kolumnie Dowex i nieodsolonego moczu, stosując różne objętości moczu. Badania nasze wykazały, że nie jest obojętne dla wyników, czy stosujemy mocz odsolony czy też nieodsolony, 25 czy 300 μl do analizy chromatograficznej. W moczu nieodsolonym (25 μl) u noworodków w okresie pierwszych siedmiu dni znajdujemy od 5 do 10 aminokwasów na chromatogramie dwukierunkowym, w moczu odsolonym (25 μl) od 6 do 17 aminokwasów, a w 300 μl moczu odsolonego od 11 do 19 aminokwasów.

Ponieważ diureza waha się u noworodków w szerokich granicach, od 40 ml w pierwszym dniu życia do 240 ml w siódmym dniu, dlatego sprawa nanoszenia na bibułę objętości moczu w zależności od diurezy nabiera w przypadku noworodków większego znaczenia. Porównując wyniki podane w tablicach 1 i 2, które stanowią przykłady jednej z kilku serii doświadczeń, wydaje się, że nanoszenie na bibułę objętości moczu w zależności od diurezy jest uzasadnione, ponieważ w moczach w ten sposób badanych (1/5000 objętości moczu dobowego naniesionego na bibułę) wahań w liczbie i jakości wykrywanych aminokwasów były stosunkowo nieznaczne. Opierając się na powyższych doświadczeniach, nanoszono na bibułę zawsze mocz odsolony w ilości 1/5000 objętości moczu dobowego.

Krew pobierano u noworodków w tych samych porach dnia. Po odbiałczeniu 5% kwasem trójchlorooctowym w stosunku 1 : 2, odsalano na kolumnie Dowex 50 i do chromatografii nanoszono 300 μ l surowicy w odniesieniu do objętości pierwotnej.

Skróty stosowane w tekście

Ala, Alanina; AspNH₂, Asparagina; Asp, Kwas asparaginowy; Arg, Arginina; α -NH₂Butt, Kwas α -aminomasłowy (identyfikacja niepewna); β -NH₂Ibutt, Kwas β -aminoizomasłowy; „B“, plama niezidentyfikowana (występuje w każdym moczu fizjologicznym zarówno u dorosłych, jak i dzieci; położenie na chromatogramie dwukierunkowym w układzie fenol-propanol między kwasem glutaminowym a asparaginowym; z ninhydryną zabarwienie żółte); Cy₂S₂, Cystyna; Cit, Cytrulina; Gly, Glicyna; Glu, Kwas glutaminowy; GluNH₂, Glutamina; His, Histydyna; CH₃His, Metylohistydyna; „Leu“, plama zespołowa obejmująca nierozdzielone: leucynę, izoleucynę i feniloalaninę; Lys, Lizyna; Pro, Prolina; Hy-pro, Hydroksypolina; Ser, Seryna; Tau, Tauryna; Thr, Treonina; Tyr, Tyrozyna; „Val“, plama zespołowa obejmująca nierozdzielone: walinę, metioninę i tryptofan.

WYNIKI I Dyskusja

U 10 noworodków w różnych dniach pierwszego tygodnia życia oznaczono w moczu dobowym azot całkowity i aminowy. Wyniki podano w tablicy 3 przeliczając dobowy azot na 1 kg wagi dziecka. Według naszych badań, azot aminowy w dobowym moczu noworodków w pierwszym tygodniu życia waha się w granicach 2 - 7 mg/kg/24 godz., a indeks aminowy (procent azotu NH₂ z N-całk.) w granicach 5 - 8. Simon [17] wykazał w swoich próbach u noworodków między 2 - 7 dniem życia stały wzrost frakcji aminokwasowej. Według Loeba i Englana [12] dobowe wydalanie azotu aminowego osiąga swoje maksimum, tj. 10 mg/kg/24 godz.

w ciągu drugiego miesiąca życia, a po ukończeniu drugiego roku życia spada do 2 - 4 mg/kg/24 godz. Jest to już wartość stała zarówno dla dzieci, jak i dorosłych. Berger [1] podaje dla noworodka w okresie pierwszego tygodnia przyrost azotu aminowego z 2,5 do 10 mg. Indeks aminowy wynosi w pierwszym tygodniu około 6, a później spada do 2 w ciągu 12 miesięcy. Childs [3] podaje dla azotu aminowego u niemowląt w wieku 1 do 3 miesięcy wartości od 0,82 - 14,6 mg/2kg/24 godz., a u starszych dzieci w wieku około 12 lat od 0,71 - 1,9 mg/kg/24 godz. Znalezione wartości podwyższonego indeksu aminowego (5 - 6) są na ogół zgodne z wynikami podawanymi przez innych autorów. Dane Dustin [7] odnoszą się do wcześniaków 25 i 38-dniowych. Azot aminowy w moczu noworodków w normalnym czasie urodzonych wynosił 2,9%, a dla moczu wcześniaków w tym samym wieku 4,3%.

Do naszych badań przystosowaliśmy metodę kompleksów miedziowych według Spiera i Pashera [18], która na podstawie wstępnych doświadczeń porównawczych wykazała wiele zalet w zestawieniu z innymi. Na korzyść tej właśnie metody przemawia to, że obejmuje ona i iminokwasy — prolinę i hydroksyprolinę, a ponadto kłopotliwe usuwanie amoniaku z moczu konieczne przy innych metodach jest tu zbędne. Dobra powtarzalność wyników, nieznaczny wpływ składników towarzyszących, jak amoniaku, mocznika i kwasu moczowego, oraz niewielki błąd świadczą na korzyść tej metody.

Tablica 3

Azot całkowity, aminowy i indeks aminowy w moczu noworodków w pierwszym tygodniu życia

Noworodki	A	B	C	D	E	F	G	K	L	M
Doba	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Waga dziecka (g)	3260	2940	3480	2600	2700	2800	3360	3300	3200	3700
Diureza (ml)	40	65	80	150	180	220	200	280	150	180
N-całkowity (mg/kg/24 godz.)	35,5	49,0	146,0	88,0	83,0	71,3	69,0	98,0	103,0	68,0
N _{NH₂} (mg/kg/24 godz.)	2,1	2,5	6,7	4,7	4,3	4,5	5,4	5,9	5,0	3,6
Indeks aminowy	5,9	5,1	4,5	5,3	5,2	6,3	7,8	6,2	5,0	5,3

Istotne znaczenie dla badań aminoacydurii mają oznaczenia jakościowego i ilościowego składu aminokwasów. Najczęściej używana jest analiza chromatograficzna na bibule, jednak jak wykazaliśmy, nie wszystkie metody są jednakowo czułe i wyniki mogą się zasadniczo różnić w zależności od użytej metody.

Tablica 4

Częstość występowania u noworodków aminokwasów nie występujących normalnie w moczu dorosłych i dzieci (aminokwasy „obce”)

Opracowano na podstawie 100 chromatogramów moczków noworodków i 100 osobników starszych

Aminokwas	Mocz noworodków (1-7 dni) częstość występowania (%)	Mocz normalny dorosłych i dzieci częstość występowania (%)
Hypro	90	0
Pro	80	0
Lys	80	20
„Val”	70	5
„Leu”	30	5
α -NH ₂ Butt	30	5
β -NH ₂ lbutt	30	10

Różne sposoby oceny wyników analizy chromatograficznej aminokwasów w moczu, stosowane przez poszczególnych autorów, są niewygodne do porównywania. Np. Loeb i Engelen [12] oraz Miquel [13] oceniają

Tablica 5

Intensywność zabarwienia plam aminokwasów testem ninhydrynowym

Opracowano na podstawie 100 chromatogramów moczków noworodków i 100 dorosłych

Aminokwas	Mocz noworodków	Mocz normalny dorosłych
Gly	++++	+++
Ala	++++	+++
Glu	++++	++
His	+++	++
Thr	+++	++
Lys	+++	+
Cy ₂ S ₂	+++	+
Hypro	+++	0
Pro	+++	0
AspNH ₂	++	++
GluNH ₂	++	++
Asp	++	+
Tyr	++	+

aminoacydurię według częstości występowania poszczególnych aminokwasów w badanych moczach. Szeregi aminokwasów ułożone według zmniejszającej się częstości występowania są różne dla dzieci poniżej i powyżej jednego roku życia. Dustin [7, 8] w ocenie aminoacyduriis oznacza zakresy procentowych zawartości aminokwasów.

Nasze wyniki zestawiliśmy według częstości występowania poszczególnych aminokwasów i według intensywności zabarwienia plam testem ninhydrynowym. Stwierdziliśmy, że w moczu noworodków występują zawsze lub często takie aminokwasy, które nie występują prawie nigdy w moczu fizjologicznym u dorosłych. Zjawisko to można by wyjaśnić pewną niewydolnością resorpcji nerek, właściwą dla pierwszego okresu rozwojowego. Wyniki podano w tablicy 4 i jak widać, w moczu noworodków występuje hydroksypolina i prolina, których nie wykrywa się nigdy w moczu fizjologicznym dorosłych. Na podstawie wielkości i intensywności plam wykazano wyższe zawartości większości aminokwasów w moczu noworodków aniżeli w moczu dorosłych. Zebranie tych ocen podano w tablicy 5.

W celu wykazania ewentualnych różnic w wydalaniu aminokwasów w moczu noworodków między 1 a 7 dniem życia, przygotowano zbiorczy obraz wydalania dla poszczególnych aminokwasów na podstawie



Rys. 1. Wydalanie aminokwasów w moczu 5 noworodków w okresie pierwszego tygodnia życia.

I — VII, dni tygodnia. (1) Gly, (2) Ser, (3) Glu, (4) GluNH₂, (5) Ala, (6) Thr, (7) Tau, (8) Lys, (9) „Val” (= Val + Meth + + Try), (10) α-NH₂Butt, (11) β-NH₂Ibutt, (12) „Leu” (= Leu + + Ileu + Phe), (13) Pro, (14) Hypro, (15) Tyr, (16) AspNH₂, (17) His, (18) CH₃His, (19) Cy₂S₂, (20) Asp, (21) „B”, (22) Arg, (23) Cit

chromatogramów z moczu 5 noworodków (Rys. 1). Częstość występowania poszczególnych aminokwasów stanowiła podstawę do tego zestawienia. Systematyczne badania przeprowadzone na 5 noworodkach (35 chromatogramów) wykazały, że najwięcej aminokwasów wykrywa się w pierwszym i siódmym dniu życia, a najmniej między trzecim a piątym dniem życia. Na wszystkich chromatogramach wykrywano, oprócz aminokwasów znajdujących się w moczach ludzi dorosłych, jak glicynę, kwas glutaminowy, alaninę, taurynę, kwas asparaginowy, plamę „B” — hydroksyprolinę; na większości chromatogramów — serynę, treoninę, cystynę, glutaminę, tyrozynę, histydynę, a z „obcych“, tzn. nie występują-

cych w moczu ludzi dorosłych i starszych dzieci — prolinę; mniej niż na połowie chromatogramów „walinę“, „leucynę“, kwas α -aminomasłowy, kwas β -aminoizomasłowy i metylohistydynę, a sporadycznie argininę i cytrulinę.

Tablica 6

Aminokwasy moczu niemowląt w różnych okresach życia

Przykład jednej z badanych serii. Chromatografowano 300 μ l z dobowego odsolonego moczu.
(+), wykryto aminokwas; (—), nie wykryto

Aminokwas	7 dni	30 dni	3 mies.	6 mies.	12 mies.
Gly	+	+	+	+	+
Ser	+	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+	+
GluNH ₂	+	+	+	+	+
Ala	+	+	+	+	+
Thr	+	+	—	—	+
Tau	+	+	+	+	+
Lys	+	—	+	+	+
„Val”	+	—	—	+	—
α -NH ₂ Butt	—	—	+	—	—
β -NH ₂ Ibutt	—	—	—	+	+
„Leu”	+	+	+	+	+
Pro	+	—	+	—	—
Hypro	+	+	+	—	—
Tyr	+	+	+	+	+
AspNH ₂	—	—	—	+	—
His	+	+	+	+	+
CH ₃ His	—	—	—	—	—
Cy ₂ S ₂	+	+	+	—	+
Asp	+	+	+	+	+
„B”	+	+	+	+	+
Arg	+	+	+	+	+
Cit	—	—	+	+	—

W celu zbadania, jak długo utrzymują się odchylenia w składzie aminokwasowym stwierdzone w moczu noworodków, przeprowadzono badania w kilku seriach na niemowlętach od 7-dniowych do 12-miesięcznych (Tabl. 6). Woolf i Normann [20] na bogatym materiale 283 prób moczu od 119 niemowląt wykazali obecność z aminokwasów „obcych“: prolinę, hydroksyprolinę, zwiększone ilości lizyny i tauryny, kwas β -aminoizomasłowy i etanolaminę. Nie wykrywali natomiast proliny i hydroksyproliny u noworodków w pięciu pierwszych dniach życia. W naszych badaniach stwierdzaliśmy te dwa aminokwasy prawie zawsze już od pierwszego dnia życia. Na uwagę zdaje się zasługiwać fakt nie pojawiania się hydroksyproliny i proliny w moczu starszych niemowląt.

Tablica 7

Częstość występowania aminokwasów w moczu dzieci przedwcześnie urodzonych, w pierwszych trzech tygodniach życia

Chromatografowano 1/5000 objętość dobowego, odsolonego moczu. Mocz badano 6 razy w ciągu 3 tygodni

Częstość występowania aminokwasów	Aminokwasy powtarzające się	Suma aminokwasów powtarzających się
6-krotnie	Gly, Ser, Glu, Glu NH ₂ , Ala, Thr, Tau, Lys, „Val”, Pro, Hypro	11
5- „	Tyr, His, Asp	3
4- „	β -NH ₂ Butt, Cy ₂ S ₂	2
3- „	AspNH ₂ , „B”	2
2- „	α -NH ₂ Butt	1
1- „	„Leu”	1
0- „	CH ₃ His, Arg, Cit	3

Badania przeprowadzone nad składem aminokwasowym w moczu niemowląt przedwcześnie urodzonych porównawczo z moczami niemowląt w tym samym wieku normalnie urodzonych wykazały występowanie niektórych aminokwasów „obcych“, jak hydroksyproliny, proliny, lizyny i „waliny“ aż w 100% przeprowadzonych badań (Tabl. 7). Przyjmując

Tablica 8

Częstość występowania aminokwasów w surowicy noworodków w pierwszym tygodniu życia

Chromatografowano 260 μ l surowicy po odsoleniu. Wyniki z kilkunastu oznaczeń

Częstość występowania aminokwasów w 7 dniach	Aminokwasy powtarzające się	Suma aminokwasów powtarzających się
4-krotnie	Cys, Pro, „Val”, Lys, Tau, Thr, Ala, GluNH ₂ , Glu, Ser, Gly	11
3- „	„Leu”, Tyr	2
1- „	α -NH ₂ Butt, Hypro	2
0- „	Cit, „B”, CH ₃ His, His, AspNH ₂	5

jako jeden ze wskaźników patologicznej aminoacydurii występowanie na chromatogramach plam aminokwasów „obcych“, wyniki naszych badań wskazują na wyższy stopień aminoacydurii u wcześniaków w porównaniu z dziećmi normalnie urodzonymi. Sèreni i wsp. [16] w zestawieniu swoich badań na moczach wcześniaków podkreślają również częste występowanie proliny, np. u 11 wcześniaków w 9 przypadkach wykryli prolinę, zaś u no-

T a b l i c a 9

Częstość występowania aminokwasów w moczu noworodków
w pierwszym tygodniu życia

Zestawienie opracowane na podstawie 100 chromatogramów

Aminokwasy	Występowanie	
	Częstość	%
Gly, Glu, Ala, Tau	zawsze	100
Hypro, Asp, „B”	prawie zawsze	90
Thr, Lys, Pro, Cy ₂ S ₂ , His	b. często	80
Tyr, GluNH ₂ , Ser, „Val”	często	70
β -NH ₂ Ibutt, Arg, α -NH ₂ Butt, AspNH ₂ , „Leu”	dość często	30-40
CH ₃ His, Cit	sporadycznie	10

worodków normalnie urodzonych znaleźli prolinę w 2 przypadkach na 7, a u dzieci i dorosłych w 1 przypadku na 9 badanych.

Ze zrozumiałych względów troski o noworodki, badania nad składem aminokwasowym surowic nie mogły być przeprowadzone tak systematycznie jak w moczach. Dlatego też zestawienie naszych badań w surowicach odnosi się do kilkunastu noworodków, którym pobierano krew raz tylko w okresie pierwszego tygodnia życia (Tabl. 8). Badania te na tak

T a b l i c a 10

Przybliżona ocena zawartości aminokwasów w moczu noworodków
w pierwszym tygodniu życia

Opracowano na podstawie 100 chromatogramów

Aminokwasy	Intensywność plam
Gly, Glu, Ala, Tau	++++
Thr, Lys, Pro, Cys, His, Hypro	+++
Tyr, GluNH ₂ , Ser, „Val”, „B”, AspNH ₂ , Asp	++
Arg, „Leu”, CH ₃ His, Cit, α -NH ₂ Butt, β -NH ₂ Ibutt	+

szczupłym materiale mają charakter orientacyjny. W porównaniu do równocześnie przebadanych surowic ludzi dorosłych i dzieci zdrowych, nie stwierdziliśmy wyraźnych odchyień w składzie aminokwasowym surowicy noworodków w pierwszym tygodniu życia.

Wyniki naszych badań zebrane w Tabl. 9, 10 i 11 zdają się potwierdzać poglądy Doolana i wsp. [6], Bickela [2] i innych, że aminoacyduria u noworodków jest spowodowana zmniejszoną resorpcją aminokwasów w kanalikach nerkowych. W szczególności wykrywanie w moczu noworodków

Tablica 11

Malejące szeregi częstości występowania aminokwasów w moczu dzieci

Autorzy	Kolejność częstości występowania																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Loeb i Engelen [12]	Dzieci poniżej roku																						
	Gly	Ala	GluNH ₂	Ser	Glu	Cy ₂ S ₂	Asp	Thr	„Val“	AspNH ₂	Pro	Hypro											
	Dzieci powyżej roku																						
	Gly	Ala	GluNH ₂	Ser	Cy ₂ S ₂	Glu	Asp	β-NH ₂ Ibutt	Lys	His	Thr												
Nasze wyniki	Noworodki w pierwszym tygodniu życia																						
	Gly	Ala	Glu	Tau	Hypro	Asp	„B“	Thr	Lys	Pro	Cy ₂ S ₂	His	Tyr	GluNH ₂	Ser	„Val“	„Leu“	AspNH ₂	α-NH ₂ Ibutt	β-NH ₂ Ibutt	Arg	Cit	CH ₃ His

aminokwasów „obcych“ pozostaje w zgodzie z klasyfikacją Doolana i wsp. [5], którzy podzielili aminokwasy moczu na podstawie stopnia resorpcji w nerce na 3 grupy:

I) Try, Phe, Meth, Pro, Hypro, Arg, Val, Ileu, Leu, Lys, o doskonałej resorpcji;

II) Tyr, Thr, His, GluNH₂, Cy₂S₂, Ser, o średniej resorpcji;

III) Gly, o najmniejszej resorpcji.

W naszych doświadczeniach wykrywaliśmy zawsze w moczu noworodków aminokwasy „obce“, prawie zawsze hydroksyprolinę, prolinę i lizynę, często walinę, rzadziej kwasy aminomasłowe (Tabl. 9). Interesujące spostrzeżenie dotyczy seryny, którą wykrywamy w moczu noworodków zaledwie w 70%, a w moczu dzieci i dorosłych występuje zawsze. W badaniach przeprowadzonych w moczu dzieci nefrotycznych wykazaliśmy również brak seryny na chromatogramach¹. Między pierwszym a siódmym dniem życia nie było wyraźnych różnic w składzie aminokwasowym moczu.

Podwyższone zawartości azotu aminowego potwierdzały przybliżoną ilościową ocenę z chromatogramów, na których plamy aminokwasów pospolitych, w szczególności glicyny, alaniny, kwasu glutaminowego były

¹ Badania aktualnie wykonywane.

znacznie intensywniejsze niż na chromatogramach z moczu ludzi dorosłych, zdrowych.

W Tablicy 11 zestawiono kolejność częstości występowania aminokwasów w moczu dzieci poniżej i powyżej roku życia podane przez Loeba i Engela [12] i wykazane przez nas u niemowląt. Wprawdzie trudno jest przeprowadzić dokładne porównanie tych wyników, ponieważ w naszych warunkach wykrywamy prawie dwa razy tyle aminokwasów co Loeb i Engel, i ponadto nasze zestawienie dotyczy noworodków, a Loeba starszych dzieci. Niemniej jednak podkreślić można pewne istotne różnice. Na 12 aminokwasów wykrywanych przez Loeba, seryna zajmuje 4 miejsce, a w naszym szeregu na 23 aminokwasy 15 miejsce, hydroksyprolina i prolina u Loeba zajmują 11 i 12 miejsce, a w naszym szeregu 5 i 10.

Wstępne doświadczenia metodyczne potwierdzają nasz pogląd, że analizę składu aminokwasowego techniką chromatografii bibułowej należy przeprowadzać tylko na moczu uprzednio odsolonym, naniesionym na bibułę w objętościach ściśle określonych, zależnych od diurezy. W szczególności ten ostatni warunek powinien być uwzględniony w badaniach aminoacydurii u noworodków, niemowląt i dzieci.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania nad składem aminokwasowym w moczu noworodków w pierwszym tygodniu życia, badano również mocz wcześniaków, niemowląt, dzieci starszych i dorosłych zdrowych. Skład aminokwasowy określano jakościowo dwukierunkową chromatografią bibułową, w układach propanol - woda i fenol - woda. Plamy wywoływano zimnym testem ninhydrynowym. Azot aminowy oznaczano metodą Spiera i Pashera.

W moczu noworodków wykrywa się obok aminokwasów występujących w moczu dorosłych, również i nie występujące normalnie w moczu starszych dzieci i dorosłych, jak hydroksyprolinę i prolinę, oraz aminokwasy występujące rzadko, jak kwasy aminomasłowe, walinę i leucynę.

U dzieci przedwcześnie urodzonych hyperaminoaciduria występuje w silniejszym stopniu, odnosi się to do wszystkich trzech rodzajów aminokwasów.

LITERATURA

- [1] Berger H., *Ann. Paed.* **186**, 338, 1956.
- [2] Bickel H., *Exp. Med. Surg.* **12**, 245, 1954.
- [3] Childs B., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **81**, 225, 1953.
- [4] Colloque sur les Acides Aminés, Journées Médicales Nestlé, *Exp. Med. Surg.* **12**, 1954.

- [5] Doolan P. D., Harper H. A., Hatchin M. E., Shreeve W. W., *J. Clin. Invest.* **34**, 247, 1955.
- [6] Doolan P. D., Harper H. A., Hatchin M. E., Alpen E. L., *J. Clin. Invest.* **35**, 888, 1956.
- [7] Dustin J. P., *Exp. Med. Surg.* **12**, 233, 1954.
- [8] Dustin J. P., Moore S., Bigwod E. J., *Metabolism* **4**, 75, 1955.
- [9] Goebel F., *Z. Kinderheilk.* **34**, 94, 1923.
- [10] Homolka J., *Chemicka Diagnostika w Detskym Veku*, Praha, 1956.
- [11] Huisman T. H. J., *Arch. Franc. Paed.* **14**, 166, 1957.
- [12] Loeb H., Engelen M., van Geffel R., *Acta Paed. Belg.* **10**, 4, 1956.
- [13] Miquel M. J., *Montpellier Med. L. II*, **4**, 343, 1957.
- [14] Opieńska-Blauth J., *Clin. Chim. Acta* **4**, 841, 1959.
- [15] Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Pietrusiewicz M., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 333, 1958.
- [16] Sereni F., Helen Mc. Namora M. A., Shibuya M., Kretchmer N., Barnett H. L., *Pediatrics*, **15**, 575, 1955.
- [17] Simon S., *Z. Kinderheilk.* **2**, 1, 1911.
- [18] Spier H. W., Pasher G., *Z. Physiol. Chem.* **296**, 147, 1954.
- [19] Stroeder J., Grauhofner H. M., Heim L., *Ann. Paed. Belg.*, **180**, 52, 1953.
- [20] Woolf L. I., Normann A. P., *J. Pediatrics*, **50**, 271, 1957.

AMINOACIDURIA IN NEWBORN DURING THE FIRST WEEK OF THEIR LIFE

Summary

Studies were carried out on amino acids occurring in the newborns' urine during the first week of their life, in the infants urine and in that of children and adult persons. Amino acids were identified on paper dimensional chromatography within the solvent systems: propanol - water and phenol - water. Spots were developed by means of the cold ninhydrine reaction. The amino nitrogen was estimated by the Spier's and Pasher's method.

In the newborn's urine besides amino acids usually found in children and adult persons, some others were detected such as hydroxyproline and proline, as well as rarely occurring aminobutyric acids, valine and leucine.

Hyperaminoaciduria was found in immature newborns, concerning all the amino acids.

Otrzymano 12.12.1959 r.

P. SZAFRAŃSKI, E. SUŁKOWSKI, T. GOŁASZEWSKI and J. HELLER

ISOLATION AND SOME CHARACTERISTICS OF THE CYTOPLASMIC NUCLEOPEPTIDES FROM GUINEA PIG LIVER

*Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
(Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw)*

The role of peptides as intermediates in protein biosynthesis was considered to be doubtful as yet. However, a series of communications was recently published reporting the isolation of some compounds of this kind from various biological materials and suggesting that they might participate in protein biosynthesis. Koningsberger *et al.* [7] have isolated nucleopeptides from baker's yeast, the peptide component being bound to the nucleotide one through the activated carboxyl group, which yielded hydroxamic acid on treatment with hydroxylamine. Harris and Davies [5] have obtained from the same material some similar compounds that contained the uridine-5-phosphate bound to a tetrapeptide composed of alanine and arginine. Nucleopeptides have been isolated from *Chlorella*, too [6]. They contained adenine, uracil and peptides consisting of several amino acids among which cystine prevailed. Brown [2] has obtained similar compounds from *Streptococcus faecalis*. The synthetic adenil-5-dipeptide has also been discussed [5], its properties having revealed to be very close to those of nucleopeptides isolated from biological material.

All these communications appear to give a preliminary picture of some studies on the matter only. Nevertheless the examples referred to above point to the large occurrence of these compounds in living organisms .

This paper is the extended study of our previous report [16] on isolation of the guinea pig liver cytoplasmic nucleopeptides and their characteristics. Some elucidation of the structure of these compounds as well as of their role in the cell may contribute considerably to a better comprehension of the mechanism of protein biosynthesis.

EXPERIMENTAL

THE PREPARATION OF CYTOPLASMIC MATERIAL AND ITS FRACTIONATION

Guinea pigs 6-8 months old were employed. The animals were starved for 24 hours, stunned and killed by decapitation, livers were removed as soon as possible, then washed with 0.25 M-sucrose solution and ground with a laboratory meat-mill. The 6 g. sample of the ground tissue was homogenized with an equal volume of 0.25 M-sucrose solution for 45 seconds in an ice-cooled homogenizer with a polyacrylic piston. Then more sucrose solution was added up to ten times original tissue weight and centrifuged at 10 000 *g* at 0°. The sediment was discarded

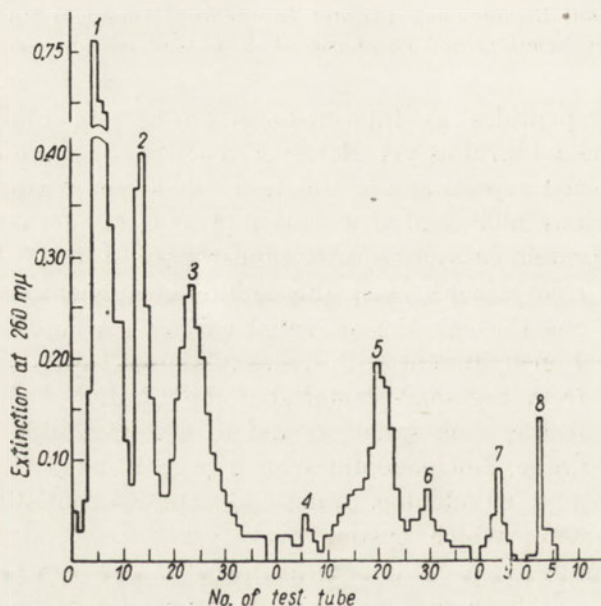


Fig. 1. Fractionation of the protein-free extract of guinea pig liver on TEAE column. Eluents used: fractions 1-3, 0.01 M-tris bufer, pH 7.4; fractions 4-6, 0.01 M-tris bufer containing increasing concentrations of sodium chloride; fraction 7, 1 M-sodium chloride solution in 0.01 M-tris bufer; fraction 8, 1 per cent sodium hydroxide, adjusted afterwards to pH 7.4 with hydrochloric acid. Time of filling each test tube 8-10 min. Volume 3.8 ml

and the supernatant saturated with solid ammonium sulphate, centrifuged in cold at 32 000 *g* and the precipitate discarded. The supernatant was added with cold ethanol up to its final concentration of 85% and allowed to stand for several hours at -20° in order to precipitate completely the

excess of ammonium sulphate. The protein-free solution was evaporated *in vacuo* at room temperature to remove ethanol, filtered through a glass filter (Schott G4) and the absorption of the filtrate was measured at 260 m μ . The sample corresponding to the absorption of 1.2 mg. of RNA was diluted with water up to 10 ml. and transferred to the triethylamine-ethylcellulose (TEAE) containing column, 1.5 cm. in diameter and 12 cm. long [12]. Fractionation was carried out using 0.01 M-tris buffer, pH 7.4, then by gradient elution with sodium chloride solution. The mixing chamber 0.5 liter in volume was used with 0.01 M-tris buffer, pH 7.4, while the container of 0.5 liter was employed for 0.5 M-solution of sodium chloride in tris buffer. Afterwards the column was eluted with 1 M-sodium chloride solution in 0.01 M-tris buffer and finally with 1% sodium hydroxide. The last eluate was adjusted to pH 7.4 with hydrochloric acid. The fractionation was followed in the so obtained solutions by measuring the extinction at 260 m μ . The results are presented in Fig. 1.

The elution of the column with 0.01 M-tris buffer, pH 7.4, yielded three fractions (1 to 3). Three fractions (4 to 6) were also obtained by gradient elution with sodium chloride. The elution with 1 M-sodium chloride as well as that with 1% sodium hydroxide gave in each case one fraction only (7 and 8 respectively).

CHARACTERISTICS OF THE FRACTIONS

Estimations of hydroxamic acids and of amino acids before and after hydrolysis

The fractions collected from the column were evaporated to dryness at room temperature *in vacuo* over calcium chloride, dissolved in 2 ml. of water, then 0.2 ml. samples were withdrawn from each fraction, an equal volume of 10 N-perchloric acid was added, and amino acids determined by ninhydrine method according to Troll and Cannan [20]. The other 0.2 ml. sample with equal amount of perchloric acid was hydrolysed for 1 hr. at 100° and ninhydrine reaction was then performed. The contents of the amino acids found in fractions before and after hydrolysis are given in Table 1. The amino acids contents were higher after hydrolysis than before it in all examined fractions. This content was in some fractions (the 4-th, e.g.) three times that found before hydrolysis, what was an evidence for the presence of peptides.

The addition of hydroxylamine and ferric chloride [7] gave positive hydroxamic reactions in all fractions thus indicating the presence of

Table 1

Amino acids before and after hydrolysis in the fractions collected from the TEAE

The sample corresponding to the absorption of 1.2 mg. of RNA was withdrawn for fractionation from the protein-free extract of the guinea pig liver. Experiments marked "a" and "b" represent two series of experiments performed on various guinea pigs. Details in the text

No. of fraction	Experiment	Amino acids before hydrolysis (μ moles)	Amino acids after hydrolysis (μ moles)	Amino acids liberated on hydrolysis (μ moles)
1	a	2.5	5.4	2.9
	b	5.1	6.3	1.2
2	a	1.0	1.8	0.8
	b	1.1	2.0	0.9
3	a	1.8	2.5	0.7
	b	1.48	2.6	1.12
4	a	4.0	13.7	9.7
	b	0.85	2.2	1.35
5	a	1.3	2.3	1.0
	b	1.25	2.2	0.95
6	a	10.0	18.1	8.1
	b	3.8	5.5	1.7
7	a	2.0	2.7	0.7
	b	5.0	7.8	2.8
8	a	5.2	7.1	1.9
	b	7.2	9.3	2.1

activated carboxyl groups belonging to peptides, probably. The amounts of hydroxamic acids could not be compared to the values found for amino acids since a considerable destruction of the amino acids occurred on hydrolysis under applied conditions, whereas the results yielded by the Troll and Cannan method before hydrolysis were somewhat too high (material heated up to 100° in 80% phenol underwent partial hydrolysis). Thus the difference stated between the contents of amino acids before and after hydrolysis under such a condition appeared to be lower than it really was, therefore it did not correspond to the values found for hydroxamic acids.

Nucleic bases and ribose

The fractions obtained from the TEAE column were also examined for the presence of purine and pyrimidine bases as well as of ribose. To identify purine and pyrimidine bases fractions collected from the column were evaporated to dryness on water bath, the residue dissolved in 0.5 ml. of 11 N-perchloric acid and hydrolysed for 1 hour at 100° . The acid was then neutralised with concentrated solution of potassium

hydroxide, cooled and potassium perchlorate removed by centrifugation. The solutions were concentrated by evaporation and subjected to chromatography in the two following systems of solvents: hydrochloric acid - isopropanol - water [21] and formic acid - butanol-water [9]. Spots corresponding to adenine, guanine, cytosine and uracil were found in all fractions, and what was rather unexpected, spots corresponding to thymine were detected.

The presence of ribose was verified in each fraction. Since the Mejsbaum reaction in the column eluates gave some atypical greenish-yellow colour, chromatography was applied. For this purpose fractions were evaporated to dryness and extracted with 10 ml. of acetone containing 5 drops to 1 N-HCl. Acetone being evaporated, the residue was redissolved in 1 ml. of water and treated with bromine for 3 minutes at 105° [10]. After the elimination of bromine the solution was added with 5 ml. of 0.5 N-H₂SO₄ and heated under reflux condenser for 2 hours.

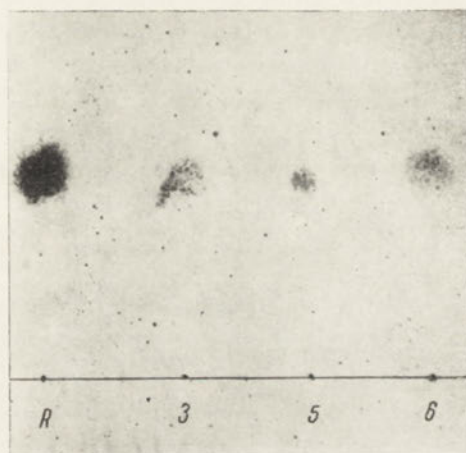


Fig. 2. The ribose chromatogram. *R* — ribose standard, 3, 5 and 6 — fractions collected from the column. Solvents used: butanol- acetic acid - water (4 : 1 : 5). Chromatogram developed with ammoniacal solution of silver nitrate

Sulphuric acid was removed as its barium salt, the liquid concentrated by evaporation and ribose detected chromatographically in all fractions. Fig. 2 represents the picture of the ribose standard chromatogram as well as those of fractions 3, 5 and 6.

The detection of activated peptides, purine and pyrimidine bases and ribose in the protein-free material points to the presence of nucleopeptides. It may be assumed that peptides in these compounds are bound to nucleotide part by means of their carboxyl groups.

Chromatography of hydroxamic acids and of amino acids. Dialysis of nucleopeptides

In order to give some more detailed characteristics of the activated peptides, they were converted into hydroxamic acids and chromatographed [7]. Each fraction collected from the column was evaporated at room temperature, *in vacuo* over calcium chloride, the residue extracted with acidified acetone and the latter removed thereafter together with the remaining hydrochloric acid. The residue was then treated with 1 ml. of 1 N salt-free hydroxylamine and evaporated *in vacuo*, over sulphuric acid to remove the excess of hydroxylamine. The residue was dissolved in some few drops of water and subjected to chromatography. Chromatograms were developed with acidified ferric chloride. The presence of 6 to 8 pink-brown spots were stated in all fractions. The colour became more intense within the time. The spots were excised and eluted with 0.1 N-HCl. The acid was evaporated, and ferrum removed as hydroxide, then the eluate was hydrolysed in 6 N-HCl for 16 hrs. at 105°. Hydrochloric acid was eliminated and chromatography of amino acids was performed, butanol-acetic acid-water (4 : 1 : 5) being used as solvents [11]. In all the fractions more than ten spots of amino acids were found after spraying with ninhydrine. These spots corresponded to cystine, ornithine, aspartic acid, glycine and/or serine, alanine and/or threonine, or glutamic acid, proline, tyrosine, methionine and/or valine, or tryptophan, and phenylalanine and/or leucine.

Since such a large number of various amino acids as well as of purine and pyrimidine bases was found, the question arose whether the examined nucleopeptides were dialysable or not. To clear up this question each fraction collected from the column was subjected to dialysis overnight against water at 2°.

Absorption at 260 m μ was measured both in the solution surrounding the dialysis bags and in those inside the bags. The contents of amino acids were estimated too, before and after hydrolysis in both liquids. The values found in the all fractions were similar for the two corresponding solutions indicating thus that nucleopeptides were readily dialysable.

Paper electrophoresis and characteristics of electrophoretic fractions

Paper electrophoresis was performed to give more characteristics of the studied compounds. In our previous experiments [16] fractions were evaporated to dryness *in vacuo*, dissolved in a little of water and transferred on paper. Yet, such fractions were contaminated with tris buffer and sodium chloride. To avoid these contaminations the procedure

was somewhat modified. Fractions were evaporated to dryness, extracted with 10 ml. of acetone acidified with hydrochloric acid (5 drops of 1 N-HCl), and sediment removed by centrifugation. The supernatant was evaporated to a small volume and transferred to the Whatman No. 1 paper strips. The strips were 5 cm. wide and 40 cm. long and the examined solution was placed at 12 cm. from cathode. Electrophoresis was carried out for 15 hours at 0°, in 0.1 M-ammonium acetate buffer, pH 5.9, the applied potential gradients was 10 v/cm. Each fraction was subdivided on electrophoresis into several spots showing a violet fluorescence in ultraviolet light. All the spots moved towards anode under these conditions. Fig. 3 shows picture (A) of electrophorograms of the individual fractions taken in ultraviolet light.

The pictures in ultraviolet being taken, electrophorograms were sprayed with 1 N-hydroxylamine, allowed to hang for two days in air and developed with ferric chloride. The pink-brown spots appeared on the strips indicating thus the presence of hydroxamic acids. The pictures of these strips taken in day light are shown in Fig. 3 (B). The comparison of the ultraviolet picture showing the localization of the nucleic bases with those on which the activated peptides are visible reveals that the spots are placed identically on the two corresponding pictures. This is true for all the examined fractions. Thus, electrophoresis provides one evidence more that peptides represented here by hydroxamic acids (pictures B) are bound to the nucleotide part through their carboxyl groups by means of anhydride linkages. The intensity of the hydroxamic spots does not correspond, however, to that of the nucleotide ones. A very distinct nucleotide spot is visible in fraction 2, for instance, which does not find its quantitative equivalent in the hydroxamic acid spot. In fraction 3, on the other hand, the rather low amounts of nucleotides correspond to considerable amounts of hydroxamic acids. Fraction 5 contains three intense nucleotide spots while only one hydroxamic spot is equal to them in its intensity. There is a series of very intense nucleotide spots in fraction 6, but none of the hydroxamic spots is of such intensity.

Thus it can be seen, that either the electrophoretic fractions are not homogenous and they contain some nucleotide compounds not bound to peptides, or there are some oligonucleotides bound to one or more activated peptides. Our preliminary experiments plead for the latter possibility. The electrophoretically separated fractions were excised, eluted with water, treated with 0.5 ml. of 1 N-hydroxylamine, its excess removed by evaporation, the residue dissolved in some few drops of water and chromatography of hydroxamic acids was performed. After

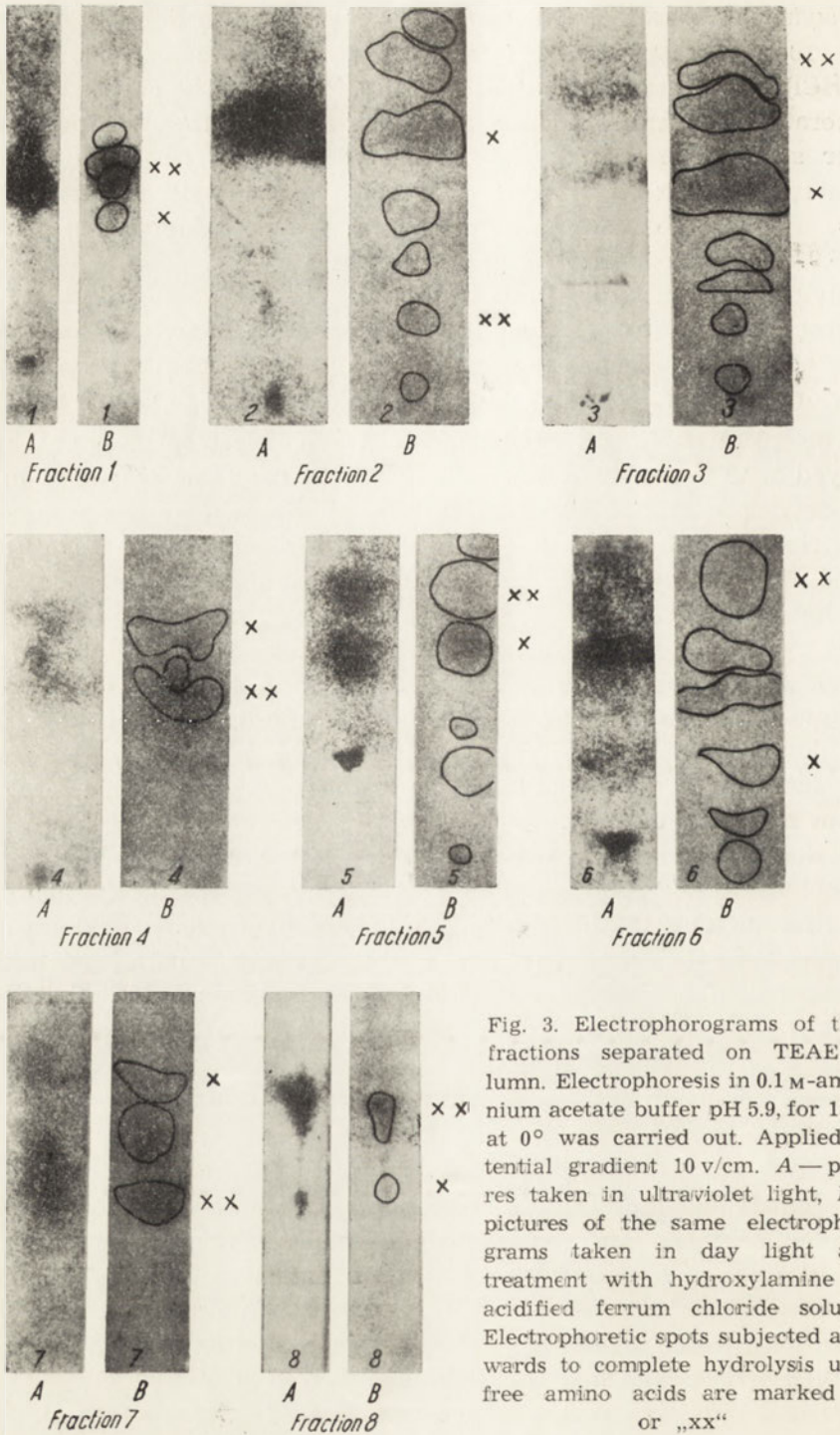


Fig. 3. Electrophoretograms of the 8 fractions separated on TEAE column. Electrophoresis in 0.1 M-ammonium acetate buffer pH 5.9, for 15 hrs at 0° was carried out. Applied potential gradient 10 v/cm. A — pictures taken in ultraviolet light, B — pictures of the same electrophoretograms taken in day light after treatment with hydroxylamine and acidified ferrum chloride solution. Electrophoretic spots subjected afterwards to complete hydrolysis up to free amino acids are marked „x“ or „xx“

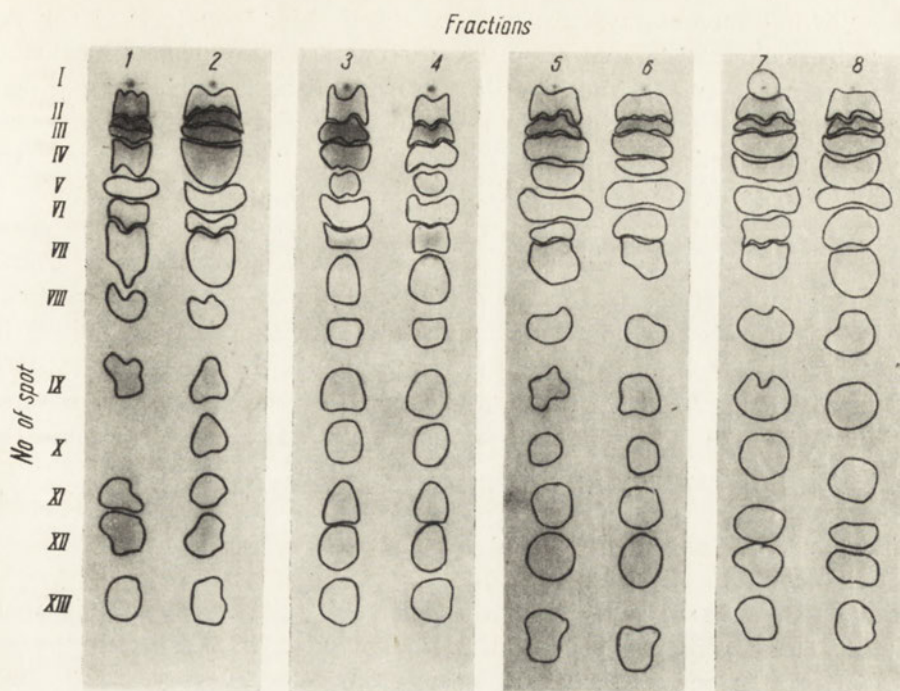


Fig. 4. Chromatograms of amino acids obtained on hydrolysis of nucleopeptides deriving from various electrophoretic fractions, marked "xx" on Fig. 3. Numbers 1 to 8 signify fractions collected from the column, subjected to electrophoresis. Butanol-acetic acid-water (4:1:5), were used as solvents. Spots were developed with ninhydrine

treatment with ferric chloride 2 or 3 spots were revealed which indicated the presence of hydroxamic acids. Provided that the electrophoretic fractions were homogenous, these experiments might indicate that the studied compounds were composed of some nucleotides bound to 2 or 3 activated peptides.

Our further experiments aimed to give some more detailed characteristics of the peptide part of the nucleopeptides. For this purpose 2 spots marked with "x" or "xx" were excised from each of the eight electrophorograms (8 fractions collected from the column) developed with ferrum chloride, shown in Fig. 3. Each spot was eluted with 2 ml. of water, ferrum was eliminated with ammonium hydroxide, the eluate evaporated to dryness on water bath, redissolved in 0.5 ml. of 6 N-HCl and hydrolysed in sealed tubes for 16 hrs at 105°. The tubes being opened, hydrochloric acid was eliminated, the residue dissolved in some few drops of water and subjected to the descending chromatography with

the following solvents system: butanol - acetic acid - water (4 : 1 : 5). All the sixteen chromatograms after treatment with ninhydrine revealed to be very similar one to another. Besides several amino acids, a red spot was present on all the chromatograms, it showed a slight mobility and suggested the amine nature of the substance. Some pictures of the chromatograms are presented in Fig. 4. These are the chromatograms of the spots marked with "xx" in Fig. 3. It can be seen from these chromatograms that all the examined peptides are composed of nearly the same amino acids. The I spot corresponds to cystine, the II is a red one but it may also contain ornithine, the III corresponds to histidine, the IV to lysine, the V to arginine, the VI to citrulline, the VII to aspartic acid, the VIII may contain serine and glycine or one of these two amino acids, the IX alanine, threonine and glutamic acid or one of them, the X corresponds to proline, the XI to tyrosine, the XII may be the mixture of methionine, valine and tryptophan, the XIII — that of phenylalanine and leucine. The chromatogram of the first fraction is the unique which does not contain proline, an amino acid present on seven others. To summarise, it can be stated that the electrophoretic nucleopeptide spots yielded after hydrolysis the identical amino acids to those found when the hydroxamic and amino acids were chromatographed (p. 156). This result proves once more that the peptide part of the isolated nucleopeptides consists always of the same amino acids and the various electrophoretic mobility of the nucleopeptides may be due probably to various stages of their polymerization.

DISCUSSION

The early studies on protein biosynthesis brought an ample evidence for the possibility that peptide fragments might polymerise to greater molecules and proved that proteolytic enzymes were able to catalyse the exchange of amino acids inside the peptide chain [3]. Many facts, however, were not consistent with the transpeptidation theory; therefore its adherents renounced it gradually. One of the most grave objection was that there was no possibility of controlling the specificity of the protein molecule synthesis. The rather low specificity of proteolytic enzymes might result in the synthesis of a random protein. There were also some essential objections from the thermodynamic point of view, since the free energy of the peptide linkage hydrolysis was of negative value and thus the reaction equilibrium was shifted towards hydrolysis rather than to synthesis under normal conditions. Some attempts to introduce labelled peptides into the protein molecule by administering such peptides to

animals were always unsuccessful. At last no significant amounts of any peptide were found in tissue extracts besides of glutathion.

For all these reasons the transpeptidation theory gave gradually way for the last ten years to the matrix theory, which assumed the protein biosynthesis to be a one-step reaction between individual amino acids arranged on a macromolecular nucleic acid.

Recently communications have been published on isolation of nucleopeptides from various microorganisms [2, 6] as well as on the presence of peptides bound to carbohydrates, lipides and maybe nucleotides in the silkworm haemolymph [14]. The just mentioned communications and the results of investigations here presented as well as the isolation of activated peptides from the *Bombyx mori* silk glands (in preparation) have directed our attention to the peptide theory again. The problem is of great interest since we have stated the formation of the activated peptides during the protein biosynthesis *in vitro* (in preparation). The peptide theory cannot be maintained, however, in its old original form. The peptides isolated in our laboratory from guinea pig liver as well as those found by other authors in microorganisms are bound to nucleotide part through the activated carboxyl groups. Thus it becomes apparent that the administration of partially hydrolysed protein which contains unspecific and non-activated peptides has resulted in the excretion of these peptides by experimental animals. The amounts of nucleopeptides that we have isolated are by no means negligible since the protein-free extract obtained from 6 g. of liver tissue has yielded enough material for 4 fractionations on column, electrophoresis and the subsequent investigations.

The liver nucleopeptides are composed of several various amino acids found in all isolated nucleopeptides. It seems to be probable that the peptide parts of these compounds differ one from another in the length of the peptide chain and, perhaps, in the sequence of amino acids, too. The nucleotide parts are not so far studied, as yet, since at this stage of investigations we were interested in getting some general idea only. Although several purine and pyrimidine bases have been found in the fractions collected from the column, yet it is still not known what are the bases bound to peptide parts after electrophoretic separation. In spite of the rather large molecule of the studied compounds they are readily dialysable through the wall of the dialysis bag and it is interesting whether they can also pass through a cell membrane.

The main problem remains, however, still to be solved: where and how is the peptide linkage formed. Although there are no sufficient data, as

yet, to give an adequate answer to this question, the up to day information allow, however, to sketch some general picture of the process.

The results here reported as well as the recent communications of other authors plead for the assumption that the peptide synthesis does occur in the soluble cytoplasmic fraction. Our previous investigations on the synthesis of soluble nucleoproteins [15] also support this suggestion. But it is not possible to answer the question how is the peptide linkage formed, whether the whole peptides may undergo activation or individual amino acids are the only compounds liable to this process. There exist some data allow to suppose that many amino acid molecules are transferred at once on the soluble ribonucleic acid (s-RNA) [8]. The presence of peptide fragments bound to s-RNA has been also stated [4] and it is likely that these compounds might play the role of the amino acids arranging factor.

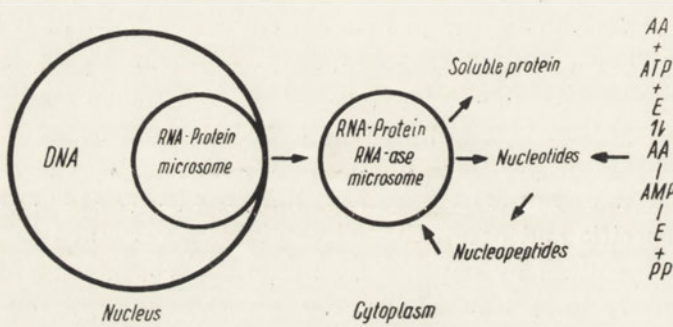


Fig 5. Scheme illustrating the relationships between some process of the protein biosynthesis in the cell. AA — amino acids, E — amino acid activating enzymes

It may also be suggested that the binding of the nucleotide fragment to the peptide renders the latter resistant to the action of proteolytic enzymes.

If nucleotide fragments are assumed to be responsible for the amino acid sequence, their specificity in the transmission of the information must be absolute. Therefore the question arises what is the genetic relationship between these nucleotide compounds and the nucleus, the essential role of which in transmitting the genetic features of the cell is indisputable. Bonner in his theory [1] presents an attempt to explain this transfer on the genetic information. He assumes that microsomes are produced *de novo* in nucleus and then delivered into the surrounding cytoplasm. If it is so indeed, the genetic relationship between the deoxyribonucleic acid present in nucleus and the microsomal nucleoproteins, giving rise to the typical nucleopeptide fragments in cytoplasm, should be much easier to comprehend.

We have demonstrated in our previous report [17] the resemblance existing between the protein components of microsomal nucleoproteins and those found in the supernatant obtained after the elimination of microsomes. Simkin [13] has stated the shift of the radioactive protein from microsomes to the supernatant, indicating thus the direction of the process. All these findings suggest that the nucleoproteins degradation does occur in microsomes and that the nucleic component of the so changed nucleoproteins should be a source of the nucleotides in the soluble cytoplasm. The above considerations allow to draw up, in a very general way only, the scheme of some processes related to the protein biosynthesis. The scheme given in Fig. 5 is based upon the assumption that microsomes formed in nucleus should receive and transmit information on protein synthesis to the soluble cytoplasm. The protein synthesis itself should run, however, in the opposite direction, i.e., should be initiated in the soluble cytoplasm by the amino acid activation passing through the stage of nucleopeptides and ended in microsomes. Thus microsomal nucleoproteins should deliver into cytoplasm, protein and the typical nucleotide fragments responsible for the sequence of amino acids. These fragments might be the acceptors of amino acids to give nucleopeptides, then transferred to microsomes. These nucleopeptides should undergo polymerisation become partially digested by RNA-ase [18, 19] in some specific way, then deliver protein into cytoplasm and give again the characteristic nucleotide fragments necessary for the specific protein biosynthesis. The process of the transition of the synthesized protein from microsomes into cytoplasm may be ATP dependent [13].

Thus some cyclic process should be running between microsomes and the soluble cytoplasm supplied with new microsomes produced in nucleus.

We wish to thank Miss K. Derkus for valuable assistance in these studies.

SUMMARY

Dialysable nucleopeptides were isolated from the guinea pig liver cytoplasm.

The protein-free liver extract was fractionated on the TEAE filled column. The elution was performed with 0.01 M-tris buffer, pH 7.4, then with the increasing concentrations of sodium chloride and finally with the 1 per cent solution of sodium hydroxide. Eight fractions were obtained in which the presence of activated peptides, purine and pyrimidine bases as well as that of ribose was detected. Each fraction was treated

with hydroxylamine, and chromatography of the peptide hydroxamates was performed as well as that of amino acids present in these peptides when hydrolysed.

Further separation of the fractions collected from the column was achieved by means of paper electrophoresis in 0.1 M-ammonium acetate buffer, pH 5.9. The nucleotide spots visible on electrophorograms in ultraviolet light corresponded to the spots arising in hydroxamic reaction on these electrophorograms. The spots were eluted from the electrophorograms and amino acids chromatographed after hydrolysis. In all the cases the presence of more than ten amino acids was stated indicating thus the rather complex nature of the isolated nucleopeptides.

The possible role of nucleopeptides in the protein biosynthesis is discussed and the scheme of some processes related to this synthesis is presented.

REFERENCES

- [1] Bonner J., *Engineering and Science Monthly*, October, 1958.
- [2] Brown A. D., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 447, 1958.
- [3] Fruton J. S., Johnston R. B., Fried M., *J. Biol. Chem.* **190**, 39, 1951.
- [4] Habermann V., *Biochim. Biophys. Acta*, **32**, 297, 1959.
- [5] Harris G., Davies J. W., *Nature* **184**, 788, 1959.
- [6] Hase E., Mihara S., Otsuka H., Tamiya H., *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 170, 1959.
- [7] Koningsberger V. V., Van Der Grinten Chr. O., Overbeek J. Th. G., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 483, 1957.
- [8] Lederberg J., *Angew. Chemie* **71**, 473, 1959.
- [9] Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.* **45**, 294, 1949.
- [10] Massart L., Hoste J., *Biochim. Biophys. Acta* **1**, 83, 1947.
- [11] Partridge S. M., *Biochem. J.* **42**, 238, 1948.
- [12] Porath J., *Arch. Kemi*, **11**, 99, 1957.
- [13] Simkin J. L., *Biochem. J.* **70**, 305, 1958.
- [14] Sissakian N. M., in *Biochemistry of Insects* (ed. L. Levenbook) *Proceeding of the 4th Inter. Cong. Biochem.*, Vienna 1958, vol. 12, p. 73, Pergamon Press, London, 1959.
- [15] Szafranski P., Sulkowski E., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 185, 1959.
- [16] Szafranski P., Sulkowski E., Gołaszewski T., *Nature* **184**, 1940, 1959.
- [17] Szafranski P., Wehr H., Sulkowski E., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 11, 1960.
- [18] Tashiro Y., *J. Biochem.* **45**, 937, 1958.
- [19] Tashiro Y., Inouye A., *J. Biochem.* **46**, 1243, 1959.
- [20] Troll W., Cannan K., *J. Biol. Chem.* **200**, 803, 1953.
- [21] Wyatt G. R., *Biochem. J.* **48**, 584, 1951.

IZOLOWANIE I CHARAKTERYSTYKA CYTOPLAZMATYCZNYCH
NUKLEOPEPTYDÓW Z WĄTROBY ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

Z cytoplazmy wątroby świnki morskiej wyizolowano dializujące nukleopeptydy.

Fracjonowanie odbiałzonego wyciągu z wątroby prowadzono na kolumnie z TEAE stosując 0,01 M-bufor tris pH 7,4, wzrastające stężenie chlorku sodowego i 1% wodorotlenek sodu. Uzyskano osiem frakcji, w których stwierdzono obecność zaktywowanych peptydów, zasad purynowych i pirymidynowych oraz rybozy. Po dodaniu do poszczególnych frakcji hydroksylaminy przeprowadzono chromatografię kwasów hydroksamowych peptydów, a następnie aminokwasów zawartych w tych peptydach po ich uprzedniej hydrolizie.

Fracje z kolumny rozdzielono dalej za pomocą elektroforezy bibułowej w 0,1 M-buforze amonowoocowym pH 5,9. Plamy nukleotydowe widoczne na elektroforogramach w świetle nadfioletowym pokrywały się z plamami powstającymi na tych samych elektroforogramach po przeprowadzeniu reakcji hydroksamowej. Plamy eluowano z elektroforogramów i po hydrolizie przeprowadzono chromatografię aminokwasów. We wszystkich przypadkach stwierdzono obecność kilkunastu aminokwasów wskazujących na złożony charakter wyizolowanych nukleopeptydów.

Dyskutowany jest udział nukleopeptydów w biosyntezie białka, oraz przedstawiony schemat niektórych procesów tej syntezy w komórce.

Otrzymano 24.12.1959 r.

KATHLEEN M. HENRY, S. K. KON, PAMELA E. E. TODD, JOYCE TOOTHILL
and D. H. TOMLIN

CALCIUM AND PHOSPHORUS METABOLISM IN THE RAT: EFFECT OF AGE ON RATE OF ADAPTATION TO A LOW CALCIUM INTAKE *

*National Institute for Research in Dairying, Shinfield, Reading,
and Department of Physics, University of Reading*

There is ample evidence (cf. Irving, 1957; Malm, 1958) that populations, or individuals, can maintain health on diets supplying much smaller quantities of calcium than those normally believed necessary. The view is, therefore, that the human body can adapt itself to low intakes of dietary Ca. Experimental evidence of such adaptation has recently been obtained. Malm (1958), in extensive long-term balance studies with men, found that all but three of his twenty-five subjects were at first in negative balance when the daily Ca intake was reduced from about 940 to 450 mg, but that nineteen of them regained Ca equilibrium after 28 - 252 days. In a less extensive study, Thorangkul, Johnston, Kime & Clark (1959) also observed signs of adaptation by young men to a markedly reduced Ca intake. Henry & Kon (1953) observed normal calcification in the growing rat on a diet low in Ca (0.13%) although the process was somewhat slower than on a diet high in Ca (0.8%).

Moreover, rats accustomed to a high Ca intake from weaning to 21 months partly adapted their metabolism to a low intake in the course of 3 months; these experiments could not be continued because of increasing mortality in such old rats. The experiments now reported were planned to give more conclusive evidence on this question of adaptation to low Ca intakes. We have found in earlier experiments (Henry & Kon, 1953) that the body losses of Ca that occur, as shown by balance tests when old rats are changed from a high intake of Ca to a low one, are not reflected in the mineral composition of the long bones as shown by analysis. The losses were undoubtedly too small to come to light and it

* Read in part at the 4th International Congress of Biochemistry (Henry, Kon, Todd & Toothill, 1958).

was thought that the technique of bone autoradiography developed in this laboratory (Tomlin, Henry & Kon, 1953a; 1955) might prove more sensitive than analytical procedures. Experiments were done therefore to test this supposition.

In the newly weaned rat, when the supply of dietary phosphorus is suboptimal, the P is preferentially used for the formation of soft tissues with the result that there is not enough of it to allow maximum Ca retention for bone formation (McCann & Barnett, 1922; Henry & Kon, 1937, 1939, 1947). As the animal matures it might be expected that the tissue demands for P would decrease leaving more of it available to bind Ca in the bones. Experiments on this point are now reported.

EXPERIMENTAL

DIETS AND GENERAL TECHNIQUE

The composition and analysis of the diets used in the various experiments are shown in Table 1. Cod-liver oil was given separately to supply each rat with about 0.5 i.u. vitamin D₃ daily.

Table 1
Percentage composition of diets and their content of Ca, P and moisture

Component	Diet				
	Very low-Ca	Low-Ca	High-Ca	Low-P	Adequate-P
Egg albumin	13.5	—	—	13.5	13.5
Wheat, whole ground	—	86.0	83.9	—	—
Milk: dried whole*	—	10.0	9.7	—	—
dried skim*	—	—	—	6.5	6.5
Sugar	9.0	—	—	8.0	8.0
Margarine fat	10.0	—	—	10.0	10.0
Maize starch	63.7	—	—	59.4	58.0
Ca- and P-free salts [†]	2.7	4.0	3.9	2.5	2.5
CaCO ₃	—	—	—	0.1	0.1
CaHPO ₄ .2H ₂ O	—	—	2.5	—	—
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1.1	—	—	—	1.4
Vitamin mixture [‡]	0.05	—	—	0.05	0.05
Ca	0.0431	0.1270	0.7594	0.1504	0.1510
P	0.174	0.380	0.848	0.050	0.239
Moisture	10.55	12.86	12.54	9.60	10.10

* Different batches were used and in consequence the Ca and P content of different batches of diet varied to some extent. Mean values for all batches are quoted here but appropriate values were used for calculations in different experiments.

† Salt mixture of de Loureiro (1931) with calcium phosphate omitted.

‡ Inositol 4.4, nicotinic acid 1.0, Ca-pantothenate 2.0, p-aminobenzoic acid 1.5, thiamine hydrochloride 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine hydrochloride 0.16 g.

Margarine fat included in some of the diets contained about 30 i.u. vitamin D/g. Male rats were used in all experiments. Metabolic cages of the Hopkins type (Ackroyd & Hopkins, 1916) were used. A description of these cages together with details of the collection and analysis of the excreta will be found in an earlier publication (Henry & Kon, 1937). Unless otherwise stated, excreta were discarded for the first 3 days or 1 week in each balance experiment and then collected for analysis for 1 week. P was determined by the molybdivanadate method (Kitson & Mellon, 1944; Hanson, 1950). Some urine samples, when treated with the molybdivanadate reagent, developed a red colour that interfered with the determination. The interference was overcome by evaporating a suitable portion of urine to dryness and ashing with magnesium nitrate solution (Association of Official Agricultural Chemists, 1955). The residue was then moistened with water, dissolved in the least quantity of hot 20% (v/v) nitric acid, filtered and made up to a suitable volume.

ANIMALS AND EXPERIMENTAL PROCEDURE

Expts 1-6. Adaptation to low Ca intake by the growing and adult rat

In each experiment rats were weaned onto diets low or high in Ca. Three to sixteen months later the animals on the high-Ca diet were transferred to the low-Ca diet (experimental group) and Ca retention from this diet was determined immediately and at intervals until retention did not differ significantly from that of animals given the low-Ca diet throughout (control group). The dietary changes, distribution of litter-mates and ages when metabolic tests were done are shown in Table 2. In Expts 1 - 4 succeeding metabolic tests were done on the same rats. In Expts 5 and 6 attempts were made to demonstrate changes in total skeletal Ca by analysis of some of the rats immediately before the dietary change and at the end of each metabolic test. The ashing of such large rats (15 - 24 months old) proved difficult, however, and no reproducible results were obtained.

Expts 7 and 8. Effect of age of rat and of Ca intake on Ca metabolism

These two experiments were primarily planned to study certain aspects of bone metabolism with ^{45}Ca . As the plan of the experiments involved changes from high Ca intakes to low ones as well as the reverse, Ca retention was also measured to add to the information obtained in earlier experiments (Henry & Kon, 1947, 1953).

Expt 7. This experiment involved autoradiographic studies of bones and was divided into two parts. The dietary changes, distribution of

litter-mates and age at the time of the metabolic tests are shown in Table 2 and the periods when ^{45}Ca was included in the diets in Fig. 1. At the end of each metabolic test some rats were killed and autoradiographs of the femora and humeri were prepared as described by Tomlin

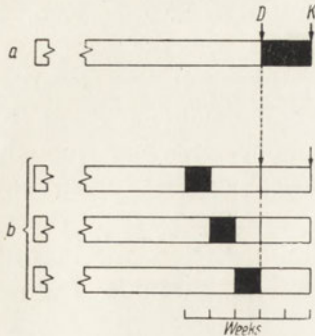


Fig. 1. Expt 7. Scheme of dietary treatments. Groups of rats received diets low or high in Ca from weaning up to the age of 6, 9, 12 or 15 months (D), and then continued on the low- or high-Ca diet or were changed from one diet to the other; excreta were collected for 2 weeks after (D), the rats were killed at (K). Black areas denote periods (in *a* 2 weeks, in *b* 1 week) when diets contained ^{45}Ca and each such treatment involved groups of rats killed at the ages stated above

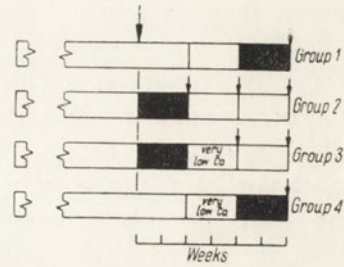


Fig. 2. Expt 8. Scheme of dietary treatments. The rats received the high-Ca diet for 1 year (shown by the big arrow) and thereafter this diet or, as shown, one very low in Ca; black areas denote periods when the diet contained ^{45}Ca . Two rats were killed at each point shown by an arrow

et al. (1953*a*, 1955). To obtain a base-line for Ca retention by 1-month-old rats from the high- and low-Ca diets, four rats given each diet were placed in metabolic cages 10 days after weaning and the excreta collected for 1 week and pooled for analysis.

Expt 8. Four litters of three and one litter of two rats were given the high-Ca diet from weaning until they were 13 months old. The rats were then divided into four groups and given, during 2-week periods, the high-Ca diet with or without the addition of ^{45}Ca ($15\ \mu\text{c}/100\ \text{g. diet}$) or a diet very low in Ca (0.04% Ca), as shown in Fig. 2. Pairs of animals were killed at the times marked with an arrow and autoradiographs of the femora and humeri were prepared as in Expt 7. The six rats comprising groups 3 and 4 were placed in metabolic cages and Ca balances determined during the 2nd of each of the 2 weeks that the animals were in the metabolic cages; only four animals were available for the final metabolic period on the high-Ca diet as two were killed for bone autoradiographs after the period on the diet very low in Ca (Fig. 2).

Table 2
Expts 1-7. Distribution of litter-mate rats, dietary changes and ages of rats at time of metabolic tests for Ca and P

Expt no.	No. of litters	No. of rats/litter	Treatment and no. of litter-mates		Age at time of metabolic test (months)
			Ca level in diet at weaning	Ca level in diet during metabolic tests	
1	6	2	{ 1 Low }	Low	{ 3 4 5 6 7 }
			{ 1 High }		{ 3 4 5 6 7 }
2	6	2	{ 1 Low }	Low	{ 6 7 8 9 10 }
			{ 1 High }		{ 6 7 8 9 10 }
3	6	2	{ 1 Low }	Low	{ 9 10 11 12 }
			{ 1 High }		{ 9 10 11 12 }
4	6	2	{ 1 Low }	Low	{ 12 13 14 15 }
			{ 1 High }		{ 12 13 14 15 }
5	6	8	{ 4 Low }	Low	{ *15+ 18+ 21+ }
			{ 4 High }		{ *15+ 18+ 21+ }
6	6	5	{ 5 Low }	Low	{ *16+ 20+ 22+ 24+ }
			{ 5 High }		{ *16+ 20+ 22+ 24+ }
7a	8	4	{ 2 Low }	{ 1 Low 1 High }	{ 6+ 6+ 9+ 9+ 12+ 12+ 15+ 15+ }
			{ 2 High }		{ 6+ 6+ 9+ 9+ 12+ 12+ 15+ 15+ }
7b	8	6	6 Low	{ 3 Low 3 High }	{ 6+ 6+ 9+ 9+ 12+ 12+ 15+ 15+ }
			6 High		{ 6+ 6+ 9+ 9+ 12+ 12+ 15+ 15+ }

* Asterisk shows that one rat from each litter was killed before the beginning of metabolic test.
+ Dagger shows that one rat from each litter was killed at the end of metabolic test.

Expt 9. Effect of age of rat and of P intake on Ca retention

Six litters of four rats were used. Two rats from each litter were weaned onto the low-P diet and two onto the diet adequate in P. After 1 week on these diets, i. e. when the rats were 1 month old, metabolic tests were done on one rat from each pair of litter-mates. These tests were repeated on the same rats when they were 3, 6 and 9 months old. One rat on each diet died before it was 12 months old and was replaced by its litter-mate. The experiment was discontinued before the rats were 15 months old because of increasing mortality and of the poor condition of many of the surviving rats, particularly on the low-P diet. To obtain adequate samples of excreta for analysis the metabolic periods lasted for 3 weeks at 1 month, 2 weeks at 3, 6 and 9 months and 1 week at 12 months.

RESULTS

Expts 1 - 6. Adaptation to a low Ca intake by the growing and adult rat

The mean results for Ca balances are given in Table 3 and for P balances in Table 4. Table 3 shows that rats maintained for from 3 to 16 months on a high-Ca diet completely adapted their metabolism to a much lower Ca intake in the course of 2-6 months. Analysis of faeces showed that this adaptation was brought about by increased absorption of Ca. Table 3 shows that, at all ages, the percentage absorption of Ca by the experimental groups was, initially, markedly inferior to that of the control animals. In the latter, absorption decreased progressively with age, whereas in the experimental groups absorption increased for 1 or 2 months after the dietary change and then declined, though at a slower rate than in the control groups. There were no consistent differences between the two groups in the urinary excretion of Ca, except in the initial test with the 3-month-old rats when the urinary Ca of the control group amounted to only 25% of that of the experimental group. Retention of P differed little between the two groups; the only significant differences were in the first two tests with the 3-month-old rats (Expt 1) when the control animals retained significantly more P than the experimental ones.

Expts 7 and 8. Effect of age of rat and of Ca intake on Ca metabolism

Balance experiments. The mean results for Ca and P balances are given in Tables 5 (Expt 7, groups a and b combined) and 6 (Expt 8). The results of Expt 7 confirm earlier findings in this laboratory (Henry & Kon,

Table 3

Expt 1-6. Weight gain, and intake, excretion and excretion of Ca from a low-Ca diet by litter-mate male rats given (a) a high-Ca diet from weaning for varying periods and then the low-Ca diet (experimental group) or (b) the low-Ca diet throughout (control group)

Mean values for metabolic tests lasting for 1 week

Expt no.	Period on high-Ca diet (months)	No. of rats/group	Gain in weight (g.)	Ca eaten (mg.)	Ca excreted		Ca absorbed		Ca retained		No. of rats/group	Gain in weight (g.)	Ca eaten (mg.)	Ca excreted		Ca absorbed		Ca retained																			
					Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)	(mg.)	(%)				Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)	(mg.)	(%)																		
1	3	6	17.5	162.7	2.4	57.3	105.4	64.8	103.0	63.4 ± 2.15	6	17.8	168.4	0.6	6.6	161.8	96.1	161.2	95.8 ± 2.15																		
																				4.3	44.2	126.1	74.0	121.8	71.9 ± 2.70	6	15.0	170.6	3.9	15.3	155.3	91.0	151.4	88.8 ± 2.70			
																				4.0	64.2	112.9	63.7	108.9	61.8 ± 3.24	6	13.2	180.0	3.7	45.8	134.2	74.6	130.5	72.8 ± 3.24	74.6	130.5	72.8 ± 3.24
																				5.9	89.5	74.7	45.5	68.8	41.9 ± 2.68	6	13.0	166.4	4.9	70.5	95.9	57.6	91.0	55.1 ± 2.68	57.6	91.0	55.1 ± 2.68
2	6	6	7.8	156.2	4.6	92.8	63.4	40.6	58.8	37.7 ± 3.26	6	8.2	162.4	3.9	97.2	65.2	61.3	37.9 ± 3.26																			
																			4.5	134.9	33.1	19.7	28.6	17.3 ± 2.97	6	9.7	162.9	4.5	75.5	87.4	53.7	82.9	50.9 ± 2.97				
																			4.6	119.7	45.6	27.6	41.0	24.7 ± 2.92	6	8.1	158.7	5.5	95.8	62.9	39.6	57.4	36.0 ± 2.92	39.6	57.4	36.0 ± 2.92	
																			2.9	117.7	48.7	29.3	45.8	27.6 ± 2.54	6	0.0	153.2	3.4	103.2	50.0	32.6	46.6	30.2 ± 2.54	32.6	46.6	30.2 ± 2.54	
3	6	6	4.8	169.9	5.6	124.6	45.3	26.7	39.7	23.5 ± 1.45	6	4.5	170.5	6.2	116.5	54.0	31.7	47.8	28.0 ± 1.45																		
																				2.7	136.9	38.4	21.9	35.7	20.7 ± 1.81	6	0.8	174.8	4.7	135.6	39.2	22.4	34.5	19.8 ± 1.81			
																				6.2	150.7	26.9	15.1	20.7	11.9 ± 1.06	6	9.0	183.9	5.0	122.3	61.6	33.5	56.6	30.9 ± 1.06	33.5	56.6	30.9 ± 1.06
																				6.3	160.2	40.5	20.2	34.2	16.8 ± 1.88	6	3.7	197.2	3.8	143.6	53.6	27.2	49.8	25.4 ± 1.88	27.2	49.8	25.4 ± 1.88
4	12	6	0.7	178.5	7.9	148.3	30.2	16.9	22.3	12.1 ± 1.68	6	2.5	181.5	3.9	139.0	42.5	23.4	38.6	21.4 ± 1.68																		
																				11.7	141.6	33.7	19.2	22.0	12.4 ± 1.15	6	6.2	186.3	9.8	151.9	34.4	18.5	24.6	13.3 ± 1.15			
																				6.2	162.2	13.8	7.8	7.6	4.7 ± 3.71	6	10.8	179.2	6.1	142.9	36.3	20.3	30.2	16.9 ± 3.71	20.3	30.2	16.9 ± 3.71
																				5.7	177.4	21.9	11.0	16.2	7.9 ± 5.13	6	1.1	193.1	7.3	161.8	31.3	16.2	24.0	12.8 ± 5.13	16.2	24.0	12.8 ± 5.13
5	15	6	-1.2	180.2	5.2	154.2	26.0	14.4	20.8	11.7 ± 2.91	5 ⁺	-2.6	176.4	6.1	148.3	28.1	15.9	22.0	12.3 ± 2.91																		
																				6.3	159.5	13.5	7.8	7.2	3.9 ± 2.25	6	-1.5	182.3	6.3	165.0	17.3	9.5	11.0	6.0 ± 2.25			
																				12.4	158.9	21.1	11.7	8.7	4.9 ± 3.43	6	0.7	176.3	12.0	138.8	37.5	21.3	25.5	14.8 ± 3.43	21.3	25.5	14.8 ± 3.43
																				7.0	140.6	28.4	16.8	21.4	12.3 ± 3.19	4	2.2	169.9	7.6	127.7	42.2	24.8	34.6	20.5 ± 1.96	24.8	34.6	20.5 ± 1.96
6	16	4	14.0	189.6	7.6	164.2	25.4	13.4	17.8	9.5 ± 2.48	4	8.7	189.8	8.5	165.6	24.2	12.8	15.7	7.9 ± 1.83																		
																				9.9	179.7	-3.3	-1.9	-13.2	-7.9 ± 2.31	6	3.8	182.8	8.6	152.9	29.9	16.4	21.3	11.7 ± 0.97			
																				8.5	155.0	28.8	15.7	20.3	11.1 ± 3.67	5	3.4	188.3	8.5	158.6	29.7	15.8	21.2	11.3 ± 1.43	15.8	21.2	11.3 ± 1.43
																				7.5	164.4	19.3	10.5	11.8	5.7 ± 2.77	3	0.0	188.1	6.0	164.8	23.3	12.4	17.3	9.2 ± 0.62	12.4	17.3	9.2 ± 0.62
6	16	3	-8.0	176.9	9.5	167.3	9.6	5.4	0.1	0.5 ± 3.40	3	-3.3	185.4	7.5	173.2	12.2	6.6	4.7	2.4 ± 1.67																		
																				9.5	167.3	9.6	5.4	0.1	0.5 ± 3.40	3	-3.3	185.4	7.5	173.2	12.2	6.6	4.7	2.4 ± 1.67			

* Value with its standard error.

+ Result for one pair of litter-mates was omitted because the control rat ate very little food during the second half of the week; Ca and P excretions were normal, but owing to the low intake the balances were negative.

Table 4

Expts 1-6. Weight gain, and intake, excretion and retention of P from a low-Ca diet by litter-mate male rats given (a) high-Ca diet from weaning for varying periods and then the low-Ca diet (experimental group) or (b) the low-Ca diet throughout (control group)

Mean values for metabolic tests lasting for 1 week

Expt no.	Period on high-Ca diet (months)	Period on low-Ca diet (months)	Experimental group						Control group					
			No. of rats/group	P eaten (mg.)	P excreted		P retained		No. of rats/group	P eaten (mg.)	P excreted		P retained	
					Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*			Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*
1	3	0	6	431	258	105	68	15.9 ± 1.28	446	273	73	100	22.2 ± 1.28	
		1	6	474	283	108	83	17.4 ± 0.48	475	290	91	94	19.8 ± 0.48	
		2	6	556	314	152	90	16.3 ± 1.06	565	322	144	99	17.7 ± 1.06	
		3	6	501	294	148	59	11.8 ± 0.67	508	296	140	72	14.2 ± 0.67	
2	6	4	6	467	260	149	58	12.4 ± 0.98	485	274	162	49	10.1 ± 0.98	
		0	6	505	248	179	78	15.6 ± 2.06	490	263	137	90	18.2 ± 2.06	
		1	6	494	298	160	36	7.0 ± 0.91	474	278	152	44	9.4 ± 0.91	
		2	6	486	286	177	23	4.8 ± 1.55	447	268	162	17	3.9 ± 1.55	
3	9	3	6	527	311	177	39	7.2 ± 1.26	529	308	178	43	8.2 ± 1.26	
		4	6	552	321	194	37	6.6 ± 0.50	550	310	199	41	7.3 ± 0.50	
		0	6	492	282	168	42	8.3 ± 2.02	510	295	160	55	10.9 ± 2.02	
		1	6	580	339	207	34	5.9 ± 0.79	570	339	190	41	7.2 ± 0.79	
4	12	2	6	510	328	188	-6	-1.5 ± 1.86	518	318	176	24	4.4 ± 1.86	
		3	6	476	279	155	42	7.4 ± 4.21	506	285	175	46	9.1 ± 4.21	
		0	6	478	274	160	44	9.2 ± 1.33	487	264	163	60	12.2 ± 1.33	
		1	6+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	15	2	6	517	325	184	8	1.5 ± 0.73	506	315	175	16	3.3 ± 0.73	
		3	6	492	305	182	5	1.1 ± 0.71	518	300	199	19	3.6 ± 0.71	
		0	6	583	334	204	45	7.8 ± 0.82	572	334	188	50	6.6 ± 0.82	
		3	3	548	339	203	6	1.0 ± 0.87	550	325	192	33	5.9 ± 1.64	
6	16	6	4	585	361	214	10	1.7 ± 1.61	586	372	216	-2	-0.8 ± 3.21	
		0	6	573	333	241	-1	-0.1 ± 1.26	594	339	226	29	4.9 ± 0.81	
		4	6	618	340	219	59	9.7 ± 0.99	633	353	222	58	9.1 ± 0.61	
		6	6	544	335	204	5	0.6 ± 1.47	556	354	202	0	0.0 ± 3.84	
		8	3	496	310	201	-15	-3.3 ± 1.53	519	340	200	-21	-4.5 ± 3.91	

* Value with its standard error.

+ Urines were discarded in error before analysis.

++ See footnote to Table 2.

Table 5

Expt 7. Weight gain, and intake, excretion and retention of Ca and P from diets low or high in Ca by male rats maintained for various periods after weaning on diets low or high in Ca

Mean values for metabolic tests lasting for 1 week

Diet from weaning	Period on weaning diet (months)	Diet during metabolic test	No. of rats/group	Gain in weight (g.)	Ca eaten (mg.)	Ca excreted		Ca retained		P eaten (mg.)	P excreted		P retained	
						Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*		Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*
Low-Ca	0	Low-Ca	4	18.5	95.4	2.0	5.0	88.4	92.7 ⁺	296	150	84	62	21.1 ⁺
	6			12.0	190.9	6.1	133.6	51.2	26.8 ± 2.73	584	323	199	62	10.1 ± 1.61
	9			9.9	207.8	8.5	147.9	51.4	24.6 ± 1.78	601	342	208	51	8.8 ± 1.34
	12			12.9	215.6	7.2	175.6	32.8	14.9 ± 3.92	640	367	245	28	4.2 ± 1.01
Low-Ca	0	High-Ca	8	3.0	181.7	9.4	143.0	29.3	16.0 ± 2.51	603	321	234	48	7.9 ± 4.59
	6			11.6	1209.8	11.1	956.1	242.6	19.5 ± 2.80	1264	388	758	118	9.3 ± 1.31
	9			10.2	1190.2	13.6	1120.4	56.2	4.7 ± 1.47	1433	404	856	173	11.9 ± 0.97
	12			15.0	1267.8	15.2	1131.4	121.2	9.7 ± 1.13	1438	427	922	89	6.3 ± 1.15
High-Ca	0	Low-Ca	8	6.8	1096.7	18.2	1019.8	60.7	5.6 ± 1.36	1285	398	812	75	5.4 ± 2.41
	6			13.9	206.8	7.3	174.4	25.1	12.5 ± 2.99	632	349	217	66	10.3 ± 1.01
	9			2.9	193.8	7.8	166.9	19.1	9.1 ± 3.26	560	323	207	30	4.9 ± 1.53
	12			3.3	199.4	7.0	193.5	-1.1	-0.3 ± 3.69	590	341	249	0	0.0 ± 1.01
High-Ca	0	High-Ca	8	5.6	181.9	11.0	166.8	4.1	2.3 ± 1.91	604	322	250	32	5.0 ± 1.92
	6			17.5	699.8	11.6	375.4	312.8	44.7 ⁺	64	164	387	95	14.7 ⁺
	9			10.6	1348.9	14.1	1090.4	244.4	17.2 ± 2.40	1403	437	859	107	7.4 ± 1.21
	12			6.2	1146.1	13.1	1096.4	36.6	3.2 ± 0.95	1379	399	857	123	8.8 ± 0.72
High-Ca	7	High-Ca	7	6.9	1192.3	12.7	1117.6	62.0	5.3 ± 1.23	1351	422	874	55	4.0 ± 1.11
	15			3.4	1115.6	14.7	1030.4	70.5	6.2 ± 1.34	1306	427	811	68	5.1 ± 1.91

* Value with its standard error.

+ Single value (see p. 171).

1953), that rats maintained on a high-Ca diet for from 3 to 15 months after weaning retain Ca less efficiently from a low-Ca diet than rats given this diet from weaning. Rats given the low-Ca diet for from 3 to 15 months before the metabolic tests retained Ca slightly better from the high-Ca diet than the rats given the high-Ca diet from weaning. The difference was statistically significant only for the 12-month-old rats. Expt 8 shows that rats reared for 13 months on the high-Ca diet retained Ca from this diet rather more efficiently after than immediately before a 2-week period on a diet very low in Ca. In both experiments there were only small differences in P retention between the different groups of rats.

Table 6

Expt 8. Weight gain, and intake, excretion and retention of Ca and P from diets high or very low in Ca of male rats maintained for 1 year after weaning on the high Ca diet. The values are for two periods on this diet and an intervening period on the diet very low in Ca

Mean values for metabolic tests lasting for 1 week

Ca level in diet	No. of rats	Gain in weight (g.)	Ca eaten (mg.)	Ca excreted		Ca retained		P eaten (mg.)	P excreted		P retained	
				Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*		Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*
High	6	7.5	1259.5	13.2	1180.5	65.8	5.2±0.81	1420	497	890	33	2.2±2.02
Very low	6	5.7	55.4	8.9	78.9	-32.9	-58.1±7.63	224	193	60	-29	-13.5±2.91
High	4 ⁺	-2.0	1085.2	9.8	1017.6	57.8	8.4±1.88	1256	410	804	42	3.4±2.82

* Value with its standard error.

⁺ Four rats only as two had been killed after the period on the diet very low in Ca (see p. 170).

Autoradiographic studies of bones. The autoradiographs prepared from the long bones of all the experimental animals that were given ⁴⁵Ca in the various diets were similar in general features to those previously described by Tomlin *et al.* (1955). They showed the same clear distinction between the high activity of bone material newly added by surface accretion and the very much lower activity of interstitial uptake throughout the previously formed cortex. Cancellous tissue in the metaphyseal regions showed incorporation of the radioactive dietary Ca at about the same specific activity as in the newly formed cortical layers.

Some qualitative comparisons between the different experimental groups of animals could be made by visual examination of the autoradiographs; in addition, attempts were made to obtain semi-quantitative measurements by the previously reported method of microdensitometry in the autoradiographic regions corresponding to interstitial uptake

(Tomlin *et al.*, 1955). These were the only regions in which fairly uniform activities were obtained over relatively large areas.

Accretion of new bone mineral at the cortical surfaces, representing physical growth of the bones, was observed to some extent in all the experimental groups, though in amounts decreasing with the age of the

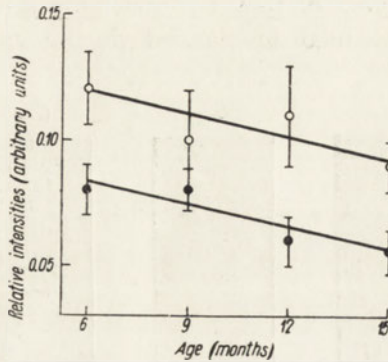


Fig. 3. Expt 7a. Relationship between age of rat and autoradiographic film densities of the long bones (cf. Fig. 1); the densities are proportional to the ^{45}Ca content of the bones. The vertical lines through the points show the range found in each group (four bones from each of two rats). (O) — Low-Ca diet + ^{45}Ca for 2 weeks after continuous administration of the low-Ca diet. (●) — Low-Ca diet + ^{45}Ca for 2 weeks after continuous administration of the high-Ca diet

animals. Those that had been maintained from weaning on the diet lower in Ca were in general found to continue the growth process later into life than those that had received the high-Ca diet.

A parallel effect in the interstitial metabolic activity was revealed by microdensitometric measurements in Expt 7a. Rats that had been maintained on the low-Ca diet until the experimental period and then given ^{45}Ca showed a stronger interstitial effect than those reared on the high-Ca diet and then similarly transferred to the low-Ca diet containing ^{45}Ca . This comparison is shown in Fig. 3 in which the autoradiographic film densities may be regarded as proportional to the ^{45}Ca content of the bone.

In Expt 8 the same effect of increased interstitial uptake from the radioactive high-Ca diet was found in animals that had received the diet very low in Ca in the immediately preceding period. It was accompanied by a pronounced uptake in cancellous bone (Pl. 1a and e). No marked differences were found between animals that, after corresponding periods of 2 weeks on the radioactive high-Ca diet received the high-Ca diet (Pl. 1b), the diet very low in Ca (Pl. 1c) or the high-Ca diet after that very low in Ca (Pl. 1d).

This general feature was found also in Expt 7b in which dietary changes were imposed after periods on the radioactive diet.

The main features of the autoradiographs obtained in Expt 7b were: (1) the radioactivity of cancellous bone tissue disappeared steadily over the time interval of 2 - 4 weeks after the administration of the radioactive diet, (2) the surface layers of new cortical bone formed during a period of radioactive diet remained unchanged during subsequent periods of

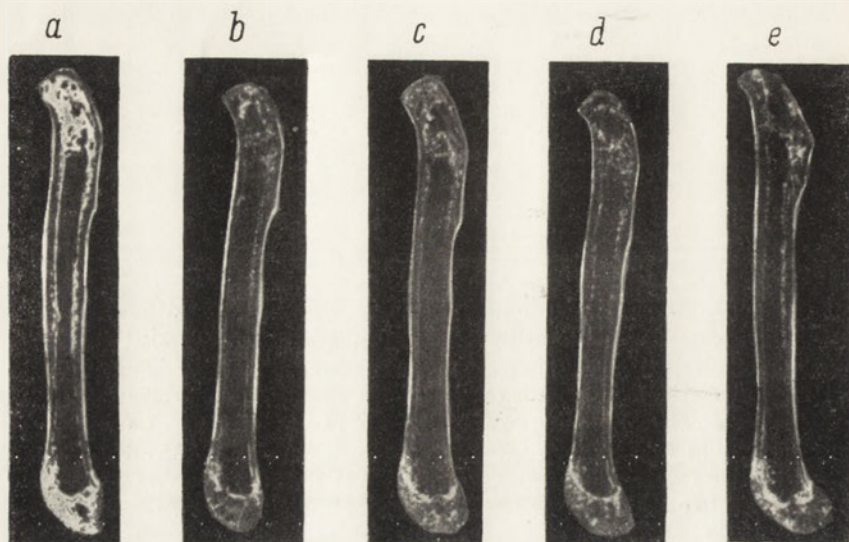


Plate 1. Expt 8. Autoradiographs of femurs of male rats given diets of different Ca content and killed at the end of the final 2 weeks. *a* — Diet very low in Ca for 2 weeks followed by radioactive high-Ca diet for 2 weeks. *b* — Radioactive high-Ca diet for 2 weeks followed by high-Ca diet for 2 weeks. *c* — Radioactive high-Ca diet for 2 weeks followed by diet very low in Ca for 2 weeks. *d* — Radioactive high-Ca diet for 2 weeks followed by diet very low in Ca for 2 weeks and high-Ca diet for a further 2 weeks. *e* — High-Ca diet from weaning followed by radioactive high-Ca diet for 2 weeks

up to 4 weeks on the non-radioactive diet, and (3) the interstitially absorbed ^{45}Ca was slowly lost during that time. The rate of this loss appeared to increase with the age of the animals. No significant correlation was observed between any of these processes and the changes in dietary Ca level imposed after the periods on the radioactive diet.

Expt 9. Effect of age of rat and of P intake on Ca retention

The mean results for Ca and P balances are given in Table 7. They show, in agreement with our earlier findings (Henry & Kon, 1939), that

Table 7

Expt 9. Weight gain, and intake, excretion and retention of Ca and P by male rats maintained from weaning on a diet low or adequate in P

Mean values for groups of six rats in metabolic tests lasting for 1 week

Age of rats (months)	Gain in weight (g.)	Ca eaten (mg.)	Ca excreted		Ca retained		P eaten (mg.)	P excreted		P retained	
			Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*		Urine (mg.)	Faeces (mg.)	(mg.)	(%)*
Low-P diet											
1	18.6	88.1	60.7	4.9	22.5	25.4 ± 1.33	61	1	17	43	70.1 ± 3.26
3	15.6	125.3	24.3	4.7	96.3	76.9 ± 2.59	84	2	18	64	76.7 ± 7.19
6+	6.5	196.6	24.4	70.7	101.5	52.1 ± 3.52	87	6	28	53	60.7 ± 3.49
9	4.9	151.9	18.3	103.2	30.4	20.0 ± 1.73	92	30	48	14	14.8 ± 2.06
12	-1.0	143.8	14.1	104.0	25.7	17.5 ± 1.66	95	33	51	11	10.1 ± 3.45
Diet adequate in P											
1	32.3	117.6	2.4	2.1	113.1	96.1 ± 1.33	215	79	21	115	53.4 ± 3.26
3	18.5	146.5	4.7	6.7	135.1	91.0 ± 2.59	257	160	20	77	26.3 ± 7.19
6+	4.4	223.2	13.2	145.2	64.8	29.1 ± 3.52	293	191	69	33	11.2 ± 3.49
9	4.8	179.2	21.9	134.1	23.2	13.1 ± 1.73	281	189	78	14	4.9 ± 2.06
12	7.0	184.6	22.0	143.3	19.3	10.7 ± 1.66	289	182	86	21	7.0 ± 3.45

* Value with its standard error.

+ During this period the diet contained 0.20% Ca and 0.09% P.

+ During this period the diet contained 0.20% Ca and 0.27% P.

1-month-old rats retained very much less Ca from the diet low in P than from that adequate in it. At 3 months there was a marked increase in Ca retention in the low-P group and a slight decrease in the group given adequate P; thereafter Ca retention from both diets decreased progressively but more rapidly when P was adequate. The 1-month-old rats retained, as would be expected, markedly more P from the higher than from the lower intake of P; thereafter, differences between the groups were less marked and at 6 months P retention was, in fact, better from the low-P diet. The efficiency of P retention was consistently better with the diet low in P, markedly so during the first 6 months of the experiment.

DISCUSSION

The experiments now described confirm earlier findings in this laboratory (Henry & Kon, 1953) and those of other workers (Rottstein, 1938; Carlsson, 1951; Hansard, Comar & Plumlee, 1951; Hansard & Plumlee, 1954) that, when the intake of Ca is limited, Ca is less efficiently retained by rats with high body stores than by those with low body stores. Our experiments also show that rats of different ages can completely adapt

their metabolism to a low Ca intake within 2-6 months of changing from a high to a low Ca intake.

It can be seen from Table 3 that the improved Ca retention of rats changed from a high to a low intake of Ca was, at all ages studied, due to changes in faecal excretion of this element. Although Hansard & Plumlee (1954), using ^{45}Ca , have shown that endogenous losses of Ca by the rat increase somewhat with increasing Ca intake, faecal Ca gives a good indication of the amount of unabsorbed dietary Ca. It is evident from our experiments that when the Ca intake is reduced, it is the absorptive mechanism that must become adjusted to a relatively meagre supply. In all age groups, immediately after the dietary change, absorption was markedly lower in the experimental group than in the controls that had remained on the same diet from weaning. In the control groups the normal progressive decrease with age in the ability of rats to absorb Ca (cf. Carlsson, 1951; Henry & Kon, 1947, 1953) was evident. At all ages, absorption increased for a period in the experimental groups after the dietary change and then decreased. This decrease was slower than in the control group presumably because the natural decrease was partly offset by the process of adaptation. This decline was more rapid in younger than in older rats (Tables 3 and 5; cf. Henry & Kon, 1953), which would explain the somewhat longer period required for complete adaptation by the 3- and 6-month-old rats than by those 9 and 12 months old. As already mentioned (p. 169, Table 2) the plan of the experiments with the 15- and 16-month-old rats was somewhat different from that with the younger rats; the results show, however, that the old rats required a minimum period of 4 months for adaptation. These findings and our earlier ones with 21-month-old rats (Henry & Kon, 1953) suggest that the process of adaptation may be somewhat slower in aged rats than in younger ones.

Fournier (1951) is of the opinion that Ca absorption is greater when the intake is greater, but not proportionately so, whereas Hansard & Plumlee (1954) found that the efficiency of utilization of Ca decreased as the level of intake increased. The results of Expt 7 (Table 4) confirm both these findings. Although the absolute retention of Ca was higher from the high-Ca diet than from the low-Ca diet, Ca was more efficiently retained from the latter. The low urinary excretion of Ca on both diets indicates that little excess Ca was absorbed from either. It is evident, therefore, that absorption is more efficient from a limited intake and that animals accustomed to a high intake must adjust their absorptive mechanism to a lower supply of Ca. It is of interest that Hansard *et al.* (1951) in studies with ^{45}Ca found some improvement in Ca absorption

even 2 days after a change from a high- to a low-Ca diet. It has also been shown that in man adaptation to a reduced Ca intake is brought about by more efficient absorption (Malm, 1958; Thorangkul *et al.* 1959).

Body stores of Ca have little effect on the efficiency of its utilization from a high intake. Thus in Expt 7 (Table 5) the percentage retention of Ca from the high-Ca diet was little better by rats previously given the low-Ca diet than by those given the high-Ca diet throughout. Rats given the high-Ca diet excreted consistently more Ca in the urine than those given the low-Ca diet, irrespective of body stores. This finding agrees with the view of Nicolaysen, Eeg-Larsen & Malm (1953) that, in man, urinary Ca reflects Ca intake.

Although surprisingly little effect of the change in Ca and P content of the diets was found in the autoradiographs, the effects that did appear to have some significance can be correlated with the evidence from the metabolic studies. It is clear that many autoradiographic observations and measurements would be needed to provide closer quantitative support. Nevertheless investigations in which possible effects of variation in diet on the mechanisms of mineral metabolism in bone are studied are likely to increase our knowledge both of the nutritional effects of the diets and of the details of the physiological mechanisms of metabolism. The interstitial metabolism of Ca in the cortical bone is considered important in that, though only a small fraction of the mineral content appears to take part in the metabolic process, a large total volume of such bone minerals is available. It seems likely that a detailed study of the influence of nutritional conditions on this aspect of bone-mineral behaviour would provide useful information on its nature.

A consideration of our results has led us to the following tentative view of interstitial metabolism.

The bone-mineral crystals embedded in the cortical matrix take up Ca from the body fluids either by surface exchange, or by accretion in which the crystals continue to grow after the initial mineralization of the matrix. As was pointed out in an earlier paper (Tomlin *et al.* 1955), it is not at once possible to determine from the turnover rate of the process which of the two types is predominant. It is so because the weakness of the radioactivity observed in these regions of bone in tracer experiments indicates that only a small fraction of the ions located in the total crystal surface is involved. Once a portion of the surface has become occupied by the radioactive tracer, the probability of these particular ions subsequently undergoing the reverse exchange may therefore be very small, and the uptake appears to be permanent. Such an exchange process may therefore

be indistinguishable from a genuinely permanent uptake by crystal growth. The experiments reported in the earlier paper were done with 3-month-old rats, and it will be noted that in the work now described, involving older animals, the interstitial uptake was found to be less permanent. This finding suggests that in relatively young animals the uptake is largely due to continued mineralization of the matrix by crystal growth, whereas in older animals, in which mineralization is presumably complete, the process becomes one of exchange. Otherwise it would be necessary to postulate a more rapid exchange in older rats.

The finding of Expt 7a that interstitial uptake is more pronounced in rats of any age when they have been reared on a low-Ca diet would then indicate that the rates of either continued mineralization or exchange are higher at any particular age on the low-Ca diet than on the high-Ca diet. This result points to delayed maturity in skeletal development when the dietary Ca is limited and agrees with our earlier conclusions from bone analysis (Henry & Kon, 1953).

The results of Expt 8, both metabolic and autoradiographic, may be interpreted as showing that a sudden change to a very low intake of Ca results in a withdrawal of bone mineral from the crystal surfaces, and that this material is replaced on reversion to a normal Ca intake. The fact that no clear evidence of the withdrawal process was found when the diet very low in Ca was imposed after the period on the radioactive diet indicates again that the area of crystal surface available for withdrawal is very large compared with the proportion occupied by the recently absorbed radioactive material.

Quite apart from these interstitial processes, taking place within the cortical bone at crystal surfaces, rapid structural changes in cancellous bone certainly contribute to the balance of Ca among the body tissues. For example, we have shown (Tomlin *et al.* 1953b) that in lactating female rats the demands for Ca are largely met by an increase in the resorptive processes leading to the destruction of much cancellous bone and even of cortical bone from the endosteal surfaces. These effects were not now observed to any marked extent in non-lactating rats.

The pattern of interstitial processes suggested here, though tentative in character, is clearly of interest in the study of skeletal metabolism. It is thought that further work of a more quantitative nature on the effects of dietary levels of Ca could contribute to our knowledge of this aspect of the problem, little understood so far.

In contrast to the effect of dietary stores of Ca on its retention, P retention from a somewhat limited intake (low-Ca diet) was largely independent of the previous level of intake of both Ca and P (Expts 1 - 7).

In Expt 8, however, in which the change from the high-Ca diet to that very low in Ca resulted in a much greater reduction in the intake of both elements, the P balance, as well as the Ca balance, became negative (Table 6). This finding agrees with that of Hansard & Plumlee (1954) who reported a decreased retention of ^{32}P by rats from a diet containing 0.03% Ca compared with one containing 0.5% Ca; both diets contained 0.4% P. They concluded that shortage of Ca affects the absorption or retention, or both, of P.

We concluded from earlier experiments (Henry & Kon, 1937, 1939, 1947) that a shortage of dietary P relative to Ca results in poor Ca utilization by the young rat because the limited P available is preferentially used for the formation of the soft tissues. This view is confirmed by the results of Expt 9 where in 1-month-old rats Ca retention was very much lower with the low than with the adequate intake of P. The Ca content of these diets was the same but there was five times less P in the former.

We have previously demonstrated (Henry & Kon, 1939, 1947) that on low-residue diets, such as those used in Expt 9, faecal P can be almost entirely accounted for by that in bacterial bodies. It can be calculated (cf. Henry & Kon, 1939) that on the low-P diet the available P (that is excluding that in bacterial bodies) was almost quantitatively retained by rats up to 6 months of age; thereafter there was an appreciable loss in the urine. The marked improvement in Ca retention at 3 months, compared with that at 1 month, indicates that the tissue requirements for P were largely met at 3 months and that more of it was available for the fixation of Ca in the bones. Subsequently there was little difference in the absolute retention of P between the two groups, but both the absolute and percentage retentions of Ca were higher in the low-P group than in that receiving adequate P, possibly because the Ca stores of the former group were less.

It may be concluded that when P is short it is preferentially used by the rapidly growing rat for the formation of soft tissues, but that in early maturity (3 months) these demands are largely satisfied and more P is available for bone formation, and that after 6 months the demands for both Ca and P decline sharply.

SUMMARY

1. Groups of three to six male rats were given from weaning until they were 3, 6, 9, 12, 15 or 16 months old, a diet containing 0.76% Ca and 0.85% P. The diet was then changed to one containing 0.13% Ca and 0.38% P. Ca retention from this diet was determined at intervals until it

did not differ significantly from that of litter-mate control rats that received the low-Ca diet throughout.

2. At all ages the rats adapted themselves to a low-Ca intake within, 2 - 6 months of the change in diet.

3. This more efficient retention of Ca on the low-Ca diet was brought about by a reduction in the faecal excretion of Ca and it is concluded that, in adaptation, the absorptive mechanism becomes adjusted to a reduced Ca intake.

4. There were indications that older rats took longer than younger ones to adapt themselves.

5. In a second series of experiments groups of two to eight rats were given the low- or high-Ca diets from weaning until they were 6, 9, 12 or 15 months old when one half of each group continued on its own diet and the other received the other diet. ^{45}Ca was added to the diets at different periods and bone autoradiographs were prepared from the long bones at the end of each experiment. In most groups metabolic tests were done during the 2 weeks before killing. During one of the experiments rats on the high-Ca diet were given a diet very low in Ca (0.04% Ca, 0.17% P) for 2 weeks.

6. The metabolic tests showed that rats with low body stores of Ca retained Ca more efficiently than those with higher stores, from both the high- and low-Ca diets. The effect was much more marked with the latter diet. Rats retained Ca more efficiently from the high-Ca diet after than immediately before 2 weeks on the diet very low in Ca.

7. The bone autoradiographic studies showed that the accretion of new bone mineral at cortical surfaces, representing physical growth of the bone, decreased with increasing age of the rat. The accretion was more prolonged in animals maintained from weaning on a diet low in Ca than in those on a diet high in Ca, which confirms earlier findings (Henry & Kon, 1953) based on analysis of bones. There was a heavy deposition of ^{45}Ca from the high-Ca diet in cancellous bone after a period of very low intake of Ca.

8. In a third series of experiments the retention of Ca and P from diets containing 0.15% Ca and 0.05 or 0.24% P was determined in groups of six rats aged from 1 to 12 months.

9. Only 25% of the ingested Ca was retained by 1-month-old rats on the low-P diet compared with 96% by those given more P. On the low-P diet Ca retention rose to 76% at 3 months and thereafter declined. It is concluded that when dietary P is limited it is preferentially retained by the soft tissues in the young rat, but that by 3 months these demands are

largely met and that more P is then available for bone formation. The requirements for both Ca and P declined sharply from 6 months onwards.

We are grateful for the assistance given by Miss M. V. Chapman in the care and feeding of the animals and by Mrs. E. M. Wiltshire in preparing bone sections and autoradiographs.

REFERENCES

- Ackroyd H. & Hopkins F. G., *Biochem. J.* **10**, 551, 1916.
 Association of Official Agricultural Chemists, *Official and Tentative Methods of Analysis*, Eighth ed. p. 114, Washington, D. C.: Association of Official Agricultural Chemists, 1955.
 Carlsson A., *Acta pharmacol. Toxicol.* **7** suppl. 1, 1951.
 de Loureiro A., *Arch. Pat., Lisboa*, **3**, 72, 1931.
 Fournier P., *C. R. Acad. Sci.* **232**, 1593, 1951.
 Hansard S. L. & Plumlee M. P., *J. Nutr.* **54**, 17, 1954.
 Hansard S. L., Comar C. L. & Plumlee M. P., *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, **78**, 455, 1951.
 Hanson W. C., *J. Sci. Fd. Agric.* **1**, 172, 1950.
 Henry K. M. & Kon S. K., *Milk and Nutrition*, Part 1, p. 9, Reading: National Institute for Research in Dairying, 1937.
 Henry K. M. & Kon S. K., *Biochem. J.* **33**, 173, 1939.
 Henry K. M. & Kon S. K., *Biochem. J.* **41**, 169, 1947.
 Henry K. M. & Kon S. K., *Brit. J. Nutr.* **7**, 147, 1953.
 Henry K. M., Kon S. K., Todd P. E. E. & Toothill J., *Int. Congr. Biochem. IV, Vienna, Abstr. Pap.* p. 99, 1958.
 Irving J. T., *Calcium metabolism*, London: Methuen & Co. Ltd., 1957.
 Kitson R. E., & Mellon M. G., *Industr. Engng. Chem. (Anal. ed.)* **16**, 379, 1944.
 McCann G. F. & Barnett M., *J. biol. Chem.* **54**, 203, 1922.
 Malm O. J., *Calcium Requirement and Adaptation in Man*. Oslo: Oslo University Press, 1958.
 Nicolaysen R., Eeg-Larsen N. & Malm, O. J., *Physiol. Rev.* **33**, 424, 1953.
 Rottensten K. V., *Biochem. J.* **32**, 1285, 1938.
 Thorangkul D., Johnston F. A., Kime N. S. & Clark S. J. *J. Amer. diet. Ass.* **35**, 23, 1959.
 Tomlin D. H., Henry K. M. & Kon S. K., *Brit. J. Nutr.* **7**, 235, 1953a.
 Tomlin D. H., Henry K. M. & Kon S. K., *Proc. Nutr. Soc.* **12**, iv, 1953b.
 Tomlin D. H., Henry K. M. & Kon S. K., *Brit. J. Nutr.* **9**, 144, 1955.

METABOLIZM WAPNIA I FOSFORU U SZCZURÓW. WPŁYW WIEKU NA SZYBKOŚĆ ADAPTACJI DO DIETY NISKO WAPNIOWEJ

Streszczenie

1. Grupy złożone z trzech do sześciu szczurów samców od chwili odstawienia od matki aż do 3, 6, 9, 12 lub 16 miesiąca życia otrzymywały dietę zawierającą 0,76% Ca i 0,85% P. Po tych różnych okresach czasu

zmieniano dietę na zawierającą 0,13% Ca i 0,38% P. Przy tej drugiej diecie oznaczano zatrzymanie Ca w ustroju. Oznaczenia przeprowadzano w pewnych odstępach czasu, tak długo aż nie było wyraźnej różnicy w zatrzymywaniu Ca w porównaniu z kontrolnymi szczurami z tego samego miotu, które otrzymywały przez cały czas dietę nisko-Ca.

2. Wszystkie szczury niezależnie od wieku adaptowały się w ciągu 2-6 miesięcy od zmiany diety, do niskiego spożycia Ca.

3. Wydatniejsze zatrzymywanie Ca na diecie nisko-Ca polegało na zmniejszeniu wydalania Ca w kale. Wynika stąd, że przy adaptacji mechanizm absorpcji dostosowuje się do zmniejszonego spożycia Ca.

4. Są pewne dane, że starsze szczury potrzebują dłuższego czasu do adaptacji aniżeli młodsze.

5. W drugiej serii doświadczeń grupy składające się z dwóch do sześciu szczurów otrzymywały dietę nisko-Ca lub wysoko-Ca, od chwili odstawienia od matki do 6, 9, 12 lub 15 miesięcy życia. W tych okresach połowa z każdej grupy pozostawała na tej samej diecie, zaś druga połowa dostawała drugą dietę. W różnych okresach dodawano do pokarmu ^{45}Ca i na koniec każdego doświadczenia robiono autoradiogramy kości długich. W większości grup oznaczano bilans przez 2 tygodnie przed zabiciem. W trakcie jednego z doświadczeń szczury trzymane na wysoko-Ca diecie otrzymywały przez 2 tygodnie dietę bardzo nisko-Ca (0,04% Ca, 0,17% P).

6. Oznaczanie bilansu wykazało, że szczury z niską zawartością Ca w ustroju zatrzymywały wydatniej Ca, aniżeli szczury z wyższym zapasem Ca. Stwierdzono to zarówno przy diecie wysoko- jak i nisko-Ca. Efekt ten był o wiele silniej zaznaczony przy diecie nisko-Ca. Na diecie bogatej w wapń szczury zatrzymywały wydatniej Ca, o ile okres wysoko-Ca diety był poprzedzony przez dwutygodniowy okres diety nisko-Ca.

7. Autoradiogramy kości wykazały, że przyrost nowych substancji mineralnych na powierzchniach korowych, przedstawiający fizyczny wzrost kości, zmniejsza się z wiekiem szczura. Przyrost był bardziej przedłużony u zwierząt trzymanych od chwili odstawienia od matki na diecie nisko-Ca, aniżeli na wysoko-Ca, potwierdza to wcześniejsze wyniki (Henry i Kon, 1953) oparte na analizach kości. Stwierdzono wybitne odkładanie ^{45}Ca w tkance gąbczastej kości, przy diecie wysoko-Ca poprzedzonej okresem niskiego spożywania wapnia.

8. W trzeciej serii doświadczeń, oznaczano zatrzymanie w ustroju Ca i P z diety zawierającej 0,15% Ca i 0,05 lub 0,24% P, w grupach złożonych z 6 szczurów w wieku od 1 do 12 miesięcy.

9. Jednomiesięczne szczury zatrzymywały tylko 25% spożytego Ca, przy diecie nisko-P, zaś 96% przy diecie zawierającej więcej P. Przy nisko-P diecie zatrzymanie Ca wzrastało do 76% w 3 miesiącu życia, następnie spadało. Wnioskujemy stąd, że przy ograniczonej ilości P, jest on u młodego szczura zatrzymywany wybiórczo przez tkanki miękkie, lecz w 3 miesiącu zapotrzebowanie to jest już zaspokojone i więcej jest wtedy dzięki temu dostępnego P dla tworzenia kości. Zapotrzebowanie na Ca i P ostro spada od 6 miesiąca życia.

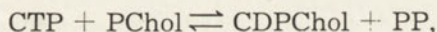
Otrzymano 28.12.1959

J. HELLER, T. CHOJNACKI and MARIA J. PIECHOWSKA

ON PYROPHOSPHATE IN THE HAWK-MOTH *CELERIO EUPHORBIAE*

Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
(Department of Evolutionary Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics,
Polish Academy of Sciences, Warsaw)

The previous studies [2] on the occurrence and the role of pyrophosphate (PP) in the Hawk-moth had led to the suggestion that PP formed in the white part of the *ductus ejaculatorius* was released in the reaction of cytidine triphosphate (CTP) and phosphocholine (PChol) [4]



being the first stage of lecithine synthesis.

This assumption was based on the presence of a considerable amount of phosphocholine in the testis but not in the ejaculatory duct. Since a decrease in phosphocholine content was attended by an increase in pyrophosphate content, the above explanation has been accepted.

Large amounts of PP found in the duct homogenate should drive the reaction equilibrium to the left and thus suppress the forward reaction. It is generally assumed, that various reactions connected with the formation of pyrophosphate proceed, due to the decomposition of the latter by pyrophosphatase. Although no evidence for the pyrophosphatase activity in *ductus ejaculatorius* was provided [2], the formation of PP notwithstanding does not appear to be inhibited and the product is accumulated in an amount not found elsewhere. This finding strongly favours the suggestion that PP in the duct is in a combined rather than free state, and for this reason is unable to affect its own formation.

To verify this suggestion the behaviour of the PP in dialysis was observed. The separated duct was homogenized with tris buffer, pH 7.4, and dialysed against water for 24 hours at room temperature. Then the bag content was filtered and MnCl_2 was added, according to the Jones procedure [3]. No sediment of manganous pyrophosphate was obtained.

But a chromatogram¹ of the same homogenate showed an intensive pyrophosphate spot. After the fluid from bag had been deproteinized with 4% trichloroacetic acid (TCA) and filtered, pyrophosphate was detectable in the filtrate as well by the Jones method and by paper chromatography. This result indicated that the PP in *ductus ejaculatorius* was present but neither dialysable nor precipitable by Jones' procedure to any appreciable extent. Many attempts of extractions with various neutral buffer or NaCl solution failed to reveal PP in the extract. Pyrophosphate passes only into either acidic, at pH below 3, or strongly basic solvents of pH more than 11. This question did not arise in our earlier investigations, because the first step in preparation was always the grounding of the duct in TCA. This also explains our positive results in chromatographing ducts after Ebel with the acidic solvent containing TCA.

The above investigations proved PP to be in the semen in a bound form. Pyrophosphate extracted with TCA is decomposed easily by crystalline pyrophosphatase [2], and the point of interest was to investigate whether this bound PP is sensitive to this enzyme. For this purpose the homogenate of the white part of *ductus ejaculatorius* was incubated with Kunitz's crystalline pyrophosphatase. No decomposition of pyrophosphate took place within 1 hour, whereas in controls pyrophosphate extracted with TCA was completely decomposed during 15 min. incubation.

In order to decide whether this negative result is to be attributed to a special state of pyrophosphate or to some inhibitory action of the homogenate on PP-ase, two following experiments were carried out. In the first the homogenate was prepared from the white part of the ejaculatory duct of a freshly emerged moth injected the day before with ³²P-ortophosphate (2 μ c.). We know from earlier experience [2] that almost the whole label is transferred to PP of the duct during this time. The homogenate, 0.2 ml. (diluted up to contain 600 μ g. P in the form of ³²P-pyrophosphate per ml.) were added with 0.2 ml. of 0.001 M-MgCl₂, 0.2 ml. of pyrophosphate solution (120 μ g. P), 0.8 ml. of 0.1 M-veronal buffer, pH 7.2, and 0.1 ml. of Kunitz's crystalline pyrophosphatase (1 μ g. of protein). The mixture was incubated at 37°, 0.2 ml. samples were taken at intervals and deproteinized with 0.2 ml. of 10% TCA and chromatographed. Radioactive spots of PP and non-radioactive, intensively coloured spots of ortophosphate, were obtained. A control experiment carried out without enzyme, showed a dark intensively coloured spot of PP and only traces of ortophosphate.

¹ Ascending paper chromatograms were developed in the acid solvents system after Ebel [1].

It is evident from these results that PP-ase was without any effect on the own labelled PP of the Hawk-moth, but in the same time the enzyme splitted the added non-labelled PP. Therefore the stability of the endogenous PP would be attributed to a special state of PP and not to an inhibitory effect of the homogenate on crystalline PP-ase.

This view is even more strongly supported by the second experiment carried out in a reversal situation: The labelled PP² was added to the homogenate of the white part containing native unlabelled PP. As can be seen from Fig. 1, at "zero time", the radioactivity is concentrated at the PP spot. But after 5 minutes the PP spot shows blue colour only, and the total radioactivity is in the ortophosphate spot. This indicates that in this case the added PP was also decomposed, whereas the endogenous PP remained intact. Finally, after 60 min. incubation without PP-ase added the homogenate itself was found to decompose slightly the added labelled PP (Fig. 1), and so the presence of a weak PP-ase activity is to be admitted.

The insensitivity against PP-ase as well as results of the dialysis experiment, indicated that PP in the ejaculatory duct is in a bound state. To estimate the size of the molecule or particle to which PP is attached

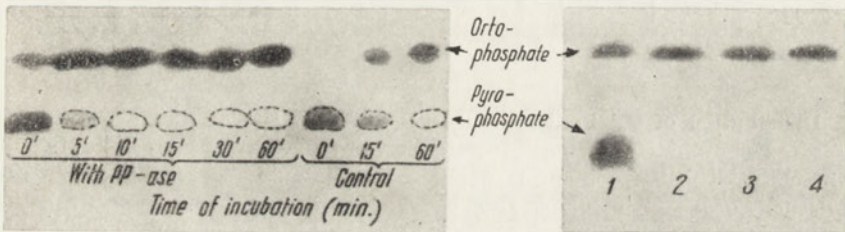


Fig. 1. Action of Kunitz's pyrophosphatase on native unlabelled, and added labelled pyrophosphates (autoradiogram). Black spots: radioactive ³²P. Dotted line: Blue spots of pyrophosphate developed with ammonium molybdate

Fig. 2. Differential centrifugation of the homogenate of the white part of the ejaculatory duct prepared 24 hours after injection of ³²P-ortophosphate. Autoradiogram of phosphate chromatograms of: 1 — non-centrifuged homogenate; supernatant obtained at: 2 — 500 g, 3 — 2000 g, 4 — 9000 g. Supernatants 2, 3, 4, were used in volume twice that of 1

the homogenate of the duct labelled *intra vitam* with ³²P was centrifuged at different velocities, and the supernatants obtained were chromatographed (Fig. 2). Almost total radioactive phosphorus of the homogenate was in the form of PP. Total PP was found to be sedimented by

² Sodium ³²P-pyrophosphate was obtained by heating monosodium ³²P-ortophosphate at 215° for 12 hours.

centrifugation at 500 *g* in a few minutes. The results obtained indicate that PP is combined with large particles of the homogenate of the ejaculatory duct.

In view of the possibility of PP being directly bound to protein, ³⁵S-methionine was used to label proteins in the Hawk-moth. Of course, the positive result could have been expected merely in the case of simultaneous pyrophosphate and respective protein syntheses.

A male moth immediately after emerging was injected with 0.02 μ c of ³²P-orthophosphate and about 20 μ c of ³⁵S-methionine. After 24 hours the ejaculatory duct was separated and the content of the white part was collected. Preliminary determinations of ³⁵S and ³²P in the duct³ showed

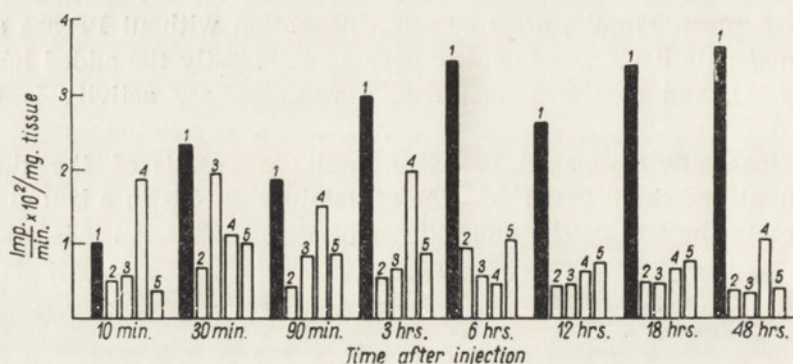


Fig. 3. Distribution of ³²P in the tissues of the male Hawk-moth at various times after ³²P-orthophosphate injection. Injections were made not later than two hours after hatching. The ³²P content is expressed in impulses per minute per mg. of fresh tissue. Successive columns give ³²P content in 1 — white part, 2 — testis, 3 — grey part, 4 — fat-body, and 5 — muscles

that the duct did not accumulate the sulphur introduced in such extent as it did the phosphorus. The per cent of the ³⁵S found in the duct and expressed on the introduced sulphur-basis, was 1/1000 that obtained for the phosphorus ratio. Protein synthesis in the ejaculatory duct is thus shown to proceed at a rate not comparable to that of PP synthesis. When the duct content was suspended in several millilitres of water and centrifuged, ³⁵S was found to be mainly in the supernatant, whereas ³²P — in the sediment, and as proved by chromatography in the form of PP. The successive washings of the sediment did not contain radioactive phosphorus and only trace amounts of sulphur. Besides of this

³ Determinations of ³⁵S and ³²P in the same sample were carried out by the absorption technique. The celluloid filter (23.2 mg./cm.²) retained 99% of the ³⁵S radiation and only about 6% of the ³²P radiation.

radioactivity due to ^{32}P , the sediment yielded a slight and constant radiation of ^{35}S . This was interpreted as evidence of the presence of labelled proteins in the same particles with ^{32}PP .

In connection with these experiments it was of interest to study the distribution of ^{32}P in various tissues at different time following the injection. The results (Fig. 3) are expressed as impulses per minute per 1 mg. of fresh tissue.

Ten minutes after injection the highest proportion of the radioactive phosphorus was found in the fat-body which of course is the tissue accepting and absorbing the injected fluid. After 30 minutes the highest

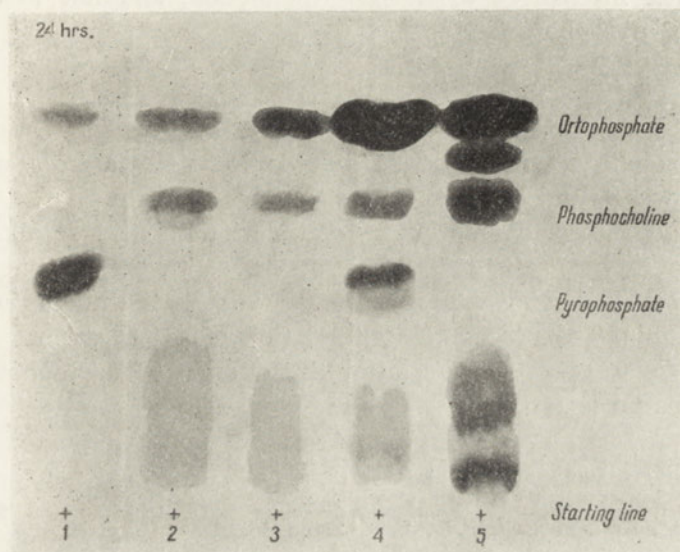


Fig. 4. Chromatographic distribution of ^{32}P in TCA extracts of tissues of male moth 24 hours after injection of ^{32}P -orthophosphate (autoradiogram). 1 — white part, 2 — testis, 3 — grey part, 4 — fat-body, 5 — muscles. The quantity of white part material placed on paper was $1/4$ — $1/5$ that used in the case of other organs

proportion of ^{32}P was found in the white part and a somewhat lower in the grey part of the ejaculatory duct. In the next periods up to the 6th hour, the radioactivity of the white part rose at the expense of that of other tissues, and then remained constant until the end of observation (48 hrs.).

The results given above refer to the total content of the radioactive phosphorus. To identify the nature of the compounds into which the radioactive phosphorus was incorporated, TCA extracts were prepared from various tissues 24 hours after the injection. Paper chromatograms and their autoradiograms were obtained; one of them is presented in

Fig. 4. As may be seen, the white part of the duct contains ^{32}P almost exclusively in the form of pyrophosphate and only a slight amount as orthophosphate. The testis and the grey part contain the label in orthophosphate and in phosphocholine. The fat-body contains a considerable quantity of label in orthophosphate, smaller in phosphocholine and trace amounts in PP. Muscles were found to show, besides labelled orthophosphate and phosphocholine, some unidentified radioactive spots.

In view of the results obtained in the presented investigations, the accumulation of pyrophosphate in the white part of the ejaculatory duct may be attributed to the trapping of the forming pyrophosphate in a complex insensitive to the enzyme action, and not to a lack or inhibition of pyrophosphatase.

SUMMARY

Pyrophosphate accumulated in the *ductus ejaculatorius* of *Celerio euphorbiae* was found to occur there in a bound form.

It could be detected only after treatment with acid or alkali. In its native form it was resistant to the action of the crystalline Kunitz's pyrophosphatase. The pyrophosphatase activity in the ductus was found to be negligible. The process of accumulation of ^{32}P in various organs of the moth *Celerio euphorbiae* after injection of ^{32}P -orthophosphate into abdomen was presented.

REFERENCES

- [1] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. biol.* **34**, 321, 1956.
- [2] Heller J., Piechowska M. J., Chojnacki T., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 343, 1956
- [3] Jonse L. T., *Ind. Eng. Chem., (Anal. Ed.)* **14**, 536, 1942.
- [4] Kennedy E. P., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193, 1956.

O PYROFOSFORANIE MOTYLA WILCZOMLECZKA

Streszczenie

Stwierdzono, że nagromadzający się w *ductus ejaculatorius* motyla wilczomlecza pyrofosforan występuje w formie związanej. Można go wykazać dopiero po zadziałaniu kwasem lub zasadą. W naturalnej formie jest niepodatny na działanie pyrofosfatazy krystalicznej Kunitza. W *ductus* stwierdzono bardzo słabą aktywność pyrofosfatazową. Przedstawiono przebieg nagromadzenia ^{32}P w narządach motyla wilczomlecza po wstrzyknięciu do odwłoku ^{32}P -ortofosforanu.

Otrzymano 28.12.1959 r.

KRYSTYNA BELŻECKA and KONSTANCJA RACZYŃSKA-BOJANOWSKA

STUDIES ON TRANSAMINATION IN INSECTS

II. ENZYME-COENZYME CONNECTION AND COENZYME REQUIREMENT IN ASPARTIC- α -KETOGLUTARIC TRANSAMINASE IN *CELERIO EUPHORBIAE*

Zakład Chemii Fizjologicznej, AM, Warszawa
Kierownik: prof. dr J. Heller

(Department of Physiological Chemistry, Medical School, Warsaw)

Our previous studies [2] have shown a marked stability of the aspartic- α -ketoglutaric transaminase system in *Celerio euphorbiae* tissues. The following paper is concerned with more detailed studies on the enzyme-coenzyme connection and coenzyme requirement of the transaminase protein in diapausing pupae. This object seems to be of special interest as it constitutes closed system with no food supply and different enzymatic processes competing for vit. B₆.

MATERIALS AND METHODS

Enzymatic preparations from isolated muscles and fat-body of *C. euphorbiae* pupae and pigeon heart muscle were obtained in the same way as previously described [2]; the dialysis against 0.01 M-phosphate buffer being performed alternatively during 24 and 48 hrs. at 4°.

α -Ketoglutaric acid (Nutritional Biochemicals Corporation U.S.A.), L-aspartic acid (B.D.H.), isonicotinyl hydrazide (INH) was a gift from the Department of Organic Technology of the Warsaw Politechnic School. Pyridoxal phosphate was prepared from pyridoxal hydrochloride (Fluka, Switzerland) by phosphorylation according to Peterson, Sober and Meister [9]. Spectrum of the obtained pyridoxal phosphate was examined in 0.1 M-pyrophosphate buffer, pH 8.7 [11] and in 0.1 M-phosphate buffer, pH 7.4 and compared with the spectra of pyridoxal phosphate of S.A.F. Hoffmann La Roche.

The activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase was determined by the spectrophotometric method of Cammarata and Cohen [3]. The following system was used: aliquots of the investigated enzymatic preparations (0.15 — 3 mg. of protein), 20 μ moles of sodium aspartate and 20 μ moles of sodium α -ketoglutarate in 0.05 M-phosphate buffer, pH 7.4, final vol. 3.2 ml. Oxalacetate formed during transamination from aspartate was measured at 280 m μ spectrophotometrically. The rate of the reaction was graphically established by plotting values from three subsequent determinations. This method was chosen instead of previously used Steinberg's procedure as the introduction of malic dehydrogenase to the system was undesirable in our present studies. The activity was expressed in μ moles of oxalacetate formed /min./mg. of protein; formation of one μ mole/ml. of oxalacetate and glutamate being accompanied by an increase of 0.499 density unit.

Determination of protein was made by spectrophotometric method based on absorption measurements at 260 and 280 m μ as in our previous studies [2].

Pyridoxal phosphate was determined in dialyzed preparations by the method of Levine and Hansen [6]. This method was preferred because of its simplicity and sensitivity although the colour reaction with thiophene like the other colour tests for pyridoxal is not specific. The analysed preparations were freed beforehand from short chain carbonyl compounds by prolonged dialysis and the results obtained served merely for comparison purpose. Vitamin B₆ content in bakers yeast as determined by the thiophene method proved to be about the same as in insect under the same conditions, i.e. about 15 μ g./mg. of protein.

All spectrophotometric measurements were made with the Unicam spectrophotometer type SP-500.

RESULTS

Pyridoxal phosphate requirement for the aspartic- α -ketoglutaric transaminase of *C. euphorbiae* pupae was established by the use of INH, a known inhibitor of vitamin B₆ requiring enzymes. The inhibition of transaminase activity in the insect preparations was determined in various concentrations of INH. Dialyzed preparations from muscles with fat-body of *C. euphorbiae* containing approximately 8 mg. of protein were incubated alternatively in 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² M-solutions of INH in phosphate buffer, pH 7.4, for 90 minutes at room temperature. The transaminase activity was then determined. The results given in Table 1 are related to the preparation non-treated with INH, the activity of which is considered as 100. For matter of comparison the results obtained with

pigeon heart muscle preparation are included in the same table. The undialyzed preparation of pigeon heart muscle was used because of the marked loss of the coenzyme on dialysis [2]. Aspartic- α -ketoglutaric transaminase of the dialyzed insect preparation was inhibited to 88.5%

Table 1

The inhibitory effect of isonicotinyl hydrazide (INH) on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase

The results are expressed in percent of inhibition. Details see text

Final concn. of INH	Muscles with fat-body of <i>C. euphorbiae</i> (dialyzed)	Pigeon heart muscle (undialyzed)
10^{-4} M	0	9.3
10^{-3} M	88.5	13.0
10^{-2} M	100.0	100.0

in 10^{-3} M concentration of INH, while the same activity of undialyzed preparation of pigeon heart muscle was inhibited to only 13% under the same conditions. Total inhibition of transaminase of insect preparation was observed at 10^{-2} M concentration of INH, i. e. at the same concentration of INH that inhibits this activity of pigeon heart muscle.

Quantitative studies concerning coenzyme requirement of aspartic- α -ketoglutaric transaminase involved problem of coenzyme "saturation" of the transaminase protein in the untreated preparation, relation between coenzyme requirement and transaminase activity, and coenzyme resolution under various agents.

Table 2

The effect of dialysis on the aspartic- α -ketoglutaric transaminase activity

Activity expressed in μ moles of oxalacetate formed/min./mg. of protein $\times 10^2$

Enzymic preparation	Undialyzed	Dialyzed against		
		0.01M-phosphate buffer, pH 7.4		Water
		24 hrs.	48 hrs.	24 hrs.
Muscles with fat-body	1,7	1.7	—	1.09
Muscles	7	—	22	—
	16	—	45	—
	11	—	49	—

Dialysis of enzymic preparation of muscles [2] and muscles with fat-body of *C. euphorbiae* pupae against 400 vol. of 0.01 M-phosphate buffer, pH 7.4, for 24 hrs. at 4° had no effect on the transaminase activity and

no dissociation of the coenzyme from the enzymic protein did occur under these conditions (Tabl. 2). Dialysis of the muscles with fat-body preparation against water for 24 hrs. decreased the activity by 30%. The addition of 20 μg . of pyridoxal phosphate/mg. of protein did not restore the activity. This indicates thus partial inactivation of the enzyme.

Dialysis of muscles preparation against 0.01 M-phosphate buffer, pH 7.4 prolonged to 48 hrs. even increased the transaminase activity (Tabl. 2).

The effect of the addition of increasing amounts of pyridoxal phosphate was studied with dialyzed against phosphate buffer and undialyzed preparations to see whether transaminase protein is totally "saturated" with coenzyme. It was ascertained beforehand in control experiments, that pyridoxal phosphate does not undergo destruction when incubated under applied conditions.

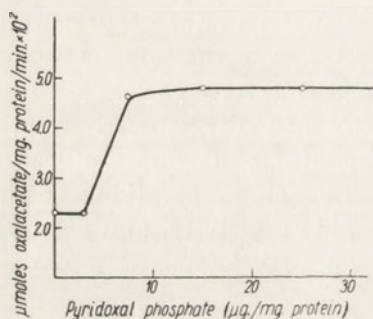


Fig. 1. Effect of pyridoxal phosphate on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of dialyzed preparation of muscles with fat-body of pupae

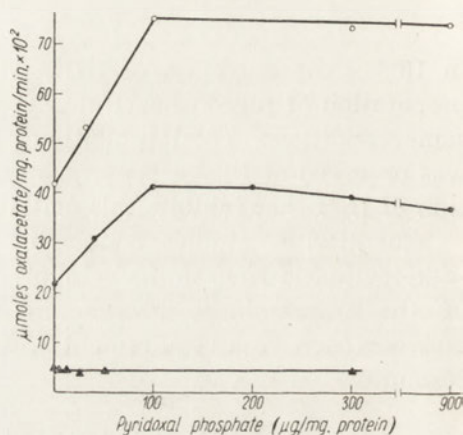


Fig. 2. Effect of pyridoxal phosphate on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of dialyzed preparation of muscles and fat-body. Dialysis against 0.01 M-phosphate buffer, pH 7.4, 48 hrs; I, (●) muscles of pupae in the beginning of diapause; II, (○) muscles of pupae 4 weeks later; (▲) fat-body of pupae

Data given in Fig. 1 refer to dialyzed preparation of muscles with fat-body. 0 - 25 μg . of pyridoxal phosphate in 0.05 M-phosphate buffer, pH 7.4 were added to the enzymic preparations followed by incubation for 20 minutes at 37.5°. Maximum activity was obtained when 9 - 15 μg . of pyridoxal phosphate were added per mg. of protein. At this concentration of the coenzyme the transaminase activity was twice as

great as that in untreated preparation. Higher amount of pyridoxal phosphate did not practically increase the transaminase activity above this level.

The results given in Fig. 1 represent the effect of pyridoxal phosphate on a mixture of two tissues of very different transaminase activity [2]. Therefore experiments of this kind were repeated with muscles and fat-body separately. Data presented in Figure 2 refer to the results

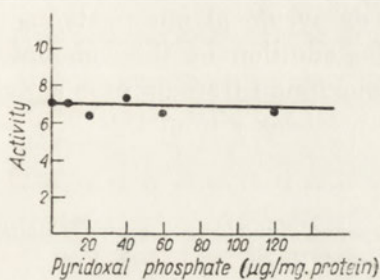


Fig. 3. Effect of pyridoxal phosphate on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of undialyzed pupal muscles. Activity expressed in μ moles of oxalacetate formed/mg. of protein/min. $\times 10^2$

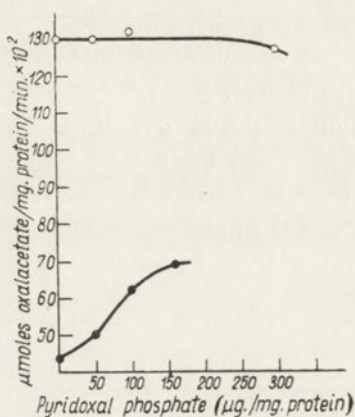


Fig. 4. Effect of pyridoxal phosphate on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of (○) undialyzed, (●) dialyzed pigeon heart muscle

obtained with dialyzed preparations of muscles and fat-body respectively. Pyridoxal phosphate was added in the amount up to 900 μ g./mg. of protein. Maximum activity of the muscles transaminase was achieved upon addition of 100 μ g. of pyridoxal phosphate/mg. of protein. This concentration of the coenzyme doubled the transaminase activity. The results diagramed on curve I concern the muscles preparation from pupae in the beginning of diapausis, while curve II represent data obtained 4 weeks later with the preparation from pupae of the same lot. No increase of transaminase activity was noted upon the addition of pyridoxal phosphate up to 300 μ g. to fat-body preparation.

In undialyzed muscles preparation the addition of 8-120 μ g. of pyridoxal phosphate/mg. of protein had no effect upon transaminase activity (Fig. 3).

The results obtained with the insect preparation were compared with that of pigeon heart muscle. Aspartic- α -ketoglutaric transaminase activity of undialyzed pigeon heart preparation did not increase upon the addition

of pyridoxal phosphate up to 300 $\mu\text{g./mg.}$ of protein. A 48 hrs. dialysis against phosphate buffer, pH 7.4 decreased the transaminase activity by 2/3 (Fig. 4). The addition of pyridoxal phosphate up to 160 $\mu\text{g.}$ restored partially the activity by about 30%, but did not reach the value found in undialyzed preparation.

The effect of agents applied ordinary in purification of the enzymes, i. e. heating and NH_4^+ ion concentration was studied with the preparation of muscles with fat-body according to O'Kane and Gunsalus [8] (Tabl. 3). The activity of enzymatic preparation dialyzed 24 hrs. against 0.01 M-phosphate buffer, pH 7.4 and heated to 60° was decreased from 2.75 to 1.97, although tissue pyridoxal ratio increased from 9.5 to 11.8 $\mu\text{g./mg.}$ of protein. The addition however of 20 $\mu\text{g.}$ of pyridoxal phosphate/mg. of protein increased the activity to 5.3. The addition of this amount of pyridoxal phosphate was found to secure maximum transaminase activity of the dialyzed preparation of muscles with fat-body (Fig. 1).

Table 3

Effect of heating and NH_4^+ ions on the aspartic- α -ketoglutaric transaminase activity
Activity expressed in μmoles of oxalacetate formed/min./mg. of protein $\times 10^2$

Muscles with fat-body preparation dialyzed against phosphate buffer	$\mu\text{g.}$ of pyridoxal phosphate/mg. of protein	Activity	
		without pyridoxal phosphate added	with 20 $\mu\text{g.}$ of pyridoxal phosphate added/mg. of protein
untreated	9.5	2.75	5.13
heating to 60°	11.8	1.97	5.30
39% saturation	supernat*.	17.50	41.67
with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	precipit.**	no activity	no activity
92% saturation	supernat.*	no activity	no activity
with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	precipit.**	12.27	20.44

* Samples from supernatants were drawn and dialyzed against phosphate buffer before the activity determinations.

** The precipitates were dissolved in water and dialyzed against phosphate buffer subsequently.

Salting out the same non-heated preparation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 39% saturation increased the transaminase activity per/mg. of supernatant protein from 2.75 to 17.5 due to 6-fold purification; the ratio of pyridoxal phosphate being increased simultaneously from 9.5 to 18.2 $\mu\text{g./mg.}$ of protein. The addition of 20 $\mu\text{g.}$ of pyridoxal phosphate/mg. of protein increased the activity from 17.5 to 41.67. In 92% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution precipitation of transaminase took place; the activity of the precipitate, dissolved in water and dialyzed against phosphate buffer, dropped to

12.27 and pyridoxal phosphate ratio decreased to 5 $\mu\text{g.}/\text{mg.}$ of protein. Addition of the standard amount of pyridoxal phosphate increased the activity only to 20.44, proving thus partial inactivation of the enzyme protein.

DISCUSSION

The requirement of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of muscles and fat-body of *C. euphorbiae* pupae for pyridoxal phosphate was ascertained by showing the inhibition effect of izoniazid (INH), a specific inhibitor of pyridoxal phosphate requiring enzymes [5].

It was found that the coenzyme does not split out from the enzymic protein on 24—28 hrs dialysis against 0.01 M-phosphate buffer, pH 7.4 (Tabl. 2). The partial resolution of the enzyme was however observed upon dialysis against water, heating to 60° and saturation to 39 and 92% with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ partial inactivation of the enzymic protein was noted upon dialysis in water, and on 92% saturation with NH_4^+ ions. One step fractionation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 39% saturation caused 8-fold purification of the enzyme (Table 3).

Studies on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase and "saturation" of the enzymic protein with the coenzyme revealed a distinct difference between transaminase systems in pigeon heart muscle and insect tissues. The transaminase of pigeon heart muscle in undialyzed preparation does not respond to the addition of pyridoxal phosphate proving total "saturation" of the enzyme with the coenzyme (Fig. 4). On 48 hrs. dialysis against phosphate buffer a marked resolution takes place; the activity being decreased by about 65%. The addition of 160 $\mu\text{g.}$ of pyridoxal phosphate/mg. of protein to the dialyzed preparations restores only partially the transaminase activity, i.e. to about half of the value found before dialysis. Similar observation was made by Cammarata and Cohen [4] who did not obtain full recovery of the resolved aspartic- α -ketoglutaric transaminase from pig heart on supplementing the enzyme with pyridoxal phosphate.

Full "saturation" of the insect transaminase was found in dialyzed fat-body preparation (Fig. 2), which indicates the presence of the coenzyme in sufficient amount to activate relatively small amounts of transaminase protein in this tissue: the activity in fat-body is about 10 times lower than in the muscles [2].

Total coenzyme "saturation" of the enzymic protein was noted in undialyzed muscles preparations (Fig. 3). On 48 hrs dialysis however an about 3-fold increase of the activity was found (Tabl. 2) and the addition of pyridoxal phosphate up to 100 $\mu\text{g.}/\text{mg.}$ of protein caused a further

increase, i.e. doubled the activity of the dialyzed non-supplemented transaminase.

Data presented by Meister *et al.* [7] show a marked increase of the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of pig heart both in dialyzed and undialyzed preparations upon the addition of pyridoxal phosphate; the dialysis applied by them did not affect the activity. These results suggest thus "unsaturation" of the enzyme protein in this tissue. A marked increase in the activity of the γ -aminobutyric- α -ketoglutaric transaminase was obtained by Baxter and Roberts [1] in *E. coli*, and a very high concentrations of pyridoxal phosphate were required for maximum activation of this enzyme. The conclusions, however, concerning the coenzyme "saturation" are hardly to be drawn in this case because of the lack of sufficient information about the enzyme resolution.

The observed stimulation of the transaminase activity in muscles of *C. euphorbiae* pupae upon dialysis and response to the addition of pyridoxal phosphate may indicate the presence of other vit. B₆ requiring enzymes or non-enzymic proteins of high vit. B₆ affinity, which are inactivated or changed respectively upon dialysis in a way excluding competition for vit. B₆. It may be assumed as well that some dialyzable inhibiting agents are present in the undialyzed preparation of muscles, blocking the sites of coenzyme binding. This inhibiting effect may perhaps be due to some metal ions [10].

SUMMARY

1. Total inhibition of aspartic- α -ketoglutaric transaminase of muscles and fat-body of *C. euphorbiae* pupae with 10^{-2} M-isonicotinic acid hydrazide (INH) was noted.

2. Coenzyme does not dissociate out from the transaminase of pupal muscles on 24-48 hrs dialysis against phosphate buffer, but splits out on the dialysis against water, on heating to 60° and on 39 and 92% saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; dialysis against water and 92% saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cause simultaneous, partial inactivation of enzymic protein.

3. A 48 hrs dialysis against phosphate buffer increases approximately 3 times the transaminase activity of pupal muscles.

4. The transaminase activity of undialyzed pupal muscles is not changed upon the addition of pyridoxal phosphate up to 900 $\mu\text{g.}/\text{mg.}$ of protein. It is doubled however after dialysis on the addition of 100 $\mu\text{g.}$ of pyridoxal phosphate/ mg. of protein. Activation of pupal muscles transaminase upon the addition of coenzyme was compared with that of the same enzyme in pigeon heart muscle.

REFERENCES

- [1] Baxter C. F., Roberst E., *J. Biol. Chem.* **233**, 1135, 1958.
[2] Bełżecka K., Raczyńska-Bojanowska K., Heller J., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 195, 1959.
[3] Cammarata P. S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **193**, 45, 1951.
[4] Cammarata P. S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **193**, 53, 1951.
[5] Davison A. N., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 131, 1956.
[6] Levine V. E., Hansen W. G., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 248, 1959.
[7] Meister A., Sober H. A., Peterson E. A., *J. Biol. Chem.* **206**, 89, 1954.
[8] O'Kane D. E., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **170**, 425, 1947.
[9] Peterson E., Sober H. A., Meister A. in *Biochemical Preparation* **3**, 29, (ed. E. E. Snell) J. Wiley, Chapman and Hall, New York, London, 1953.
[10] Wada H., Yoshimatsu H., Kaizumi T., Iuone F., Ito K., Morisue T., Nasu H., Ito H., Sakamoto Y., Ichihara K., *Proceedings of International Symposium on Enzyme Chemistry* p. 148, (ed. K. Ichihara) Pergamon Press, London, 1957.
[11] Williams V., Neilands J. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **53**, 56, 1954.

TRANSAMINACJA U OWADÓW

II. ZWIĄZEK MIĘDZY ENZYMEM I KOENZYMEM W TRANSAMINAZIE:
KWAS ASPARAGINOWY-KWAS α -KETOGLUTAROWY U *C. EUPHORBIAE*

Streszczenie

1. Hydryzyd kwasu izonikotynowego (INH) w stężeniu 10^{-2} M hamuje całkowicie transaminazę: kwas asparaginowy-kwas α -ketoglutazarowy w mięśniach i ciele tłuszczowym poczwarki.

2. Koenzym nie odszczepia się od transaminazy mięśni poczwarki w czasie 24 - 48 godz. dializy w buforze fosforanowym, natomiast odszczepia się pod wpływem dializy w wodzie, grzania do 60° oraz nasycenia do 39 i 92% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dializa w wodzie i nasycenie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 92% powodują częściową inaktywację białka enzymu.

3. 48 godz. dializa w buforze fosforanowym powoduje ok. 3-krotną aktywację czynności transaminazy mięśni poczwarki.

4. Aktywność transaminazy mięśni poczwarki przed dializą nie zmienia się na skutek dodawania fosforanu pirydoksalu (do 900 $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka), natomiast po dializie wzrasta ok. dwukrotnie po dodaniu 100 μg fosforanu pirydoksalu/mg białka. Porównano aktywację transaminazy mięśni poczwarki pod wpływem dodawanego koenzymu z tym samym układem w mięśniu sercowym gołębia.

Otrzymano 31.12.1959 r.

MARIA TOCZKO, S. NIZIOŁEK, F. RYSZKA, W. BRZESKI i I. REIFER

BIOSYNTeza I PRZEMIANY ALKALOIDÓW W LUBINIE WĄSKOLISTNYM

I. ZMIANY SKŁADU ALKALOIDÓW WE WCZESNYCH STADIACH ROZWOJU ROŚLIN

*Zakład Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
i Katedra Biochemii SGGW, Warszawa
Kierownik: prof. dr I. Reifer*

Badania nad biosyntezą i przemianami alkaloidów w łubinie wąskolistnym są prowadzone w naszej pracowni od kilku lat. Wstępne doświadczenia [9] z jałowymi kulturami izolowanych zarodków i ich organów uwzględniały znane wówczas, typowe dla tego gatunku alkaloidy, tj. lupaninę i hydroksylupaninę, przy czym wykazano, że dla ich syntezy w początkowym okresie rozwoju rośliny niezbędna jest obecność liścienia.

W tym samym czasie i w następnych latach ukazało się kilka prac, w których stwierdzono obok lupaniny i hydroksylupaniny występowanie nowych, przedtem nie znanych alkaloidów w łubinie wąskolistnym [4, 15 16, 11, 2].

Te nowe spostrzeżenia skłoniły nas do zbadania wzajemnych przekształceń między alkaloidami w celu uzyskania podstawy do dalszych prac nad ich biosyntezą. W niniejszej pracy, jako pierwszej w serii badań nad biosyntezą i przemianami alkaloidów w łubinie wąskolistnym, przedstawiono wyniki obserwacji zmian jakościowego i ilościowego składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju tej rośliny.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny

Materiałem doświadczalnym były młode rośliny łubinu wąskolistnego, które hodowano z nasion odmiany „Wielkopolski gorzki“ w kulturach wazonowych i kulturach jałowych.

Kultury wazonowe. Nasiona wysiewano do wazonów z piaskiem nawilgoconym wodą wodociągową do 60% pojemności i hodowano rośliny w szklarni uzupełniając ubytki wody. Hodowlę prowadzono w ciągu jednego miesiąca (lipiec), przy czym w odstępach około 5-dniowych pobierano do analizy dwie równoległe próby po 10 roślin.

Kultury jałowe. Hodowlę roślin w warunkach jałowych przeprowadzono w probówkach Hagedorna z pożywką White'a zestaloną agarem. Do probówek odmierzano po 10 ml pożywki White'a [9] z dodatkiem 1% agaru i zamykano korkiem z waty. Probówki z pożywką wyjaławiano trzy razy po 30 min. w aparacie Kocha (temperatura około 100°).

Zdrowe i całe nasiona umieszczano w rozdzielaczu i przez około 5 min. płukano je dokładnie w letniej wodzie z dodatkiem detergenta (Patepon), a następnie przemywano kilkakrotnie wodą. W końcu dodawano nasyconej wody bromowej (około 3,5%), zamykano rozdzielacz korkiem z waty i pozostawiano na 5 min. Po usunięciu wody bromowej z rozdzielacza przepłukiwano nasiona wyjałowioną wodą wodociągową (zachowując warunki jałowości) aż do całkowitego wymycia śladów bromu, tj. około 6 razy po 200 ml wody.

Wyjałowione nasiona w rozdzielaczu i probówki z jałową pożywką przenoszono do szafki Hansena uprzednio wydezynfekowanej roztworem sublimatu i denaturatem. Po 30-minutowym naświetlaniu lampą kwarcową wprowadzano do każdej probówki po 10 nasion.

Jałowe kultury hodowano w naturalnych warunkach oświetlenia (luty-marzec) i w temperaturze około 10-20° w ciągu kilkunastu dni, przy czym w różnych odstępach czasu pobierano do analizy po dwie probówki z roślinami.

Metody analityczne

W przypadku kultur wazonowych analizowano materiał uzyskany przez zmielenie całych roślin uprzednio suszonych w temperaturze 60—70°. W doświadczeniach z jałowymi kulturami analizowano świeży materiał roślinny natychmiast po pobraniu prób, oddzielnie zarodki¹, liścienie i pożywkę. Ekstrakcję alkaloidów wykonano metodą Reifera i Niziołka [10], po czym oznaczano je chromatograficzną metodą Reifera, Przeździeckiej i Kleczkowskiej [11]. Krzywą standardową dla angustyfoliny wyznaczano podobnie jak dla alkaloidów opisanych w metodzie.

Przy interpretacji wyników konieczne było przyjęcie takiego sposobu przedstawienia wartości liczbowych, aby odnosiły się one do jednostki wielkości badanego materiału nie ulegającej zmianom.

¹ Określenie „zarodek” odnosi się zarówno do właściwego zarodka, jak i do rozwiniętej z niego rośliny, pozbawionej liścieni (część nadziemna plus korzeń).

Zmiany zawartości alkaloidów w zależności od różnych wielkości odniesienia podano w tablicy 1. Jak wynika z przytoczonych danych, zarówno świeża, jak i sucha masa rośliny nie jest odpowiednią wielkością odniesienia dla zmian zawartości alkaloidów, gdyż zmienia się wraz z rozwojem rośliny. Obrazem rzeczywistych zmian jest wyłącznie bezwzględna zawartość alkaloidów w jednej roślinie, która wykazuje stały wzrost.

T a b l i c a 1

Zmiany zawartości alkaloidów w zależności od różnych wielkości odniesienia

Wiek roślin (dni)	Masa jednej rośliny (g)		Zawartość alkaloidów (μg)		
	świeża	powietrznie sucha	na g świeżej masy	na g powietrznie suchej masy	na 1 roślinę
20	4,06	0,517	528,4	4149	2145
25	4,92	0,612	486,3	3910	2393
31	6,47	1,02	500,0	3169	3232

Zmiany w zawartości alkaloidów w różnych doświadczeniach wyrażano w procentach wartości początkowej, tj. w nasieniu. Było to uzasadnione tym, że początkowa zawartość alkaloidów w nasieniu, przyjęta za 100, często znacznie się różniła w różnych doświadczeniach (1170, 2080, 832 μg). Podane różnice są uzasadnione pochodzeniem materiału nasiennego z różnych zbiorów w związku z wykonywaniem doświadczeń w ciągu kilku lat. Nasiona w różnych doświadczeniach różniły się wielkością i masą, a zatem i bezwzględną zawartością alkaloidów, chociaż nie różniła się ona znacznie w odniesieniu do suchej masy. W obrębie jednego doświadczenia nie obserwowano natomiast znacznych wahań, a równoległe oznaczenia wynosiły np.: 206,1 i 201,8 μg ; 1275,8 i 1322,4 μg ; 1824,3 i 1719,0 μg .

WYNIKI

Wstępne doświadczenia przeprowadzono w wazonach, tj. w warunkach zbliżonych do naturalnych warunków polowych. W tablicy 2 są przedstawione zmiany zawartości poszczególnych alkaloidów i ich sumy w całej masie rozwijającej się rośliny. Jak widać, począwszy od 10 dnia rozwoju zwiększa się suma alkaloidów, przy czym jest różny udział poszczególnych alkaloidów w ogólnej syntezie. W czasie trwania całego doświadczenia, oprócz 4 dnia, obserwuje się dość regularny spadek zawartości lupaniny niemal do połowy początkowej wartości w nasieniu, a hydroksylupanina utrzymuje się na mniej więcej stałym poziomie. Wzrost ogólnej zawartości alkaloidów jest zatem wynikiem powstawania oksylu-

paniny² i angustyfoliny, które nie występują w nasieniu lub występują tylko w nieznacznych ilościach.

Angustyfolina, którą wykryto w suchych nasionach, zanika zupełnie po 4 dniach rozwoju i znów pojawia się w ilościach śladowych w 10 dniu. Dopiero po 25 dniach wzrasta znacznie jej zawartość, stanowiąc w końcu doświadczenia 16,5% (45,6 z 275) sumy alkaloidów. Oksylupanina pojawia się dopiero w 10 dniu i bardzo szybko przyrasta, tak że pod koniec doświadczenia stanowi powyżej 50% sumy alkaloidów.

Tablica 2

Zmiany składu alkaloidów w roślinach w ciągu 31 dni rozwoju w kulturach wazonowych

Wiek roślin (dni)	Zawartość alkaloidów w jednej roślinie (w % sumy alkaloidów w nasieniu)				
	lupanina	hydroksylupanina	oksylupanina	angustyfolina	suma alkaloidów
0	70,5	28,3	0,0	1,1	100*
4	11,5	6,0	0,0	0,0	17,5
10	60,4	26,2	23,2	śl.	110
15	58,8	30,5	61,5	śl.	151
20	68,1	20,3	93,5	śl.	182
25	46,9	27,4	95,6	32,9	203
31	41,5	31,5	156,0	45,6	275

* Suma alkaloidów w nasieniu wynosiła 1170 µg.

W czwartym dniu rozwoju młodych roślin obserwuje się znaczny spadek, ponad 80% sumy alkaloidów w porównaniu z nasionami. Spadek ten był prawdopodobnie spowodowany przenikaniem alkaloidów do podłoża, w którym mogą one ulegać mikrobiologicznemu rozkładowi [5, 6]. W związku z tą obserwacją należy podkreślić, że między 4 a 10 dniem rozwoju następuje znów kilkakrotny wzrost zawartości lupaniny i hydroksylupaniny, które w tym czasie osiągają poziom niemal jak w nasionach.

Opisane wyniki doświadczenia wazonowego wskazywały, że w ciągu pierwszego miesiąca rozwoju rośliny ulega znacznym zmianom nie tylko ilościowym, lecz i jakościowym skład alkaloidów, szczególnie w odniesieniu do angustyfoliny i oksylupaniny. W dalszym ciągu było zatem interesujące zbadanie, jak zmienia się skład alkaloidów w młodych rozwijających się zarodkach i liścieniach. W tym celu zrobiono doświadczenia, w których dla uniknięcia możliwości niepożądanych wpływów mikrobiologicznych zastosowano jałowe kultury roślin.

² Nie zidentyfikowana substancja o R_f oksylupaniny.

T a b l i c a 3

Zmiany zawartości alkaloidów w zarodkach i liściach w ciągu 10 dni rozwoju roślin w kulturach jałowych

Wiek roślin (dni)	Zawartość alkaloidów w jednej roślinie (r) i w jej częściach: w jednym zarodku (z) lub dwóch liściach (l)																													
	(w % sumy w nasieniu)																													
	lupanina						hydroksylupanina						oksyłupanina						angustyfolina						suma alkaloidów					
	z		l		r		z		l		r		z		l		r		z		l		r		z		l		r	
0	0,1	60,8	60,9	0,5	37,8	38,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,8	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	99,4	100*					
2	3,8	33,4	37,2	2,7	18,3	21,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4	51,7	59,1					
4	10,2	12,2	22,4	7,1	10,1	17,2	1,0	śl.	1,0	śl.	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,3	22,3	40,6					
7	15,0	13,1	28,1	5,6	21,2	26,8	7,2	8,0	15,2	8,0	15,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,8	42,3	70,1					
10	13,0	10,3	23,3	14,0	15,0	29,0	13,8	12,0	25,8	12,0	25,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,8	37,3	78,1					

* Suma alkaloidów w nasieniu wynosiła 2080 µg.

T a b l i c a 4

Zmiany składu alkaloidów w zarodkach, liściach i pożywce w ciągu 14 dni rozwoju roślin w kulturach jałowych

Wiek roślin (dni)	Zawartość alkaloidów w kulturze jednej rośliny (k) oraz w jej frakcjach: jednym zarodku (z), dwóch liściach (l) i pożywce (p)																																							
	(w % sumy alkaloidów w nasieniu)																																							
	lupanina								hydroksylupanina								oksyłupanina								angustyfolina								suma alkaloidów							
	z		l		p		k		z		l		p		k		z		l		p		k		z		l		p		k									
0	0,3	50,0	0,0	50,3	0,4	33,4	0,0	33,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	99,3	0,0	100*													
4	2,7	45,9	10,6	59,2	2,3	25,2	3,5	31,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	7,3	11,4	0,0	5,0	75,2	21,4	102														
10	26,6	44,7	16,1	87,4	11,9	26,7	4,0	42,6	15,4	0,0	0,0	15,4	4,5	14,7	6,0	25,2	58,4	86,1	26,1	171																				
14	87,0	36,9	4,0	127,9	16,3	23,3	0,0	39,6	26,8	34,7	0,0	61,5	33,0	9,9	0,0	42,9	163,1	104,8	4,0	272																				

* Suma alkaloidów w nasieniu wynosiła 832 µg.

Wyniki analizowanych zarodków i liścieni w ciągu 10 dni rozwoju podane są w tablicy 3. Z przytoczonych danych wynika, podobnie jak i w poprzednim doświadczeniu wazonowym, że do 4 dnia rozwoju następuje spadek sumy alkaloidów w całej roślinie. W 7 i 10 dniu obserwuje się natomiast ponowny wzrost sumy alkaloidów w całej roślinie, chociaż do końca doświadczenia nie osiąga ona początkowego poziomu w nasieniu. Natomiast zupełnie inny obraz daje analiza zmian zawartości alkaloidów w zarodkach i liścieniach. Suma alkaloidów w zarodku przyrasta systematycznie przez cały czas rozwoju, podczas gdy w liścieniach obserwuje się znaczny spadek. Zawartość poszczególnych alkaloidów zmienia się także w różny sposób w zarodkach i liścieniach. W zarodkach następuje ciągle gromadzenie się lupaniny i hydroksylupaniny. Angustyfolinę wykryto tylko w 2 dniu, zaś oksylupanina pojawia się w 4 dniu i dalej znacznie przyrasta. Przez cały czas rozwoju rośliny spada natomiast silnie (sześciokrotnie) zawartość lupaniny w liścieniach, w słabszym stopniu maleje zawartość hydroksylupaniny (dwukrotnie), a minimalne ilości angustyfoliny występują tylko w kontrolnych liścieniach. Jednakże oksylupanina pojawia się w śladowych ilościach w liścieniach w 4 dniu i dalej przyrasta, podobnie jak w zarodku.

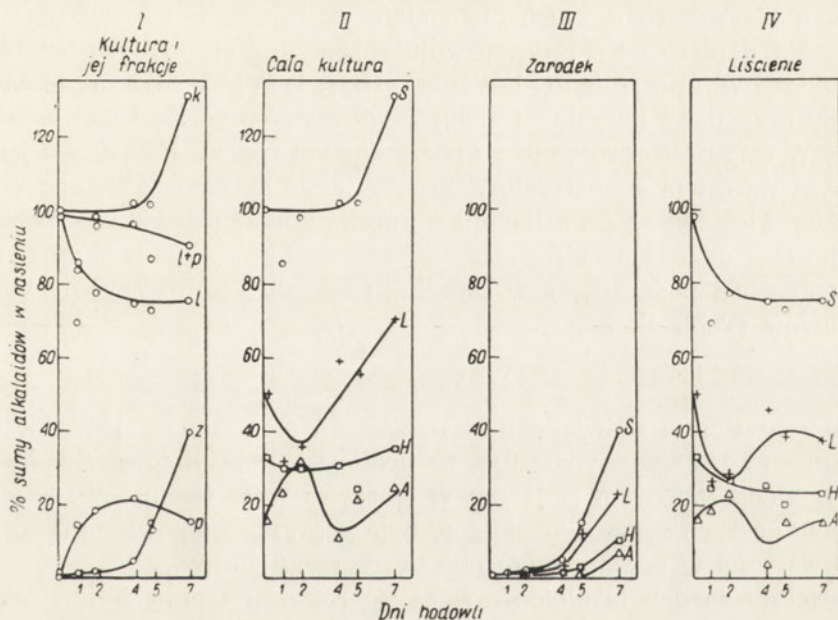
Ogólny obraz zmian składu alkaloidów w opisanym doświadczeniu z kulturami jałowymi jest zgodny z wynikami dla kultur wazonowych (Tabl. 2), ponadto jednak doświadczenie to uwidocznilo znaczne różnice ilościowe i jakościowe, a w przypadku lupaniny i hydroksylupaniny nawet różny kierunek zmian w zarodkach w porównaniu z liścieniami.

W opisanym doświadczeniu z kulturami jałowymi obserwowano początkowy spadek ogólnej zawartości alkaloidów, który mógł być spowodowany przenikaniem ich do pożywki. W celu zbilansowania alkaloidów w całej kulturze wykonano jeszcze jedno podobne doświadczenie, z tą tylko różnicą, że w czasie rozwoju roślin analizowano oddzielnie nie tylko zarodki i liścienie, lecz także pożywkę. Wyniki doświadczenia podane są w tablicy 4.

Jak widać z wyników, suma alkaloidów w przeliczeniu na kulturę, tj. jedną roślinę i przypadającą jej pożywkę, nie maleje, lecz utrzymuje się początkowo na stałym poziomie, a po 4 dniu rozwoju stale wzrasta. Wzrost ten jest spowodowany wzrostem w zarodku, gdyż początkowa suma alkaloidów (5,62 μg) zwiększa się przeszło 240 razy (do 1360 μg). W liścieniach obserwuje się pewien spadek sumy alkaloidów, około 20%, tj. 200 μg , ale w 10 dniu następuje już ponowny przyrost i w 14 dniu osiąga on początkowy poziom alkaloidów. Początkowemu spadkowi w liścieniu odpowiada w przybliżeniu pojawienie się alkaloidów w pożywce, lecz ich zawartość zmniejsza się pod koniec doświadczenia do 4% sumy wyjściowej.

Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, w zarodkach obserwuje się od początku regularny przyrost lupaniny, niemal 300-krotny, i hydroksylupaniny, około 40-krotny, zaś angustyfolina i oksylupanina pojawiają się dopiero między 4 a 10 dniem i przyrastają do końca doświadczenia. W liścieniach wyraźnie obniża się zawartość lupaniny i hydroksylupaniny. Zawartość angustyfoliny waha się i przyjmuje zmienne wartości od 16 do 40% całości, a oksylupanina pojawia się w liścieniach dopiero w ostatnim dniu doświadczenia. W pożywce utrzymuje się najdłużej i w największej ilości lupanina. Hydroksylupaniny i angustyfoliny nie znajduje się już w ostatnim dniu doświadczenia, natomiast oksylupaniny w ogóle nie wykryto w pożywce.

W opisanych wynikach należy zwrócić uwagę na dwa interesujące fakty w początkowym okresie rozwoju roślin: znaczne wahania zawartości



Rys. 1. Zmiany składu alkaloidów w ciągu 7 dni rozwoju roślin w kulturach jałowych. Wyniki podane w % sumy alkaloidów w nasieniu, która wynosiła 832 μg . I. Suma alkaloidów w (k) kulturze, (z) zarodku, (l) liścieniach, (p) pożywce. II. Poszczególne alkaloidy w kulturze, III — w zarodku, IV — w liścieniach.

(+) Lupanina, L, (\square) Hydroksylupanina, H, (Δ) Angustyfolina, A, (\circ) suma alkaloidów, S.

angustyfoliny w liścieniach od początku doświadczenia aż do 10 dnia, oraz pojawianie się angustyfoliny i oksylupaniny w zarodkach między 4 a 10 dniem. Fakty te skłoniły nas do bardziej szczegółowego przeanalizowania

zowania zmian alkaloidów w początkowym okresie rozwoju. Na rysunku 1 przedstawiono graficznie te zmiany badane w 1, 2, 4, 5, 7 dniu rozwoju roślin.

Z podanych wyników widać, że spadek sumy alkaloidów w liścieniach (Rys. 1, I) następuje tylko do 4 dnia, przy czym odpowiada on początkowemu pojawianiu się alkaloidów w pożywce, podczas gdy łączna ich suma w liścieniach i pożywce niemal nie zmienia się. W zarodkach występuje w tym czasie nieznaczny tylko przyrost alkaloidów, a dopiero od 4 dnia rozpoczyna się bardzo intensywny ich wzrost.

Obserwacja ta znajduje potwierdzenie w analizie zmian w zarodku (Rys. 1, III), które ponadto wykazały, że najszybszy jest przyrost lupaniny, i że do 7 dnia rozwoju nie występuje oksylupanina.

Analiza poszczególnych alkaloidów w kulturze (Rys. 1, II) wykazuje, że największym zmianom podlega lupanina i angustyfolina, przy czym w ciągu pierwszych czterech dni zmiany te biegną w przeciwnych kierunkach i dopiero od 4 dnia rozwoju rozpoczyna się synteza obydwóch alkaloidów. Wykres zmian w liścieniach (Rys. 1, IV) uwidacznia, że współzależne przemiany lupaniny i angustyfoliny dokonują się tylko w liścieniach. W ciągu 4 dni rozwoju po początkowym spadku lupaniny z jednoczesnym wzrostem angustyfoliny obserwuje się następową zmianę w odwrotnym kierunku, a po ustaleniu się mniej więcej pierwotnego poziomu w 4 dniu nie dokonują się już znaczniejsze zmiany w liścieniach do 14 dnia doświadczenia, podczas gdy w zarodkach ma miejsce intensywny wzrost alkaloidów (Tabl. 4).

DYSKUSJA

Nasze wstępne doświadczenia wazonowe, a zwłaszcza doświadczenia z kulturami jałowymi wykazują, że ilościowy i jakościowy skład alkaloidów ulega znacznym zmianom w czasie rozwoju rośliny. W doświadczeniach naszych synteza alkaloidów była poprzedzona pewnym spadkiem ich zawartości w początkowym okresie rozwoju rośliny.

Podobny spadek alkaloidów w czasie rozwoju łubinu żółtego obserwowali już wcześniej Sabalitschka i Jungermann [12]. Autorzy ci na podstawie dalszych doświadczeń [13] sądzą, że alkaloidy są zużywane w metabolizmie rośliny. Twierdzą oni, że nasiona wydzielają wprawdzie alkaloidy do podłoża, jednak tylko wtedy, gdy jest zbyt duża wilgotność, co wiąże się bezpośrednio z osłabieniem siły kiełkowania. Jednak na podstawie naszych doświadczeń uważamy, że początkowy spadek alkaloidów wynika głównie z ich przenikania do podłoża. W doświadczeniu, w którym analizowano także pożywkę (Tabl. 4), nie obserwowaliśmy spadku alkaloidów w kulturze, gdyż widoczny ich ubytek z rośliny znajdował się w pożywce. Przenikanie alkaloidów do podłoża obserwował także Nowacki [7].

Wszyscy wymienieni autorzy są zgodni pod tym względem, że zjawisko to występuje tylko w początkowym okresie rozwoju. Naszym zdaniem alkaloidy dopóty dyfundują z nasion, dopóki nasiona nie przejdą w stan fizjologicznie czynny. Jak widać z tablicy 4, od 10 dnia, tj. z chwilą gdy rośliny mają już rozwinięty system korzeniowy, mogą one pochłaniać alkaloidy z podłoża. Dlatego też jest możliwe, że Sabalitschka i Jungermann nie zdołali zaobserwować alkaloidów w podłożu, gdyż były one prawdopodobnie pochłaniane przez normalnie rozwijające się rośliny, natomiast obserwowali oni alkaloidy w podłożach zbyt silnie nawilgoconych, na których nasiona utraciły zdolność kiełkowania, a przenikanie mogło tylko następować na podstawie osmozy.

Z przedstawionych doświadczeń widać, że począwszy od 4 dnia następuje synteza sumy alkaloidów. Bardzo silny przyrost zaobserwowano w zarodkach, co nie dowodzi jednak, że alkaloidy są syntetyzowane wyłącznie w zarodku. Równie dobrze mogą one powstawać w tym okresie w liścieniach i przenikać z liścieni do zarodka.

Podobnie jak kilku innych autorów [4, 15, 7, 1] wykazaliśmy, że udział poszczególnych alkaloidów w roślinie ulega zmianom w różnych okresach rozwoju. W nasionach obserwuje się wyłącznie lupaninę i hydroksylupaninę, a tylko ślady angustyfoliny i dopiero w czasie rozwoju młodych roślin pojawiają się bardzo duże ilości angustyfoliny i oksylupaniny. W żadnym przypadku nie stwierdziliśmy obecności sparteiny, co nasuwa pytanie, czy sparteina jest, jak przypuszczają niektórzy autorzy, podstawowym alkaloidem, z którego na skutek utleniania powstaje lupanina, hydroksylupanina [14, 3, 4, 7] oraz ewentualnie oksylupanina. Przypuszczalny schemat: sparteina \rightarrow lupanina \rightarrow hydroksylupanina \rightarrow oksylupanina, wydawałby się uzasadniony, szczególnie w świetle prac Nowackiego i Bireckiej [7, 8, 1], w których dowiedziono utlenianie wprowadzonej do rośliny sparteiny, gdyby nie obserwowana przez nas w liścieniach odwrotna współzależność zmian zawartości lupaniny i angustyfoliny przy stałym poziomie hydroksylupaniny (Rys. 1, I). Oksylupanina pojawia się w liścieniach później od angustyfoliny. Zupełnie niejasna wydaje się tu pozycja angustyfoliny, która jako alkaloid o mniejszej liczbie atomów węgla w cząsteczce mogłaby stanowić raczej jeden z dalszych produktów przemiany alkaloidów. Przypuszczenie to nie tłumaczy jej ścisłej współzależności z lupaniną znajdującą się w początkowym ogniwie przemian tych alkaloidów w przypuszczalnym schemacie.

Szczególnie interesujący wydał się nam początkowy okres (do czterech dni) rozwoju roślin łubinu. Wahania zawartości poszczególnych alkaloidów w tym czasie wskazują, że jest to okres organizacji młodej rośliny, w którym dokonują się różnokierunkowe i szybkie przekształcenia między alkaloidami.

STRESZCZENIE

1. Zbadano zmiany jakościowego i ilościowego składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju łubinu wąskolistnego w kulturach wazonowych i jałowych.

2. W pierwszych dniach rozwoju rośliny stwierdzono spadek ogólnej zawartości alkaloidów, który związany jest z ich przenikaniem do podłoża. Przenikanie to ustaje około 4 dnia.

3. W rozwoju rośliny zaobserwowano występowanie wczesnego stadium, w którym przebiegają w liścieniach różnokierunkowe i szybkie przekształcenia między alkaloidami, przy czym przyrost alkaloidów w zarodkach jest nieznaczny. Od około 4 dnia stwierdzono intensywną syntezę alkaloidów w roślinie.

4. W zarodku wykazano najwcześniejszy i największy przyrost lupaniny, podczas gdy najpóźniej pojawia się oksylupanina. Ponadto obserwowano syntezę hydroksylupaniny i angustyfoliny, a obecności innych alkaloidów nie wykryto.

LITERATURA

- [1] Birecka H., Rybicka H., Ścibor-Marchocka A. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 25, 1959.
- [2] Bratek M. D., Wiewiórowski M. *Roczn. Chemii* **33**, 1187, 1959.
- [3] Hegnauer R. Th. *Abhandl. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Biol. Geol.* **7**, 10, 1956.
- [4] Kuy A., *Bijdrage tot de kennis vcn alkaloide-vorming bij ekele species van het genus Lupinus*, teza doktorska, S. Gravenhagen, 1956.
- [5] Lypacewicz J. *Acta Soc. Bot. Polon.* **7**, 252, 1930.
- [6] Możejko-Toczko M. *Acta Microbiol. Polon.*, w druku, 1960 r.
- [7] Nowacki E. *Roczniki Nauk Roln.* **79-A**, 505, 1958.
- [8] Nowacki E. *Bull. Acad. Polon. Scienc. Cl. II*, **6**, 11, 1958.
- [9] Reifer I., Kleczkowska D. *Acta Biochim. Polon.* **4**, 135, 1957.
- [10] Reifer I., Niziołek S. *Acta Biochim. Polon.* **4**, 165, 1957.
- [11] Reifer I., Przeździecka J., Kleczkowska D. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 17, 1959.
- [12] Sabalitschka Th., Jungermann C. *Biochem. Z.* **163**, 445, 1925.
- [12] Sabalitschka Th., Jungermann C. *Pharmaceut. Zentrallhalle für Deutschland* **66**, 474 i 501, 1925.
- [14] Schöpf C., Arm H., Benz G., Krimm H. *Naturwiss.* **38**, 196, 1951.
- [15] Schwarze P., Hackbarth J. *Der Züchter* **27**, 332, 1957.
- [16] Wiewiórowski M., Bratek M. D. *Acta Soc. Bot. Polon.* **26**, 129, 1957.

BIOSYNTHESIS AND CHANGES OF ALKALOID CONTENT IN
LUPINUS ANGUSTIFOLIUS

I. CHANGES IN CONTENT OF ALKALOIDS IN THE EARLY STAGES OF GROWTH

Summary

1. The qualitative and quantitative changes in the content of various alkaloids during the early stages of plant growth were investigated in sterile and pot cultures.

2. A decrease in total alkaloids was observed in the plant during the first few days of growth, owing to migration of the alkaloids into the medium. Afterwards the release ceased and the alkaloids from the medium were again taken in by the roots.

3. Two strictly defined stages were observed in the early growth of the plant. The first stage up to the fourth day is characterised by rapid changes in the quantitative set up of the alkaloids in the cotyledons. In the second stage, from the fourth day onward, an intensive synthesis of all alkaloids in the plant has been observed.

4. Lupanine was the first, oxylupanine the last alkaloid to be synthesised in large quantities in the young seedlings. Biosynthesis of hydroxylupanine and angustifoline was also observed, and no other alkaloids could be detected.

Otrzymano 2.1.1960 r.

M. ŻYDOWO

**DEZAMINAZY KWASU ADENILOWEGO I ADENOZYNY
W NERCE SZCZURA ****Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk**Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

Wiadomo od dawna, że enzymy odczepiające grupę aminową od pochodnych adeninowych są dość rozpowszechnione w tkankach zwierzęcych. O ile jednak większość tkanek z łatwością dezaminuje adenozyne [4, 10], to rozkład kwasu adenilowego do kwasu inozynowego stwierdzono tylko w mięśniach [13, 22], we krwi [15] i w mózgu [23]. Z drugiej strony, znaczna szybkość wbudowywania izotopowego azotu amonowego w grupę 6-aminową kwasu adenilowego [11, 17] każe myśleć o jakiejś szczególnej biologicznej roli reakcji odczepienia grupy aminowej od kwasu adenilowego. Wyniki obecnej pracy świadczą o tym, że poza wymienionymi wyżej trzema tkankami, także i nerka szczura zawiera swoistą dezaminazę kwasu adenilowego, ale dla uwidocznienia jej aktywności należy ją odzielić od dezaminazy adenozyiny i od fosfatazy.

METODY DOŚWIADCZALNE

Przygotowanie frakcji nerkowych. Do doświadczeń użyto nerki białych szczurów, usunięte po krótkiej narkozie chloroformowej. Po dekapulacji, nerki wrzucano do lodowato-zimnego, 0,1 M roztworu KCl, w obojętnym 0,039 M buforze boranowym. Nerki ważono, przemywano tym roztworem, a następnie homogenizowano w 7,5 objętościach tegoż roztworu, chłodząc homogenizator Potter-Elvehjem'a wodą z lodem. Homogenat wirowano w ok. 600 g przez 5 min. w wirówce umieszczonej w chłodni o temperaturze 0°, otrzymując osad nie rozbitych komórek, jąder i ewentualnie nie wypłukanych krwinek (OI), oraz płyn nad osadem (SI) będący zawiesiną mniejszych tworów cytoplazmatycznych

* Tymczasowe doniesienie z części wyników tej pracy ogłoszono w *Nature* (London) 184, 1641, 1959.

w rozcieńczonej cytoplazmie. Ten płyn wirowano ponownie przez 15 min. w ok. 16 000 g, w wirówce chłodzonej jedynie wodą z kranu; otrzymywano po tym wirowaniu osad (OII), który będzie nazywany dalej frakcją mitochondrialną, oraz klarowny płyn nad osadem (SII), zawierający rozpuszczalne składniki cytoplazmy. Wszystkie frakcje przeznaczone do inkubacji z kwasem adenilowym lub adenozyną dializowano następnie przez 24 godz. wobec wody destylowanej w 0°. Po tym czasie, z frakcji SII wypadał osad białka, które łatwo rozpuszczało się po dodaniu KCl, a które nazwano globulinami cytoplazmy (SIIG); pozostałe w roztworze białka cytoplazmy będą nazywane w dalszym ciągu tej publikacji albuminami cytoplazmy i będą oznaczane symbolem SIIA.

Morfologiczny obraz osadów otrzymanych przez wirowanie (OI oraz OII) kontrolowano przez rozmazanie kropli świeżego osadu na szkiełku podstawowym i zabarwienie hematoksyliną żelazistą po utrwaleniu w formalinie; frakcja mitochondrialna (OII) składała się z drobnych, słabo barwiących się ziarnistości bez żadnych domieszek jąder czy innych tworów komórkowych. Preparaty te sporządzała dr T. Wrzółkowa z Zakładu Anatomii Patologicznej A. M. G., za co jej bardzo dziękuję.

Oznaczanie aktywności enzymatycznych. Inkubację przeprowadzano w 25°, zwykle przez 30 min. Jeżeli substratem był mięśniowy kwas adenilowy (AMP), wówczas stężenia poszczególnych związków w mieszaninie inkubacyjnej były następujące: AMP 0,005 M, KCl 0,1 M, bufor bursztynianowy o pH 6,0 0,025 M; oraz białko w ilości odpowiadającej 0,1 do 0,3 mg azotu białkowego; końcowa objętość płynu 2 ml. Reakcję rozpoczynano przez dodanie białka, a przerywano przez dodanie 1 ml 15% kwasu trójchlorooctowego. Jeżeli warunki były inne, to zaznaczono to w tekście. Odbiałczone płyny inkubacyjne sączono przez sączki z bibuły Macherey & Nagel S61, która zawiera najmniejsze ilości amoniaku spośród bibuły wypróbowanych przez nas.

Aktywność nieswoistej fosfatazy oznaczano przez inkubację frakcji nerkowych z β -glicerofosforanem sodowym w stężeniu 0,005 M lub z fosforanem fenoloftaleiny w stężeniu 0,001 M, w buforze bursztynianowym o pH 5,0 lub w buforze 2-amino-2-hydroksymetylopropan-1,3-diol-HCl (tris) o pH 9,0. Miarą aktywności fosfatazy w wypadku glicerofosforanu jako substratu było stężenie nieorganicznego fosforanu, w wypadku fosforanu fenoloftaleiny natężenie zabarwienia próby po przerwaniu reakcji glicynowym buforem o pH 11, zawierającym pirofosforan sodowy [9].

Aktywność dezaminazy adenozyń oznaczano według Kalckara [10], śledząc przy pomocy spektrofotometru SF-4 spadek absorpcji roztworu adenozyń w 265 m μ .

Przy wszystkich oznaczeniach enzymatycznych wykonywano równoległe ślepe próby substratowe i enzymatyczne.

Oznaczanie amoniaku. W przesączach poinkubacyjnych oznaczano amoniak podchlorynową metodą Van Slyke'a w modyfikacji Russela [21], po absorpcji amoniaku w 0,01 M-HCl, w mikrodyfuzyjnych naczynkach Conway'a [3].

Oznaczanie fosforanu nieorganicznego. Oznaczanie wykonywano według Gomori'ego [7], w fotometrze Coleman-14.

Azot białkowy dializowanych frakcji. Oznaczano go metodą Kjeldahla w aparacie Parnasa i Wagnera, używając przy spalaniu CuSO_4 jako katalizatora i odbierając destylat do kwasu borowego z czerwienią metylową.

Chromatografia bibułowa. Płynty po inkubacji przeznaczone do chromatografii odbiałczano przez wstawienie na 5 min. do wrzącej łaźni wodnej lub dodanie kwasu trójchlorooctowego do końcowego stężenia 5%; w tym ostatnim wypadku ekstrahowano następnie kwas trójchlorooctowy eterem. Rozdział nukleozydów i nukleotydów uzyskiwano przez jednowymiarową chromatografię zstępującą na bibule Macherey-Nagel S61 lub Whatman 1, stosując rozpuszczalnik podany przez Deutscha i Nilssona [6]. Plamy uwidacziano przez sfotografowanie chromatogramu w świetle lampy kwarcowej na bardzo twardym światłoczułym papierze chlorowym produkcji Bydgoskich Zakładów Fotochemicznych.

Używane odczynniki. AMP był preparatem mięśniowego kwasu adenilowego firmy „Zellstoffabrik Waldhof“. Adenozyna, inozyna oraz sól barowa kwasu inozynowego używane do identyfikacji plam chromatograficznych były produktem firmy L. Light. Tę ostatnią przed użyciem do chromatografii przeprowadzano w sól sodową przez zmieszanie z ekwiwalentną ilością Na_2SO_4 . Tris i fosforan fenoloftaleiny (sól dwusodowa estru dwufosforowego fenoloftaleiny) pochodziły także z firmy L. Light. Kwas bursztynowy był oznakowany: Apotekarnes Droghandelsaktiebolag, Stockholm. Reszta odczynników pochodziła z Fabryki Odczynników Chemicznych w Gliwicach. Otrzymanie preparatu inozyny i trisu zawdzięczaam Doktorowi S. V. Perry'emu, za co mu bardzo dziękuję.

WYNIKI

Homogenat nerki inkubowany z AMP wytwarza zarówno amoniak, jak i nieorganiczny ortofosforan. Z tablicy 1 widać, że aktywność fosfatazy AMP jest skoncentrowana głównie we frakcji mitochondrialnej nerki. Globuliny cytoplazmy są jedyną frakcją, która powoduje, że liczba grup aminowych odczepionych od AMP jest większa, aniżeli liczba odczepionych reszt fosforanowych; można by więc przypuszczać, że dezaminacji ulega kwas adenilowy a nie adenozyna. Mitochondria nerki nie zawierają prawie dezaminazy AMP, wobec tego użyto ich jako fosfatazy w doświad-

T a b l i c a 1

Aktywność fosfatazy AMP i dezaminazy AMP w nerce szczura

Warunki doświadczenia jak opisano w tekście. Wyniki wyrażono ilością nieorganicznego fosforanu lub amoniaku uwolnioną w ciągu 30 minut w przeliczeniu na ilość białka odpowiadającą 1 mg azotu białkowego. Litery a, b, c oznaczają nerki różnych szczurów

Frakcja		$\mu\text{moli P/mg N}_b \times 30\text{min.}$	$\mu\text{moli NH}_3/\text{mg N}_b \times 30\text{min.}$
Homogenat	a	4,42	3,42
	b	3,23	1,89
	c	3,98	2,58
Frakcja mitochondrialna (OII)	a	14,70	1,71
	b	7,23	0,00
	c	8,85	0,80
Albuminy cytoplazmy (SIIA)	a	1,40	2,68
	b	1,33	0,56
	c	1,05	1,11
Globuliny cytoplazmy (SIIG)	a	1,21	5,65
	b	1,43	5,45
	c	1,82	7,87

czeniu przedstawionym w tabelicy 2. Doświadczenie to miało wykazać, czy globulinowa frakcja cytoplazmy zawiera rzeczywiście swoistą dezaminazę AMP, nie działającą na adenozyne, oraz w jakiej frakcji zawarta jest dezaminaza adenozyne.

Ilość amoniaku odczepiona od AMP przez frakcję globulinową jest praktycznie taka sama zarówno wtedy, kiedy do inkubacji wzięto samą frakcję globulinową, jak i wtedy, kiedy dodano mitochondriów do frakcji globulinowej. W tym ostatnim przypadku ilość odczepionego fosforanu jest oczywiście znacznie wyższa. Można stąd wnosić, że globuliny cytoplazmy nerki nie dezaminują adenozyne, powstałej po odczepieniu fosforanu od AMP. Inaczej przedstawia się sprawa z frakcją albuminową cytoplazmy. Frakcja ta uwalnia amoniak z AMP w sposób wyraźny dopiero wówczas, kiedy działaniem mitochondriów odczepi się reszta kwasu ortofosforowego.

Wynikający z powyższych doświadczeń wniosek, że przez dializę cytoplazmy nerki wobec wody destylowanej można oddzielić dezaminazę adenozyne od dezaminazy AMP, sprawdzono w doświadczeniu, którego wynik przedstawiono na rys. 1. Adenozyne po inkubacji z frakcją globulinową daje jedną plamę na chromatogramie; nie jest rozkładana przez globuliny cytoplazmy. Frakcja ta rozkłada natomiast AMP do kwasu inozynowego (IMP). Globuliny mają także niewielką aktywność fosfatazową.

co widać z tablicy 1. Albuminy cytoplazmy dezaminują adenozyne do inozyny, nie odczepiają natomiast grupy aminowej od AMP.

Nerka szczura posiada zatem zarówno dezaminazę adenilową, jak i adenozynową. Opisane wyżej reakcje enzymatyczne prowadzono w pH 6, ponieważ takie optimum pH ma dezaminaza adenilowa mięśnia szkieletowego [14]. Jednakże optimum pH dla aktywności dezaminazy adenilowej zawartej we frakcji globulinowej nerki szczura leży w obojętnym pH, jak to widać na rys. 2. Podobnie, w oddziaływaniu obojętnym najsilniej działa dezaminaza adenozyne zawarta w albuminach cytoplazmy, ale jest ona aktywna w nieco szerszym zakresie pH aniżeli dezaminaza adenilowa.

Tablica 2

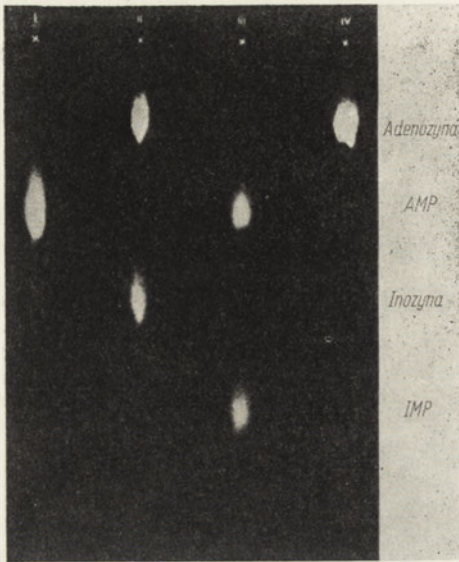
Lokalizacja dezaminazy adenozyne i dezaminazy AMP we frakcjach nerki szczura

Do poszczególnych prób dawano: 0,2 ml 0,05 M-AMP, 0,2 ml 1 M-KCl, 1 ml buforu bursztynianowego o pH 6, wody destylowanej tyle, ażeby końcowa objętość wynosiła 2,0 ml, oraz po 0,3 ml poszczególnych frakcji komórkowych. Po 30 min. inkubacji w 25° odbliaczano przez dodanie 1 ml 15% kwasu trójchlorooctowego, sączono ilościowo do kalibrowanej probówki, dopełniano wodą do 10 ml i oznaczano nieorganiczny fosforan oraz amoniak. Wyniki wyrażono w bezwzględnej liczbie mikromoli fosforu lub amoniaku uwolnionego w próbie

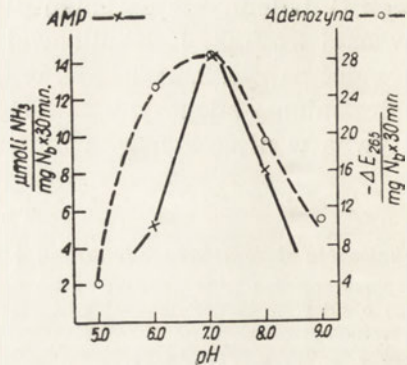
Frakcje		$\mu\text{moli P}$	$\mu\text{moli NH}_3$
Frakcja mitochondrialna	a	4,11	0,48
	b	2,02	0,00
	c	2,18	0,20
Albuminy cytoplazmy	a	0,35	0,67
	b	0,24	0,10
	c	0,19	0,20
Globuliny cytoplazmy	a	0,35	1,64
	b	0,40	1,53
	c	0,40	1,73
Albuminy cytoplazmy + frakcja mitochondrialna	a	4,52	2,60
	b	2,50	1,63
	c	2,66	1,73
Globuliny cytoplazmy + frakcja mitochondrialna	a	4,00	2,03
	b	2,42	1,43
	c	2,50	1,63

Globulinowa frakcja cytoplazmy wykazuje wciąż pewną aktywność fosfatazy; powstaje pytanie, czy jest to swoista fosfataza AMP (5'-nukleotydydaza), czy też fosfataza nieswoista. Dla uzyskania pewnych wskazówek, przeprowadzono serię doświadczeń, w których inkubowano nerkowe frakcje z β -glicerofosforanem i z fosforanem fenoloftaleiny w pH 5 i w pH 9. Wyniki tych doświadczeń przedstawia tablica 3. Widzimy, że w zasado-

wym środowisku globulinowa frakcja cytoplazmy katalizuje rozkład zarówno β -glicerofosforanu, jak i fosforanu fenoloftaleiny. Aktywność kwaśnej fosfatazy jest większa we frakcji albuminowej, ale i frakcja globuli-



Rys. 1. Chromatogram odbiałczonych płynów po inkubacji cytoplazmatycznych frakcji nerki z AMP i z adenozyzną: (I) Frakcja albuminowa (SIIA) inkubowana z AMP, (II) Frakcja albuminowa (SIIA) inkubowana z adenozyzną, (III) Frakcja globulinowa (SIIG) inkubowana z AMP, (IV) Frakcja globulinowa (SIIG) inkubowana z adenozyzną. Inkubacja 45 minut w 25° w warunkach opisanych w tekście. Chromatografia zstępująca na bibule Whatman 1; rozpuszczalnik: nasycony siarczan amonowy — izopropanol — woda (79:2:19) . (6)



Rys. 2. Zależność aktywności (x) deaminazy adenilowej i (o) deaminazy adenozyzny od pH. Aktywność deaminazy adenilowej globulin cytoplazmy oznaczana z ilości uwolnionego amoniaku w warunkach opisanych w tekście; pH zmieniano przy pomocy buforów bursztynianowego (pH 4, 5, 6) i trisu (pH 7,2, 8, 9). Aktywność tego enzymu w pH 5 i poniżej oraz w pH 9 była tak niska, że nie dawała miarodajnych odczytów. Aktywność deaminazy adenozyzny albumin cytoplazmy oznaczano badając spadek absorpcji w 265 m μ co 5 minut przez pół godziny, po dodaniu białka w ilości odpowiadającej 0,015 mg azotu białkowego do 3 ml roztworu adenozyzny o początkowym stężeniu 63 μ M; pH zmieniano przy pomocy moderatorów fosforanowych (pH 5, 6, 7,2) lub trisu (pH 7,2, 8, 9)

nowa rozkłada fosforan fenoloftaleiny w kwaśnym oddziaływaniu, natomiast nie rozkłada β -glicerofosforanu.

Oznaczenie jedynie stężenia produktów reakcji w odniesieniu do azotu białkowego nie pozwala na zdanie sobie sprawy z tego, czy taka sama część całkowitej aktywności fosfatazy znajduje się we frakcji globulinowej wtedy, kiedy za substrat służy glicerofosforan czy fosforan fenolofta-

T a b l i c a 3
 Rozmieszczenie fosfatyz we frakcjach nerki szczura
 Warunki doświadczeń jak opisano w tekście. Oznaczenia frakcji komórkowych jak w tabelicy 4

Substrat	β-Glicerofosforan										Fosforan fenoloftaleiny													
	pH 5					pH 9					pH 5					pH 9								
pH	H	OII	SIIA	SIIG	H	OII	SIIA	SIIG	H	OII	SIIA	SIIG	H	OII	SIIA	SIIG	H	OII	SIIA	SIIG	H	OII	SIIA	SIIG
Frakcja komórkowa	1,05	2,00	1,73	0,0	8,55	33,20	0,0	5,00	1,80	0,50	1,12	0,23	3,64	11,09	0,35	3,27	4,42	14,70	1,40	1,21	3,23	7,23	1,33	1,43
	0,96	1,63	0,87	0,0	6,49	25,60	0,87	3,47	1,10	1,26	1,53	0,50	8,55	21,00	1,45	3,94	3,98	8,85	1,05	1,82	3,98	8,85	1,05	1,82
Udział poszczególnych frakcji w defosforylacji*	100%	12%	43%	0	100%	25%	0	9%	100%	1,8%	16%	2%	100%	19%	2%	14%	100%	21%	8%	4%	100%	14%	11%	7%
	100%	11%	24%	0	100%	25%	3%	8%	100%	7,3%	37%	7%	100%	16%	4%	7%	100%	14%	7%	7%	100%	14%	7%	7%

* Dane tej rubryki uzyskano w oparciu o znajomość aktywności przeliczonej na mg azotu białkowego oraz o dane tabelicy 4, która podaje, jaki jest udział poszczególnych frakcji w zawartości azotu białkowego tkanki.

leiny, jak i wtedy, kiedy substratem jest AMP. Należało więc zbadać udział poszczególnych frakcji komórkowych w defosforylacji różnych substratów. Dlatego oznaczono rozmieszczenie azotu białkowego we frakcjach nerki. W tym celu frakcjonowano homogenat nerki podobnie, jak to opisano poprzednio, ale każdą frakcję zbierano ilościowo i określoną objętość danej frakcji wlewano do worka dializacyjnego. Po oddializowaniu drobnocząsteczkowych składników w ciągu 24 godz. w wodzie destylowanej, pozostałe w worku białko spalano razem z węzłem, lub usuwano je ilościowo z worka i oddzielano przez wirowanie frakcję albuminową od globulinowej. Równocześnie spalano odpowiednie ślepe próby. Wyniki oznaczenia azotu białkowego frakcji podano w tabelicy 4.

T a b l i c a 4

Rozmieszczenie azotu białkowego we frakcjach nerki

Azot wszystkich frakcji oznaczono wprost po dializie wobec wody destylowanej, z wyjątkiem frakcji OI, którą oznaczono z różnicy (H—SI)

Frakcje	mg N/g nerki	% azotu białkowego
H — homogenat	24,4	100
OI — osad pierwszy (jądra, nie rozbite komórki)	12,1	49,5
SI — płyn nad pierwszym osadem	12,3	50,5
OII — osad drugi (mitochondria)	1,56	6,4
SII — płyn nad drugim osadem (cytoplazma)	10,7	43,9
SIIA — albuminy cytoplazmy	6,43	26,4
SIIG — globuliny cytoplazmy	3,76	15,4
SIIR — białka cytoplazmy nie dające się rozpuścić w KCl po dializie	0,45	1,8
SIIR + SIIG + SIIA + OII + OI	24,3	99,5

W oparciu o dane tej tabelicy obliczono rozmieszczenie aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej we frakcjach nerki, co podano w drugim rzędzie tabelicy 3 (% aktywności). Frakcja globulinowa zawiera 7—13% całkowitej aktywności nieswoistej fosfatazy zasadowej, i 0—7% całkowitej aktywności kwaśnej fosfatazy. Z danych tabelic 1 i 4 można obli-

czyć, że na frakcję globulinową przypada 4—7% enzymu odczepiającego resztę fosforanową od AMP.

Nie można na tej podstawie powiedzieć, czy w globulinowej frakcji cytoplazmy nerki jest swoista 5'-nukleotydaza. Można jednak stwierdzić, że frakcja ta katalizuje oderwanie reszty fosforanowej od AMP i że zawiera nieswoistą fosfatazę.

DYSKUSJA

Stwierdzono, że nerka szczura zawiera obok dezaminazy adenozykowej także dezaminazę kwasu adenilowego. Obydwa te enzymy można łatwo od siebie oddzielić dzięki temu, że jeden rozpuszcza się w wodzie destylowanej, a drugi jest rozpuszczalny w roztworze soli, ale wypada z roztworu po usunięciu soli przez dializę. Obydwie dezaminazy są zlokalizowane w cytoplazmie komórkowej; frakcja mitochondrialna jest praktycznie wolna od katalitycznych właściwości odczepiania amoniaku od AMP lub adenozy. Defosforylacja AMP natomiast jest najsilniejsza w tej właśnie mitochondrialnej frakcji. Nie można powiedzieć, czy jest to swoista fosfataza AMP.

W wielu tkankach, a także w jadzie węzów, wydaje się istnieć swoista 5'-nukleotydaza [8, 18, 20], rozkładająca znacznie szybciej mięśniowy kwas adenilowy, aniżeli inne estry fosforowe. Z doświadczeń, w których użyto β -glicerofosforanu i dwufosforanu fenoloftaleiny jako substratów, wynika, że nieswoista fosfataza nerki jest także zagęszczona we frakcji mitochondrialnej. Trudno stąd wyciągać wnioski co do stosunków w żywej nie uszkodzonej komórce. Wiadomo bowiem z badań De Duve i współprac. [1, 2], że różne zabiegi wykonywane na mitochondriach powodują, że aktywność fosfatazy w tych subkomórkowych tworach wzrasta; działa tak m. in. dializa wobec wody; a dializę wobec wody stosowano w opisywanych obecnie doświadczeniach. Pewna ilość fosfatazy zawarta jest we frakcji globulinowej cytoplazmy. Także i ta fosfataza nie wydaje się być swoistą fosfatazą AMP, gdyż globuliny cytoplazmy katalizują zarówno rozkład β -glicerofosforanu w zasadowym środowisku, jak i fosforanu fenoloftaleiny w pH 5 i w pH 9.

Stosunkowo wysoka aktywność dezaminaz adenilowej i adenozykowej w nercie szczura jest szczególnie ciekawa w zestawieniu z faktem, że zwierzę to wydziela duże ilości amoniaku w moczu [5, 19]. Według Daviesa i Yudkina [5] szczury pozostające na przeciętnej diecie wydalają w ciągu doby $11,1 \pm 0,86$ mg N-NH₃/24 godz. (samce) i $8,7 \pm 0,13$ (samice). Większa z tych wartości stanowi około 790 μ moli NH₃ wydalonych w ciągu doby. Z danych tablicy 1 można obliczyć, ile amoniaku mogłaby w ciągu doby wyprodukować nerka szczura z kwasu adenilowego bądź adenozy.

Pełny homogenat, w warunkach doświadczenia stosowanych w tej pracy, wytwarza przeciętnie 2,63 $\mu\text{moli NH}_3$ na 1 mg azotu białkowego, w ciągu 30 minut. Przeliczając to na 24 godziny i 24,4 mg azotu białkowego zawarte w 1 gramie nerki (Tabl. 4), otrzymujemy 3090 $\mu\text{moli amoniaku}$ wytworzonego w ciągu doby przez 1 g nerki (nerki szczura ważą zwykle więcej aniżeli 1 g). Otrzymana wartość przekracza kilkakrotnie przeciętną ilość amoniaku wydalaną w ciągu doby przez szczura. Dwóch czynników nie uwzględniono w powyższym porównaniu: stężenia substratu, które w nerce *in vivo* nie jest znane, i stężenia jonów wodorowych. Liczby wzięte do obliczenia uzyskano z inkubacji homogenatu nerki w pH 6, a optimum działania dezaminaz przypada w oddziaływaniu obojętnym. Jeżeli w komórkach nerkowych pH jest bliskie obojętnego, to zdolność produkcyjna nerek szczura jest jeszcze większa aniżeli 3090 $\mu\text{moli amoniaku}$ na dobę.

Analogiczne obliczenie przeprowadzone dla dezaminacji tylko kwasu adenilowego przez globuliny cytoplazmy nerki wykazuje, że nawet gdyby jedynie dezaminaza kwasu adenilowego wytwarzała amoniak w nerce, to w ciągu doby mogłoby się go wydalić co najmniej 1140 μmoli (z danych tablicy 1 widzimy, że globuliny cytoplazmy produkują przeciętnie 6,32 $\mu\text{moli NH}_3/\text{mg N}_b$ w ciągu pół godziny, a tablicą 4 podaje, że w 1 g nerki 3,76 mg azotu przypada na globuliny cytoplazmy).

Udział pochodnych adenozytowych w produkcji amoniaku przez nerkę wydaje się tym bardziej prawdopodobny, że Yefimochkina i Braunstein [24] oraz Kometiani i Klein [12] donieśli o reaminacji kwasu inozynowego przez kwas asparaginowy w mięśniach i mózgu. Aczkolwiek wydaje się udowodnione, że glutamina i niektóre inne aminokwasy [5, 16, 19] są źródłem amoniaku wydalanego z moczem, to jednak nie można wykluczyć, że pewną rolę odgrywa tutaj także kwas adenilowy.

Panu Prof. Wł. Mozołowskiemu dziękuję za instruktywną dyskusję, Pani Reginie Kaczorowskiej za pomoc techniczną w czasie wykonywania tej pracy.

STRESZCZENIE

Homogenat nerki szczura odczepia od kwasu adenilowego zarówno resztę fosforanową, jak i grupę aminową. Przez różniczkowe wirowanie homogenatu nerki, sporządzonego w 0,1 M-KCl buforowanym obojętnym boranem, i przez dializę wobec wody destylowanej, można otrzymać frakcje, z których jedna (globuliny cytoplazmy) zawiera dezaminazę kwasu adenilowego, inna (albuminy cytoplazmy) dezaminazę adenozy. Aktyw-

ność fosfatazy AMP jest zagęszczona we frakcji mitochondrialnej, ale i cytoplazmatyczne frakcje wykazują słabą aktywność fosfatazową. Badając rozkładanie β -glicerofosforanu i fosforanu fenoloftaleiny, nie znaleziono danych pozwalających stwierdzić, że któraś z frakcji zawiera swoistą fosfatazę AMP (5'-nukleotydzę). Przedyskutowano możliwość udziału dwóch opisanych dezaminaz w wytwarzaniu amoniaku wydalanego z moczem.

L I T E R A T U R A

- [1] Berthet J., Berthet L., Appelmans F., De Duve C. *Biochem. J.* **50**, 182, 1951.
- [2] Berthet J., De Duve C. *Biochem. J.* **50**, 174, 1951.
- [3] Conway E. J., „*Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*” Crosby Lockwood & Son Ltd., London 1957.
- [4] Conway E. J., Cooke R. *Biochem. J.* **33**, 479, 1939.
- [5] Davies B. M. A., Yudkin J. *Biochem. J.* **52**, 407, 1952.
- [6] Deutsch A., Nilsson R. *Acta Chem. Scand.* **7**, 858, 1953.
- [7] Gomori G. *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 955, 1941—1942 jak opisano w książce *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Ed. Miriam Reiner, Academic Press, New York 1953.
- [8] Gulland J. M., Jackson E. M. *Biochem. J.* **32**, 597, 1938.
- [9] Huggins C., Talalay P. *J. Biol. Chem.* **159**, 399, 1945.
- [10] Kalckar H. M. *J. Biol. Chem.* **167**, 461, 1947.
- [11] Kalckar H. M., Rittenberg D. *J. Biol. Chem.* **170**, 455, 1947.
- [12] Kometiani P. A., Klein E. E. *Biochimia* **21**, 389, 1956.
- [13] Lee Y.-P. *J. Biol. Chem.* **227**, 987, 1957.
- [14] Lee Y.-P. *J. Biol. Chem.* **227**, 993, 999, 1957.
- [15] Mozołowski W. *Biochem. Z.* **206**, 150, 1929.
- [16] Muntwyler E., Iacobellis M., Griffin G. E. *Am. J. Physiol.* **184**, 83, 1956.
- [17] Newton A. A., Perry S. V. *Nature* **179**, 49, 1957.
- [18] Novikoff A. B., Podber E., Ryan J. *Federation Proc.* **9**, 210, 1950.
- [19] Rector F. C. Jr., Seldin D. W., Roberts A. D. Jr., Copenhaver J. H. *Am. J. Physiol.* **179**, 353, 1954.
- [20] Reis J. *Enzymologia* **2**, 110, 183, 1937; **5**, 251, 1938.
- [21] Russel J. A. *J. Biol. Chem.* **156**, 457, 1944.
- [22] Schmidt G. *Z. physiol. Chem.* **179**, 243, 1928.
- [23] Weil-Malherbe H., Green R. H. *Biochem. J.* **61**, 218, 1955.
- [24] Yefimochkina E. F., Braunstein A. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 350, 1959.

DEAMINASES OF ADENYLIC ACID AND ADENOSINE IN RAT KIDNEY

S u m m a r y

Rat kidney homogenate produces both ammonia and inorganic phosphate, when incubated with muscle adenylic acid (AMP). The homogenate prepared in 0.1M-KCl buffered with neutral borate can be separated into three fractions by differential centrifugation and dialysis against distilled water. One of these fractions (cytoplasmic globulins) has

adenylic deaminase activity, in another fraction (cytoplasmic albumins) adenosine deaminase is present. The AMP phosphatase is concentrated in the mitochondrial fraction although both cytoplasmic fractions have also phosphatase activity. As both β -glicerophosphate and phenolphthalein phosphate are split by the same fractions as AMP, it was not possible to establish whether any fraction contains specific AMP phosphatase (5'-nucleotidase).

The possibility that both deaminating enzymes participate in urine ammonia formation is discussed.

Otrzymano 7.1.1960 r.

L. ŻELEWSKI

**ZALEŻNOŚĆ ODDYCHANIA MITOCHONDRIÓW OD ŚRODOWISKA
UŻYTEGO DO HOMOGENIZACJI***Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk**Kierownik: prof. dr Wł. Mozołowski*

Własności enzymatyczne mitochondriów zależą od warunków preparowania. Istotne znaczenie posiada zarówno skład płynu użytego do homogenizacji tkanek, jak i temperatura. Porównanie pod tym względem zdolności oddechowych mitochondriów, preparowanych w środowisku jonowym oraz w środowisku sacharozowym na różnych substratach jest przedmiotem obecnej pracy.

METODY

Do doświadczeń użyto nerki białych szczurów nie będących na diecie standardowej. Po krótkiej narkozie chloroformowej usuwano po dekapulacji nerki i przemywano je lodowatym roztworem używanym do homogenizacji. Wszystkie następne czynności poza wirowaniem przeprowadzono umieszczając naczynia w lodzie. Tkanekę homogenizowano w homogenizatorze Potter-Elvehjem'a z siedmioma objętościami płynu. Homogenat wirowano przez 5 minut przy 2100 obr./min. (600 g) w temp. 0 — 5°. Dekantowano znad osadu płyn i nazwano go płynem S_I. Celem uzyskania frakcji zwanej mitochondrialną, płyn określony jako S_I wirowano przez 15 minut przy 15 000 obr./min. (16 000 g) w wirówce chłodzonej wodą wodociągową. Temperatura płynu w wirówce po takim wirowaniu wahała się od 28 — 32°. Rozdzielano w ten sposób osad mitochondriów od płynu, który określano jako S_{II}. Mitochondria po dokładnym osuszeniu ścianek probówki wirówkowej i przemyciu płynem użytym do homogenizacji zawieszano w roztworze KCl-boranu (0,1 M-KCl w 0,039M-buforze boranowym o pH = 7,0). Zużycie tlenu mierzono w aparacie Warburga w temp. 30° w ciągu godziny. Czas potrzebny na wyrównanie temperatury wynosił 7 min. Dwa ml mieszaniny sporządzonej tak jak podaje

Gładtke i Liss [1] zawierały następujące substancje w μmolach : 60 fosforanów, 250 sacharozy, 2 EDTA, 120 fluorku, 6 ATP¹, 15 MgCl_2 oraz 30 substratu. Jako substratów używano kwasu α -ketoglutazarowego (z dodatkiem 30 μmoli kwasu malonowego) albo kwasu jabłkowego lub bursztynowego. Płyiny zobojętniano wodorotlenkiem potasu do $\text{pH} = 7,4$. Do pomieszczenia centralnego wkładano pasek bibuły i 0,2 ml 10% (w/obj.) KOH. Do każdego naczynka dawano 2 ml płynu inkubacyjnego oraz 1 ml zawiesiny frakcji komórkowych w KCl-boranie. Azot użytych frakcji komórkowych oznaczano metodą Kjeldahla w aparacie Parnasa-Wagnera destylując do kwasu borowego.

WYNIKI

Porównano oddychanie mitochondriów uzyskanych po homogenizacji w 0,25 M-sacharozie zawierającej 0,002 M-EDTA i homogenizacji w 0,1 M-KCl z 0,039 M-buforem boranowym o pH 7, używając jako substratu kwasu α -ketoglutazarowego, jabłkowego oraz bursztynowego (Tabl. 1). Stwierdzono znikome zużycie tlenu na substracie kwasu α -ketoglutazarowego i jabłkowego dla mitochondriów preparowanych w KCl-boranie w porównaniu z mitochondriami z sacharozą EDTA. Natomiast zużycie tlenu przez mitochondria na substracie kwasu bursztynowego jest wysokie dla obu preparatów mitochondriów.

Tablica 1

Oddychanie mitochondriów uzyskanych przez homogenizację nerek szczura w sacharozie z dodatkiem EDTA i chlorku potasu w buforze boranowym

Wartości wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{mg}$ azotu mitochondriów

Roztwór użyty do homogenizacji	Substraty		
	Kwas α -ketoglutazarowy	Kwas jabłkowy	Kwas bursztynowy
0,25 M-sacharoza, 0,002 M-EDTA	186; 158; 160	135; 108; 172	306; 258; 311
0,1 M-KCl, 0,039 M-boran	11; 8; 22	5; 6; 15; 3	340; 319; 368

Dla zorientowania się, jaki wpływ może mieć boran, homogenizowano nerki szczura w 0,15 M-KCl bez boranu oraz w sacharozie-EDTA z dodatkiem 0,039 M-buforu boranowego. Wyniki podane w tablicy 2 nie różnią się istotnie od danych tablicy 1. Wskazuje to na brak wpływu

¹ Użyte skróty: ATP — kwas adenozynotrójfosforowy; DPN — nukleotyd dwufosfopirydynowy; EDTA — kwas etylenodwuaminocteroowy.

buforu boranowego w płynie użytym do homogenizacji na oddychanie mitochondriów.

Na podstawie wyników umieszczonych w tabelicy 1 można by przypuszczać, że obniżenie oddychania mitochondriów uzyskanych z KCl-boranu dotyczy tych substratów, których utlenienie wymaga DPN. Utrata aktywności oddechowej mitochondriów mogła być wynikiem braku DPN, jak i inaktywującego działania temperatury podczas odwirowania mitochondriów szczególnie z KCl-boranu; w końcu wirowania bowiem temperatura sięgała 28 — 32°.

T a b l i c a 2

Wpływ boranu na oddychanie mitochondriów
Wartości wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{mg}$ azotu mitochondriów

Roztwór użyty do homogenizacji	Substraty	
	Kwas <i>a</i> -ketoglutaryowy	Kwas jabłkowy
0,25 M-sacharoza, 0,002 M-EDTA, 0,039 M-boran	152; 158	127; 139
0,15 M-KCl	16; 22	17; 18

T a b l i c a 3

Zależność oddychania mitochondriów nerek szczura od DPN oraz od warunków, w których znajdowały się mitochondria przed doświadczeniem

Nerki homogenizowano w 0,1 M-KCl w 0,039 M-buforze boranowym o pH = 7,0. W naczyniach inkubacyjnych do 2 ml płynu o składzie podanym w opisie metod, dodawano 1 ml preparatu mitochondriów. Wartości wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{mg}$ azotu mitochondriów

Preparat mitochondriów	Substraty	
	Kwas <i>a</i> -ketoglutary.	Kwas jabłkowy
Zawiesina mitochondriów po pierwszym wirowaniu (płyn S _I)	141; 176	115; 143
Odwirowane mitochondria zawieszona w KCl-boranie	11; 8; 22	5; 6; 15; 3
Odwirowane mitochondria zawieszona w oddzielnym płynie S _{II}	19; 29	21; 27
Odwirowane mitochondria zawieszona w KCl-boranie; do inkubacji dodano 3 μmole DPN	65; 58	35; 35; 54; 36

Celem wykazania wpływu DPN i temperatury na oddychanie mitochondriów preparowanych z KCl-boranu wykonano doświadczenia inkubując izolowane mitochondria z dodatkiem 10^{-3} M-DPN oraz z dodatkiem

płyну znad osadu mitochondriów (płyn S_{II}). Równocześnie dla porównania badano oddychanie nie odwirowanej zawiesiny mitochondriów (płyn S_I). Z tablicy 3 widać pobudzający wpływ DPN na oddychanie oraz to, że zawiesina mitochondriów w rozcieńczonej cytoplazmie przed

Tablica 4

Wpływ amidu kwasu nikotynowego w płynie użytym do homogenizacji na oddychanie mitochondriów nerek szczura

Nerki homogenizowano w KCl-boranie z dodatkiem 0,02 M-amidu kwasu nikotynowego. Warunki doświadczalnego jak podano w opisie metod. Wartości wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{mg}$ azotu mitochondriów

Preparat	Substraty	
	Kwas α -ketoglutarynowy	Kwas jabłkowy
Odwirowane mitochondria	4; 5	4; 5
Odwirowane mitochondria z dodatkiem płynu S_{II}	65; 61	89; 91

odwirowaniem oddycha żywiej niż wówczas, gdy izolowane mitochondria odwirowano i ponownie zawieszono w oddzielnym płynie. Efekt ten można przypisać podwyższonej temperaturze sięgającej $28 - 32^\circ$ przy końcu wirowania. Ponieważ dodatek DPN do płynu inkubacyjnego częściowo reaktywował oddychanie, nie jest wykluczone, że podczas homogenizacji w KCl-boranie, jak i odwirowania mitochondriów zachodzi aktywacja DPN-azy. Użyto więc do homogenizacji roztwór KCl-boranu z dodatkiem 0,02 M-amidu kwasu nikotynowego, o którym wiadomo, że jest silnym inhibitorem DPN-azy [5]. Izolowane z tego homogenatu mitochondria zawieszono w odwirowanym płynie (S_{II}) wykazywały znacznie wyższą aktywność oddechową od tych samych mitochondriów zawieszonych w płynie użytym do homogenizacji (Tabl. 4).

Utrata aktywności oddechowej mitochondriów uzyskanych przez homogenizację w KCl-boranie oraz związek z DPN nasuwał przypuszczenie o łączności tego zjawiska z pęcznieniem. Homogenizowano więc nerki z KCl-boranem, do którego dodawano 10^{-3} M-ATP lub 5×10^{-4} M-EDTA. Wyniki umieszczone w tablicy 5 wykazują brak jakiegokolwiek wpływu ATP dodanego przy homogenizowaniu na oddychanie. Natomiast obecność EDTA przyczynia się do zachowania pewnej aktywności mitochondriów. Jednak porównanie oddychania mitochondriów preparowanych z KCl-boranu z dodatkiem 0,01 M-EDTA z mitochondriami uzyskanymi z sacharozy-EDTA stwierdza u tych ostatnich znacznie wyższą aktywność oddechową (Tabl. 6).

T a b l i c a 5

Wpływ ATP i EDTA w płynie użytym do homogenizacji na oddychanie mitochondriów nerek szczura przy użyciu różnych substratów

W doświadczeniu I. mitochondria zawieszano w 0,5 ml płynu użytego do homogenizacji + 0,5 ml KCl-boranu. W doświadczeniu II. mitochondria zawieszano w 0,5 ml płynu użytego do homogenizacji z dodatkiem ATP i 0,5 ml płynu użytego do homogenizacji z dodatkiem EDTA. Wartości wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz./mg}$ azotu mitochondriów

Roztwór użyty do homogenizacji	Doświadczenie I			Doświadczenie II
	Kwas α -ketoglutarynowy	Kwas jabłkowy	Kwas bursztynowy	Kwas bursztynowy
0,1 M-KCl, 0,039 M-boran, 10^{-3} M-ATP	7; 8	6; 10	341; 321	278; 291
0,1 M-KCl, 0,039 M-boran, 5×10^{-4} M-EDTA	96; 102	50; 58	158; 216	195; 261

T a b l i c a 6

Porównanie oddychania mitochondriów uzyskanych przez homogenizację w sacharozie i KCl-boranie z dodatkiem EDTA

Wartości wyrażano w $\mu\text{l O}_2/\text{godz./mg}$ azotu mitochondriów

Roztwór użyty do homogenizacji	Substraty		
	Kwas α -ketoglutarynowy	Kwas jabłkowy	Kwas bursztynowy
0,25 M-sacharoza, 0,002 M-EDTA	186; 158; 160	135; 108; 172	306; 258; 311
0,1 M-KCl, 0,039 M-boran, 0,01 M-EDTA	79; 75	55; 45	210; 280

Wyniki doświadczeń podanych w tabl. 1, 5 i 6 wskazują na to, że dodatek EDTA powoduje zmniejszenie oddychania mitochondriów, gdy substratem jest kwas bursztynowy. Natomiast, gdy substratem są inne członki cyklu kwasów trójkarboksylowych, oddychanie mitochondriów preparowanych z KCl-boranem ulega pewnej stabilizacji pod wpływem EDTA.

DYSKUSJA

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić odmienną aktywność oddechową mitochondriów preparowanych z sacharozy i KCl-boranu. Środowisko jonowe KCl-boranu i temperatura podczas wirowania, wahająca się od $28 - 32^\circ$, prowadzą do zmian w mitochondriach, wynikiem których jest zmniejszone oddychanie. Stwierdzona w obecnej pracy odporność mitochondriów nerek szczura, preparowanych w sacharozie na temperaturę sięgającą $28 - 32^\circ$, jest podobna do mitochondriów

z serca wołu otrzymywanych z sacharozy po 10 min. preinkubacji w temp. 30° [4].

Analogiczną utratę aktywności oddechowej, jaką stwierdzono w obecnej pracy dla mitochondriów homogenizowanych w KCl-boranie i odwirowanych w temp. 28 — 32°, zaobserwowano u mitochondriów z serca kota preparowanych w środowisku solnym na substracie kwasu α -ketoglutazarowego, jabłkowego i szczawiooctowego, gdy inkubowano mitochondria przez 15 min. w temperaturze 25° [8]. Również doświadczenia przeprowadzone z homogenatem nerek szczura sporządzonym w wodzie lub w izotonicznym KCl wykazały znaczną utratę aktywności oddechowej homogenatu preinkubowanego w temperaturze 38° w ciągu 15 minut, gdy substratem był szczawiooctan [6].

Pobudzające działanie DPN na oddychanie mitochondriów znajduje swoje wytłumaczenie w szeregu faktów doświadczalnych. Stwierdzono spadek stężenia DPN w mitochondriach serca wołu uprzednio zamrożonych po preinkubacji w 30°, czemu towarzyszyło obniżenie aktywności oddechowej [4]. Mitochondria wątroby szczura preinkubowane w fosforanie przez 10 minut w temperaturze 30° tracą aktywność oddechową wobec szeregu substratów z wyjątkiem bursztynianu. Dodatek DPN w stężeniu 10^{-3} M z EDTA 5×10^{-4} M powodował powrót do normy oddychania [2]. Wartości uzyskane w tej pracy z dodatkiem 10^{-3} M-DPN nie pozwalają jednak na przypisanie mu wyłącznej roli w utracie aktywności. Jak wynika z danych tablicy 3, amid kwasu nikotynowego dany do płynu homogenizacyjnego nie zapobiega utracie aktywności oddechowej mitochondriów. Dodatek płynu z nad mitochondriów po drugim wirowaniu w znacznie większym stopniu przywraca oddychanie mitochondriów niż ten sam płyn, gdy nie dodano amidu kwasu nikotynowego. Wydaje się, że amid kwasu nikotynowego nie zapobiega uwalnianiu DPN z mitochondriów, hamuje jednak jego rozkład po uwolnieniu z mitochondriów. Stwierdzoną stabilizującą rolę EDTA na oddychanie mitochondriów preparowanych z KCl-boranu na badanych substratach z wyjątkiem kwasu bursztynowego można również interpretować w powiązaniu z DPN. Można przyjąć, że EDTA wiąże DPN z mitochondriami, umożliwiając ich oddychanie. Równocześnie wiążąc jony wapniowe może zapobiegać aktywującemu działaniu tych jonów na DPN-azę.

Tym też można by tłumaczyć hamujący wpływ EDTA na oddychanie, gdy substratem jest kwas bursztynowy. Zachowany DPN w takich mitochondriach umożliwia powstawanie kwasu szczawiooctowego, a ten jest silnym inhibitorem oksydazy bursztynowej [9]. Różnice w oddychaniu pomiędzy mitochondriami preparowanymi w KCl-boranie i w sacharozie mogą znaleźć swoje uzasadnienie w pęcznieniu mitochondriów. Brak ATP w mitochondriach prowadzi do utraty zdolności oddychania. Nie dotyczy

to kwasu bursztynowego jako substratu, który do swego utlenienia nie wymaga ATP [7]. Stwierdzona wyższa aktywność ATP-azy w mitochondriach preparowanych w chlorku potasu w porównaniu do mitochondriów uzyskanych z sacharozy [3] pozwala na podobną interpretację wyników obecnej pracy.

STRESZCZENIE

1. Mitochondria nerki szczura otrzymane z homogenatów KCl-boranych, odwirowane w temperaturze 28 — 32° w przeciwieństwie do mitochondriów preparowanych z 0,25 M-sacharozy z EDTA tracą swoją aktywność oddechową, jeżeli substratem jest kwas α -ketoglutaryny lub jabłkowy; natomiast zachowują zdolność oddychania, gdy substratem jest kwas bursztynowy.

2. Proces inaktywacji oddychania mitochondriów uzyskanych przez homogenizację tkanki w KCl-boranie jest uzależniony od obecności DPN.

3. Dodatek EDTA do płynu użytego przy homogenizowaniu wpływa stabilizująco na aktywność oddechową mitochondriów, gdy substratem jest kwas α -ketoglutaryny lub jabłkowy.

LITERATURA

- [1] Gładtke G., Liss E. *Biochem. Z.* **331**, 65, 1958.
- [2] Hunter F. E., Ford L. *J. Biol. Chem.* **216**, 357, 1955.
- [3] Klemperer H. G., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 404, 1957.
- [4] Lester R. L., Hatefi Y. *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 103, 1958.
- [5] Mann P. J. G., Quastel J. H. *Biochem. J.* **35**, 502, 1941.
- [6] Potter V. R., LePage G. A., Klug H. L. *J. Biol. Chem.* **175**, 619, 1948.
- [7] Raaflaub J. *Helv. Physiol. Acta* **11**, 157, 1953.
- [8] Slater E. C., Cleland K. W. *Biochem. J.* **55**, 566, 1953.
- [9] Swingle K. F., Axelrod A. E., Elvehjem C. A. *J. Biol. Chem.* **145**, 581, 1942.

THE EFFECT OF MEDIUM USED FOR HOMOGENIZATION UPON THE MITOCHONDRIAL RESPIRATION

Summary

1. The rat kidney mitochondria obtained from KCl-borate homogenates, in contrast to those prepared from 0.25 M-sucrose with EDTA, lose their respiratory activity when α -ketoglutarate or malate is the substrate, while they do not so when succinate is the substrate.

2. The respiratory inactivation of mitochondria obtained by homogenizing tissue in KCl-borate is DPN-dependent.

3. The addition of EDTA to the solution used for homogenization exerts some stabilizing effect on respiratory activity of mitochondria, when α -ketoglutarate or malate is employed as substrate.

Otrzymano 13.1.1960 r.

ALICJA GRUDZIŃSKA

**PORÓWNANIE WOLNYCH AMINOKWASÓW MOCZU
I ŚLINY CZŁOWIEKA**

*Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk
Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

W płynach fizjologicznych wydalanych z ustroju znajduje się pewna ilość wolnych aminokwasów. Porównanie aminokwasów wydalanych przez nerki z moczem z tymi, jakie wydalają się przez ślinianki w ślinie, mogłoby rzucić pewne światło na fizjologiczne znaczenie i mechanizm wydalania tych związków.

White i współpr. [9], dyskutując wyniki swych badań nad elektrolitami śliny, liczą się z możliwością przeprowadzenia pewnych analogii między budową, a także i czynnością komórek nerki i ślinianek. Nabłonek z rąbkami szczoteczkowym (*rodged epithelium*) występuje zarówno w kanalikach krętych nerki, jak i w przewodach wydzielniczych ślinianek podszczękowych i przyusznych. Temu nabłonkowi przypisują autorzy funkcję reabsorpcyjną. Gdyby przyjęto takie rozumowanie za słuszne, byłoby uzasadnione podjęcie oznaczeń porównawczych także i w odniesieniu do aminokwasów.

Celem tej pracy jest dokonanie takiego porównania. Szczególną uwagę zwrócono przy tym na kwas β -aminoizomasłowy, o którym wiadomo, że jest niestałym składnikiem moczu, występującym u ludności angielskiej w 5-10% przypadków [4, 7, 6, 5]. Gdyby kwas β -aminoizomasłowy (BAIB) występował w ślinie tylko u tych osób, u których znajduje się w mocz, a nie występował w ślinie innych ludzi, można by snuć przypuszczenia co do analogii mechanizmu wydzielania aminokwasów przez nerki i przez ślinianki.

METODY

Przedmiotem badań były ślina, mocz i osocze zdrowych ludzi, obojga płci, w wieku od 18 - 40 lat. Mocz i ślinę każdego osobnika badano dwu- do pięciokrotnie w różnych okresach czasu. Ślinę pobierano, jak opisano po-

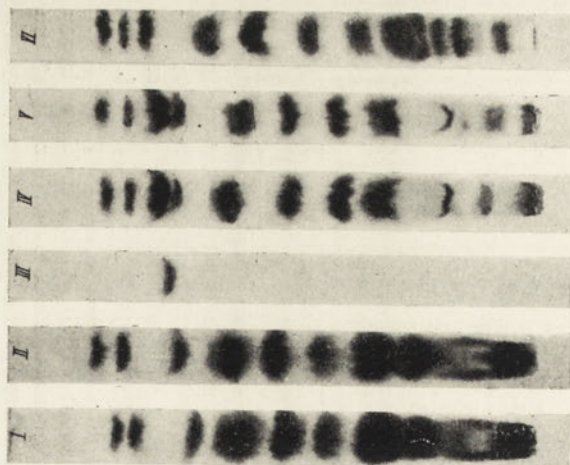
przednio [8]. Mocz przeznaczony do badania pochodził z rannej porcji. Osocze otrzymywano z heparynowanej krwi, pobranej na czczo z żyły łokciowej. Ślinę po pobraniu odbiałczano 96% etanolem w stosunku 1 : 4, następnie odwirowywano i płyn odparowywano w temperaturze 45 - 55°. Suchą pozostałość rozpuszczano w 10% izopropanolu zakwaszonym HCl (4 ml 6 N-HCl na 1000 ml izopropanolu). 1 ml w ten sposób otrzymanego roztworu odpowiadał 10 ml śliny. Śliny nie odsalano. Osocze odbiałczano 96% etanolem i przygotowywano jak ślinę. 1 ml końcowego roztworu odpowiadał 2 ml osocza. Mocz przygotowywano, jak opisał Angielski [1]. Otrzymane w ten sposób płyny badano chromatograficznie na zawartość aminokwasów.

Chromatografię wstępującą wykonywano techniką opisaną przez Angielskiego [1]. Na paski bibuły Whatman 1 o szerokości 3 cm nakrapiano po 10, 20 i 30 μ l moczu, 20 i 40 μ l osocza, po 20, 40 i 60 μ l śliny. Rozpuszczalnik: *n*-butanol-kwas octowy-woda (4 : 1 : 1) (rozpuszczalnik I). Rozwijano trzykrotnie w temp. 18 - 22°, po 12 godzin każdorazowo. W układzie tym BAIB wędruje razem z metioniną, wobec czego, przed rozwinięciem chromatogramu, utleniało perhydrolem naniesioną próbkę moczu względnie śliny. Używano również rozpuszczalnika *n*-butanol-kwas mrówkowy-woda (75 : 15 : 10) (rozpuszczalnik II), ze względu na to, że według Awapary i Sato [2] BAIB w tym układzie wędruje sam. Jednak plamy odpowiadające kwasowi β -aminoizomasłowemu były o wiele intensywniejsze, niż w pierwszym rozpuszczalniku i pojawiały się we wszystkich badanych moczach i ślinach, co nasunęło przypuszczenie, że jest to plama również i innego aminokwasu, który zidentyfikowano jako tyrozynę. Dlatego używano rozpuszczalnik I a nie II.

Używano następujących substancji chemicznych: *n*-butanol (Estron), L-leucynę i lizyny jednochlorowodorek (Schuchard), alaninę i glicynę (Merck), DL-treoninę (Chemapol Czechosłowacja), walinę (ZSRR), histydyny jednochlorowodorek i γ -aminomasłowy (Fluk), tyrozynę i feniloalaninę niewiadomego pochodzenia (przepakowano w Gliwicach), kwas glutaminowy (B. D. H. Londyn), kwas DL- α -aminomasłowy, α -aminoizomasłowy i β -aminoizomasłowy (Hoffman la Roche).

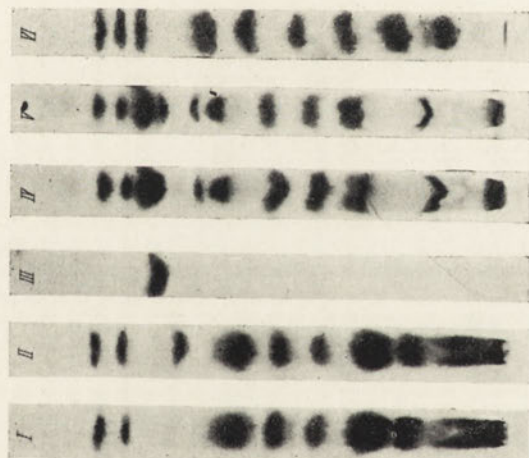
WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Porównanie jakościowego składu wolnych aminokwasów moczu i śliny wykazuje istotne różnice pomiędzy tymi dwoma płynami (Rys. 1, 2 i 3). Spośród 20 zbadanych osobników tylko u 4 stwierdzono w moczu wyraźną plamę na chromatogramie odpowiadającą kwasowi β -aminoizomasłowemu. W ślinie wszystkich tych osobników, którzy nie wydalali BAIB w moczu, nie stwierdzono również plamy na chromatogramie odpowia-



Leu, Izol
Fen
Wal
BAIB
Tyr
Ala
Kw. Glu, Tre
Gli, Ser, MetSO₂
Liz, Hist

Rys. 2. Chromatogramy aminokwasów
moczu, śliny i osocza β -wydzielaczy

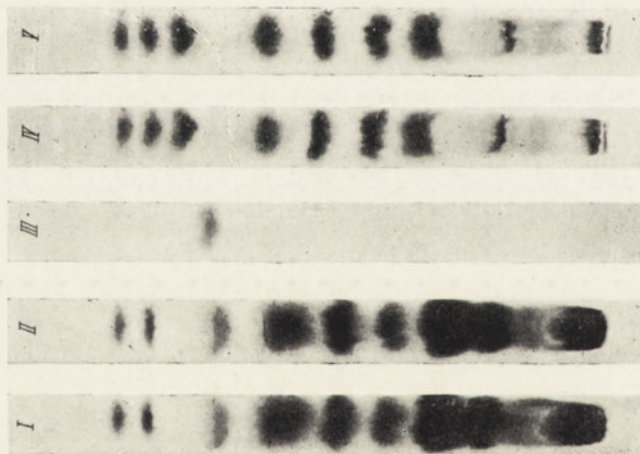


Leu, Izol
Fen
Wal
BAIB
 γ -Aminomasł.
Tyr
Ala
Kw.Glu, Tre
Gli, Ser, MetSO₂
Liz, Hist

Rys. 1. Círomatogramy aminokwasów
moczu, śliny i osocza nie β -wydziela-
czy

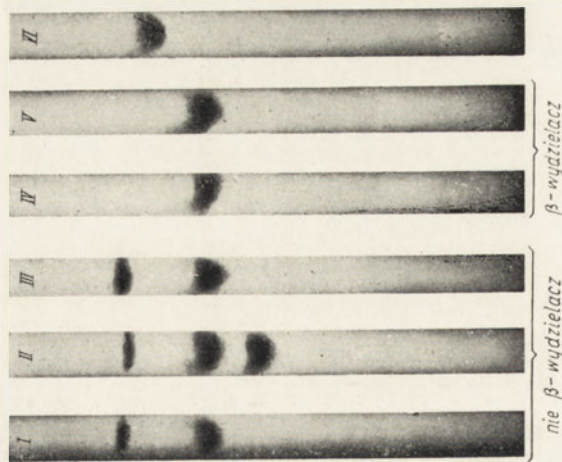
(I) moczu, (II) moczu z dodatkiem 7 μ g BAIB, (III) 7 μ g BAIB, (IV) ślina, (V) ślina
z dodatkiem 7 μ g BAIB, (VI) osocze odbiałczone

Leu, Izol
 Fen
 Wal
 BAIB
 Tyr
 Ala
 Kw. Glu, MetSO₂
 Liz, Hist



Rys. 3. Chromatogramy aminokwasów moczu i śliny β -wydzielaczy (I) mocz, (II) mocz z dodatkiem 7 μ g BAIB, (III) 7 μ g BAIB, (IV) ślina, (V) ślina z dodatkiem 7 μ g BAIB

Wal
 α -Aminomasłowy i
 α -Aminoizomasł.
 BAIB
 γ -Aminomasł.



Rys. 4. Chromatograficzna charakterystyka aminokwasu śliny wędrującej jak walina. Plamę odpowiadającą walinie w rozpuszczalniku I, rechromatowano w rozpuszczalniku II. Plama otrzymana (I) ze śliny nie β -wydzielacza, (II) z dodatkiem kwasu γ -aminomasłowego, (III) z dodatkiem waliny, (IV) plama ze śliny β -wydzielacza, (V) z dodatkiem 5 μ g BAIB, (VI) standard kwasu α -aminomasłowego z α -aminoizomasłowym

jącej temu związkowi (Rys. 1). Śliny osób, wydających BAIB w moczu, zdają się jednak także nie zawierać tego aminokwasu (Rys. 2). Przy zastosowaniu do rozdziału rozpuszczalnika I uwidacznia się niekiedy w ślinie słaba plama, której położenie odpowiada kwasowi β -aminoizomasłowemu, jednakoż występowanie tej plamy w ślinie osób, wydających BAIB z moczem, jest bardzo nieregularne (Rys. 3).

Uderzające jest, że zarówno śliny β -wydzielaczy (tzn. osób wydających BAIB w moczu), jak i nie β -wydzielaczy zawierają spore ilości aminokwasu, którego położenie na chromatogramie odpowiada walinie, a którego nie stwierdza się w moczu (Rys. 1, 2 i 3). Tuż poniżej tej plamy umiejscawia się dodany BAIB.

Przypuszczając, że może BAIB nie rozdzielił się od waliny, wykonano doświadczenie, w którym skrawek paska bibuły odpowiadającego oddzielonej walinie i BAIB eluowano 10% izopropanolem i poddawano ponownemu rozdziałowi chromatograficznemu w układzie *n*-butanol-kwas mrówkowy-woda. Na tym wtórnym chromatogramie otrzymano dwie plamy zarówno u β -, jak i nie β -wydzielaczy (Rys. 4). Jedna z nich, bardzo słaba, odpowiada walinie, co byłoby zgodne z niewielkimi ilościami waliny, znalezionymi w ślinie przez Woldringa [10], druga zaś, bardzo intensywna, odpowiada dodanemu BAIB. Dodawano również kwas α -amino-masłowy, γ -aminomasłowy i α -aminoizomasłowy, lecz plama ta żadnemu z nich nie odpowiada. Możliwe, że plama ta jest BAIB, albo też odpowiada związkowi, który znajdowali Berry i Cain [3] i uważają go za główny aminokwas śliny, a którego nie udało im się zidentyfikować.

Jak widać z powyższych doświadczeń, wśród 20 badanych osobników, czterech wydziela kwas β -aminoizomasłowy w moczu. Nie wykazano jednak równoległości pomiędzy wydzielaniem tego aminokwasu w moczu i w ślinie.

Z badanych 20 moczów tylko 2 zawierały plamę odpowiadającą walinie, i to o słabym natężeniu. Natomiast we wszystkich ślinach plama ta znajduje się i jest intensywna. Bliższe badanie tej plamy wykazało, że składa się ona co najmniej z dwóch związków, z których walina jest mniejszym ilościowo składnikiem. Tę odpowiadającą walinie plamę znaleziono również wśród wolnych aminokwasów osocza.

STRESZCZENIE

Przeprowadzony rozdział chromatograficzny wolnych aminokwasów śliny, moczu i odbiałzonego osocza u tego samego osobnika, wykazuje, że skład aminokwasowy tych trzech płynów ustrojowych jest różny. W szczególności nie wykazano równoległości w wydzieleniu kwasu β -aminoizomasłowego w moczu i w ślinie. Ślina wszystkich badanych

osobników zawiera aminokwas, którego nie ma w moczu, a którego R_F w układzie *n*-butanol-kwas octowy-woda odpowiada walinie, ale który przy rechromatografii zachowuje się inaczej niż walina.

LITERATURA

- [1] Angielski S. *Acta Biochim. Polon.* 5, 75, 1958.
- [2] Awapara J., Sato Y. *Clin. Chim. Acta* 1, 75, 1956.
- [3] Berry H. K., Cain L. *Univer. Texas Pub.* No. 5109 (71—76), 1951.
- [4] Crumpler M. R., Dent C. E., Harris H., Westall R. G. *Nature* 167, 307, 1951.
- [5] Fink K., Cline R. E., Henderson R. B., Fink R. M. *J. Biol. Chem.* 221, 425, 1956.
- [6] Fink K., Henderson R. B., Fink R. M. *J. Biol. Chem.* 197, 441, 1952.
- [7] Fink K., Henderson R. B., Fink R. M. *Proc. Soc. Biol. Med.* 76, 692, 1951.
- [8] Grudzińska A. *Acta Biochim. Polon.* 5, 67, 1958.
- [9] White A. G., Entmacher P. S., Rubin G., Leiter R. *J. Clin. Inv.* 34, 246, 1955.
- [10] Woldring M. G. *J. Dent. Research* 248, 34, 1955.

THE COMPARISON OF THE FREE AMINO ACIDS IN HUMAN URINE AND SALIVA

Summary

The chromatography of free amino acids in saliva, urine and protein free plasma in the same individuum, showed that the amino acid compositions of the three fluids were different. Especially the excretion of β -amino-isobutyric acid did not run in parallel in urine and in saliva. Saliva of all the persons tested contained an amino acid which does not occur in urine; its R_F corresponded to valine in the solvents system *n*-butanol-acetic acid-water, but it did not behave like valine on rechromatography.

Otrzymano 15.1.1960 r.

J. ROGULSKI

**GRUPY SULFHYDRYLOWE TKANEK SZCZURÓW PO ZATRUCIU
KWASEM MALEINOWYM**

*Zakład Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk
Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

Kleinzeller i Cort [21] przypuszczają, że stan grup sulfhydrylowych białek błony komórkowej jest czynnikiem kontrolującym przepuszczalność komórek kanalików nerkowych. Mechanizm działania diuretyków rtęciowych, ich wpływ farmakologiczny wiąże się z ich reakcją z grupami SH enzymów nerki działających w kanalikowej reabsorpcji [8, 14, 15]. Zaburzenia przepuszczalności spowodowane trwałym połączeniem rtęci z grupami SH wyrażają się przede wszystkim zablokowaniem reabsorpcji elektrolitów w kanalikach nerkowych [13, 21]. Stwierdzono też zwiększone wydalanie glikozy i aminokwasów [34]. Badania histochemiczne wykazały, że wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie grup SH oraz rtęci związanej przez tkankę nerkową po podaniu diuretyków ściśle się ze sobą pokrywają, ograniczając się głównie do zewnętrznej części kory [14, 15]. Wiadomo też, że 2,3-dwumerkaptopropanol (BAL), tworzący ze związkami rtęci trwałe merkaptidy [8], znosi diurezę zmniejszając ilość związanej przez nerkę rtęci, a zwiększając i przyspieszając jej wydalanie z moczem [13].

Kleinzeller i Cort [21] stwierdzili, że wpływ na przepuszczalność komórek kanalików nerkowych, podobny do diuretyków rtęciowych, posiada *p*-chinon. Związek ten wykazuje strukturalne podobieństwo do kwasu maleinowego. Obie substancje zawierają w swojej cząsteczce system sprzężonych wiązań podwójnych, który według Friedmanna i współprac. [16] jest odpowiedzialny za reakcję tych związków z grupami SH. Wiadomo, że zarówno kwas maleinowy, jak i 1,4-chinony tworzą trwałe połączenia z drobnocząsteczkowymi związkami sulfhydryłowymi [24, 33] i wykazują zdolność inhibicji pewnych systemów enzymatycznych [25, 30, 27]. Dane te pozwalają przypuszczać, że występujące po parenteralnym po-

daniu kwasu maleinowego zaburzenia w reabsorpcji kanalików nerkowych wyrażające się polyurią, zwiększonym wydalaniem elektrolitów [10], cukromoczem i aminoacydurią [19, 1] związane są również z tworzeniem przez kwas maleinowy trwałych połączeń z grupami SH białek komórek kanalików nerkowych. Dodatkowym potwierdzeniem tego przypuszczenia był fakt, stwierdzony przez Angielskiego i Rogulskiego [2], że BAL zapobiega wystąpieniu aminoacydurii u szczurów zatrutych kwasem maleinowym. Opisane w tej pracy doświadczenia mają za zadanie zbadać wpływ kwasu maleinowego na zawartość grup sulfhydrylowych nerki, wątroby i krwi szczura.

METODY

Doświadczenia wykonano na 55 białych szczurach obu płci, wagi 180-280 g, z których jedna grupa była karmiona dietą bezlaktozową, druga grupa otrzymywała dietę mleczną [1]. Kwas maleinowy wstrzykiwano podskórnie w dawce 300 mg na 1 kg wagi szczura, jako 1 M roztwór wodny, doprowadzony do pH 7,0 przy użyciu NaOH. Szczury zabijano przez odcięcie głowy. Krew zbierano do heparynizowanej parowniczkii, następnie hemolizowano 9 objętościami wody lub hemolizowano 8 objętościami wody i odbiałczano 1 objętością 25% kwasu sulfosalicylowego. Nerki i wątrobę po wycięciu wrzucano do zimnego izotonicznego roztworu KCl, a po osuszeniu bibułą i zważeniu (około 1 g tkanki) homogenizowano z dziesięciokrotną objętością zimnej wody lub 2,5% kwasu sulfosalicylowego. Homogenizację przeprowadzano w szklanym homogenizatorze Pottera, chłodzonym wodą z lodem. Azot całkowity hemolizatów krwi i homogenatów tkanek oznaczano metodą Kjeldahla w aparacie Parnas-Wagnera.

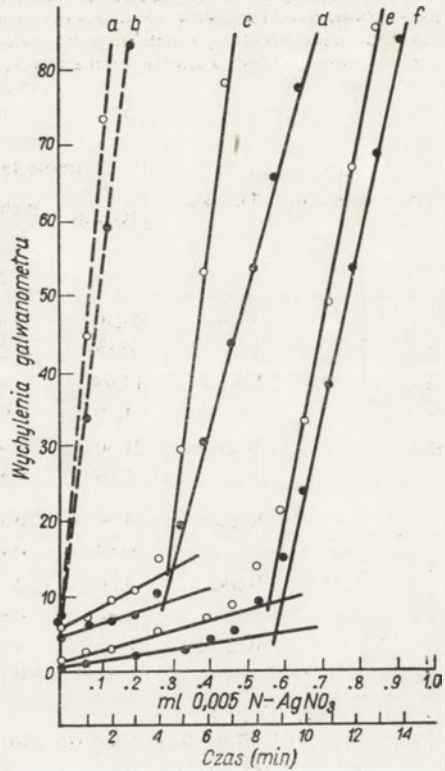
Grupy sulfhydrylowe oznaczano miareczkowaniem amperometrycznym. Elektrode porównawczą sporządzono według Kolthoffa i Harrisa [22], platynową elektrodę wirującą według Bhattacharya [12], a mostek elektrolityczny według Benescha i współprac. [9]. Miareczkowano w środowisku wodno-amoniakalnym o pH 9,2. Roztwór o końcowej, całkowitej objętości 30 ml był 0,25 N ze względu na NH_3 , 0,05 N ze względu na NH_4NO_3 i 0,01 N ze względu na KCl. W części doświadczeń stosowano środowisko opisane przez Poglazowa i współprac. [29] cechujące się większym stężeniem amoniaku. Wyniki uzyskiwane w obu przypadkach były całkowicie zgodne. Miareczkowano 0,001 lub 0,005 N roztworem AgNO_3 dodając z mikrobiurety po około 50 μl w odstępach 1-minutowych. Wchylenia galwanometru odczytywano w 55 sekund po dodaniu AgNO_3 . Elektrode standaryzowano przy użyciu roztworów glutationu (Merck). Uzyskiwane wyniki stanowiły $95 \pm 3\%$ wartości teoretycznych. Rysunek 1 podaje typowe krzywe miareczkowania roztworów glutationu

oraz homogenatów nerki. Po dodaniu wodnych roztworów glutationu do homogenatów tkanek odzyskanie grup SH glutationu było ilościowe.

Standardowe roztwory glutationu sprawdzano na zawartość grup SH miareczkowaniem jodometrycznym [28]. Całkowitą zawartość grup SH (białkowe i niebiałkowe) oznaczano w 10-krotnie rozcieńczonych wodnych hemolizatach krwi oraz w 10% wodnych homogenatach nerki i wątroby [11]. Niebiałkowe grupy SH oznaczano po odbiałczeniu kwasem sulfosalicylowym [7]. Używane jednorazowo do miareczkowania objętości homogenatów względnie ekstraktów tkanek (zwykle 1 do 2 ml) zawierały zwykle od 1 do 5 μ moli SH. Oznaczenia były wykonywane w przeciągu 3-4 godzin od chwili zabicia zwierzęcia. Homogenaty i ekstrakty tkanek do czasu wykonania miareczkowania chłodzono wodą z lodem. W tych warunkach nie stwierdzono spadku zawartości grup SH w ciągu 4 godzin. Samo miareczkowanie wykonywano w temperaturze pokojowej. Wartości grup SH białek obliczano przez odjęcie wartości niebiałkowych od wartości całkowitych grup SH. Wyniki podano w μ molach grup SH na 1 g tkanki oraz na 1 g białka.

WYNIKI

Surtshin i Yagi [35] wykazali, że nerka szczurów karmionych dietą cukrową, bezbiałkową zawiera większe ilości białkowych i niebiałkowych grup SH w porównaniu z nerką szczurów karmionych zwykłą dietą. W poprzednich naszych doświadczeniach [1] stwierdzono istotne znacze-



Rys. 1. Typowe krzywe amperometrycznego miareczkowania standardu glutationu i homogenatu nerki. Skład płynu miareczkowanego: 1 do 5 ml badanej próbki, 0,7 ml NH_4OH (c. wł. 0,923), 1,5 ml 1 M- NH_4NO_3 , 0,3 ml 1 M-KCl, woda do objętości 30 ml. (a) i (b): wyniki miareczkowania samego środowiska, bez dodania grup SH. (c) i (d): dodano po 1,5 ml standardu glutationu w kwasie sulfosalicylowym (1,5 μ mola grup SH). Znalaziono 94,5 oraz 94,0% wartości teoretycznych. (e) i (f): dodano po 2 ml 10% wodnego homogenatu nerki. Znalaziono 14,0 i 14,4 μ moli grup SH na 1 g nerki

Tablica 1

Grupy sulfhydrylowe krwi, nerki i wątroby szczurów

Wyniki uzyskano przy użyciu miareczkowania amperometrycznego w środowisku wodno-amoniakalnym. Zawartość całkowitą grup SH (a) oznaczono w pełnym homogenacie, zawartość niebiałkowych grup SH (b) po odbiałczeniu kwasem sulfosalicylowym. Zawartość grup SH białek obliczono przez odjęcie wartości niebiałkowych od wartości całkowitych. Podano średnie odchylenie

Dieta	Liczba szczurów	Tkanka	Grupy sulfhydrylowe					
			μmole/lg tkanki			μmole/lg białka tkanki		
			całkowite	niebiałkowe	białkowe	całkowite	niebiałkowe	białkowe
			(a)	(b)	(a-b)	(a)	(b)	(a-b)
Bezlaktozowa	9	Krew	23,40 ±0,88	0,96 ±0,20	22,44 ±0,13	113,9 ±8,6	4,7 ±1,8	109,2 ±8,3
		Nerka	14,95 ±1,29	2,63 ±0,47	12,32 ±1,31	101,5 ±11,8	17,8 ±1,4	83,7 ±11,5
		Wątroba	21,30 ±1,08	3,99 ±0,58	17,31 ±1,30	111,6 ±7,7	20,9 ±4,2	90,7 ±7,5
Mleczna	6	Krew	23,50 ±0,64	0,88 ±0,17	22,62 ±0,39	117,5 ±1,4	4,4 ±1,0	113,1 ±1,1
		Nerka	13,80 ±1,48	2,14 ±0,47	11,66 ±1,25	95,7 ±13,0	14,8 ±2,4	80,9 ±10,9
		Wątroba	20,65 ±0,82	4,23 ±0,79	16,42 ±1,24	105,9 ±1,6	21,7 ±5,6	84,2 ±5,8

nie laktozy w diecie dla wywołania u szczurów aminoacydurię przez parenteralne podanie kwasu maleinowego. W świetle badań Surtshin i Yagi można było przypuszczać możliwość wpływu laktozy w diecie na zawartość grup SH nerki szczurów. Uzyskane wyniki przedstawiające zawartość grup SH tkanek szczurów karmionych dietą bezlaktozową oraz dietą mleczną są zawarte w tablicy 1. Okazuje się, że obecność laktozy w diecie nie wpływa w sposób istotny na zawartość grup SH krwi, nerki i wątroby szczurów. Według danych Angielskiego i współpr. [3] w 15 minut po podaniu kwasu maleinowego rozpoczyna się znaczna diureza, która po upływie 3 godzin ulega wyraźnemu zmniejszeniu. Natomiast wydalanie azotu α-aminowego osiąga maksimum zwykle dopiero na drugi dzień po podaniu kwasu maleinowego. W oparciu o te spostrzeżenia oznaczano grupy SH tkanek szczurów zatrutych kwasem maleinowym w 15 minut, 3 godziny i 48 godzin od chwili wstrzyknięcia kwasu maleinowego. Doświadczenia robiono na szczurach karmionych dietą mleczną i bezlaktozową przypuszczając, że może dopiero przy zatruciu wystąpi wpływ diety na zawartość grup SH. Jako kontrolę użyto wyniki otrzymane u szczurów niezatrutych kwasem maleinowym. Jak widać z tablicy 2, po podaniu kwasu maleino-

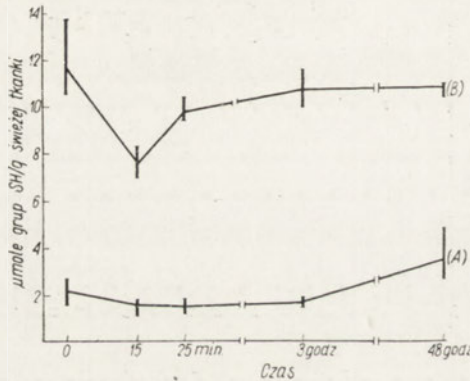
T a b l i c a 2

Grupy sulfhydrowe krwi, nerki i wątroby szczurów po zatruciu kwasem maleinowym

Kwas maleinowy wstrzyknięto podskórnie w dawce 300 mg/kg wagi szczura. Wartości kontrolne dotyczą szczurów niezatrutych kwasem maleinowym. Podano średnie odchylenie

Dieta	Liczba szczurów	Czas między podaniem kwasu maleinowego a zabiciem zwierzęcia	Krew						Nerka						Wątroba					
			Grupy SH w μ molach/1 ml krwi			Grupy SH w μ molach/1 g nerki			Grupy SH w μ molach/1 g wątroby											
			całkowite (a)	niebiałkowe (b)	Stosunek (a-b)	całkowite (a)	niebiałkowe (b)	Stosunek (a-b)	całkowite (a)	niebiałkowe (b)	Stosunek (a-b)	całkowite (a)	niebiałkowe (b)	Stosunek (a-b)	całkowite (a)	niebiałkowe (b)	Stosunek (a-b)			
Bezlaktozowa	9	kontrola	23,40 ±0,88	0,96 ±0,18	22,44 ±1,26	1:23,4	14,95 ±1,29	2,63 ±0,47	12,32 ±1,31	21,30 ±1,08	3,99 ±0,58	17,31 ±1,30	1:4,3	20,65 ±0,82	4,23 ±0,79	16,42 ±1,24	1:3,9			
	6	15 min.	24,15 ±2,13	0,97 ±0,17	23,18 ±2,12	1:23,9	11,75 ±0,49	1,86 ±0,24	9,89 ±0,47	21,25 ±2,0	4,34 ±1,24	16,91 ±1,01	1:3,9	19,65 ±1,62	4,40 ±1,11	15,25 ±0,66	1:3,5			
	5	3 godz.	22,85 ±0,92	0,83 ±0,13	22,02 ±0,82	1:26,5	12,30 ±1,07	1,54 ±0,44	10,77 ±0,85	20,00 ±0,86	3,04 ±0,68	16,96 ±0,7	1:5,6	19,90 ±1,68	3,61 ±0,65	16,29 ±1,65	1:4,5			
	4	48 godz.	23,70 ±1,76	0,88 ±0,19	22,82 ±1,75	1:25,9	13,80 ±0,56	2,75 ±0,24	11,05 ±0,47	20,00 ±1,42	3,92 ±0,66	16,08 ±1,27	1:4,1	20,65 ±0,82	4,23 ±0,79	16,42 ±1,24	1:3,9			
Mleczna	6	kontrola	23,50 ±0,64	0,88 ±0,17	22,62 ±0,39	1:25,7	13,80 ±1,48	2,14 ±0,47	11,66 ±1,25	20,65 ±0,82	4,23 ±0,79	16,42 ±1,24	1:3,9	20,65 ±0,82	4,23 ±0,79	16,42 ±1,24	1:3,9			
	5	15 min.	23,75 ±1,99	0,85 ±0,18	22,90 ±1,86	1:27,0	9,10 ±0,57	1,54 ±0,34	7,56 ±0,53	19,65 ±1,62	4,40 ±1,11	15,25 ±0,66	1:3,5	19,65 ±1,62	4,40 ±1,11	15,25 ±0,66	1:3,5			
	4	3 godz.	23,60 ±1,87	0,68 ±0,13	22,92 ±1,88	1:33,6	12,30 ±0,66	1,61 ±0,16	10,69 ±0,61	19,90 ±1,68	3,61 ±0,65	16,29 ±1,65	1:4,5	19,90 ±1,68	3,61 ±0,65	16,29 ±1,65	1:4,5			
	4	48 godz.	23,10 ±2,0	0,82 ±0,26	22,28 ±1,83	1:27,2	14,40 ±1,07	3,49 ±1,04	10,91 ±0,35	19,90 ±0,62	4,71 ±1,01	15,19 ±0,71	1:3,2	19,90 ±0,62	4,71 ±1,01	15,19 ±0,71	1:3,2			

wego zarówno u szczurów karmionych dietą bezlaktozową, jak i u szczurów karmionych dietą mleczną nie stwierdza się we krwi i w wątrobie istotnych zmian w zawartości grup SH. Natomiast wyraźne i istotne zmiany wykazują nerki. U obu grup zwierząt całkowita zawartość grup SH w nerce ulega w 15 minut znacznemu zmniejszeniu. Spadek ten dotyczy zarówno niebiałkowych, jak i białkowych grup SH. U szczurów karmionych dietą bezlaktozową w 15 minut po podaniu kwasu maleinowego zawartość całkowitych, białkowych i niebiałkowych grup SH zmniejsza się o około jedną piątą w porównaniu z wartościami normalnymi. Całkowita zawartość grup SH spada z około 15 do około 11,7 $\mu\text{moli}/1$ g tkanki; niebiałkowe grupy SH ulegają obniżeniu z około 2,6 do około 1,8; a grupy SH białek zmniejszają się z około 12 do około 10. U szczurów karmionych dietą mleczną spadek ten jest znacznie większy i wynosi ponad jedną trzecią dla całkowitych i białkowych, a jedną czwartą dla niebiałkowych grup SH w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Całkowita zawartość grup SH ulega obniżeniu z około 14 do około 9; niebiałkowe grupy SH spadają z około 2,1 do około 1,5; grupy SH białek ulegają obniżeniu z około 11,6 do około 7,5 $\mu\text{moli}/1$ g tkanki. W trzy godziny po podaniu



Rys. 2. Zmiany w zawartości niebiałkowych grup SH (A) oraz w zawartości grup SH białek (B) nerki szczurów po zatruciu kwasem maleinowym. Szczury karmiono dietą mleczną

kwasu maleinowego u obu grup zwierząt poziom białkowych grup SH ulega regeneracji, ale poziom niebiałkowych grup SH pozostaje w dalszym ciągu obniżony. W 48 godzin po podaniu kwasu maleinowego u obu grup zwierząt zawartość zarówno białkowych, jak i niebiałkowych grup SH osiąga już wartości normalne. Jak widać, spadek zawartości grup SH w nerce występuje prawie natychmiast, lecz nie utrzymuje się długo. Zmiany w zawartości grup SH białek nerki zostają wyrównane, prawie

całkowicie, już w 3 godziny po podaniu kwasu maleinowego. Regeneracja niebiałkowych grup SH odbywa się znacznie wolniej; jednak w 48 godzin po podaniu kwasu maleinowego wykazują one wartości znacznie przewyższające wartości normalne. Dokładniej ilustruje to rys. 2 przedstawiający zmiany w zawartości grup SH nerki w ciągu 48 godzin po podaniu kwasu maleinowego u szczurów karmionych dietą mleczną. Ciekawe, że w nerce szczurów karmionych dietą mleczną stosunek niebiałkowych do białkowych grup SH jest niższy (1 : 5,4) niż u zwierząt karmionych dietą bezlaktozową (1 : 4,7). To znaczy, że nerka szczurów karmionych dietą mleczną posiada mniej czynnika osłaniającego grupy SH białek. Być może dlatego w pierwszym okresie po podaniu kwasu maleinowego (15 minut) u tych szczurów spadek grup SH jest większy niż u szczurów karmionych dietą bezlaktozową; a spadek białkowych grup SH jest większy (o jedną trzecią) niż niebiałkowych grup SH (o jedną czwartą). Porównanie stosunku niebiałkowych do białkowych grup SH w nerce po 48 godzinach wskazuje, że osiąga on wyższe wartości, szczególnie u szczurów karmionych dietą mleczną. Być może jest to wynikiem mechanizmów kompensacyjnych. Występująca po podaniu kwasu maleinowego znaczna diureza oraz spadek zwierząt na wadze nasuwały przypuszczenie występowania istotnych zmian w uwodnieniu tkanek po podaniu kwasu maleinowego. Okazuje się jednak, że wartości azotu całkowitego tkanek szczurów zatrutych kwasem maleinowym i zabijanych

T a b l i c a 3

Zawartość azotu całkowitego oraz białka (N całkowity $\times 6,25$) we krwi, nerce i wątrobie szczurów

Podane wyniki wyrażają średnie wartości, zarówno szczurów kontrolnych, jak i szczurów zatrutych kwasem maleinowym. Podano średnie odchylenie

Dieta	Liczba szczurów	Azot całkowity			Białko (N całk. $\times 6,25$)		
		mg/1 ml	mg/1g świeżej tkanki		mg/1 ml	mg/1g świeżej tkanki	
		Krew	Nerka	Wątroba	Krew	Nerka	Wątroba
Bezlaktozowa	24	32,87 $\pm 0,91$	23,55 $\pm 0,73$	30,51 $\pm 1,15$	205,5 $\pm 6,6$	147,2 $\pm 5,1$	190,7 $\pm 8,0$
Mleczna	19	32,00 $\pm 1,02$	23,08 $\pm 0,70$	31,19 $\pm 1,20$	200,0 $\pm 7,1$	144,2 $\pm 4,9$	194,9 $\pm 8,4$

w 15 minut, 3 godziny i 48 godzin później nie wykazują żadnych istotnych różnic w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych. Średnie wartości azotu całkowitego krwi, nerki i wątroby szczurów oraz odpowiadające im wartości białka (N całkowity $\times 6,25$) przedstawia tablica 3. Wartości grup SH wzięte z tablicy 2, po przeliczeniu na 1 g białka tkanki

T a b l i c a 4

Grupy sulfhydrylowe krwi, nerki i wątroby szczurów po zatruciu kw. maleinowym

Przedstawione wyniki uzyskano przez przeliczenie wyników zawartych w tabelcy 2 na g białka tkanki. Podano średnie odchylenie

Dieta	Czas między podaniem kwasu maleinowego a zabiciem zwierzęcia	Grupy sulfhydrylowe w $\mu\text{molach/1g}$ białka tkanki											
		Krew				Nerka				Wątroba			
		całkowite (a)	niebiałk. (b)	białkowe (a-b)	całkowite (a)	niebiałk. (b)	białkowe (a-b)	całkowite (a)	niebiałk. (b)	białkowe (a-b)			
Bezłaktózowa	kontrola	113,9 ±8,6	4,7 ±1,80	109,2 ±8,3	101,5 ±11,8	17,8 ±1,4	83,7 ±11,5	111,6 ±7,7	20,9 ±4,2	90,7 ±7,5			
	15 min.	117,5 ±9,5	4,7 ±0,57	112,8 ±10,4	79,8 ±2,7	12,6 ±2,2	67,2 ±2,0	111,4 ±11,5	22,7 ±9,8	88,7 ±11,0			
	3 godz.	111,2 ±2,1	4,1 ±0,67	107,1 ±1,0	83,6 ±6,9	10,4 ±3,4	73,2 ±7,5	105,0 ±3,4	16,0 ±3,6	89,0 ±1,8			
	48 godz.	115,3 ±8,1	4,3 ±1,25	111,0 ±11,0	93,1 ±1,1	18,0 ±2,5	75,1 ±2,7	105,0 ±5,2	20,0 ±3,8	85,0 ±4,8			
Mleczna	kontrola	117,5 ±1,4	4,4 ±1,0	113,1 ±1,1	95,7 ±13,0	14,8 ±2,4	80,9 ±10,9	105,9 ±1,6	21,7 ±5,6	84,2 ±5,8			
	15 min.	118,7 ±9,8	4,3 ±1,3	114,4 ±9,4	63,1 ±2,8	10,6 ±2,8	52,5 ±7,3	100,8 ±7,7	22,6 ±6,5	78,2 ±3,3			
	3 godz.	118,0 ±9,3	3,4 ±0,9	114,6 ±10,0	85,3 ±2,5	11,2 ±1,2	74,1 ±4,1	102,1 ±5,8	18,5 ±7,0	83,6 ±7,1			
	48 godz.	115,5 ±9,5	4,1 ±2,7	111,4 ±8,7	99,9 ±13,0	24,3 ±7,9	75,6 ±1,7	102,1 ±1,8	24,2 ±6,1	77,9 ±1,9			

przedstawione są w tablicy 4. Analiza danych zawartych w tablicy 4 prowadzi do wniosków, całkowicie zgodnych ze spostrzeżeniami poczynionymi na podstawie danych zawartych w tablicy 2, o zmianach zawartości grup SH nerki po podaniu kwasu maleinowego.

DYSKUSJA

Wartości niebiałkowych grup sulfhydrylowych oznaczane przez różnych badaczy przy użyciu różnych metod wykazują znaczne rozbieżności [31, 18, 5, 20]. Poza różnicami wynikającymi ze stosowanej metody istotny wpływ na wynik mają również: ogólny stan zwierząt (głodzenie i zimno wybitnie obniżają niebiałkowe grupy SH wątroby, nieznacznie nerki [5]); dieta stosowana do karmienia zwierząt [35]; płeć, a także pora dnia, w której wykonuje się doświadczenia [6]. Niewiele jest danych o zawartości grup SH białek w homogenatach takich tkanek jak nerka, wątroba a nawet krew. Materiał porównawczy jest skąpy. Zestawienie wyników własnych dla szczurów niezatrutych kwasem maleinowym z rezultatami Bhattacharya [12] oraz Surtshin i Yagi [35] przedstawia tablica 5. Uzyskane w tej pracy wartości całkowitych grup SH w nerce wykazują zgodność z wynikami Bhattacharya oraz Surtshina i Yagi, stosunek niebiałkowych do białkowych grup SH przesunięty jest jednak nieco na korzyść grup SH białek. Natomiast we krwi wartości całkowitych i białkowych grup SH są prawie o jedną piątą niższe w porównaniu z wynikami Bhattacharya. Dla wątroby różnice są większe i dotyczą one, jak to widać z danych tablicy 5, przede wszystkim białkowych grup SH. Podkreślić trzeba, że Bhattacharya stosował tzw. ślepą próbę z *p*-chlorortęciobenzoanem.

W interpretacji uzyskanych wyników jako punkt wyjścia przyjęto bezpośrednią reakcję *in vivo* kwasu maleinowego z grupami SH. Reakcja ta została *in vitro* udowodniona przez Morgana i Friedmanna [25] oraz Weil-Malherbe [36]. Fakt, że po podaniu szczurom kwasu maleinowego stwierdza się spadek grup SH w nerce nie jest wprawdzie bezpośrednim i dostatecznym dowodem występowania tej reakcji *in vivo*, stanowi jednak poważne potwierdzenie takiego przypuszczenia. Uzyskane wyniki zdają się wskazywać, że zmiany zawartości grup SH po podaniu kwasu maleinowego dotyczą wybiórczo nerki. Skądinąd wiadomo, że po podaniu diuretyków rtęciowych, rtęć zostaje wybiórczo wychwyтана przez nerkę [14, 13, 26]. Przyjmuje się przy tym, że jest ona wiązana przez grupy SH białek [14, 21, 15].

Stwierdzono, że spadek zawartości grup SH nerki jest nagły i występuje już w 15 min. po podaniu kwasu maleinowego. Podobnie Lazarow [23] stwierdził po podaniu alloksanu nagle i bardzo znaczne obniżenie

T a b l i c a 5

Zestawienie porównawcze zawartości grup SH krwi, nerki i wątroby szczurów, oznaczonych miareczkowaniem amperometrycznym

Wyniki Bhattacharya przeleczono z mg SH na μ mole SH w odniesieniu do 1 g tkanki. Wyniki Surtshina i Yagi dotyczą szczurów karmionych dietą zwykłą. Wyniki własne dotyczą szczurów karmionych dietą bezlaktosową. W nawiasach wartości graniczne

Autor	Tkanka	Grupy SH w μ molach na 1g tkanki		Grupy SH w μ molach na 1g białka tkanki			
		całkowite (a)	niebiałkowe (b)	białkowe (a-b)	całkowite (a)	niebiałkowe (b)	białkowe (a-b)
Bhattacharya [12]	Krew	27,68 (25,00—30,60)	0,88 (0,76—1,00)	26,80			
	Nerka	14,60 (13,65—16,50)	3,40 (2,64—3,95)	11,20			
	Wątroba	16,80 (15,60—17,80)	8,00 (7,10—9,70)	8,80			
	Nerka				101,0 \pm 8,4	24,6 \pm 1,9	76,1 \pm 0,8
Surtshin i Yagi [35]	Krew	23,40 (21,70—26,00)	0,96 (0,60—1,30)	22,44 (20,80—24,90)			
	Nerka	14,95 (13,00—16,75)	2,63 (2,00—3,30)	12,32 (10,73—14,40)	101,5 \pm 11,8	17,8 \pm 1,4	83,7 \pm 11,5
	Wątroba	21,30 (19,50—23,25)	3,99 (3,50—5,00)	17,31 (15,75—19,20)			
Własne wyniki:							

się poziomu glutationu krwi i wątroby i stopniowy powrót do wartości normalnych w przeciągu około 24 godzin. Przypuszcza on, że alloksan łączy się najpierw z niebiałkowymi grupami SH (glutation), a dopiero po całkowitym wyczerpaniu w danej tkance tych niebiałkowych grup SH reaguje z grupami SH białek.

Dane przedstawione w tablicy 2 i 4 wskazują, że po podaniu kwasu maleinowego ulegają spadkowi równocześnie zarówno niebiałkowe, jak i białkowe grupy SH, mniej więcej w tym samym stosunku. Jednak stan grup SH białek ulega wyrównaniu znacznie szybciej aniżeli niebiałkowe grupy SH. Ponadto spadek całkowitej zawartości grup SH jest większy u szczurów karmionych dietą mleczną; nerki tych szczurów zawierały stosunkowo mniej niebiałkowych grup SH. Wskazuje to na ich istotne znaczenie jako czynnika osłaniającego grupy SH białek [32]. Nie można jednak powiedzieć, że łączenie się kwasu maleinowego z niebiałkowymi grupami SH poprzedza jego reakcję z grupami SH białek, gdyż początkowy spadek zarówno niebiałkowych, jak i białkowych grup SH nerki jest równoczesny, tak samo gwałtowny i ilościowo podobny.

Według Borghgraefa i Pittsa [13] diureza występująca po podaniu diuretyków rtęciowych jest związana z szybkością wychwytywania rtęci przez nerki i z szybkością jej wydalania. U psów rtęć zostaje bardzo szybko wychwytana przez nerkę i następnie wydalona. Odpowiednikiem tego jest natychmiastowa i krótkotrwała diureza. U szczurów natomiast wiązanie przez nerkę i wydalanie rtęci odbywa się powoli, w związku z czym diureza u szczurów rozpoczyna się później i trwa dłużej. Diureza występująca po podskórnym podaniu kwasu maleinowego w dawce 300 mg/kg wagi szczura ma następujący przebieg [3]. Już w 15 minut po podaniu kwasu maleinowego szczur zaczyna wydalac znaczne ilości moczu; mniej więcej po 3 godzinach diureza ulega wyraźnemu zmniejszeniu. W przeciągu tych pierwszych 3 godzin szczur wydalala przeciętnie ilość moczu odpowiadającą normalnej dobowej diurezie lub nawet większą. Całkowita ilość wydalonego moczu w pierwszej dobie po podaniu kwasu maleinowego przewyższa 2 do 3 razy normalną dobową ilość. Największe nasilenie diurezy jest zwykle na 2 lub 3 dzień po zatruciu, przy czym ilości wydalonego moczu są 2 do 4 razy większe niż w normie. Podobnie w 2 lub 3 dniu ilość wydalanego azotu α -aminowego osiąga najwyższe wartości. Dość trudno jest łączyć taki przebieg diurezy oraz aminoacydurii ze zmianami zawartości grup SH nerki po podaniu kwasu maleinowego, tym bardziej że nic nie jest wiadomo, w jakiej postaci i kiedy kwas maleinowy jest wydalany z moczem. Można jednak przypuścić,

że znaczna początkowa diureza rozpoczynająca się nagle około 15 minut po podaniu kwasu maleinowego wiąże się z występującym w tym czasie gwałtownym i bardzo znacznym spadkiem zawartości grup SH białek nerki. Po 3 godzinach białkowe grupy SH nerki ulegają znacznej regeneracji, w tym też czasie ulega zahamowaniu początkowa diureza. Jednak w 48 godzin po podaniu kwasu maleinowego wartości grup SH białek nerki są już tylko bardzo nieznacznie (o jedną piętnastą) niższe w porównaniu ze stanem przed zatruciem, a jednak w tym czasie występuje największe nasilenie diurezy i aminoacydurii. Brak jest w tej chwili podstaw do jakiegokolwiek interpretacji tych faktów.

Spadek ilości grup SH w 15 minut po podaniu kwasu maleinowego stwierdzony w nerce szczurów karmionych dietą mleczną wynosi przeszło jedną trzecią wartości normalnych. Jeżeli przyjąć, że dorosły szczur wagi około 200 g posiada około 1,7 g tkanki nerkowej (obie nerki), a normalna całkowita zawartość grup SH w nerce jest rzędu 14 $\mu\text{moli/l}$ g tkanki; to po przeliczeniu okaże się, że obie nerki takiego szczura zawierają około 24 μmole grup SH. Z drugiej strony wiadomo, że toksyczna dla szczurów dawka sublimatu wynosi 3 mg/1 kg wagi ciała [4]. Na szczura wagi 200 g wypada więc około 2,2 μmola rtęci. Jeżeli założyć, że wszystkie rtęć zostanie wychwyтана przez nerkę, a nawet, że zostanie związana w formie podwójnego merkaptynu -S-Hg-S-, wówczas ilość grup SH, jaką może ona związać, wynosi tylko około 4,5 μmola . A więc ilość rtęci, która zabija zwierzę, może związać maksymalnie tylko połowę tej ilości grup SH, która przypuszczalnie zostaje wiązana przez kwas maleinowy. Zapewne chodzi tu o zdolność wiązania przez rtęć i kwas maleinowy różnych grup SH, czynnych w różnych procesach związanych z funkcją lub przemianą pośrednią nerki. Dobrze znany jest fakt, że rtęć wychwytywana przez nerkę gromadzi się głównie w rozpuszczalnej frakcji cytoplazmatycznej [35, 17]. W pewnym odsetku jednak wiązana jest też przez mitochondria [17]. Z drugiej strony Surtshin i Yagi wykazali [35], że osłaniające w stosunku do sublimatu działanie diety cukrowej, bezbiałkowej wyraża się znacznym zwiększeniem zawartości grup SH (przede wszystkim białkowych) we frakcji cytoplazmatycznej. W nerce szczurów karmionych taką dietą ilość rtęci wiązana przez frakcję cytoplazmatyczną jest znacznie większa, natomiast frakcja mitochondrialna wiąże wówczas prawie dwukrotnie mniejsze ilości rtęci. Autorzy przypuszczają, że zwiększona tolerancja tych zwierząt na sublimat jest spowodowana osłaniającym mitochondria działaniem zwiększonej zawartości grup SH cytoplazmy. Być może działanie kwasu maleinowego na mitochondria nerki jest ze względu na jego strukturę, lub z innych przyczyn, utrudnione. Na podstawie przypuszczenia Surtshin i Yagi w ten właśnie sposób można by tłuma-

czyć fakt, że dawka kwasu maleinowego wiążąca 2 razy więcej grup SH nerki, niż śmiertelna dawka sublimatu, nie zabija jednak zwierzęcia.

Z tego względu celowym wydaje się przebadanie wpływu kwasu maleinowego na zawartość grup SH w poszczególnych frakcjach homogenatów nerki.

STRESZCZENIE

U szczurów zatrutych kwasem maleinowym oznaczano miareczkowaniem amperometrycznym zawartość grup sulfhydrylowych krwi, nerki i wątroby. Oznaczenia wykonywano: w 15 minut, 3 godziny, w 48 godzin po podskórnym podaniu kwasu maleinowego w dawce 300 mg na 1 kg wagi szczura. Ani w krwi, ani w wątrobie nie stwierdzono zmian w zawartości grup SH w porównaniu ze stanem u zwierząt niezatrutych. Natomiast w nerce, w 15 minut po zatruciu, zawartość białkowych i niebiałkowych grup SH ulega znacznemu obniżeniu. I to u szczurów karmionych dietą bezlaktozową o około jedną piątą, a u szczurów karmionych dietą zawierającą laktozę o około jedną trzecią wartości normalnych (tj. szczurów niezatrutych). W 3 godziny po podaniu kwasu maleinowego poziom grup SH białek ulega regeneracji, a po 48 godzinach zarówno białkowe, jak i niebiałkowe grupy SH osiągnają wartości normalne.

W dyskusji porównano działanie kwasu maleinowego oraz działanie rtęci na grupy sulfhydrylowe nerek i przypuszczalną łączność tego zjawiska z diurezą w obydwóch omawianych zatruciach.

LITERATURA

- [1] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 295, 1959.
- [2] Angielski S., Rogulski J., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 411, 1959.
- [3] Angielski S., Rogulski J., Madońska L., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 269, 1960.
- [4] Aposhian H. V., Aposhian M. M. *J. Pharmacol.* **126**, 131, 1959.
- [5] Barlett R. G., Register U. D., *Proc. Exper. Biol. Med.* **86**, 397, 1954.
- [6] Beck L. V., Rieck V. D., Duncan B. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **97**, 229, 1958.
- [7] Benesch R. E., Benesch R., *Arch. Biochem.* **28**, 43, 1950.
- [8] Benesch R., Benesch R. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 425, 1952.
- [9] Benesch R. E., Lardy H. A., Benesch R., *J. Biol. Chem.* **216**, 663, 1955.
- [10] Berliner R. W., Kennedy T. J., Hilton J. G. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **75**, 791, 1950.
- [11] Bhattacharya S. K., *Biochem. J.* **69**, 43P, 1958.
- [12] Bhattacharya S. K. *Nature* **183**, 1327, 1959.
- [13] Borghgraef R. R. M., Pitts R. F. *J. Clin. Invest.* **35**, 31, 1956.
- [14] De Metry J. P., Aikawa J. K. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **90**, 415, 1955.
- [15] Farah A., Bender C. H., Kruse R., Cafruny E. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **125**, 309, 1959.

- [16] Friedmann E., Marrian D. H., Simon-Reuss J. *Brit. J. Pharmacol.* **3**, 335, 1948.
[17] Greif R. L., Sullivan W. J., Jacobs G. S., Pitts R. F. *J. Clin. Invest.* **35**, 38, 1956.
[18] Grunert R. R., Phillips P. H. *Arch. Biochem.* **30**, 217, 1951.
[19] Harrison H. E., Harrison H. C., *Science* **120**, 606, 1954.
[20] Jocelin P. P., *Clin. Chim. Acta* **3**, 401, 1958.
[21] Kleinzeller A., Cort J. A. *Biochem. J.* **67**, 15, 1957.
[22] Kolthoff J. M., Harris W. E. *Ind. Eng. Chem. Analyt. Ed.* **18**, 161, 1946.
[23] Lazarow A. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **66**, 4, 1947.
[24] Morgan E. J., Friedmann E. *Biochem. J.* **32**, 733, 1938.
[25] Morgan E. J., Friedmann E. *Biochem. J.* **32**, 862, 1938.
[26] Mustakallio K. K., Teikä A. *Science* **118**, 320, 1953.
[27] Niemi R., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 95, 1960.
[28] Patterson J. W., Lazarow A. w *Methods of Biochemical Analysis* (ed. D. Glick), vol. 2, p. 267, Interscience Publishers, N. York, 1955.
[29] Poglazow B. F., Biluszi W., Bajew A. A. *Biochimia* **23**, 269, 1958.
[30] Potter V. R., Du Bois K. P. *J. Gen. Physiol.* **26**, 391, 1943.
[31] Schraeder E. F., Woodward G. E. *J. Biol. Chem.* **129**, 283, 1939.
[32] Singer T. P., Barron E. S. G. *J. Biol. Chem.* **157**, 241, 1945.
[33] Snell J. M., Weisberger A. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 450, 1939.
[34] Stave U. *Klin. Wochenschr.* **35**, 860, 1957.
[35] Surtshin A., Yagi K. *Am J. Physiol.* **192**, 405, 1958.
[36] Weil-Malherbe H. *Biochem. J.* **32**, 2257, 1938.

SULPHYDRYL GROUPS IN RAT TISSUES AFTER INTOXICATION WITH MALEIC ACID

Summary

The sulphhydryl group contents were estimated in blood, kidneys and liver of the maleic acid intoxicated rats. Amperometric titration was applied. Measurements were performed within 15 minutes, 3 hours and 48 hours after the subcutaneous administration of maleic acid at doses of 300 mg. per kg. of body weight. No changes in the contents of SH groups were found in blood nor in liver as compared with values found in normal animals. In kidneys, however, a considerable decrease in both protein and non-protein SH groups was observed within 15 minutes after intoxication. This decrease amounted for about 1/5 of normal values in the lactose-free diet fed rats and 1/3 in those fed with lactose containing diet. The normal level of the protein SH groups was reestablished after 3 hours while the total SH group content was so after 48 hours.

The effect of maleic acid is discussed in comparison to that of mercurium upon the kidneys SH groups as well the hypothetic relationship of this phenomenon and diuresis in both intoxications.

Otrzymano 16.1.1960 r.

M. LASKOWSKI and BEATRICE KASSELL

CHROMATOGRAPHIC STUDIES WITH CHYMOTRYPSINOGEN B AND CHYMOTRYPSIN B*

*Department of Biochemistry, Marquette University School of Medicine,
Milwaukee, Wisconsin (USA)*

Chymotrypsinogen B [11, 13, 7], and its activated form, chymotrypsin B [1], have been crystallized starting with the acid extract of beef pancreas. They were found to be distinct from the basic proteins of the α -series in that the proteins of the B series were acidic, with isoelectric points of 5.2 for the zymogen, and 4.7 for the activated enzyme [9]. These findings have been confirmed by the results of Hirs [5] who used chromatography on IRC 50, XE-64 resin, and recently by Keller, Cohen and Neurath [8] who chromatographed the fresh pancreatic juice obtained from steers with pancreatic duct fistulas and found two chymotrypsinogen peaks corresponding to α and B respectively.

In many other aspects, however, proteins of the B series resemble those of the α -series. Qualitatively, the specificity appears to be identical [2]; the molecular weights are similar [17], and so is the behaviour toward naturally occurring trypsin inhibitors [18]. Both zymogens, α and B, can be activated by trypsin, whereas some difference was noted in respect to the activation by enterokinase [7].

In order to study the detailed mechanism of activation by trypsin it was imperative to obtain chymotrypsinogen B free from activated chymotrypsin B. Unfortunately, the method of preparation previously described [12] does not prevent a partial activation, and crystalline chymotrypsinogen B may contain up to 3 per cent of the activated enzyme. It was therefore decided to subject crystalline preparations of chymotrypsinogen B to chromatography on substituted celluloses with

* Supported by the grants from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institute of Health, U. S. Public Health Service (A-535), and the National Science Foundation (NSF-G-2430). Preliminary results pertaining to chromatography on CM-cellulose have been published [6].

the hope that a clean-cut separation of the zymogen from the activated form would be achieved.

The present paper describes such a method. However, as the study progressed, it became clear that neo-chymotrypsinogens B (term analogous to that of Desnuelle [16]) exist and are not separated by this procedure. It was also shown that more than one active form of chymotrypsin B exists. One of these forms has been crystallized.

MATERIAL AND METHODS

Chymotrypsinogen B and chymotrypsin B were prepared by the standard methods used in this laboratory [12]. Crystalline carboxypeptidase A was purchased from Worthington Biochemical Corporation and was washed according to Gladner and Neurath [3].

Carboxymethyl cellulose (CM-cellulose) and diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose) were prepared according to Peterson and Sober [15]. All chromatographic experiments were performed in the the cold room at approximately 3°. Nalcite HCR resin, 15-30 mesh, 8 to 12 per cent cross-linked, hydrogen form [3] was a gift from the National Aluminate Corporation, Chicago, Illinois.

Activity was determined by the method of Kunitz [10] with casein as substrate. Instead of expressing potency as activity per $\mu\text{g.}$ of protein, potency was expressed in per cent of the standard chymotrypsin B. The standard curve for the average preparation of chymotrypsin B has been published previously [18, 12]. It may be stated that the standard curve is a composite obtained from numerous experiments on several different preparations, and that deviations of + or - 10 per cent have been observed with some preparations. The deviations have been ascribed to the analytical error and to self-digestion of chymotrypsin B encountered during the preparation. In some cases activity was also determined by the method of Parks and Plaut [14], with phenylalanine ethyl ester (PhEE) as substrate. Potency was also expressed in per cent of the previously established standard [18].

Protein concentration was determined spectrophotometrically and expressed directly as absorbancy. Thus, $1E_{280}$ unit of absorbancy corresponds to a solution of protein having an absorbancy of 1.000 at 280 $m\mu$ in standard cell of the Beckman DU spectrophotometer with 1 cm. light path. In order to express concentration in mg./ml. it is necessary to multiply the absorbancy by the optical factor, which was established for chymotrypsinogen B as 0.55 and for chymotrypsin B as 0.54 [18, 12].

C-terminal amino acids were determined by a method similar to that described by Gladner and Neurath [3]. The chymotrypsinogen preparations

were dialyzed against 0.001 M-HCl to remove traces of adhering amino acids. Quantities equivalent to 0.1 μ mole were digested with 0.01 μ mole of carboxypeptidase A in the presence of diisopropyl fluorophosphate for one hour at 25° in 0.3 ml. of 0.05 M-phosphate buffer, pH 7.8. The reaction was stopped by addition of 0.2 ml. of 0.1 M-HCl and about 100 mg. of nalcite resin, which removed the free amino acids from the residue of protein. The resin was washed, the amino acids eluted with ammonium hydroxide and the solution evaporated. The residue was dissolved in a small amount of dilute ammonia and chromatographed in the system *n*-butanol - acetic acid - water, 4:1:5. The spots were developed and the amino acids determined quantitatively by the method of Hellmann *et al.* [4].

RESULTS

Chymotrypsinogen B, twice recrystallized and containing 1.4 per cent activity, as determined by Kunitz's method, was dissolved in water acidified with HCl, and was dialyzed against 0.1 M-phosphate, pH 4.5. After dialysis 36 ml. of solution containing 2,150 E_{280} units (equivalent to 1.150 mgs. of protein) was charged on a CM-cellulose column 2.5 \times \times 30 cm., previously equilibrated with 0.1 M-phosphate, pH 4.5. The results of the experiment are illustrated in Fig. 1.

Table 1

Analysis of terminal groups of chromatographed preparations of Chymotrypsinogen B

Chymotrypsinogen preparation							
Amino acids* moles/mole	1	2	4	5	7	8	9
Asp + Ser	0.01	0.03 0.04	0 0.02	0.10	0.03 0.02	0.34 0.35	0.09 0.13
Ala + Glu + Thr	0.04	0.05 0.06	0.06 0.08	0.17 0.17	0.09 0.08	0.45 0.44	0.12 0.15
Leu	0.08	0.06 0.06	0.07 0.08	0.20 0.21	0.11 0.10	1.84 1.99	0.24 0.28
Phe	0.01	0.01 0.01	0.01 0.01	0.08 0.08	0.02 0.03	0.45 0.45	0.09 0.12
Tyr	0.28	0.31 0.36	0.43 0.48	0.43 0.46	0.38 0.36	0.81 0.98	0.21 0.25
Val	0.21	0.03 0.03	0.01 0.02	0.10 0.10	0.04 0.04	0.87 0.86	0.17 0.20

* AspNH_2 was present in varying amounts from a trace to a definite spot, but was not determined quantitatively.

The first peak which emerged from the column with a charging buffer had activity of the order of 0.1 per cent. Only on the descending side of

the peak activity increased, as indicated by the figures above the line representing the protein concentration. After the pH of the eluting buffer was changed to 6.0, a second peak emerged, in which active chymotrypsin was concentrated.

It might be mentioned in passing that solutions of chymotrypsinogen B emerging from the column at high concentrations crystallized very readily. Not uncommonly, it was sufficient to bring the tubes from the cold room to the laboratory to induce crystallization. Even at pH close to 4.5 crystals were typical plates.

Several chromatographic experiments of the type shown in Fig. 1 have been performed with essentially identical results. However, when these preparations of chymotrypsinogen B, all of which contained about 0.1 per cent of activity were examined for the C-terminal groups with carboxypeptidase, it became evident that the preparations were not uniform.

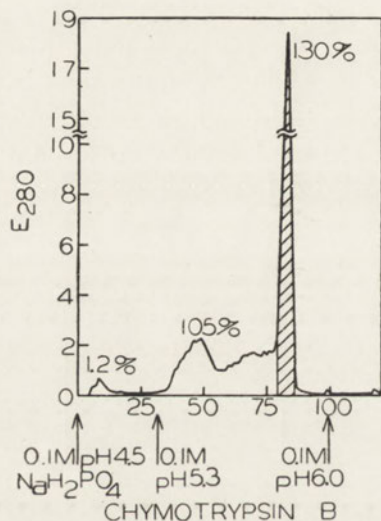


Fig. 1

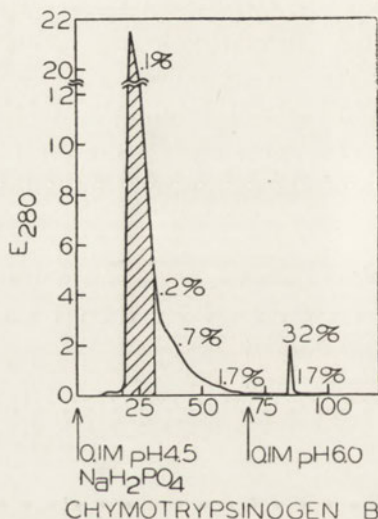


Fig. 2

Fig. 1. Chromatography on Chymotrypsinogen B on CM-cellulose. Abscissa: tube number; eluting buffers are indicated by arrows. Ordinate: protein concentration expressed in absorbancy at 280 m μ . Conditions are described in the text. The percentage figures above the curve indicate the chymolytic activity of the particular fraction. The shaded area had a uniform activity of 0.1 per cent

Fig. 2. Chromatography of Chymotrypsin B on CM-cellulose. Symbols as in Fig. 1

Table 1 shows the results. The observed variations lie far beyond the experimental error. It was therefore concluded that in the course of preparation of chymotrypsinogen B some openings of the peptide chain occurred, and that these splits were caused by the action of chymotrypsin

B. The inactive peaks, therefore, are not homogeneous, but are mixtures composed of chymotrypsinogen B and one or more neo-chymotrypsinogens B. The latter are not separable by the method employed. The results also indicate that during the preparation procedure control of chymotryptic activity was unsatisfactory. Even if one discards experiment 8 (Table 1) as an "unlucky" accident, the findings of C-terminal tyrosine in the range 0.21 - 0.43 moles per mole of protein is indicative for chymotryptic proteolysis.

In order to verify that the active form of chymotrypsin B is separable from the inactive zymogen on CM-cellulose, under the conditions studied, experiments were performed with activated form. The details of one of

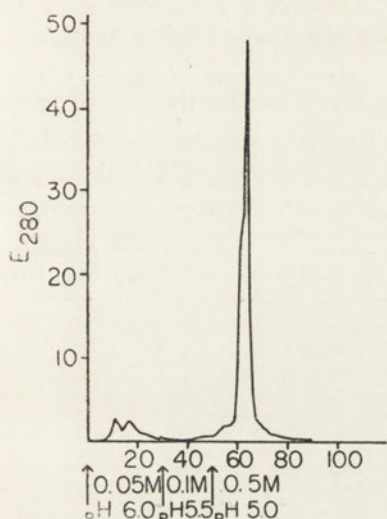


Fig. 3. Chromatography of mixed preparations of Chymotrypsin B on DEAE-cellulose. Symbols as in Fig. 1

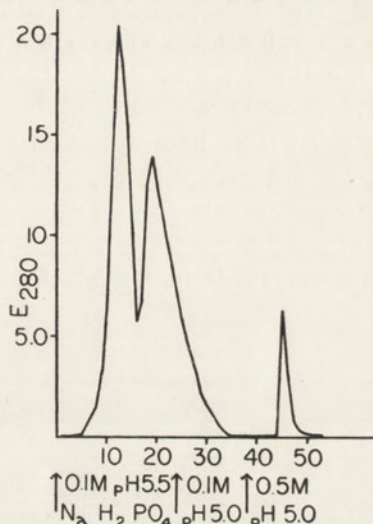


Fig. 4. Rechromatography of peak 3 from Fig. 3 on DEAE-cellulose. Symbols as in Fig. 1

the experiments (Fig. 2) were as follows: a CM-cellulose column 2.5×30 cm. was equilibrated with 0.1 M-phosphate, pH 4.5. Chymotrypsin B, once crystallized [12], had an initial activity of 110 per cent, as determined by the method of Kunitz. The solution charged on the column contained 2,646 E_{280} units, 20 ml. fractions were collected and the flow rate was approximately 10 ml./hr. The results of this experiment (Fig. 2) indicate that a small amount of the non-activated zymogen was still present in our preparation, thus confirming the validity of this system for the purpose of separation of active and inactive forms. Furthermore, the graph shows that active fractions separate into three, poorly defined, regions with different specific activity. The most active peak appears last.

The results of this experiment suggest that more than one active form of chymotrypsin B exists, and that the process of slow activation involves several hydrolytic cleavages caused not only by trypsin, but also by chymotrypsin.

This aspect has been investigated somewhat further. Several crystalline preparations of chymotrypsin B, some of which were stored in the laboratory for a period of five years were combined, dissolved with the addition of a few drops of 1M-NH₄OH, and dialyzed against 0.005 M-phosphate buffer, pH 6.7. The total amount of protein was 1,487 E₂₈₀ units. Specific activity, as read from the standard curve was 90 per cent of the standard. The dialyzed protein was applied to a DEAE-cellulose column 2 × 14 cm., and 3 ml. fractions were collected. The flow rate was about 8 ml./hr. The results of this experiment are illustrated in Fig. 3. Of the three major peaks, the first two had higher activity of 105 and 110 per cent, respectively, but were too small for further purification. The third peak had an activity of about 85 per cent of the standard. The tubes representing the third peak were pooled, lyophilized, and rechromatographed on DEAE-cellulose, using an identical column, but starting with 0.1 M-phosphate buffer, pH 5.5. The results are shown in Fig. 4. The activity of all three peaks was found identical by the PhEE

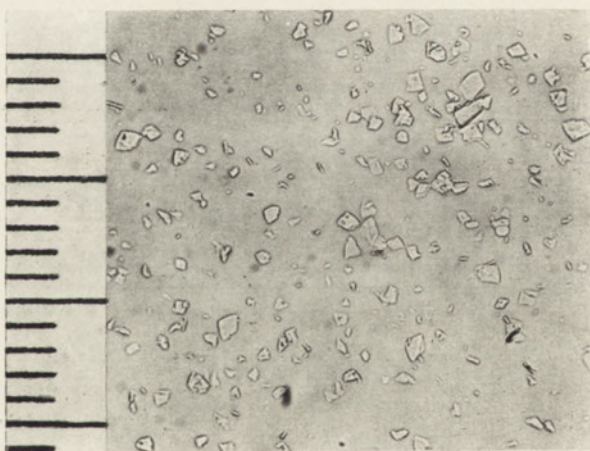


Fig. 5. Crystalline form of Chymotrypsin B obtained from peak 1, Fig. 4. The magnification is indicated on the side of the photograph. The distance between the short lines is 10 microns

method, and corresponded to 80 per cent of the standard. With casein the activity of the peak 1 was 80 per cent whereas that of peaks 2 and 3 — 85 per cent of the standard.

Peak 1 was pooled, lyophilized and dialyzed against 0.01 M-acetate buffer, pH 5.0 with frequent changes of buffer. A crystalline precipitate formed. Fig. 5 illustrates the crystals obtained. The crystalline form is different from any of the previously observed forms of chymotrypsin B.

DISCUSSION

Chromatography on CM-cellulose differentiates between the active and the non-activated proteins of the B series, but does not differentiate between "native" chymotrypsinogen B and neo-chymotrypsinogens B (Fig. 1 and Table 1). There are serious limitations imposed by the use of CM-cellulose, which is unstable below pH 4.0; yet, the chromatography of a "native" zymogen must be performed in an acidic medium to avoid further transformation by active chymotrypsin. Whereas none of the neo-chymotrypsinogens B has been isolated, evidence for their existence is supplied by the results shown in Table 1 and other data to be published separately. The preparation of "native" chymotrypsinogen B must therefore be approached by employing methods which from the start eliminate the chance for either tryptic or chymotryptic split.

The existence of more than one form of active chymotrypsin B has been shown by chromatography (Figs. 3 and 4) and by isolation of one of such forms. It is impossible to decide which stage of activation the new form represents. From consideration of the lower activity it may be expected to represent one of the terminal stages of activation, particularly so, since preliminary experiments with fast activation indicate that the early stages are most active.

The experimental evidence presented in this paper strongly suggests that the mechanism of activation of chymotrypsinogen B resembles that of α -chymotrypsinogen.

We acknowledge with thanks the assistance of Dr. R. P. Miech, Miss F. C. Wu, Mrs. Gloria Hagerty, Mrs. Bennie DuBois, and Mrs. Joan Blaskovics at various phases of this work.

SUMMARY

Crystalline chymotrypsinogen B obtained by the previously described procedure may contain up to 3 per cent of the active enzyme. The latter can be removed by chromatography on CM-cellulose. However, the method is not recommended for the preparation of the zymogen, since

the inactive fraction represents a mixture of the original chymotrypsinogen B, and neo-chymotrypsinogens B.

Chromatographic studies also revealed that several forms of active chymotrypsins B exist. One of these forms has been crystallized.

REFERENCES

- [1] Brown K. D., Shupe R. E. and Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **173**, 99, 1948.
- [2] Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **173**, 109, 1948.
- [3] Gladner J. A. and Neurath H., *J. Biol. Chem.* **205**, 345, 1953.
- [4] Hellmann J., Barrolier J. and Watzke E., *Z. physiol. Chem.* **309**, 219, 1958.
- [5] Hirs C. H. W., *J. Biol. Chem.* **205**, 93, 1953.
- [6] Kassell B. and Laskowski M., *Abstracts Am. Chem. Soc. Miami Meeting*, April 1957, p. 68C.
- [7] Keith C. K., Kazenko A. and Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **170**, 227, 1947.
- [8] Keller P., Cohen E. and Neurath H., *J. Biol. Chem.* **233**, 344, 1958.
- [9] Kubacki V., Brown K. D. and Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **180**, 73, 1949.
- [10] Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **30**, 291, 1947.
- [11] Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **166**, 555, 1946.
- [12] Laskowski M., in *Methods of Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, editors), Academic Press, New York, 1955, Vol. II, p. 8.
- [13] Laskowski M. and Kazenko A., *J. Biol. Chem.* **167**, 617, 1947.
- [14] Parks R. E. Jr. and Plaut C. W. E., *J. Biol. Chem.* **203**, 755, 1953.
- [15] Peterson E. A. and Sober H. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 751, 1956.
- [16] Roverly M., Poilroux M., Yoshida A., and Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 608, 1957.
- [17] Smith E. L., Brown D. M. and Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **191**, 639, 1951.
- [18] Wu F. C. and Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **213**, 609, 1955.

BADANIA CHROMATOGRAFICZNE NAD CHYMOTRYPSYNOGENEM B I CHYMOTRYPSYNĄ B

Streszczenie

Krystaliczny chymotrypsynogen B, otrzymany według poprzednio opisanej metody, może zawierać do 3% aktywnego enzymu, który można oddzielić chromatografią na CM-celulozie. Dla preparatyki zymogenu nie można jednak polecić tej metody, ponieważ nieaktywna frakcja przedstawia mieszaninę właściwego chymotrypsynogenu B i neo-chymotrypsynogenów B.

Badania chromatograficzne wykazały również, że istnieje kilka aktywnych chymotrypsyn B. Jedną z nich otrzymano w krystalicznej formie.

Otrzymano 25.1.1960 r.

W. RZECZYCKI i M. HILLAR

**ODDYCHANIE ŚLINIANKI PODSZCZĘKOWEJ WOŁU
A PRODUKCJA MUCYNY *IN VITRO*****Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk
Kierownik prof. dr Wł. Mozołowski*

G. Blix [1] otrzymuje mucynę ślinianek podszczękowych wołu, wykorzystując fakt, że ze skrawków ślinianek inkubowanych w wodzie przechodzi do środowiska mucyna w ciągu kilku dni licząc od momentu zabicia zwierzęcia. Zachodzi pytanie, czy to zjawisko jest związane ze zużyciem tlenu, czy istnieje zależność pomiędzy ilością mucyny przechodzącej do środowiska a ilością zużytego tlenu i czy zawartość pewnych składników w płynie inkubowanym nie wpływałaby na ogólną ilość mucyny w skrawkach i płynie inkubowanym. Gdyby się okazało, że ślinianki *in vitro* produkują mucynę, mogłyby być dobrym materiałem do badania biosyntezy składników mucyny, a w szczególności kwasu neuraminowego. Odpowiedź na to pytanie staraliśmy się dać na drodze oznaczania mucyn w skrawkach inkubowanych i nie inkubowanych w różnego rodzaju środowiskach.

Preparaty i odczynniki

Kwas N-acetyleneuraminowy otrzymano z białek surowicy krwi człowieka, posługując się przepisem podanym przez Svennerholma [7]. Własności otrzymanego związku opisane są w poprzedniej pracy [5]. Mucynę wypreparowano według sposobu podanego przez Blixa [1], zawierała ona 11% azotu oraz 11,3% kwasu neuraminowego.

Orcyna f-my Merck; dwufeniloamina cz. d. a. (radziecka); kwas siarkowy cz. (Merck) po uprzednim 3-godzinnym gotowaniu; kwas solny cz. d. a. f-my I. D. Riedel, Berlin; alkohol *n*-amyłowy cz., wyrabiany przez VEB Schering Adlershof, Berlin; tanina cz. (Merck), N-acetyloglikozamina i asparagina f-my Light; kwas octowy lodowaty cz. produkcji polskiej po przedestyłowaniu; glikoza cz. d. a. (Merck).

* Praca była dotowana przez Komitet Biochemiczny PAN.

Guma arabska, kwas α -ketoglutarynowy, kwas cytrynowy, kwas bursztynowy, kwas L-glutaminowy i arginina produkcji polskiej. Glutation, seryna, alanina, glutamina, tauryna, histydyna, lizyna, walina, leucyna, izoleucyna, tyrozyna, metionina i tryptofan były przepakowane przez BOO w Gliwicach.

*Czas przechowywania a oddychanie skrawków ślinianek
w płynie fosforanowym Krebsa*

Wycinano ślinianki podszczękowe wołu tuż po zabiciu zwierzęcia, umieszczano je w naczyniu, które wkładano do termosu zawierającego wodę z lodem i możliwie najszybciej przywożono do Zakładu. Następnie oczyszczano śliniankę dokładnie od tkanki łącznej, krajano na cienkie skrawki ważące 100 - 200 mg i umieszczano w 3 ml płynu fosforanowego Krebsa [3] w zewnętrznym przedziale naczynka Warburga. Aby pochłoniąć powstający w doświadczeniu dwutlenek węgla, do wewnętrznego przedziału naczynka dodawano 0,2 ml 10% KOH. Naczynka dołączone do manometrów zanurzano do łaźni wodnej o temp. 37°, wytrząsano przez 15 min., potem zamykano kurki manometru i wytrząsano przez dalsze 2 godziny. Odczytywano wskazania manometrów co 15 min. Oznaczenia tego rodzaju przeprowadzono z tą samą ślinianką po raz pierwszy około 3 godzin, po raz drugi około 30 godzin i trzeci raz około 50 godzin po zabiciu zwierzęcia. Śliniankę w całości przechowywano pomiędzy doświadczeniami w temperaturze 0°. Zużycie tlenu przeliczano na ilość mikrolitrów tlenu przypadającego na 1 mg suchej wagi ślinianki i 1 godzinę

T a b l i c a 1

Zależność pomiędzy oddychaniem skrawków ślinianek podszczękowych wołu a czasem ich przechowywania

W tabelcy podano ilość μ l tlenu zużytego przez 1 mg ślinianki (sucha waga) w ciągu 1 godziny (Q_{O_2}) oraz μ g kwasu neuraminowego w płynie inkubowanym. Czas inkubacji w płynie fosforanowym Krebsa wynosił 2 godziny. Wartości kwasu neuraminowego przeliczono na 1 mg suchej tkanki i 1 godzinę oraz na 1 μ l zużytego tlenu. Kwas neuraminowy oznaczano metodą orcynową używając jako standardu kwasu N-acetylneuraminowego (N-neuramin.)

Czas przechowywania	3 godz.			30 godz.			50 godz.		
	Q_{O_2}	Kwas N-neuramin.		Q_{O_2}	Kwas N-neuramin.		Q_{O_2}	Kwas N-neuramin.	
		μ g/mg suchej ślinianki i 1 godz.	μ g/ μ l O_2		μ g/mg suchej ślinianki i 1 godz.	μ g/ μ l O_2		μ g/mg suchej ślinianki i 1 godz.	μ g/ μ l O_2
I	3,57	3,5	0,98	2,48	3,3	1,33	1,81	3,4	1,88
II	3,46	3,35	0,97	2,33	3,6	1,54	1,54	3,4	2,20
III	3,80	3,35	0,88	2,59	3,25	1,25	1,93	3,5	1,81

(Q_{O_2}). Po dwugodzinnej inkubacji oddzielano skrawki od płynu przez sączenie i w płynie oznaczano kwas neuraminowy metodą orcynową [2]. Aby obliczyć suchą wagę ślinianki, znaną ilość skrawków suszono w 105° do stałej wagi. Z wyników doświadczeń zebranych w tablicy 1 widać, że skrawki ślinianek przechowywane w 0° przez dwie doby umieszczone w płynie fosforanowym Krebsa oddychają i wydzielają do środowiska kwas neuraminowy, a więc i mucyny.

Inkubacja skrawków ślinianek podszczękowych wołu w różnych środowiskach a zawartość kwasu neuraminowego

Aby się przekonać, czy całkowita ilość kwasu neuraminowego w skrawkach i płynie inkubacyjnym wzrasta, czy też pozostaje na tym samym poziomie przed i po inkubacji w różnych środowiskach, oznaczono kwas neuraminowy w homogenatach ślinianki przed i po inkubacji. W tym celu do naczynek zawierających po 3 ml płynu fosforanowego Krebsa z dodatkiem odpowiednich ilości substancji, których wpływ na produkcję kwasu neuraminowego chciano przebadac, dodawano po 125 mg skrawków ślinianek wołu. Naczynka umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 37° i wytrząsano zawartość w naczynkach przez 5 godzin. Po inkubacji przenoszono zawartość poszczególnych naczynek do homogenizatora Pottera, dodawano 3 krople alkoholu oktylowego, aby zapobiec pienieniu, homogenizowano, przenoszono homogenat ilościowo do kolbek miarowych na 25 ml, które dopełniano do kreski wodą. Do oznaczeń kwasu neuraminowego brano 0,5 i 1 ml tak przygotowanej zawiesiny. Oznaczano kwas neuraminowy metodą orcynową z wyjątkiem, kiedy skrawki ślinianki inkubowano w płynie fosforanowym Krebsa z dodatkiem ATP. W tym przypadku oznaczano kwas neuraminowy metodą dwufeniloaminową [6], ponieważ ATP w znacznym stopniu nakłada się na wynik uzyskiwany metodą orcynową. Jako próby kontrolne służyły homogenaty skrawków ślinianek nie inkubowanych.

Zbadano wpływ następujących środowisk inkubacyjnych: płynu fosforanowego Krebsa, oraz płynu fosforanowego Krebsa: a) z glikozą, b) z glikozą i ATP, c) z glikozą i kwasem L-glutaminowym, d) z glikozą i mieszaniną aminokwasów, e) z kwasem α -ketoglutazarowym, f) z kwasem α -ketoglutazarowym i mieszaniną aminokwasów, g) z N-acetyloglikozaminą i pirogromianem sodu, h) z bursztynianem sodu i i) z cytrynianem sodu. Stężenie dodawanych substancji w płynie fosforanowym Krebsa, z wyjątkiem mieszaniny aminokwasów, było 0,01 M. Mieszanina aminokwasów składała się z argininy, asparaginy, kwasu L-glutaminowego, glicyny, seryny, alaniny, glutaminy, tauryny, treoniny, histydyny, lizyny, waliny, leucyny, izoleucyny, tyrozyny, metioniny i tryptofanu oraz z dodanego glutationu.

Stężenie poszczególnych aminokwasów w płynie inkubacyjnym było około 0,001 M.

Doświadczenia z inkubacją ślinianki w podanych roztworach wykazały, że jedynie obecność glikozy powoduje wzrost wartości dla kwasu neuraminowego o około 10—20%. Dodanie ATP, mieszaniny aminokwasów z glutationem lub innych substancji podanych wyżej jest bez wpływu. Wyniki tych doświadczeń zebrano w tablicy 2 z tym, że podano jedynie doświadczenia dla płynów inkubacyjnych zawierających glikozę, oraz do porównania dla kilku płynów nie zawierających glikozy.

Tablica 2

Wpływ środowiska na całkowitą zawartość kwasu neuraminowego po 5 godz. inkubacji

Inkubowano przez 5 godz. w 37°. Kwas neuraminowy oznaczano jako kwas N-acetylneuraminowy

Środowisko inkubacyjne	Nr doświadczenia	Kwas neuraminowy ($\mu\text{g}/1$ mg świeżej ślinianki)	
		przed inkubacją	po inkubacji
Płyn Krebsa	1	6,0	6,2
	2	7,6	7,8
	3	7,1	7,0
Płyn Krebsa + glikoza	1	6,5	7,8
	2	7,2	8,0
	3	5,9	6,6
Płyn Krebsa + glikoza + ATP	1	5,9	6,8
	2	5,5	6,3
	3	7,1	8,0
Płyn Krebsa + glikoza + kw. glutaminowy	1	6,0	7,0
	2	7,2	8,1
	3	6,4	7,6
Płyn Krebsa + glikoza + mieszanina aminokwasów	1	7,4	8,3
	2	6,3	7,0
	3	6,5	7,2
Płyn Krebsa + mieszanina aminokwasów	1	6,2	6,1
	2	6,0	6,3
	3	6,8	6,5

Produkcja kwasu neuraminowego a oddychanie ślinianek

Aby się przekonać, czy mucyna jest wydzielana przez skrawki ślinianek do środowiska przy zahamowaniu zużycia tlenu, inkubowano część skrawków w płynie fosforanowym Krebsa, inne skrawki natomiast w płynie

nie fosforanowym Krebsa z dodatkiem KCN. Doświadczenie wykonywano identycznie jak przy badaniu zależności pomiędzy oddychaniem ślinianek a czasem ich przechowywania z tym, że do części naczynek Warburga, do płynu fosforanowego Krebsa dodawano KCN (na 3 ml płynu 3 krople 10% świeżo sporządzonego KCN i doprowadzonego kwasem solnym do pH 7,4). Stwierdzono, że skrawki inkubowane z KCN nie oddychały. Po 2-godzinnej inkubacji, zawartość naczynek sączono i w przesączu oznaczano zawartość kwasu neuraminowego metodą dwufeniloaminową. Metoda orcynowa nie daje w tym przypadku wiarogodnych wyników ze względu na nakładanie się KCN na wynik. Wartości kwasu neuraminowego w przesączach, zawierających i nie zawierających KCN, nie różniły się istotnie od siebie. Wniosek, który można wyciągnąć z tego doświadczenia jest następujący: wydzielanie mucyny do środowiska odbywa się *in vitro* także w przypadku nie zużywania tlenu przez tkankę.

Oznaczanie białek dających się ekstrahować ze ślinianki kwasem sulfosalicylowym przed i po inkubacji w płynie fosforanowym Krebsa bez glikozy i po jej dodaniu

Ponieważ dotychczas oznaczano mucyny drogą pośrednią, oznaczając jeden z jej składników, a mianowicie kwas neuraminowy, uważano za celowe przeprowadzić próby oznaczenia wprost mucyny w śliniance. Doświadczenia w tym kierunku oparto na fakcie, że posiadany przez nas preparat mucyny ślinianek podszczękowych wołu, rozpuszczał się w kwasie sulfosalicylowym. (Rady co do sposobu przeprowadzenia zawdzięczam Pani Doc. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen). Jeżeli inne białka zawarte w śliniance wytrącają się kwasem sulfosalicylowym, to z homogenatu ślinianki w tym kwasie przechodzi do roztworu głównie mucyna, a inne białka wytrącone dadzą się odwirować. W tak otrzymanym roztworze mucyn można oznaczyć ilość białek metodą taninową [4], używając jako standardów roztworów wzorcowych mucyny w kwasie sulfosalicylowym. Opracowanie odpowiedniego postępowania oparto na następujących doświadczeniach. Sporządzono roztwór macierzysty mucyny przez ropuszczenie w kolbie miarowej 100 mg mucyny w 10 ml 0,1 N-NaOH i dopełnieniu do 50 ml 20% kwasem sulfosalicylowym. Z roztworu macierzystego sporządzono roztwory o zawartości 20, 40, 60, 80 µg mucyny w 1 ml przez odmierzenie do kolejnych 100 ml kolbek miarowych 1, 2, 3 i 4 ml roztworu macierzystego, dodanie do każdej z kolbek po 20 ml 20% kwasu sulfosalicylowego oraz takiej ilości NaOH, aby pH roztworu było 8—9 (około 16 ml 2 N-NaOH). Każdą z kolbek dopełniono do kreski wodą. Sporządzono krzywą wzorcową oznaczania mucyn metodą taninową, biorąc do oznaczeń po 1 ml roztworów wzorcowych. Oznaczenia turbidyme-

tryczne przeprowadzano w fotometrze Pulfricha używając filtru S_{61} w naczynkach o grubości 2 cm. Zgodność z prawem Lamberta-Beera uzyskano dla stężeń mucyny w granicach od 20 do 80 μg mucyny w 1 ml. Jako próbę kontrolną używano roztworu 20% kwasu sulfosalicylowego z NaOH w takich samych stosunkach jak i standardach.

Do oznaczenia mucyn 100 mg ślinianki homogenizowano w 10 ml 20% kwasu sulfosalicylowego w homogenizatorze Pottera. Następnie wirowano homogenat przez 20 min. przy 15 000 obrotów na min. Po odwirowaniu przenoszono 5 ml klarownego płynu do kolbki miarowej na 25 ml, dodawano 2 N-NaOH do pH 8—9 (około 4 ml) i dopełniano do kreski wodą. Tak przygotowany roztwór rozcieńczano 2- i 4-krotnie, biorąc następnie po 1 ml do oznaczenia białka metodą taninową.

Mucyny po inkubacji oznaczano po zhomogenizowaniu skrawków. W tym celu przenoszono skrawki wraz z płynem inkubacyjnym do homogenizatora Pottera, dodawano taką ilość 40% kwasu sulfosalicylowego i wody, aby ogólna objętość wynosiła 10 ml a stężenie kwasu sulfosalicylowego było równe 20%. Następnie homogenizacja i oznaczanie mucyn były takie jak i przy oznaczaniu mucyn w śliniance bez uprzedniej inkubacji.

Wyniki przedstawione są w tablicy 3 i jak widać, ilość białek, dających się ekstrahować kwasem sulfosalicylowym (mucyn) ze ślinianek przed

Tablica 3

Oznaczanie mucyn w homogenatach ślinianek ekstrahowanych kwasem sulfosalicylowym

Skrawki ślinianek inkubowano 5 godzin, w 37°. Mucyny oznaczano metodą taninową [4]

Środowiska inkubacyjne	Nr dośw.	Mucyna (mg/100 mg świeżej ślinianki)	
		przed inkubacją	po inkubacji
Płyn fosforanowy Krebsa	1	5,0	5,0
	2	5,1	5,0
	3	3,9	3,9
Płyn fosforanowy Krebsa + glikoza	1	4,1	4,0
	2	3,9	3,9
	3	3,9	3,9

i po inkubacji w płynie fosforanowym bez glikozy i z jej dodatkiem, jest sobie równa. Wobec tego należy przyjąć, że przechodzenie mucyny ślinianek do środowiska polega na jej biernym wypłukiwaniu z tkanki.

DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że nagromadzenie się mucyny przez skrawki ślinianek w środowisku inkubacyjnym, trwające przez kilka dni po zabiciu zwierzęcia a wykorzystywane do izolacji mucyny ze ślinianki, nie jest związane z równoczesnym zużyciem tlenu przez te skrawki. Całkowita ilość mucyn w skrawkach inkubowanych w płynie fosforanowym Krebsa pozostaje bez zmiany i po inkubacji.

Jeżeli się oznacza jeden ze składników mucyny, kwas neuraminowy, to w środowiskach zawierających glikozę, oznaczana ilość kwasu neuraminowego w skrawkach po inkubacji jest większa niż przed inkubacją. Wzrost ten wynoszący około 10 do 20% można by tłumaczyć albo obecnością substancji będących prekursorami kwasu neuraminowego, albo też obecnością nieswoistych związków nakładających się na wynik przy oznaczaniu kwasu neuraminowego metodą orcynową.

STRESZCZENIE

Zbadano oddychanie ślinianek wołu przechowywanych przez okres 3, 30 i 50 godzin. Wydzielanie mucyny do środowiska inkubacyjnego nie zależy od tego, czy ślinianki zużywają czy też nie zużywają tlenu. Na podstawie oznaczania mucyny w skrawkach ślinianek inkubowanych oraz w skrawkach ślinianek nie inkubowanych stwierdzono, że przechodzenie mucyny ślinianek do środowiska polega na jej biernym wypłukiwaniu z tkanki.

LITERATURA

- [1] Blix G., *Z. Physiol. Chem.* **240**, 43, 1936.
- [2] Böhm P., Dauber S., Baumeister L., *Klin. Wschr.* **32**, 289, 1954.
- [3] Krebs H., Henseleit K., *Z. Physiol. Chem.* **210**, 33, 1932.
- [4] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 279, 1955.
- [5] Rzczycki W., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 171, 1959.
- [6] Seifer A., Gerstenfeld S., *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 17, 1957.
- [7] Svennerholm L., *Acta Soc. Med. Upsal* **61**, 75, 1956.

RESPIRATION OF THE BEEF SUBMANDIBULAR SALIVARY GLAND IN
RELATION TO THE PRODUCTION OF MUCIN *IN VITRO*

S u m m a r y

Respiration of the beef salivary glands stored for 3, 30 and 50 hours was examined. The secretion of mucin into incubation medium did not depend upon the uptake of oxygen. Basing on mucin estimations in salivary slices either incubated or not, it was stated that mucin was only passively washed out of tissue.

Otrzymano 25.1.1960 r.

S. ANGIELSKI, J. ROGULSKI i LUCYNA MADOŃSKA

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM

V. PORÓWNANIE ZATRUCIA KWASEM MALEINOWYM Z ZATRUCIEM WYWOŁANYM: SALYRGANEM, CHLORKIEM RĘCI, JODOOCTANEM, KWASEM MALONOWYM I FLORYDZYNĄ

*Pracownia Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk
Kierownik: prof. dr Wł. Mozołowski*

W doświadczeniach na szczurach stwierdzono, że w 15 min. po podaniu kwasu maleinowego dochodzi do nagłego spadku zawartości grup SH nerki. Szczególnie dotyczy to grup SH białek nerki, które ulegają obniżeniu o około 1/3 w porównaniu ze stanem przed zatruciem [34]. Ponadto stwierdzono, że równoczesne z kwasem maleinowym podanie BALu znosi całkowicie diurezę i aminoacydurię [2]. Dane te pozwalają przypuszczać, że występujące po podaniu kwasu maleinowego zaburzenia funkcji nerki, wyrażające się znaczną diurezą i zwiększonym wydalaniem aminokwasów, cukru i elektrolitów, związane są z działaniem kwasu maleinowego na grupy SH nerek. Obraz zatrucia występującego po podaniu kwasu maleinowego *in vivo* jest niewspółmierny z wynikami badań *in vitro*. Wiadomo bowiem, że kwas maleinowy jest stosunkowo słabym inhibitorem grup SH, w porównaniu z takimi substancjami, jak sole metali ciężkich, *p*-chlorortęciobenzoan, organiczne pochodne trójwartościowego arsenu, czy *N*-etylomaleimid. Maleinian nawet w dużych stężeniach nie hamuje aktywności wielu enzymów, jak dehydrogenaza jabłczanowa lub izocytrynowa, wrażliwych na działanie innych inhibitorów grup SH [17, 26]. Dotychczas stwierdzono jedynie dużą wrażliwość na maleinian systemów dekarboksylacji oksydacyjnych [33, 31]. Hellerman i wsp. [15, 16] po raz pierwszy zwrócili uwagę na niejednakową wrażliwość różnych grup SH na działanie różnych związków zdolnych do reakcji z tymi grupami. Być może kwas maleinowy *in vivo* wiąże specyficznie grupy SH nerki czynne w procesach związanych z funkcją tego narządu, a w mniejszym tylko stopniu uszkadza przemiany pośrednie nerki. Dlatego celo-

wym wydawało się porównanie *in vivo* działania kwasu maleinowego z działaniem związków rtęciowych. Wiadomo bowiem, że rtęć diuretyków rtęciowych zostaje wybiórczo wychwyтана przez nerkę [8, 6, 13], przypuszcza się przy tym, że jest ona wiązana przez grupy SH białek kanalików nerkowych [22, 11]. Z innych znanych inhibitorów grup SH porównano działanie jodooctanu.

Krebs i wsp. [24] oraz Orten i Smith [32] wykazali, że kwas maleinowy podany szczurom lub psom powoduje zwiększone wydalanie kwasu cytrynowego i α -ketoglutazarowego. Podobnie po podaniu kwasu malonowego wskutek inhibicji dehydrogenazy bursztynowej występuje zwiększone wydalanie kwasu bursztynowego i w mniejszym stopniu cytrynowego i α -ketoglutazarowego [24, 7]. Krebs przypuszcza, że kwas maleinowy, podobnie jak kwas malonowy, może działać jako inhibitor cyklu kwasów trójkarboksyłowych. Być może na skutek działania kwasu maleinowego jak i kwasu malonowego, dochodzi do nagromadzenia się w tkankach ketokwasów, czego wynikiem jest zwiększone ich wydalanie z moczem. Możliwa jest też równoczesna przemiana nagromadzonych ketokwasów z wytworzeniem, w wyniku transdezaminacji, zwiększonych ilości aminokwasów z następującą aminoacydurią. Być może w przypadku kwasu maleinowego dochodzi z jednej strony do zwiększonego wytwarzania aminokwasów (drogą transdezaminacji), a z drugiej — do zmniejszenia reabsorpcji aminokwasów w wyniku uszkodzenia kanalików nerkowych.

Użycie do doświadczeń florydżyny oparto na danych otrzymanych ostatnio przez Lotspeicha i wsp. [27, 18, 19, 20] oraz Shapiro [35], którzy wykazali, że florydżyna w stężeniu 5×10^{-3} M zmniejsza zużycie α -ketoglutaranu przez homogenaty i mitochondria nerek, oraz że florydżyna znosi zdolność insuliny do powiększania przestrzeni galaktozowej. Z drugiej strony badania Manchastera i Younga [28], a także Kipnisa i Moalla [21] wskazują, że insulina nie tylko zwiększa zużycie cukrów przez tkanki, lecz także powoduje wzrost zużycia aminokwasów.

Dodatkowo do doświadczeń użyto siarczanu sodu; podawano go w postaci roztworu hipertonicznego o tym samym stężeniu co kwas maleinowy.

METODY

Do doświadczeń używano białe szczury (samice) wagi 120—200 g. Zwierzęta karmiono dietą mleczną [1]. Przeciętny czas przebywania szczurów na diecie do chwili rozpoczęcia doświadczenia wynosił siedem dni. Zwierzęta trzymano pojedynczo w klatkach metabolicznych pozwalających na ilościowe zbieranie moczu bez domieszek kału i pokarmu. Pożywienie oraz woda były udostępnione zwierzętom dowolnie. Naczynia,

do których zbierano mocz, zawierały 1 ml 2 N-H₂SO₄. Zbieranie moczu odbywało się w warunkach nie zapobiegających parowaniu, dlatego liczby określające diurezę nie wyrażają bezwzględnych ilości wydalonego moczu i mają przede wszystkim znaczenie porównawcze. Natomiast liczby określające ilość azotu α -aminowego, ketokwasów i innych badanych składników moczu wyrażają wartości bezwzględne. Azot α -aminowy oznaczano po uwolnieniu moczu od amoniaku, metodą Yemina i Cockinga [43]; ketokwasy wg Friedmanna i Haugena [12]; cukier wg Nelsona w modyfikacji Somogyi'ego [30]. Krzywą dla azotu α -aminowego wykreślono dla standardów glicyny. Krzywą dla ketokwasów wykonano przy użyciu standardów kwasu α -ketoglutarynowego. Obecność białka w moczu wykazywano próbą z kwasem sulfosalicylowym.

Odczynniki. Kwas maleinowy (Schuchardt), krystalizowano z wody. Salyrgan (Hoechst) ampułkowany do wstrzyknięć domięśniowych, 10% roztwór z dodatkiem 5% 1,3-dwumetyloksantyny. Chlorek rtęciowy cz. d. a. (Fab. Odczyn. Chem., Gliwice). Jodoctan, preparat otrzymany przez dr M. Żydowo krystalizowany z eteru naftowego. Kwas malonowy cz. (Toxa, Chem. Farm. Labor. Spółdz. Pracy w Warszawie). Florydżyna (Merck.). Siarczan sodu bezwodny p. a. (Fab. Odczyn. Chem., Gliwice).

WYNIKI

Wyniki zestawiono w tablicach. Tablica pierwsza podaje przebieg diurezy w pierwszej dobie po zatruciu kwasem maleinowym. W drugiej przedstawiono porównanie diurezy w badanych zatruciach, w trzeciej analogiczne porównanie wydalania azotu α -aminowego. Tablica czwarta przedstawia wydalanie ketokwasów, a piąta wydalanie cukrów.

Tablica 1

Diureza szczurów zatrutych kwasem maleinowym w pierwszej dobie po zatruciu
Szczury karmiono dietą mleczną. Kwas maleinowy w dawce 347 μ moli na 100 g wagi podano dootrzewnowo, w jednej porcji, jako jednorodny roztwór wodny. Wartości wyrażają średnie dobowego wydalania 8 szczurów, w nawiasach wartości graniczne

	Diureza (ml)
Normalna dobową diureza szczurów niezatrutych (średnio z 3 dni)	13 (8 — 18)
Ilość moczu wydalona w ciągu pierwszych 3 godzin po zatruciu	11 (9 — 15)
Całkowita ilość moczu wydalona w pierwszej dobie po zatruciu	29 (23 — 32)

T a b l i c a 2

Porównanie wpływu kwasu maleinowego, salyrganu, chlorku rtęci, jodooctanu, kwasu malonowego, florydżyny i siarcznanu sodu na diurezę

Szczury karmiono dietą mleczną. Florydżynę rozpuszczoną w glikolu propylenowym podano podskórnie, pozostałe substancje wstrzykiwano dootrzewnowo w postaci wodnych roztworów. Liczby wyrażają w μ molach średnie dobowego wydalania, w nawiasach wartości graniczne. W każdym doświadczeniu użyto po 5 szczurów

	Kwas maleinowy	Salyrgan	Chlorek rtęci	Jodooctan	Kwas malonowy	Florydżyna	Siarczan sodu
Dawka (μ mole/100g wagi)	347	3,96	0,75	10,8	1000	106	347
Diureza (ml/24 godz.)							
Wartości normalne (średnio z 3 dni przed zatruciem)	11 (8—15)	6 (4—13)	9 (6—12)	13 (8—15)	8 (5—12)	7 (4—9)	6 (4—8)
Kolejny dzień po zatruciu							
1	26 (15—31)	17 (12—24)	11 (9—14)	9 (6—14)	20 (18—25)	14 (10—16)	8 (7—10)
2	29 (11—38)	16 (9—23)	11 (9—19)	8 (5—11)	14 (11—19)	9 (8—11)	7 (6—8)
3	23 (9—35)	23 (16—31)	28 (17—34)	8 (6—12)	15 (6—30)	10 (7—15)	7 (6—8)
4	25 (16—33)	21 (11—28)	27 (23—33)	10 (7—14)	13 (10—18)	9 (6—16)	—
5	22 (18—28)	15 (12—18)	22 (15—30)	8 (4—20)	15 (12—20)	—	—

Kwas maleinowy

Kwas maleinowy w dawce 347 μ moli, tj. 40 mg, na 100 g wagi szczura wstrzykiwano dootrzewnowo w jednej porcji, jako jednomolowy roztwór wodny (0,34 ml na 100 g wagi). Roztwór kwasu doprowadzano do pH 7,2 przy użyciu NaOH. Szczury zatrute kwasem maleinowym wydalają zwiększoną ilość moczu. Mniej więcej w 15—30 min. po podaniu kwasu maleinowego rozpoczyna się znaczna diureza, która po upływie około 3 godzin ulega wyraźnemu zmniejszeniu. W tym czasie (3 pierwsze godziny po zatruciu) szczury wydalają około 10—15 ml moczu, a więc ilości równe normalnej dobowej diurezie szczurów niezatrutych, lub większe. Całkowita ilość moczu wydalonego w pierwszej dobie po zatruciu wynosi średnio około 25 ml, przewyższa więc 2—3 razy ilość wydalaną przed zatruciem. Największe nasilenie diurezy ma miejsce w drugim dniu po podaniu kwasu maleinowego. Szczury wydalają wówczas ilości moczu

około trzy razy większe niż normalnie. Jeszcze na piąty dzień po zatruciu dobową diureza jest dwa razy większa niż normalnie.

Znaczna aminoacyduria występuje już w pierwszym dniu, a maksymalne wydalanie azotu α -aminowego przypada zwykle na drugi dzień po zatruciu, osiągając wartości 10—15 razy większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Jeszcze na piąty dzień po podaniu kwasu maleinowego szczury wydalają około dwa razy większe niż normalnie ilości azotu α -aminowego.

Kwas maleinowy wpływa również na wydalanie ketokwasów. W pierwszym dniu po zatruciu szczury wydalają prawie dwa razy więcej ketokwasów niż normalnie. W drugim i trzecim dniu wydalanie ketokwasów jest nieco zmniejszone, w następnych dniach osiąga wartości normalne. W zatruciu kwasem maleinowym występuje również cukromocz, którego przebieg jest zgodny z przebiegiem diurezy i aminoacydurii. W pierwszych dniach zatrucia stwierdza się znaczny białkomocz.

T a b l i c a 3

Porównanie wpływu kwasu maleinowego, salyrganu, chlorku rtęci, jodooctanu, kwasu malonowego i siarczanu sodu na wydalanie azotu α -aminowego

Liczba szczurów i warunki doświadczenia jak w tabl. 2. Liczby wyrażają w μ molach średnie dobowego wydalania; w nawiasach wartości graniczne

	Kwas maleinowy	Salyrgan	Chlorek rtęci	Jodooc-tan	Kwas malonowy	Flory-dzyna	Siarczan sodu
Podano μ moli/ /100g wagi)	347	3,96	0,75	10,8	1000	106	347
Azot α -aminowy (μ mole/24 godz.)							
Wartości nor-malne (średnio z 3 dni przed zatruciem)	115 (107—121)	90 (71—107)	79 (60—100)	119 (100—135)	90 (59—118)	80 (66—91)	100 (72—128)
Kolejny dzień po zatruciu							
1	1080 (450—2007)	520 (136—1050)	312 (207—521)	148 (135—164)	200 (128—250)	120 (79—172)	100 (86—114)
2	1430 (285—2430)	380 (100—1155)	279 (121—579)	158 (150—164)	185 (157—225)	98 (89—135)	135 (80—270)
3	798 (214—1630)	515 (178—1060)	543 (292—794)	115 (79—150)	136 (106—214)	100 (51—217)	115 (72—121)
4	438 (178—1240)	400 (171—800)	763 (150—1157)	114 (79—143)	171 (141—207)	115 (66—143)	—
5	271 (230—485)	178 (107—343)	427 (335—665)	117 (72—150)	186 (167—221)	—	—

T a b l i c a 4

Porównanie wpływu kwasu maleinowego, salyrganu, chlorku rtęci, kwasu malonowego i florydzyiny na wydalanie ketokwasów

Liczba szczurów i warunki doświadczenia jak w tabl. 2. Liczby wyrażają w μ molach średnie dobowe wydalania; w nawiasach wartości graniczne

	Kwas maleinowy	Salyrgan	Chlorek rtęci	Kwas malonowy	Florydzyina
Podano μ moli/100g wagi	347	3,96	0,75	1000	106
Ketokwasy (μ mole/24 godz.)					
Wartości normalne (średnio z 3 dni przed zatruciem)	81 (67—89)	66 (48—84)	108 (96—128)	81 (68—98)	56 (42—67)
Kolejny dzień po zatruciu					
1	141 (114—155)	41 (20—65)	63 (44—86)	132 (105—147)	77 (63—90)
2	59 (31—72)	15 (6—19)	18 (10—25)	85 (48—150)	62 (45—92)
3	57 (40—75)	24 (14—28)	23 (14—31)	83 (96—111)	64 (47—89)
4	68 (41—94)	39 (28—53)	40 (19—69)	90 (57—119)	73 (32—100)
5	75 (53—100)	54 (33—70)	50 (35—78)	162 (151—192)	—

Salyrgan

Salyrgan w dawce 3,96 μ mola na 100 g wagi szczura wstrzykiwano dootrzewnowo w jednej porcji jako 0,4% roztwór w izotonicznym chlorku sodu (0,5 ml na 100 g wagi). Roztwór do wstrzyknięć sporządzano przez rozcieńczenie 10% roztworu, zawierającego 5% 1,3-dwumetyloksantyny, izotonicznym chlorkiem sodu. Salyrgan w dawce stosowanej w naszych doświadczeniach wywołuje u szczurów zarówno diurezę, jak i aminoacydurię. Zwiększenie diurezy występuje już w pierwszej dobie. Ilości wydalonego moczu są 2—3 razy większe niż normalnie. Maksimum diurezy przypada zwykle na 3 i 4 dzień po zatruciu. Ilości wydalonego moczu są wówczas 2—4 razy większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem.

Aminoacyduria rozpoczyna się również w pierwszej dobie po podaniu salyrganu i ilość wydalonego azotu α -aminowego jest około pięciokrotnie zwiększona. Stan ten utrzymuje się do piątego dnia, w którym szczury wydalają już tylko prawie dwa razy większe niż normalnie ilości azotu α -aminowego. Wyniki te są zgodne z wynikami Stave [38], który w do-

świadczeniach na królikach stwierdził aminoacydurię po podaniu salyrganu w dawce 8 mg na kg.

Wydalenie ketokwasów po podaniu salyrganu ulega wyraźnemu zmniejszeniu. Spadek ten zaznacza się już w pierwszej dobie, w drugiej dobie ilości wydalanych ketokwasów są przeszło cztery razy mniejsze w porównaniu ze stanem przed zatruciem. W następnych dniach wydalanie ketokwasów stopniowo wzrasta, lecz jeszcze w piątym dniu jest mniejsze niż normalnie. Stwierdzono również, że po podaniu salyrganu występuje znaczny cukromocz, którego przebieg jest zgodny z przebiegiem diurezy i aminoacydurii. W pierwszych trzech dniach stwierdzono również wyraźny białkomocz.

Chlorek rtęciowy

Chlorek rtęciowy w dawce 0,75 μ mola na 100 g wagi wstrzykiwano w jednej porcji jako 80 mg⁰/₀ roztwór w izotonicznym chlorku sodu (0,25 ml na 100 g wagi). Obraz zatrucia wywołanego sublimatem (w dawce stosowanej w naszych doświadczeniach) jest zbliżony do zatrucia wy-

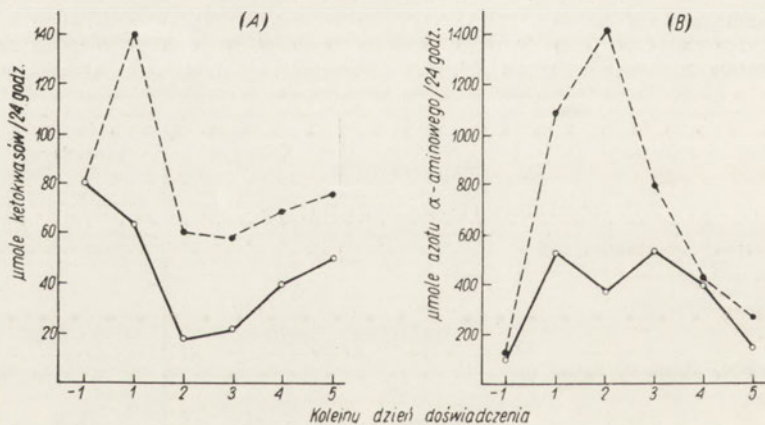
Tablica 5

Porównanie wpływu kwasu maleinowego, salyrganu i florydzyzny na wydalanie cukru
Szczury karmiono dietą mleczną. Florydzynę rozpuszczoną w glikolu propylenowym podano podskórnie, pozostałe substancje wstrzykiwano dootrzewnowo w postaci wodnych roztworów. Liczby wyrażają w μ molach średnie dobowego wydalania; w nawiasach wartości graniczne. Stosowane dawki i liczba szczurów jak w tablicy 2.

Podano	Kwas maleinowy	Salyrgan	Florydzyzna
Cukier (μ mole/24 godz.)			
Wartości normalne (średnio z 3 dni przed zatruciem)	640 (328—1380)	750 (670—850)	430 (230—560)
Kolejny dzień po zatruciu			
1	1390 (780—2040)	660 (445—850)	4800 (2200—6800)
2	2170 (940—3100)	1720 (455—2800)	810 (300—1750)
3	1520 (490—2190)	1540 (750—2300)	790 (270—1610)
4	868 (465—1390)	1560 (470—2360)	450 (170—700)
5	—	460 (250—800)	—

wołanego salyrzanem. Jednak przebieg zatrucia jest nieco inny. Wyrażna diureza występuje dopiero na trzeci dzień po podaniu sublimatu. Ilości wydalonego wówczas moczu są trzy do czterech razy większe niż normalne. W piątym dniu diureza jest jeszcze znaczna. Aminoacyduria występuje już w pierwszym dniu zatrucia (czterokrotny wzrost wydalania azotu α -aminowego), jednak największe nasilenie aminoacydurii ma miejsce dopiero w czwartym dniu po podaniu sublimatu. Ilości wydalanego wówczas azotu α -aminowego są dziewięć razy większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem. W zatruciu sublimatem, podobnie jak w zatruciu salyrzanem, dochodzi do zmniejszenia wydalania ketokwasów. W drugim dniu po zatruciu ilości wydalanych ketokwasów są pięć razy mniejsze niż normalnie. W następnych dniach wydalanie ketokwasów stopniowo wzrasta nie osiągając jednak wartości normalnych. W pierwszych dniach zatrucia stwierdzono znaczny białkomocz. Cukier w moczu oznaczano tylko w trzecim dniu po zatruciu, stwierdzono znaczne ilości cukru, rzędu około 2000 μ moli w dobowej ilości moczu.

Porównanie obrazu zatrucia kwasem maleinowym z zatruciem wywołanym sublimatem, a zwłaszcza salyrzanem wskazuje na pewne podobieństwo działania tych substancji. Zarówno w jednym, jak i w drugim



Rys. 1. Wpływ (●) kwasu maleinowego i (○) salyrzanu na wydalanie w moczu (A) ketokwasów i (B) azotu α -aminowego

przypadku występuje znaczna diureza, aminoacyduria, cukromocz i białkomocz. Wszystko to wskazuje, że po podaniu kwasu maleinowego, podobnie jak w zatruciu związkami rtęci, dochodzi przypuszczalnie do uszkodzenia kanalików nerkowych. Wyraźnie odmienny jest jednak wpływ tych substancji na wydalanie ketokwasów. Ilustruje to rys. 1.

Zwrócić też trzeba uwagę na charakterystyczną, występującą tylko w zatruciu kwasem maleinowym, nagłą początkową diurezę.

Jodooctan

Jodooctan w dawce 10,8 μ moli na 100 g wagi wstrzykiwano dootrzewnowo w jednej porcji jako 0,4% roztwór wodny (0,5 ml na 100 g wagi). Roztwór kwasu jodooctowego doprowadzano do pH 7,2 przy użyciu NaOH. W zatruciu jodooctanem nie występuje zwiększenie diurezy. Można mówić raczej o pewnym zmniejszeniu ilości wydalanego moczu. Nie ma również aminoacydurii (w pierwszym i w drugim dniu bardzo nieznaczne zwiększenie wydalania). Podobnie Stave [38] nie stwierdził aminoacydurii u królików zatrutych jodooctanem. Ketokwasów nie oznaczano. Jakościowy odczyn na cukier (z odczynnikami Benedicta) dawał wynik ujemny, nie stwierdzono też wyraźnego białkomoczu. Obraz zatrucia jodooctanem różni się całkowicie od zatrucia kwasem maleinowym lub związkami rtęci. Pozwala to przypuszczać, że w zatruciu jodooctanem nie dochodzi do uszkodzenia kanalików nerkowych, lub że działanie jodooctanu jest całkiem odmiennej natury.

Kwas malonowy

Kwas malonowy w dawce 1000 μ moli na 100 g wagi wstrzykiwano dootrzewnowo, w jednej porcji jako 1 M roztwór wodny (1 ml na 100 g wagi). Roztwór kwasu doprowadzano do pH 7,2 przy użyciu NaOH. Zatrucie kwasem malonowym cechuje się zwiększoną diurezą, nieznaczną aminoacydurią, ketoacydurią. W pierwszym dniu po zatruciu szczury wydają trzy razy więcej moczu, w następnych dniach prawie dwa razy więcej w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Zwiększone dwukrotnie wydalanie azotu α -aminowego utrzymuje się przez cały czas trwania doświadczenia (pięć dni). Wydalanie ketokwasów jest w pierwszym dniu po podaniu kwasu malonowego prawie dwukrotnie większe, w następnych dniach osiąga wartości normalne. Cukru w moczu nie oznaczano. W pierwszych dniach po podaniu kwasu malonowego stwierdzano wyraźny, choć nieznaczny białkomocz. Obraz zatrucia kwasem malonowym w pewnym stopniu przypomina zatrucie kwasem maleinowym.

Florydzyna

Florydzynę w dawce 106 μ moli na 100 g wagi wstrzykiwano podskórnie w jednej porcji jako 10% roztwór w glikolu propylenowym [41] (0,5 ml na 100 g wagi). W pierwszym dniu po zatruciu występuje dwukrotny wzrost diurezy, w następnych dniach ilości wydalonego moczu są

już normalne. Wydalanie azotu α -aminowego nie ulega widocznym zmianom w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Jak podaje Berger [5], również i Stave nie stwierdził aminoacydurii w zatruciu florydzyną. Wydalanie ketokwasów jest nieznacznie zwiększone. W pierwszym dniu po zatruciu występuje znaczny cukromocz, dziesięciokrotny wzrost wydalania cukru w porównaniu ze stanem przed zatruciem. W drugim dniu ilości wydalonego cukru są już tylko dwukrotnie większe niż normalnie. Na czwarty dzień osiągają normę. Obraz zatrucia florydzyną różni się wyraźnie od zatrucia wywołanego kwasem maleinowym. Właściwie jedyną wspólną cechą jest znaczny cukromocz, który wykazuje jednak zupełnie odmienny przebieg. W zatruciu kwasem maleinowym cukromocz trwa dłużej, a maksimum wydalania cukru przypada na 2—3 dzień po zatruciu, natomiast w zatruciu florydzyną znaczny cukromocz występuje w pierwszym dniu po zatruciu. Różnice zdają się wskazywać, że mechanizm działania kwasu maleinowego jest zupełnie inny niż mechanizm działania florydzyzny.

Siarczan sodowy

Siarczan sodowy wstrzykiwano dootrzewnowo w dawce równej kwasowi maleinowemu, a więc 347 μ moli na 100 g wagi, co odpowiada 0,34 ml 1 M roztworu wodnego. Jest on prawie bez wpływu na diurezę i zupełnie nie wpływa na wydalanie azotu α -aminowego.

DYSKUSJA

Kwas maleinowy jest obok cystyny jedyną znaną dotychczas substancją organiczną, przy użyciu której można eksperymentalnie wywołać zatrucie określane przez Mudge'a [29] jako „multiple tubular defects“ (wielostronne uszkodzenie kanalików). Obraz takiego zatrucia jest zupełnie podobny do znanych zespołów klinicznych, jak: zespół Fanconiego (dzieci i dorosłych), choroba Wilsona, *myeloma multiplex*, czy zatrucia metalami ciężkimi, zwłaszcza ołowiem. W przebiegu wszystkich tych zespołów występują jako główne objawy: aminoacyduria, glikozuria, fosfaturia. Opisany w 1954 roku przez Harrisonów [14] doświadczalny zespół „multiple tubular defects“ (MTD) wywołany był przez podanie kwasu maleinowego szczurom krzywicznym. W naszych doświadczeniach [1] stwierdziliśmy usposabiające działanie laktozy do wywołania kwasem maleinowym zespołu MTD. Mechanizm działania kwasu maleinowego jest dotychczas mało poznany. Smith [37] określa kwas maleinowy jako specyficzny czynnik nefrotoksyczny o niewyjaśnionym i skomplikowanym działaniu na układy enzymatyczne nerki. Zarówno kwas maleinowy, jak

metale ciężkie, a także cystyna są *in vitro* inhibitorami grup SH [17, 4, 36, 26]. Na tej podstawie Worthen i Good [42] przypuszczają, że działanie tych substancji, wywołujące zespół MTD, związane jest z ich działaniem na grupy SH nerki. Chodziłoby tu przede wszystkim o grupy SH komórek kanalików krętych pierwszego rzędu. Autorzy ci zwracają uwagę, że tylko nieznaczne inhibitory grup SH wywołują zespół objawów odpowiadający MTD. Jak przypuszczają, jest tak dlatego, że różne inhibitory grup SH działają *in vivo* na różne grupy sulfhydrylowe. Chodzi tu o różną lokalizację tkankową i śródkomórkową tych grup, a także o to, czy i o ile są one dostępne dla działania poszczególnych inhibitorów. Istotne znaczenie ma tu zarówno struktura białka zawierającego grupy SH, jak i struktura cząsteczki inhibitora. W poprzednich naszych doświadczeniach [34] stwierdziliśmy, że po podaniu kwasu maleinowego dochodzi do znacznego spadku zawartości grup SH (zwłaszcza białkowych) nerki oraz [2] że równoczesne podanie z kwasem maleinowym BALu znosi diurezę i aminoacydurię. Dane te zdają się potwierdzać pogląd, że mechanizm działania kwasu maleinowego, wyrażający się powstawaniem zespołu MTD związany jest z jego działaniem na grupy SH komórek kanalików nerkowych. W przedstawionych doświadczeniach stwierdziliśmy pewne podobieństwo w działaniu kwasu maleinowego i związków rtęciowych. Wyraża się ono występowaniem w obu zatruciach znacznej diurezy, aminoacyduri, cukromoczu i białkomoczu. Podkreślić jednak trzeba znaczną różnicę w wielkości stosowanych dawek. Dawka kwasu maleinowego (wyrażona w μmol ach) przewyższa około sto razy ilość rtęci salyrganu, a około pięćset razy ilość rtęci sublimatu (również wyrażone w μmol ach). Jak stwierdzono poprzednio [34], ilość grup SH, jaką przypuszczalnie wiąże kwas maleinowy, przewyższa dwukrotnie ilość grup SH, jaką mogłaby maksymalnie związać śmiertelna dawka sublimatu.

Mechanizm diurezy występującej po podaniu związków rtęciowych Pitts [6] stara się objaśnić szybkością wiązania przez nerkę i następnie wydalania z moczem rtęci poszczególnych diuretyków rtęciowych. Można przypuszczać, że mechanizm diurezy występującej po podaniu kwasu maleinowego jest podobny, tzn. związany z wychwytywaniem kwasu maleinowego przez grupy SH białek nerki i następowym wydalaniem go, być może w postaci połączenia z cysteiną. Obecność w moczu podobnego połączenia salyrganu z cysteiną po podaniu tego diuretyku została stwierdzona przez Weinerja i Müllera [40]. Zwrócić trzeba uwagę na charakterystyczne dla zatrucia kwasem maleinowym nagłe wystąpienie diurezy w 15–30 min. po podaniu kwasu maleinowego. Diureza po salyrganie występuje u szczurów dopiero po kilku godzinach.

Zarówno salyrgan, jak i sublimat powodują znaczne zmniejszenie wydalania ketokwasów. Natomiast w pierwszym dniu po zatruciu kwasem

maleinowym dochodzi do zwiększonego wydalania ketokwasów. Zwiększone wydalanie ketokwasów w zatruciu kwasem maleinowym może mieć następujące przyczyny: (1) zwiększony poziom α -ketokwasów krwi spowodowany np. inhibicją systemów dekarboksylacji oksydacyjnych, (2) zmniejszona reabsorpcja w kanalikach nerkowych, (3) zwiększone wydalanie ketokwasów do światła kanalików. Możliwość tego ostatniego procesu, to jest aktywnego wydalania przez komórki kanalików członów cyklu kwasów trójkarboksylowych, została ostatnio dowiedziona przez Vishwakarma i Lotspeicha dla kwasu jabłkowego [39]. Wydaje się, że istnieje możliwość nakładania się na siebie wszystkich lub przynajmniej dwóch spośród tych czynników. Uszkodzenie kanalików nerkowych, a co za tym idzie zmniejszenie reabsorpcji w zatruciu kwasem maleinowym zdaje się nie ulegać wątpliwości. W naszych doświadczeniach [3] potwierdziliśmy dane El Hawary'ego [9] o zwiększonym poziomie ketokwasów krwi w zatruciu kwasem maleinowym. Wydaje się więc, że zwiększone wydalanie ketokwasów po podaniu kwasu maleinowego spowodowane jest z jednej strony podniesionym poziomem ketokwasów krwi, z drugiej zmniejszoną reabsorpcją w kanalikach nerkowych. Zmniejszone wydalanie ketokwasów w zatruciu salyrgranem i chlorkiem rtęciowym można starać się tłumaczyć zmniejszonym wytwarzeniem ketokwasów w komórkach kanalików nerkowych, zwiększoną reabsorpcją, zmniejszonym wydalaniem do światła kanalików, lub jednoczesnym działaniem kilku z tych czynników. Znany jest fakt zmniejszonego wydalania ketokwasów przy niedoborze potasu [10], poziom ketokwasów krwi nie ulega wówczas obniżeniu.

Aminoacyduria i cukromocz występujące w zatruciu związkami rtęci są spowodowane, najprawdopodobniej, zmniejszeniem reabsorpcji wskutek uszkodzenia kanalików nerkowych. Jest możliwe, że podobny mechanizm występuje również w zatruciu kwasem maleinowym. Bliższe wyjaśnienie sposobu działania kwasu maleinowego jest w tej chwili niemożliwe. Można przypuszczać, w oparciu o rozumowanie Worthena i Gooda [42], że u podstaw wszystkich objawów zespołu MTD wywołanego kwasem maleinowym leży inhibicja grup SH systemów enzymatycznych nerki. Być może chodzi tu o inhibicję grup SH enzymów przemian pośrednich nerki, w wyniku czego dochodziłoby do zaburzeń energetycznych prowadzących z kolei do ogólnej niewydolności proksymalnych części kanalików nerkowych. Możliwe jest też, że chodzi raczej o inhibicję procesów związanych z funkcją nerki. Wspomniani Worthen i Good przypuszczają możliwość istnienia odrębnych ciągów reakcji odpowiedzialnych za poszczególne, różnorodne funkcje nerki, jak reabsorpcja aminokwasów, reabsorpcja cukru, elektrolitów itp. Przypuszczają oni możliwość wystę-

powania w każdym z tych odrębnych ciągów przemian etapów zależnych od aktywności grup SH. Bezpośrednia inhibicja tych grup SH mogłaby być przyczyną występowania zespołu MTD. Zwrócić trzeba uwagę na to, że jak wykazaliśmy [34], nie ma równoległości między zmianami w zawartości grup SH nerki a nasileniem diurezy i aminoacydurii. Interpretacja związków zachodzących między tymi zjawiskami jest trudna. Być może zbadanie wpływu kwasu maleinowego na zawartość nie tylko grup SH, lecz również na zawartość wiązań -S-S-, w połączeniu z badaniami histochemicznymi ułatwi interpretację i zrozumienie działania kwasu maleinowego.

Niewykluczone są też inne możliwości działania kwasu maleinowego. Być może początkowo, w wyniku inhibicji dekarboksylacji oksydatywnych, dochodzi do gromadzenia się w tkankach α -ketokwasów, po czym, w wyniku transaminacji, do zwiększonego wytwarzania i wydalania aminokwasów. W ten właśnie sposób można by tłumaczyć obraz zatrucia kwasem malonowym. Podobnie jak w zatruciu kwasem maleinowym, po podaniu kwasu malonowego dochodzi do wzmożonego wydalania ketokwasów, oczywiście obok kwasu bursztynowego i cytrynowego [24], oraz do umiarkowanego zwiększenia diurezy i aminoacydurii. Znacznie trudniej jest objaśnić obecność białkomoczu oraz utrzymywanie się nieznacznej diurezy i aminoacydurii przez kilka następnych dni. Porównanie obrazu zatrucia kwasem malonowym z zatruciem kwasem maleinowym każe uwzględnić przy próbach wyjaśnienia działania kwasu maleinowego, możliwość ogólnego, wkraczającego w przemiany wpływu kwasu maleinowego.

Obraz zatrucia jodoocetanem jest całkowicie odmienny od zatruc dotychczas omawianych. Wydaje się, że jodoocetan nie ma wpływu na procesy związane z funkcją nerki i nie jest czynnikiem wywołującym zespół MTD. Podobnie mechanizm działania florydzyiny jest całkowicie odmienny od działania kwasu maleinowego. Cechą charakterystyczną zatrucia florydzyiną jest występujący przede wszystkim w pierwszym dniu po zatruciu znaczny cukromocz. Nie ma natomiast diurezy ani aminoacydurii. Wydaje się, że wpływ florydzyiny na przepuszczalność dotyczy nie tylko aktywnego transportu, ale i wymiany izosmotycznej, nie związanej z procesami energetycznymi [23]. Ostatnio stwierdzono, że florydzyina hamuje aktywność niektórych enzymów zawierających grupy SH, jak dehydrogenaza kwasu glutaminowego [25], trudno jednak przypuszczać, żeby cukromocz w zatruciu florydzyiną był wynikiem jej działania na grupy SH komórek nerkowych, czynne w procesie reabsorpcji glikozy.

Przeprowadzone przez nas badania zdają się więc potwierdzać pogląd o szczególnym znaczeniu kwasu maleinowego jako czynnika wywołującego zespół „multiple tubular defects“.

STRESZCZENIE

Porównano zatrucie kwasem maleinowym z zatruciem wywołanym salyrganem, sublimatem, jodoocetanem, kwasem malonowym i florydżyną. Stwierdzono, że w zatruciu kwasem maleinowym, podobnie jak w zatruciu związkami rtęci, występuje znaczna diureza, aminoacyduria, cukromocz i białkomocz. W pierwszym dniu po podaniu kwasu maleinowego stwierdzono zwiększone wydalanie ketokwasów, natomiast po podaniu salyrganu i sublimatu wydalanie ketokwasów ulega wyraźnemu zmniejszeniu. W zatruciu jodoocetanem nie stwierdzono diurezy, aminoacydurii, cukromoczu i białkomoczu. W zatruciu kwasem malonowym stwierdzono w pierwszym dniu zwiększone wydalanie ketokwasów oraz nieznaczną diurezę i aminoacydurię, które utrzymywały się przez kilka dni. W zatruciu florydżyną stwierdzono znaczny, szczególnie w pierwszym dniu, cukromocz, nie stwierdzono wyraźnej diurezy, aminoacydurii czy ketoacydurii. Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać pogląd o szczególnym znaczeniu kwasu maleinowego do wywołania zespołu „multiple tubular defects”. Poddano dyskusji próby objaśnienia działania kwasu maleinowego jego wpływem na grupy SH systemów enzymatycznych nerki.

LITERATURA

- [1] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* 6, 295, 1959.
- [2] Angielski S., Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* 6, 411, 1959.
- [3] Angielski S., Rogulski J., Mikulski P., Popinigis J. *Acta Biochim. Polon.* 7, 285, 1960.
- [4] Barron E. S. G., Singer T. P. *J. Biol. Chem.* 157, 221, 1945.
- [5] Berger H. *Aminoacidurie und Hyperaminoacidurie*, Bibliotheca Paediatrica, Supplements ad Annales Paediatrici 71, 123, Basel 1959.
- [6] Borghgraef R. R. M., Pitts, R. F. *J. Clin. Invest.* 35, 31, 1956.
- [7] Busch M., Potter V. R. *J. Biol. Chem.* 198, 71, 1952.
- [8] De Metry J. P., Aikawa J. K. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 90, 415, 1955.
- [9] El Hawary M. F. S. *Biochem. J.* 61, 348, 1955.
- [10] Evans B. M., Macintyre I., Macpherson C. R., Milne M. D. *Clinical Science* 16, 53, 1957.
- [11] Farah A., Bender C. H., Kruse R., Cafruny E. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 125, 309, 1959.
- [12] Friedmann T. F., Haugen G. E. *J. Biol. Chem.* 147, 415, 1943.
- [13] Greif R. L., Sullivan W. J., Jacobs G. S., Pitts R. F. *J. Clin. Invest.* 35, 38, 1956.
- [14] Harrison H. E., Harrison H. C. *Science* 120, 606, 1954.
- [15] Hellerman L., Chinard F. P., Dietz V. R. *J. Biol. Chem.* 147, 443, 1943.
- [16] Hellerman L., Schellenberg K. A., Reiss O. K. *J. Biol. Chem.* 233, 1468, 1958.
- [17] Hopkins F. G., Morgan E. J., Lutwak-Mann C. *Biochem. J.* 32, 1829, 1938.
- [18] Keller D. M., Lotspeich W. D. *J. Biol. Chem.* 234, 987, 1959.
- [19] Keller D. M., Lotspeich W. D. *J. Biol. Chem.* 234, 991, 1959.

- [20] Keller D. M., Lotspeich W. D. *J. Biol. Chem.* **234**, 995, 1959.
- [21] Kipnis D. M., Moall M. W. *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 226, 1958.
- [22] Kleinzeller A., Cort J. H. *Biochem. J.* **67**, 15, 1957.
- [23] Krane S. M., Crane R. K. *J. Biol. Chem.* **234**, 211, 1959.
- [24] Krebs H. A., Salvin E., Johnson W. A. *Biochem. J.* **32**, 113, 1938.
- [25] Lehninger A. L., Schneider M. Z. *Physiol. Chem.* **313**, 138, 1958.
- [26] Lotspeich W. D., Peters R. A. *Biochem. J.* **49**, 704, 1951.
- [27] Lotspeich W. D., Keller D. M. *J. Biol. Chem.* **222**, 843, 1956.
- [28] Manchester K. L., Young T. G. *Biochem. J.* **70**, 353, 1958.
- [29] Mudge G. M. *Am. J. Med.* **24**, 785, 1958.
- [30] Nelson N., Somogyi M. w *Standard Methods of Clinical Chemistry*, (ed. M. Reiner) vol. 1, p. 65. Academic Press, New York, 1953.
- [31] Niemiro A. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 95 1960.
- [32] Orten M. J., Smith A. H. *J. Biol. Chem.* **117**, 555, 1937.
- [33] Peters R. A., Wakelin R. W. *Biochem. J.* **45**, 513, 1946.
- [34] Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 239, 1960.
- [35] Shapiro B. *Biochem. J.* **41**, 151, 1946.
- [36] Singer T. P., Barron E. S. G. *J. Biol. Chem.* **157**, 241, 1945.
- [37] Smith H. V. *Principles of Renal Physiology* str. 154, New York, 1956.
- [38] Stave U. *Klin. Wochenschr.* **35**, 860, 1957.
- [39] Vishwakarma P., Lotspeich W. D. *J. Clin. Invest.* **38**, 414, 1959.
- [40] Weiner J. M., Müller O. H. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **113**, 241, 1955.
- [41] Weissberger L. H. *J. Biol. Chem.* **139**, 543, 1941.
- [42] Worthen H. G., Good R. A. *A. M. A. J. Dis. Child.* **95**, 653, 1958.
- [43] Yemm E. W., Cocking E. C. *Analyst* **80**, 209, 1955.

AMINOACIDURIA INDUCED WITH MALEIC ACID

V. COMPARISON OF MALEIC ACID INTOXICATION WITH INTOXICATION CAUSED BY: SALYRGAN, MERCURIUM CHLORIDE, IODOACETATE MALONIC ACID AND PHLORIZIN

Summary

Intoxication with maleic acid was compared with those produced by salyrgan, mercurium chloride, iodoacetate, malonic acid and phlorizin. It was stated that a considerable diuresis, glucosuria, aminoaciduria and albuminuria occurred both in maleic acid and mercurium compounds intoxications. The increased excretion of keto acids was found on first day after the maleic acid administration while it was distinctly decreased when salyrgan or mercurium chloride was applied. No diuresis, aminoaciduria, glucosuria nor albuminuria were observed in the iodoacetate intoxication.

Intoxication with malonic acid resulted in the increased excretion of keto acids on the first day and slight diuresis and aminoaciduria, which lasted for several days. In phlorizin intoxication considerable glucosuria

was observed, especially on the first day, while no appreciable diuresis, aminoaciduria nor ketoaciduria was found.

The obtained results seem to support the opinion on some particular importance of maleic acid in producing the multiple tubular defects syndrom.

Some attempts of explanation of the maleic acid action by its influence on SH groups in the kidney enzymatic systems are discussed.

Otrzymano 25.1.1960 r.

S. ANGIELSKI, J. ROGULSKI, P. MIKULSKI i J. POPINIGIS

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM

VI. AZOT α -AMINOWY i KETOKWASY KRWI

*Pracownia Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk
Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

Według ogólnie przyjętych poglądów rozróżnia się aminoacydurię pochodzenia nerkowego i aminoacydurię pochodzenia pozanerkowego [7, 8, 13]. W pierwszym przypadku poziom azotu α -aminowego krwi nie ulega większym zmianom, natomiast w aminoacydurii pochodzenia pozanerkowego występuje znaczny wzrost zawartości azotu α -aminowego w krwi.

Porównanie obrazu zatrucia kwasem maleinowym z zatruciem związkami rtęci wskazywałoby na to, że aminoacyduria występująca w zatruciu kwasem maleinowym jest wynikiem zmniejszenia reabsorpcji aminokwasów wskutek uszkodzeń kanalików nerkowych [4]. Niewyjaśniona była jednak sprawa zachowania się zawartości azotu α -aminowego krwi w przebiegu zatrucia. W pierwszym dniu po zatruciu kwasem maleinowym stwierdzono dwukrotny wzrost wydalania ketokwasów. Podobne zjawisko zaobserwowano w zatruciu kwasem malonowym, natomiast po podaniu związków rtęciowych wydalanie ketokwasów ulegało wyraźnemu zmniejszeniu [4]. Na tej podstawie, a także w oparciu o dane El Hawary'ego [10] można było przypuszczać, że zwiększone wydalanie ketokwasów jest wynikiem ich zwiększonego poziomu we krwi. W poprzednich doświadczeniach stwierdzono, że kilkanaście minut po podaniu kwasu maleinowego występuje znaczna diureza, która po dwóch, trzech godzinach ulega wyraźnemu zmniejszeniu. Natomiast maksimum wydalania azotu α -aminowego przypada zwykle na drugą dobę po zatruciu. Opierając się na tych spostrzeżeniach zbadano zawartość azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru we krwi w dwie godziny i w 36 godzin po zatruciu kwasem maleinowym. Równolegle wykonano oznaczenia ilości azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru wydalanych z moczem w ciągu dwóch pierwszych godzin po zatruciu oraz w ciągu pierwszych dwunastu godzin drugiej doby po zatruciu.

METODY

Doświadczenia wykonano na 30 białych szczurach obu płci wagi 190-290 g. Szczury karmiono dietą mleczną [3]. Przed wstrzyknięciem kwasu maleinowego lub środka kontrolnego opróżniano szczurom przez uciśnięcie pęcherz moczowy. Po zastrzyku umieszczano zwierzęta w klatkach metabolicznych pozwalających na ilościowe zbieranie moczu bez domieszek kału i pokarmu. Mocz zbierano do chwili zabicia zwierzęcia, w części doświadczeń zabijano szczury dwie godziny po zatruciu i wówczas zbierano mocz pod parafinę. W pozostałych doświadczeniach zabijano szczury w 36 godzin po zatruciu, wówczas zbieranie moczu odbywało się w warunkach niezapobiegających parowaniu. Naczynia, do których zbierano mocz szczurów zabijanych po 36 godzinach, zawierały po 1 ml $2N-H_2SO_4$. Zbierano oddzielnie mocz z pierwszej doby oraz z 12 godzin — drugiej doby. Kwas maleinowy wstrzykiwano podskórnice w dawce 347 μ moli na 100 g wagi jako 1M-roztwór wodny (0,34 ml na 100 g). Szczurom kontrolnym wstrzykiwano siarczan sodowy w ilości odpowiadającej dawce kwasu maleinowego, również jako 1M-roztwór wodny. Na cztery godziny przed zabiciem usuwano zwierzętom pożywienie. Szczury zabijano przez obcięcie głowy i krew zbierano do heparynizowanej parowniczk.

Osocze oddzielano przez wirowanie przez 10 min. przy 4000 obrotów w min., następnie odbiałczano etanolem absolutnym w stosunku 1 : 5. Odwirowany osad przemywano etanolem; wirowano i oba płyny znad osadu przenoszono do kolbki na 25 ml i dopełniano wodą wolną od amoniaku. W przygotowanym w ten sposób odbiałczonym osoczu oznaczano azot α -aminowy metodą Yemma i Cockinga [19]. W pełnej krwi oznaczano ketokwasy według Friedmanna i Haugena [12] oraz cukier metodą Somogyi'ego w modyfikacji Nelsona [16]. Przy użyciu tych samych metod oznaczano azot α -aminowy, ketokwasy i cukier w moczu.

Wszystkie wyniki w odróżnieniu od innych komunikatów tej serii przeliczono na 100 g wagi szczura celem uzyskania wartości umożliwiających obliczenie „clearance“ aminokwasów i ketokwasów.

Osocze do chromatografii aminokwasów odbiałczano jak do oznaczania azotu α -aminowego. Odbiałczone osocze po odparowaniu etanolu rozpuszczano w wodzie zakwaszonej kwasem solnym i ilościowo przenoszono na kolumnę z Dowex 50 do odsolenia. Odsalanie osocza i moczu oraz rozdział chromatograficzny aminokwasów przeprowadzano według metody opisanej poprzednio [1]. Krew do chromatograficznego rozdziału ketokwasów odbiałczano według De Scheppera i wsp. [9]. Ekstrakcję przeprowadzano według McArdle [15], zaś rozdział chromatograficzny według El Hawary'ego i Thompsona [11].

WYNIKI

Dane przedstawione w tablicy 1 wskazują, że w krwi zawartość zarówno azotu α -aminowego, jak i cukru nie ulega zmianom ani w dwie godziny, ani w 36 godzin po podaniu kwasu maleinowego. Natomiast poziom ketokwasów krwi badanych w 2 godz. po podaniu kwasu maleinowego wykazuje dwukrotny wzrost w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. W 36 godzin zawartość ketokwasów krwi szczurów zatrutych nie wykazuje różnic w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Obraz chromatograficzny aminokwasów osocza szczurów zatrutych kwasem maleinowym nie wykazuje żadnych widocznych różnic w porównaniu z podobnym obrazem

Tablica 1

Zawartość azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru we krwi szczurów w 2 godziny i 36 godzin po podaniu kwasu maleinowego

Szczury karmiono dietą mleczną. Kwas maleinowy wstrzykiwano podskórnie w dawce $347 \mu\text{moli}$ na 100 g wagi. Szczurom kontrolnym wstrzyknięto taką samą ilość siarczanu sodu. Wyniki podają w μmole średnie wartości, \pm średnie odchylenie

	Liczba szczurów	Azot α -aminowy ($\mu\text{mole}/100 \text{ ml}$ osocza)	Ketokwasy	Cukier
			($\mu\text{mole}/100 \text{ ml}$ krwi)	
2 godz. po zastrzyku				
Kontrola	11	409 ± 39	44 ± 6	538 ± 98
Po podaniu kwasu maleinowego	9	392 ± 19	84 ± 7	648 ± 43
36 godz. po zastrzyku				
Kontrola (w nawiasach wartości graniczne)	3	401 (382—421)	37 (30—40)	600 (490—760)
Po podaniu kwasu maleinowego	7	453 ± 74	44 ± 8	661 ± 57

szczurów kontrolnych, zarówno w 2 godz., jak i w 36 godz. po podaniu kwasu maleinowego. W moczu natomiast stwierdza się znaczne nasilenie intensywności plam aminokwasów, odpowiadające w przybliżeniu obrazowi opisywanemu poprzednio [2]. Istotne różnice stwierdza się w obrazie chromatograficznym ketokwasów krwi. U szczurów zabijanych w 2 godz. po podaniu kwasu maleinowego stwierdza się znaczny wzrost intensywności plam odpowiadających kwasowi pyrogronowemu oraz w nieco mniejszym stopniu kwasowi α -ketoglutarrowemu. Po 36 godz. nasilenie plam nie różni się od kontrolnych. W moczu zebranym z pierwszych

2 godzin po zatruciu stwierdza się znaczny wzrost intensywności plam odpowiadających kwasowi pyrogronowemu i niewielki wzrost intensywności plamy kwasu α -ketoglutazarowego.

Wyniki przedstawione w tablicy 2 wykazują, że szczury zatrute kwasem maleinowym wydalają w pierwszych dwóch godzinach przeszło trzy razy więcej moczu w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Wydalanie azotu α -aminowego i cukru jest cztery do pięciu razy większe, a wydalanie ketokwasów przeszło piętnaście razy większe w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. W drugiej dobie szczury zatrute kwasem maleinowym wydalają w okresie dwugodzinnym około trzy razy więcej moczu, przeszło dziesięć razy więcej azotu α -aminowego i blisko trzy razy więcej cukru w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Natomiast wydalanie

Tablica 2

Ilość moczu oraz ilości azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru wydane przez szczury w ciągu dwóch pierwszych godzin oraz pierwszych 12 godzin drugiej doby po podaniu kwasu maleinowego

Wyniki doświadczalne uzyskane z analizy moczu, zbieranego pomiędzy 24-tą a 36-tą godziną po zatruciu kwasem maleinowym, podzielono przez 6 celem uzyskania wartości dających się porównać z danymi z pierwszych dwóch godzin po zastrzyku. Wyniki podano na 100 g szczura.

Liczby przedstawiają w μ molach wartości średnie; w nawiasach wartości graniczne

	Diureza (ml)	μ mol/100 g wagi szczura		
		Azot α -aminowy	Ketokwasy	Cukier
2 godz. po zastrzyku				
Kontrola*	1,4 (1,0—2,0)	6,9 (4,5—9,6)	1,9 (1,2—2,3)	5,0 (3,0—6,3)
Po podaniu kwasu maleinowego	5,0 (4,0—6,3)	30 (28—39)	30 (22—42)	24 (22—28)
36 godz. po zastrzyku				
Kontrola*	0,6 (0,4—0,8)	5,9 (4,5—7,2)	3,0 (2,2—3,5)	30 (8,0—45)
Po podaniu kwasu maleinowego	1,6 (1,1—1,9)	60 (32—104)	3,3 (2,3—4,7)	83 (32—150)

* Szczurom kontrolnym wstrzykiwano roztwór siarczanu sodowego.

ketokwasów nie różni się od wydalania szczurów kontrolnych. Wstrzykiwany jako środek kontrolny siarczan sodowy w pierwszych godzinach po wstrzyknięciu zwiększa diurezę, natomiast zmniejsza wydalanie ketokwasów, a zwłaszcza cukru. W drugiej dobie po wstrzyknięciu jest on zupełnie bez wpływu na wydalanie tych substancji. Wydalanie azotu α -aminowego zarówno w 2 godz., jak i w 36 godz. po podaniu siarczanu sodu nie

ulega istotnym zmianom. Jeśli porównać wydalanie w dwóch pierwszych godzinach po zatruciu kwasem maleinowym ze średnim dwugodzinnym wydalaniem w drugiej dobie po zatruciu, to okazuje się, że okres pierwszych dwóch godzin po podaniu kwasu maleinowego cechuje się znacznie większym nasileniem diurezy oraz wybitnie zwiększonym wydalaniem ketokwasów. Natomiast wydalanie azotu α -aminowego i cukru wykazuje większe nasilenie w drugiej dobie po zatruciu.

T a b l i c a 3

Wydalanie ketokwasów przez szczury przed i po zatruciu kwasem maleinowym

Szczury karmione dietą mleczną. Kwas maleinowy wstrzyknięto podskórnie w dawce 347 μ mol na 100 g wagi szczura. Wyniki, przeliczone na 100 g wagi, wyrażają w μ molach średnie z 8 szczurów. Dane pozycji drugiej wzięte z tablicy 2. W nawiasach wartości graniczne

1	Normalne dobowe wydalanie ketokwasów szczurów nie zatrutych	39 (27—50)
2	Ilość ketokwasów wydalana w pierwszych dwóch godzinach po zastrzyku	30 (22—42)
3	Całkowita ilość ketokwasów wydalana w pierwszej dobie po zastrzyku	89 (59—126)
4	Ilość ketokwasów wydalana w drugiej dobie po zastrzyku	38 (26—56)

Analiza danych zestawionych w tablicy 3 wskazuje, że w pierwszych dwóch godzinach po zatruciu kwasem maleinowym szczury wydalają ilości ketokwasów bliskie normalnemu dobowemu wydalaniu szczurów nie zatrutych. Stanowi to około jedną trzecią całkowitej ilości ketokwasów wydalanych w pierwszej dobie po zatruciu. Jeżeli uwzględni się, że okres znacznej początkowej diurezy po podaniu kwasu maleinowego trwa około trzech godzin, można przypuszczać, że zwiększone wydalanie ketokwasów stwierdzone w pierwszej dobie po zatruciu przypada na pierwsze trzy godziny po podaniu kwasu maleinowego. Z danych Tablicy 1 wynika, że zwiększonemu wydalaniu ketokwasów odpowiada zwiększony w tym czasie dwukrotnie poziom ketokwasów krwi. Można przypuszczać, że w następnych godzinach pierwszej doby, tak jak w drugiej dobie, zarówno poziom ketokwasów krwi, jak i wydalanie z moczem jest już normalne.

Przedstawione wyniki wskazują, że aminoacyduria i cukromocz w zatruciu kwasem maleinowym są wyłącznie pochodzenia nerkowego. Natomiast zwiększone wydalanie ketokwasów wydaje się być wynikiem ich zwiększonego poziomu we krwi. Dla lepszego zdania sobie sprawy z istoty tych zjawisk obliczono przybliżony „clearance“ aminokwasów i ketokwasów.

Zdajemy sobie całkowicie sprawę z tego, że obliczone przez nas wartości są liczbami przybliżonymi, jak również zdajemy sobie sprawę ze źródeł błędów, które mogą występować w naszym przeliczeniu. Po pierwsze „clearance“ aminokwasów obliczono nie dla poszczególnych aminokwasów, ale dla sumy aminokwasów, wyrażonej ilością azotu α -aminowego. Podobnie „clearance“ ketokwasów nie obliczono oddzielnie dla kwasu pyrogronowego i α -ketoglutazarowego, lecz dla sumy ketokwasów. Stężenie azotu α -aminowego i ketokwasów w moczu wydalonym w dwóch pierwszych godzinach po zatruciu uzyskano z analizy moczu zebranego w przeciągu tych dwóch godzin, w jednej porcji, w warunkach zapobiegających parowaniu. Było to możliwe dlatego, że szczury zatrute kwasem maleinowym wydają w tym czasie znaczne ilości moczu i ewentualne straty nie obarczają analizy dużym błędem. Również diureza szczurów kontrolnych jest wcale znaczna. Natomiast w drugiej dobie po zatruciu ilości moczu wydalone przez szczury w okresach dwugodzinnych są znacznie mniejsze i ewentualne straty stanowiłyby poważne źródło błędów. Dlatego stężenie azotu α -aminowego i ketokwasów w moczu wydalonym w drugiej dobie obliczono na podstawie analizy moczu zebranego

T a b l i c a 4

Wpływ kwasu maleinowego na „clearance“ azotu α -aminowego i ketokwasów
Obliczenia dokonano w oparciu o dane tablic 1 i 2

	Azot α -aminowy		Ketokwasy	
	$\frac{U \times V}{P}$	Procent filtracji kłębuszkowej	$\frac{U \times V}{P}$	Procent filtracji kłębuszkowej
Kontrola	14	2	36	2
2 godziny po podaniu kwasu maleinowego	64	11	290	53
36 godzin po podaniu kwasu maleinowego	110	20	63	11

U — ilość μ moli w 1 μ ltrze moczu

V — ilość moczu w μ ltrach na minutę

P — ilość μ moli w 1 μ ltrze osocza

Filtrację kłębuszkową przyjęto za Jacobsem i Brownem [14] jako równą 550 μ ltrów/min.

z pierwszych dwunastu godzin drugiej doby. Oczywiście nie kontrolowano w tym czasie stałości poziomu we krwi azotu α -aminowego czy ketokwasów. W obliczeniach nie uwzględniono również ewentualnych zmian w filtracji kłębuszkowej. Według danych Berlinera i wsp. [6] nie ulega ona zmianom u psów zatrutych kwasem maleinowym. Można też przypuszczać, że ewentualny wzrost filtracji kłębuszkowej nie mógłby być odpowiedzialny za kilkakrotny wzrost wydalania azotu α -aminowego. Mimo

powyższych zastrzeżeń wydaje się, że uzyskane liczby mają istotne znaczenie jako wartości porównawcze współczynnika oczyszczania krwi szczurów zatrutych kwasem maleinowym i szczurów kontrolnych. Z danych przedstawionych w tablicy 3 wynika, że „clearance“ azotu α -aminowego wzrasta w dwie godziny po podaniu kwasu maleinowego około pięciokrotnie, a w 36 godzin po zatruciu około ośmiokrotnie w porównaniu ze szczurami kontrolnymi. Stanowi to odpowiednio 11 i 20% filtracji kłębuszkowej, wobec 2% u szczurów kontrolnych. „Clearance“ ketokwasów w dwie godziny po zatruciu wykazuje ośmiokrotny wzrost w porównaniu ze szczurami kontrolnymi, natomiast w 36 godzin po zatruciu jest już tylko nieznacznie podwyższony. Stanowi to odpowiednio 53 i 11% filtracji kłębuszkowej, wobec 6% u szczurów kontrolnych. Przedstawione wartości współczynnika oczyszczania potwierdzają poprzednie dane o nerkowym pochodzeniu aminoacydurii w zatruciu kwasem maleinowym [4]. Wskazują one również, że zwiększone wydalanie ketokwasów jest nie tylko wynikiem ich zwiększonego poziomu we krwi, lecz spowodowane jest także bezpośrednim działaniem kwasu maleinowego na nerkę.

DYSKUSJA

Przy próbach tłumaczenia obrazu zatrucia kwasem maleinowym [18] zwracano uwagę na wybiórcze działanie kwasu maleinowego na grupy SH nerki. Wskazywano na zmniejszenie reabsorpcji w wyniku uszkodzenia kanalików nerkowych jako przyczynę występowania aminoacydurii i cukromoczu w zatruciu kwasem maleinowym [4]. Przedstawione w tej pracy wyniki stwierdzające, że w przebiegu zatrucia nie dochodzi do zwiększenia poziomu azotu α -aminowego we krwi, natomiast znacznie wzrasta współczynnik oczyszczania azotu α -aminowego, całkowicie potwierdzają przypuszczenia o wyłącznie nerkowym pochodzeniu aminoacydurii. Mechanizm zwiększonego wydalania ketokwasów wydaje się być bardziej złożony. Poza niewątpliwym zwiększeniem poziomu ketokwasu krwi istotny okazuje się bezpośredni wpływ kwasu maleinowego na nerkę, możliwe jest przy tym zarówno zmniejszenie reabsorpcji ketokwasów w wyniku uszkodzenia kanalików nerkowych, jak i zwiększenie ich wydalania do światła kanalików. Obraz chromatograficzny ketokwasów krwi wskazuje, że we krwi, w pierwszych godzinach po zatruciu, zwiększa się zawartość kwasu pyrogronowego w większym stopniu niż zawartość kwasu α -ketoglutazarowego. O ile Peters i Wakelin [17] podkreślają szczególną wrażliwość oksydazy pyrogronowej na działanie kwasu maleinowego, to El Hawary [10] stwierdził we krwi szczurów zatrutych kwasem maleinowym głównie zwiększone ilości kwasu α -ketoglutazarowego. Stosował on jednak znacznie większą dawkę kwasu maleinowego. Zwiększony

poziom ketokwasów krwi można próbować tłumaczyć inhibicją *in vivo* systemów dekarboksylacji oksydacyjnych. W komunikacie dotyczącym wpływu diety i drogi podania kwasu maleinowego na obraz zatrucia [5], zwracamy uwagę na fakt, że wątroba szczurów karmionych dietą niezawierającą laktozy lub galaktozy znosi toksyczny wpływ kwasu maleinowego na nerkę. Dane te zdają się wskazywać, że obok niewątpliwego, wybiórczego wpływu na nerkę działanie kwasu maleinowego *in vivo* nie może dotyczyć i innych narządów.

STRESZCZENIE

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach karmionych dietą mleczną. Stwierdzono, że u szczurów zatrutych kwasem maleinowym poziom azotu α -aminowego we krwi nie wzrasta ani w dwie godziny, ani w 36 godzin po podaniu kwasu maleinowego. Również obraz chromatograficzny aminokwasów osocza nie wykazuje widocznych zmian. Wydalanie azotu α -aminowego i cukru zwiększa się kilkakrotnie wykazując maksimum w drugiej dobie po zatruciu. Poziom ketokwasów krwi w dwie godziny po podaniu kwasu maleinowego wykazuje dwukrotny wzrost, natomiast w 36 godzin po zatruciu nie różni się w sposób istotny od wartości kontrolnych. Również zwiększone wydalanie ketokwasów z moczem stwierdzone w pierwszej dobie po zatruciu przypada głównie na pierwsze trzy godziny.

Przybliżony „clearance“ azotu α -aminowego wykazuje znaczny wzrost zarówno w dwie, jak i w 36 godzin po zatruciu, zaś przybliżony „clearance“ ketokwasów jest wyraźnie zwiększony tylko w dwie godziny po zatruciu.

Opierając się na tych danych można powiedzieć, że aminoacyduria i cukromocz w zatruciu kwasem maleinowym są wyłącznie pochodzenia nerkowego. Natomiast zwiększone wydalanie ketokwasów wydaje się być spowodowane z jednej strony zwiększonym poziomem ketokwasów krwi, z drugiej strony bezpośrednim wpływem kwasu maleinowego na nerkę. W dyskusji zwrócono uwagę na możliwości ogólnego, wkraczającego w przemiany działania kwasu maleinowego.

LITERATURA

- [1] Angielski S. *Acta Biochim. Polon.* 5, 75, 1958.
- [2] Angielski S., Niemirowicz R., Makarewicz W., Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* 5, 431, 1958.
- [3] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* 6, 295, 1959.
- [4] Angielski S., Rogulski J., Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* 7, 269, 1960.

- [5] Angielski S., Rogulski J., Baściak J. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 295, 1960.
- [6] Berliner R. W., Kennedy T. J., Hilton J. G. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**, 791, 1950.
- [7] Dent C. E. *Biochem. J.* **41**, 240, 1947.
- [8] Dent C. E., Walshe J. M. *Brit. Med. Bullet.* **10**, 240, 1954.
- [9] De Schepper P., Parmentier G., Vanderhaeghe H. *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 507, 1958.
- [10] El Hawary M. F. S. *Biochem. J.* **61**, 348, 1955.
- [11] El Hawary M. F. S., Thompson R. H. S. *Biochem. J.* **53**, 340, 1953.
- [12] Friedmann T. E., Haugen G. E. *J. Biol. Chem.* **147**, 415, 1943.
- [13] Harris H. *3-ème Congrès International Biochimie*, Bruxelles 1955 Rappports, str. 34.
- [14] Jacobs J., Brown J. H. U. *Amer. J. Physiol.* **186**, 172, 1956.
- [15] McArdle B. *Biochem. J.* **66**, 144, 1957.
- [16] Nelson N., Somogyi N., w *Standard Methods of Clinical Chemistry* (ed. M. Reiner), vol. 1, p. 65, Academic Press, New York 1953.
- [17] Peters R. A., Wakelin R. W. *Biochem. J.* **40**, 513, 1946.
- [18] Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 239, 1960.
- [19] Yemm E. W., Cocking E. C. *Analyst* **80**, 209, 1955.

AMINOACIDURIA INDUCED WITH MALEIC ACID.

VI. α -AMINO NITROGEN AND KETO ACIDS IN BLOOD

Summary

Experiment was carried out on rats fed with milk diet. It was stated, that the blood level of α -amino nitrogen in maleic acid intoxicated rats did not rise neither within 2 nor 36 hours after administration of maleic acid. No appreciable changes were found on chromatography, too. The excretion of α -amino nitrogen was increase several times achieving its highest value on the second day after intoxication. The blood keto acids content was twice increased within 2 hours after the administration of maleic acid, while after 36 hours it did not differ from the control ones. The increased excretion of keto acids in urine observed during the first day after intoxication occurred mainly also within the 3 first hours.

The approximative α -amino nitrogen "clearance" showed a considerable rise as well within 2 as 36 hours after intoxication, while the approximative keto acids "clearance" was distinctly increased only after 2 hours. Basing on these data it may be concluded, that aminoaciduria and glucosuria in the maleic acid intoxication are of renal origin only. The increased excretion of keto acids, however, seems to be due to their higher blood level, and, on the other hand, to the direct effect of maleic acid upon kidney.

Otrzymano 25.I.1960 r.

S. ANGIELSKI, J. ROGULSKI i JADWIGA BAŚCIAK

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM

VII. PRÓBY INTERPRETACJI WPLYWU DIETY I SPOSOBU PODANIA NA OBRAZ ZATRUCIA

*Pracownia Biochemii Patologicznej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Gdańsk
Kierownik: prof. dr Wł. Mozołowski*

Jednorazowe podskórne lub dootrzewnowe podanie kwasu maleinowego w dawce 300—400 mg/kg wagi szczurom karmionym dietą zawierającą laktozę powoduje wzrost diurezy, zwiększone wydalanie z moczem aminokwasów oraz, w mniejszym stopniu, fosforanów, amoniaku, sodu i potasu [1, 2].

Zdolność kwasu maleinowego tworzenia połączeń ze związkami posiadającymi grupy sulfhydrylowe pozwalała przypuszczać, że toksyczne działanie tego związku jest związane z inaktywacją grup SH. Znana jest szczególna wrażliwość nerki na działanie substancji blokujących grupy SH. Podanie szczurom drobnocząsteczkowych związków sulfhydrylowych równocześnie z kwasem maleinowym znosi toksyczny wpływ kwasu maleinowego [3]. W badaniach na szczurach [15] stwierdzono, że 15 min. po podaniu kwasu maleinowego zawartość grup SH homogenatu nerek spada o jedną trzecią w stosunku do wartości normalnych zwierząt uprzednio karmionych dietą zawierającą laktozę oraz o jedną piątą u szczurów pozostających na diecie bezlaktozowej.

Obraz zatrucia wywołanego kwasem maleinowym porównano z zatruciem występującym po podaniu takich związków, jak kwas malonowy, florydzyina i niektóre substancje blokujące grupy SH [4]. Pośród nich tylko związki rtęci wykazują podobny wpływ na diurezę oraz na wydalanie z moczem azotu α -aminowego i cukru. Wskazywałoby to, że obraz zatrucia po podaniu kwasu maleinowego ma pewne cechy uszkodzenia kanalików nerkowych. Związki rtęci zmniejszają wydalanie ketokwasów z moczem [4]. Natomiast kwas maleinowy, podobnie jak kwas malonowy,

powoduje zwiększone wydalanie ketokwasów [12, 4, 5], czemu towarzyszy wzrost zawartości ketokwasów krwi. Fakt ten zdaje się wskazywać, że kwas maleinowy działa również jako inhibitor cyklu kwasów trójkarboksylowych [12, 13].

Poprzednio [2] stwierdzono znaczenie laktozy w diecie dla wywołania aminoacydurii kwasem maleinowym. Doświadczenia przedstawione w tej pracy miały za zadanie zbadać wpływ galaktozy na obraz zatrucia kwasem maleinowym. Stwierdzono przy tym istotne znaczenie sposobu podania kwasu maleinowego.

METODY

Do doświadczeń używano białe szczury obu płci, wagi 120—250 g. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Jedna grupa otrzymywała dietę bezlaktozową, druga dietę mleczną [2], trzecia grupa była karmiona dietą galaktozową zawierającą 15% galaktozy. Sporządzano ją przez zastąpienie części skrobi w diecie bezlaktozowej równoważną ilością galaktozy. Warunki doświadczenia, sposób zbierania i konserwacji moczu, sposób przygotowywania roztworu maleinianu do wstrzyknięć, a także metody oznaczania azotu α -aminowego, cukru i ketokwasów podano w doniesieniu V [4]. Amoniak oznaczano metodą Connerty, Briggs i Eatu [7].

WYNIKI

Wpływ galaktozy w diecie na wydalanie azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru i amoniaku

Poprzednio stwierdzono, że pięciodniowy okres karmienia szczurów dietą mleczną był wystarczający do wykazania wpływu laktozy na obraz zatrucia kwasem maleinowym [2]. Przypuszczaliśmy, że istotnym czynnikiem usposabiającym szczury na działanie kwasu maleinowego jest składnik laktozy — galaktoza. Przypuszczenie to ma uzasadnienie w toksycznym działaniu na ustrój w przebiegu galaktozemii zarówno laktozy, jak i galaktozy [11].

Sprzeczne doniesienia dotyczące wpływu galaktozy w diecie na wydalanie azotu α -aminowego [8, 6, 10] skłoniły nas do zbadania, czy dieta zawierająca 15% galaktozy powoduje zwiększone wydalanie azotu α -aminowego. Handler [9] wykazał, że mocz szczurów karmionych dietą galaktozową cechuje się znaczną kwasotą miareczkową, która nie jest spowodowana obecnością ciał acetonowych. W związku z tym zbadano wpływ galaktozy na wydalanie ketokwasów.

Tablica 1 przedstawia w μ molach ilości azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru (wyrażanego jako glikoza) i amoniaku, wydalone w ciągu 24 godzin. Pięć szczurów wziętych do doświadczenia karmiono dietą bezlaktozową. Po tygodniu zmieniono dietę na galaktozową. Okazuje się, że szczury karmione dietą zawierającą 15% galaktozy normalnie przybierają na wadze. Ilość wydalanego moczu już następnego dnia zwiększa się dwukrotnie. Ilości azotu α -aminowego wydalanego w ciągu doby są od trzeciego dnia około dwa razy większe. Również dwukrotnie zwiększa się wydalanie ketokwasów. Ilość wydalanego cukru odpowiada około 2/3 spożytej galaktozy. Zawartość amoniaku w moczu wyraźnie wzrasta. Uzyskane wyniki dotyczące wzrostu wydalania azotu α -aminowego są zgodne z danymi Craiga i Maddocka [8], a sprzeczne z wynikami Human i wsp. [10]. Być może opisana przez Handlera zwiększona kwasowość moczu spowodowana jest częściowo stwierdzonym przez nas zwiększonym wydalaniem ketokwasów. W ten sposób można również tłumaczyć zwiększone wydalanie amoniaku.

Tablica 1

Wpływ diety galaktozowej na wydalanie azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru i amoniaku

Wartości wyrażają w μ molach średnie dobowego wydalania pięciu szczurów; w nawiasach wartości graniczne

Data	Średnia waga szczurów	Diureza (ml)	Azot α -aminowy (μ mole)	Ketokwasy (μ mole)	Cukier (μ mole)	Amoniak (μ mole)
Dieta bezlaktozowa						
25.VI	199	—	—	—	—	—
2.VII	—	8	121 (114—128)	31 (18—43)	83 (63—122)	430 (386—500)
3.VII	217	7	143 (100—171)	27 (16—45)	90 (56—128)	420 (320—520)
Dieta galaktozowa						
3.VII	—	13	114 (107—128)	60 (44—84)	950 (4280—6060)	560 (510—620)
5.VII	—	15	257 (207—363)	78 (46—94)	7180 (5900—8280)	760 (600—890)
6.VII	—	14	250 (200—343)	65 (40—94)	7000 (6070—8570)	600 (470—780)
7.VII	—	13	200 (136—258)	77 (36—97)	5890 (3400—7000)	720 (430—860)
8.VII	240	12	164 (129—207)	65 (40—86)	3390 (3890—5620)	690 (500—945)

Porównanie wpływu diety mlecznej i galaktozowej

Tablica 2 zestawia wartości azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru wydalanych przez szczury karmione dietą bezlaktozową, mleczną, względnie galaktozową przez okres 5 dni. Okazuje się, że laktoza w diecie w przeciwieństwie do galaktozy jest bez wpływu na wydalanie azotu α -aminowego. Natomiast wydalanie ketokwasów jest w porównaniu z dietą bezlaktozową dwukrotnie większe na diecie galaktozowej i mlecznej. Ilości wydalanego cukru na diecie mlecznej są znacznie mniejsze niż na galaktozowej.

Tablica 2

Porównanie diurezy oraz wydalania azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru na różnych dietach

Wartości podają w μ molech średnie dobowego wydalania; w nawiasach wartości graniczne

Rodzaj diety	Liczba szczurów	Diureza (ml)	Azot α -aminowy (μ mole)	Ketokwasy (μ mole)	Cukier (μ mole)
Bezlaktozowa	15	7	113 (86—136)	42 (28—57)	83 (61—100)
Mleczna	15	10	119 (107—129)	80 (66—90)	580 (140—900)
Galaktozowa	10	12	182 (114—257)	66 (55—78)	5700 (3390—8570)

Wpływ kwasu maleinowego na wydalanie azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru i amoniaku przez szczury karmione dietą galaktozową

Szczurom karmionym od 5 dni dietą galaktozową wstrzyknięto kwas maleinowy podskórnice w dawce 300 mg na 1 kg wagi. Mierzono dobową diurezę oraz ilości azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru i amoniaku, wydalone w ciągu 24 godzin. Wyniki przedstawiono w tablicy 3. Ilości moczu wydalone przez pierwsze trzy dni po zatruciu są około dwukrotnie większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Wzrost wydalania azotu α -aminowego występuje już w pierwszej dobie po podaniu kwasu maleinowego; największe nasilenie aminoacydurii jest w drugiej dobie i osiąga wartości cztery razy przewyższające wartości normalne. Na czwarty dzień po zatruciu zawartość wydalanego azotu α -aminowego powraca do normy. W pierwszych dniach występuje znaczne zwiększenie wydalania ketokwasów; w pierwszym dniu ilość wydalonych ketokwasów jest czterokrotnie wyższa, w drugim dniu dwukrotnie wyższa w porównaniu ze stanem przed zatruciem; w następnych dniach powracają wartości normalne.

W pierwszym dniu po podaniu kwasu maleinowego ilość wydalanego cukru spada pięciokrotnie, w następnych dniach wydalanie powraca do normy; występujący w pierwszym dniu spadek wydalania cukru można tłumaczyć mniejszym spożyciem pokarmu przez szczury. W pierwszych trzech dniach wartości wydalanego amoniaku są prawie dwukrotnie większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem.

T a b l i c a 3

Wpływ diety galaktozowej na obraz zatrucia wywołanego kwasem maleinowym podanym podskórnie

Grupa obejmuje pięć szczurów karmionych od 5 dni dietą galaktozową. Wartości wyrażają w μ molech średnie dobowego wydalania azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru i amoniaku; w nawiasach wartości graniczne

	Diureza (ml)	Azot α -aminowy (μ mole)	Ketokwasy (μ mole)	Cukier (μ mole)	Amoniak (μ mole)
Normalne wartości (z 5 dni przed zatruciem)	13	197 (114—237)	69 (60—78)	5700 (950—7180)	660 (415—1460)
Kolejny dzień zatrucia	Kwas maleinowy (300 mg/kg wagi)				
1 dzień	27	357 (186—622)	278 (150—360)	1250 (1000—1600)	1030 (415—1460)
2 dzień	27	1040 (585—1600)	125 (47—138)	4900 (1060—7000)	960 (357—1560)
3 dzień	22	572 (436—888)	63 (30—87)	3700 (1610—4800)	1320 (835—1430)
4 dzień	18	174 (136—257)	71 (26—98)	4150 (3280—5750)	520 (290—715)
5 dzień	15	243 (214—280)	69 (39—83)	3780 (2060—4670)	590 (412—770)
6 dzień	14	337 (270—357)	61 (45—85)	4150 (2440—4840)	—

Obraz zatrucia kwasem maleinowym w zależności od sposobu podania

W dalszych doświadczeniach okazało się, że droga podania kwasu maleinowego wpływa w istotny sposób na obraz zatrucia. W doświadczeniu kontrolnym kwas maleinowy wstrzykiwano podskórnie szczurom karmionym dietą nie zawierającą galaktozy ani laktozy. Stwierdzono wyraźny wzrost wydalania azotu α -aminowego. Poprzednio natomiast wykazano [2], że kwas maleinowy podany dootrzewnowo w dawce 400 mg/kg szczurom karmionym dietą bezlaktozową nie wywołuje aminoacydurii. W zwią-

T a b l i c a 4

Wpływ sposobu podania kwasu maleinowego na przebieg zatrucia u szczurów na diecie bezlaktozowej

Jedna grupa obejmuje 5 szczurów. Wartości wyrażają w μ molach średnie dobowego wydalania azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru; w nawiasach wartości graniczne

	Grupa I Kwas maleinowy podano podskórnie				Grupa II Kwas maleinowy podano dootrzewnowo			
	Diureza (ml)	Azot α -amino- wy	Keto- kwas	Cukier	Diureza (ml)	Azot α -amino- wy	Keto- kwas	Cukier
Wartości normalne (z 3 dni przed zatruciem)	7	114 (93—136)	38 (28—57)	80 (76—83)	6	100 (98—105)	45 (41—50)	72 (61—83)
Kwas maleinowy (400 mg/kg wagi)								
+1	18	504 (214—1980)	115 (91—135)	293 (128—566)	16	211 (164—228)	110 (64—130)	235 (200—289)
+2	14	890 (136—1960)	47 (28—62)	526 (58—2000)	8	143 (122—172)	49 (20—65)	113 (79—140)
+3	12	285 (100—810)	37 (32—40)	232 (41—534)	8	135 (107—172)	39 (22—51)	98 (46—144)
+4	8	242 (129—500)	34 (25—45)	121 (53—300)	7	114 (72—143)	37 (14—51)	88 (68—135)
+5	9	136 (122—158)	—	116 (91—200)	6	121 (114—143)	—	91 (67—115)

zku z tym wykonano doświadczenia, w których porównano obraz zatrucia po podskórnym oraz dootrzewnowym podaniu kwasu maleinowego. Doświadczenia wykonano na pięciu grupach zwierząt; w każdej po pięć szczurów. Dwie pierwsze grupy (I i II) były karmione dietą bezlaktozową, nie zawierającą ani laktozy, ani galaktozy. Grupy III i IV otrzymywały dietę mleczną, piąta grupa (V) otrzymywała dietę galaktozową. Wyniki przedstawione są w tablicy 4, 5 i 6.

Z danych tablicy 4 widać, że droga podania kwasu maleinowego wpływa w istotny sposób na obraz zatrucia. Kwas maleinowy wstrzyknięty podskórnie w dawce 400 mg/kg szczurom karmionym dietą bezlaktozową (grupa I) wywołuje aminoacydurię, natomiast podany dootrzewnowo (grupa II) jest prawie bez wpływu na wydalanie azotu α -aminowego. Istnieją także różnice w wydalaniu cukru; szczury, które otrzymały kwas maleinowy podskórnie, wydalają trzy do czterech razy większe ilości cukru aniżeli szczury, które otrzymały kwas maleinowy dootrzewnowo. Nie ma natomiast różnic w wydalaniu ketokwasów; zarówno szczury grupy I,

jak i grupy II wydają w pierwszym dniu trzykrotnie większe ilości ketokwasów w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Istnieją wyraźne różnice w ilości wydalanego moczu. Po podskórnym podaniu kwasu maleinowego zwiększona diureza utrzymuje się przez trzy dni, natomiast po podaniu dootrzewnowym występuje tylko w pierwszym dniu.

Jak widać z tablicy 5, obraz zatrucia kwasem maleinowym, występujący u szczurów karmionych dietą mleczną, wyraża się większą i dłużej trwającą aminoacydurią i diurezą u szczurów, które otrzymały kwas maleinowy podskórnie.

Rys. 1 przedstawia graficznie obraz zatrucia kwasem maleinowym w zależności od diety i sposobu podania kwasu maleinowego.

Dane tablicy 6 w porównaniu z danymi tablicy 3 wykazują, że szczury karmione dietą galaktozową po podskórnym podaniu kwasu maleinowego (dane tabl. 3) wydają nieco więcej azotu α -aminowego niż po podaniu dootrzewnowym (dane tabl. 6). Wydalanie ketokwasów po podaniu podskórnym jest w pierwszej dobie cztery razy większe a w drugiej dwa razy

T a b l i c a 5

Wpływ sposobu podania kwasu maleinowego na przebieg zatrucia u szczurów na diecie mlecznej

Wartości wyrażają w μ molach średnie dobowego wydalania azotu α -aminowego, ketokwasów i cukru; w nawiasach wartości graniczne

	Grupa III Kwas maleinowy podano podskórnie				Grupa IV Kwas maleinowy podano dootrzewnowo			
	Diureza (ml)	Azot α -amino- wy	Keto- kwasy	Cukier	Diureza (ml)	Azot α -amino- wy	Keto- kwasy	Cukier
Wartości normalne (z 3 dni przed zatruciem)	10	113 (107—121)	70 (66—80)	497 (143—780)	11	129 (110—139)	83 (80—87)	605 (544—672)
Kwas maleinowy (400 mg/kg wagi)								
+1	29	740 (429—980)	126 (119—142)	1455 (1170—1740)	29	770 (250—1230)	152 (129—175)	1340 (725—1650)
+2	35	1570 (1065—2760)	60 (40—93)	2455 (1670—3080)	29	1130 (229—1690)	67 (32—87)	2100 (860—2560)
+3	36	1390 (465—1965)	70 (50—91)	2380 (1080—3680)	27	700 (207—1080)	71 (53—93)	1585 (605—2410)
+4	36	910 (264—1700)	76 (49—117)	2480 (1380—3680)	25	580 (186—1150)	108 (87—149)	1610 (975—2280)
+5	35	730 (143—1610)	68 (43—133)	2100 (1000—3740)	20	222 (107—542)	112 (64—170)	1450 (370—1730)

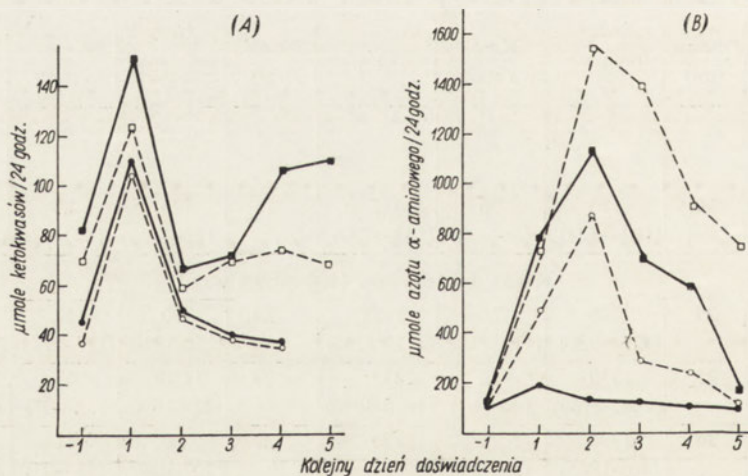
T a b l i c a 6

Wpływ diety galaktozowej na obraz zatrucia wywołanego kwasem maleinowym podanym dootrzewnowo

Wartości wyrażają w μmol ach średnie dobowe wydalania azotu α -aminowego i ketokwasów. Do doświadczenia użyto pięć szczurów, karmionych od 5 dni dietą galaktozową

	Diureza (ml)	Azot α -aminowy	Ketokwasy
Wartości normalne (z 3 dni przed zatruciem)	11	157 (142—171)	59 (55—64)
Kwas maleinowy (400 mg/kg wagi)			
1 dzień	20	450 (240—655)	140 (96—184)
2 dzień	26	615 (280—1210)	36 (29—45)
3 dzień	13	430 (122—835)	33 (20—49)
4 dzień	16	370 (86—1087)	54 (40—78)
5 dzień	14	158 (86—340)	49 (27—72)

większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem. W trzeciej dobie ilości wydalonych ketokwasów osiągają wartości normalne. Natomiast po poda-



Rvs. 1. Wydalanie w moczu (A) ketokwasów i (B) azotu α -aminowego w zależności od diety i sposobu podania. (●) dieta bezlaktozowa, kwas maleinowy dootrzewnowo, (○) dieta bezlaktozowa, kwas maleinowy podskórnie, (■) dieta laktozowa, kwas maleinowy dootrzewnowo, (□) dieta laktozowa, kwas maleinowy podskórnie

niu dootrzewnowym ilość wydalonych ketokwasów jest tylko dwa razy większa w porównaniu ze stanem przed zatruciem. W drugiej i trzeciej dobie wydalanie ketokwasów jest mniejsze, w następnych dniach osiąga wartości normalne.

DYSKUSJA

W zatruciu kwasem maleinowym da się zauważyć dwa okresy. Pierwszy okres obejmuje pierwszą dobę po podaniu kwasu maleinowego, drugi okres trwa kilka następnych dni.

W pierwszym okresie, bez względu na stosowaną dietę i bez względu na drogę podania kwasu maleinowego, występuje zwiększona diureza oraz zwiększone wydalanie z moczem ketokwasów, azotu α -aminowego, cukru i amoniaku. Wpływ stosowanej diety oraz wpływ drogi podania kwasu maleinowego zaznacza się jedynie w ilościowym nasileniu wydalania poszczególnych badanych składników moczu.

Szczury karmione dietą mleczną wydalają w pierwszej dobie, niezależnie od sposobu podania, blisko siedem razy więcej azotu α -aminowego, blisko dwa razy więcej ketokwasów i dwa do trzech razy więcej cukru w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Szczury karmione dietą bezlaktozową, które otrzymały kwas maleinowy drogą podskórną, wydalają w tym czasie pięciokrotnie większe, w porównaniu ze stanem przed zatruciem, ilości azotu α -aminowego, trzykrotnie większe ilości ketokwasów i cukru. Natomiast szczury karmione dietą bezlaktozową, które otrzymały kwas maleinowy drogą dootrzewnową, wydalają tylko dwukrotnie większe ilości azotu α -aminowego oraz trzykrotnie większe ilości ketokwasów i cukrów.

Drugi okres zatrucia kwasem maleinowym charakteryzuje się zwiększonym nasileniem diurezy, aminoacydurii i cukromoczu; nie ma natomiast zwiększonego wydalania ketokwasów. W przeciwieństwie do pierwszego okresu jest on uzależniony od stosowanej diety oraz od drogi podania kwasu maleinowego. Występuje on u szczurów karmionych dietą mleczną zarówno po podskórnym, jak i dootrzewnowym podaniu kwasu maleinowego. W pierwszym przypadku osiąga jednak większe nasilenie. Natomiast u szczurów karmionych dietą bezlaktozową ten drugi okres cechujący się zwiększonym nasileniem diurezy i aminoacydurii występuje tylko po podskórnym podaniu kwasu maleinowego, przy czym ilości wydalonego moczu i azotu α -aminowego są znacznie mniejsze w porównaniu ze szczurami karmionymi dietą mleczną. U szczurów karmionych dietą bezlaktozową, które otrzymały kwas maleinowy dootrzewnowo, drugi okres zatrucia kwasem maleinowym w ogóle nie występuje.

Mniej więcej 15 minut po podaniu kwasu maleinowego rozpoczyna się znaczna diureza, która po upływie około 2—3 godzin ulega wyraźnemu

zmniejszeniu [4]. W tym okresie szczury bez względu na stosowaną dietę i bez względu na drogę podania kwasu maleinowego wydają od 10—15 ml moczu, a więc ilości równe normalnej dobowej diurezie lub większe. Okazuje się, że w tym moczu, wydalonym w ciągu pierwszych dwóch godzin po podaniu kwasu maleinowego, szczury wydają ketokwasy oraz azot α -aminowy w ilości równej mniej więcej dobowej ilości nie zatrutych szczurów. Dodatkowo stwierdzono, że w tym czasie (2 godz. po zatruciu) występuje około dwukrotnie zwiększony poziom ketokwasów w krwi, natomiast nie stwierdzono we krwi podniesienia poziomu azotu α -aminowego i cukru.

Doświadczenia te były wprawdzie wykonane tylko na szczurach karmionych dietą mleczną, przy czym kwas maleinowy podawano im drogą podskórną, jednak wydaje się, że podobny obraz zatrucia w pierwszych dwóch godzinach po wstrzyknięciu kwasu maleinowego występuje u szczurów karmionych zarówno dietą mleczną, jak bezlaktozową, i to bez względu na drogę podania kwasu maleinowego. Dodatkowo przemawia za tym podobny we wszystkich tych przypadkach przebieg diurezy.

Po przyjęciu takiego przypuszczenia pierwszy okres zatrucia kwasem maleinowym należałoby ograniczyć do pierwszych dwóch do trzech godzin po wstrzyknięciu kwasu maleinowego, drugi okres obejmowałby dalsze około 20 godz. pierwszej doby i następne.

Wydaje się, że można zaproponować następującą próbę wytłumaczenia tych dwóch wyraźnie odgraniczonych i różniących się okresów zatrucia kwasem maleinowym.

Za punkt wyjścia przyjmujemy, że kwas maleinowy podany do otrzewnowo zostaje skierowany w znacznej części do wątroby, a tylko częściowo drogą ogólnego krążenia bezpośrednio do nerki. Natomiast po podaniu podskórnym kwas maleinowy zostaje skierowany w znacznie większej mierze bezpośrednio do nerki z ominięciem wątroby. Być może w wątrobie zachodzą reakcje detoksykacji, w wyniku których kwas maleinowy traci swój toksyczny wpływ na nerki. W ten sposób można by tłumaczyć, dlaczego u szczurów karmionych dietą bezlaktozową, po dootrzewnowym podaniu kwasu maleinowego nie dochodzi do wystąpienia drugiego okresu zatrucia. Takie byłoby znaczenie drogi podania kwasu maleinowego.

Wpływ diety można starać się objaśnić w ten sposób, że laktoza zawarta w pokarmie mlecznym znacznie obciąża wątrobę i w ten sposób wpływa na jej przemiany, że nie jest ona w stanie unieczynnić kwasu maleinowego i przepuszcza go w stanie niezmienionym do ogólnego krążenia, a tym samym do nerek. Dlatego na diecie mlecznej po dootrzewnowym podaniu kwasu maleinowego występuje jednak drugi okres zatrucia.

Za słusnością takiego tłumaczenia wpływu laktozy w diecie na obraz zatrucia kwasem maleinowym przemawia i to, że u szczurów karmionych dietą mleczną, po podskórnym podaniu kwasu maleinowego nasilenie drugiego okresu zatrucia jest jednak większe niż po podaniu dootrzewnowym.

Przedstawione doświadczenia prowadzą, w oparciu o powyższe rozumowanie, do następującego ogólnego ujęcia. Po podaniu podskórnym kwas maleinowy dostaje się, bez względu na stosowaną do karmienia zwierząt dietę, w większości bezpośrednio do nerek, powodując typowy obraz zatrucia. Natomiast po dootrzewnowym podaniu zostaje skierowany najpierw do wątroby, która go unieczynnia w przypadku szczurów karmionych dietą bezlaktozową i w ten sposób znosi jego działanie toksyczne na nerki, lub jak w przypadku szczurów karmionych dietą mleczną, nie jest w stanie unieczynnić kwasu maleinowego, który tym samym dostaje się do nerek, powodując typowy obraz zatrucia.

Podobny do laktozy wpływ wykazuje również galaktoza. U szczurów karmionych dietą galaktozową występuje pełny obraz zatrucia, z tym, że nasilenie drugiego okresu jest mniejsze w porównaniu z dietą mleczną. Wydalanie ketokwasów przez szczury karmione dietą galaktozową jest jednak odmienne. Po podskórnym podaniu kwasu maleinowego trwa zwiększone wydalanie ketokwasów przez dwie doby, natomiast po podaniu dootrzewnowym w drugiej i w trzeciej dobie występuje zmniejszenie wydalania.

Występujące w przebiegu zatrucia kwasem maleinowym takie objawy, jak polyuria i zwiększone wydalanie elektrolitów [1], cukromocz (bez zwiększonego poziomu cukru we krwi), zwiększone wydalanie azotu α -aminowego (bez zwiększenia jego poziomu we krwi), można by tłumaczyć działaniem kwasu maleinowego na nerkę i upośledzeniem jej funkcji. Natomiast zwiększone wydalanie ketokwasów, któremu towarzyszy jednoczesny wzrost poziomu ketokwasów we krwi, raczej należy tłumaczyć ogólnym, wkraczającym w przemiany działaniem kwasu maleinowego. Przypuszczalnie chodzi tu głównie o wątrobę, choć niewykluczony jest wpływ na inne narządy. Zasadniczo istnieją dwa możliwe punkty działania kwasu maleinowego: system oksydazy pyrogronowej oraz ketoglutatarowej. Zablokowanie przez kwas maleinowy tych systemów enzymatycznych prowadziłoby do nagromadzenia się we krwi wzmoczonego wydalania z moczem kwasu pyrogronowego lub α -ketoglutatarowego. Peters i Wakelin [14] stwierdzili szczególną wrażliwość na kwas maleinowy systemu oksydazy pyrogronowej. Analiza chromatograficzna krwi i moczu w dwie godziny po podaniu kwasu maleinowego wskazuje na to, że zwiększony poziom ketokwasów krwi jest spowodowany głównie zwią-

szeniem ilości kwasu pyrogronowego. Pojawia się on też w dużych ilościach w moczu [5].

Na podstawie przedstawionych wyników można podjąć badania zmierzające do ustalenia, jakie układy enzymatyczne ulegają tutaj zakłóceniu.

STRESZCZENIE

Zbadano wpływ zawartości laktozy, a także galaktozy w diecie na wydalanie azotu α -aminowego, ketokwasów, cukru i amoniaku. Stwierdzono, że w zatruciu kwasem maleinowym można wyodrębnić dwa okresy. Pierwszy, obejmujący pierwsze dwie godziny po podaniu kwasu maleinowego, cechuje się znaczną diurezą, zwiększonym wydalaniem ketokwasów, azotu α -aminowego, cukru i amoniaku. Występuje on bez względu na stosowaną dietę i bez względu na sposób podania kwasu maleinowego. Drugi okres zatrucia, trwający kilka dni, cechuje się znacznym nasileniem diurezy i aminoacydurii. Nie ma natomiast zwiększonego wydalania ketokwasów. Wystąpienie tego okresu zatrucia uzależnione jest od stosowanej diety (obecności w diecie laktozy lub galaktozy) oraz od drogi podania kwasu maleinowego. Podano próbę interpretacji wpływu diety oraz drogi podania kwasu maleinowego na obraz zatrucia.

LITERATURA

- [1] Angielski S., Niemiro R., Makarewicz W., Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* 5, 431, 1958.
- [2] Angielski S., Rogulski J., Janowicz E., Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* 6, 295, 1959.
- [3] Angielski S., Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* 6, 411, 1959.
- [4] Angielski S., Rogulski J., Madońska L. *Acta Biochim. Polon.* 7, 269, 1960.
- [5] Angielski S., Rogulski J., Mikulski P., Popinigis J. *Acta Biochim. Polon.* 7, 285, 1960.
- [6] Careddu P., Cabassa N., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 33, 444, 1957.
- [7] Connerty H. W., Briggs A. R., Eaton E. M. *Amer. J. Clin. Pathol.* 28, 634, 1957.
- [8] Craig J. M., Maddock Ch. E. A. M. A. *Arch. Pathol.* 55, 118, 1953.
- [9] Handler Ph. *J. Nutrition* 33, 221, 1947.
- [10] Human L. E., Middleton M., Geiger E. *Am. J. Physiol.* 193, 69, 1958.
- [11] Isselbacher K. *Am. J. Med.* 26, 715, 1959.
- [12] Krebs H. A., Salwin E., Johnson W. A. *Biochem. J.* 32, 113, 1938.
- [13] Niemiro R., *Acta Biochim. Polon.* 7, 95, 1960.
- [14] Peters R. A., Wakelin R. W. *Biochem. J.* 40, 513, 1946.
- [15] Rogulski J. *Acta Biochim. Polon.* 7, 239, 1960.

AMINOACIDURIA INDUCED WITH MALEIC ACID

VII. ATTEMPTS OF INTERPRETATION OF THE INFLUENCE OF DIETS AND THE MANNER OF ITS ADMINISTRATION ON THE PICTURE OF INTOXICATION

Summary

The influence of the dietary lactose and galactose content upon excretion of α -amino nitrogen, keto acids, sugar and ammonia has been examined. Two periods might be distinguished in the intoxication with maleic acid. The first lasting for two first hours after the administration of maleic acid was characterised by considerable diuresis and increase excretion of keto acids, α -amino nitrogen, sugar and ammonia. It appeared regardless the kind of applied diet nor the way of administering maleic acid. A considerable increase in diuresis and aminoaciduria was typical for the second, several days lasting period of intoxication. There was no increased excretion of keto acids at this stage. The occurrence of this period was diet dependent (presence of lactose or galactose). It depended also on the way of administration of maleic acid.

Some attempts to interpret the influence of diet and of the way of administration of maleic acid upon the picture of intoxication are presented.

Otrzymano 25.1.1960 r.

THE ANTHROPOLOGY OF THE BRITISH ISLANDS

By the Rev. Canon J. H. St. John, D.D., F.R.S., F.R.C.E., F.R.G.S., F.R.S.E., F.R.S.L., F.R.S.M., F.R.S.N., F.R.S.O., F.R.S.P., F.R.S.C., F.R.S.I., F.R.S.A., F.R.S.M., F.R.S.N., F.R.S.O., F.R.S.P., F.R.S.C., F.R.S.I., F.R.S.A.

The British Islands are a group of islands in the North Atlantic Ocean, consisting of Great Britain, Ireland, and the Hebrides, Orkney, and Shetland Islands. The population of the British Islands is approximately 60 million. The British Islands are a part of the British Isles, which also includes the Channel Islands and the Isle of Man. The British Islands are a part of the British Empire, which is the largest empire in history. The British Islands are a part of the British Commonwealth, which is a group of countries that were formerly part of the British Empire. The British Islands are a part of the British Commonwealth of Nations, which is a group of countries that are members of the Commonwealth of Nations. The British Islands are a part of the British Commonwealth of Nations, which is a group of countries that are members of the Commonwealth of Nations.

Also others to refer to the way of the British Islands to give all the details of the British Islands. The British Islands are a part of the British Isles, which also includes the Channel Islands and the Isle of Man. The British Islands are a part of the British Empire, which is the largest empire in history. The British Islands are a part of the British Commonwealth, which is a group of countries that were formerly part of the British Empire. The British Islands are a part of the British Commonwealth of Nations, which is a group of countries that are members of the Commonwealth of Nations.

Continued on page 101

CELINA JANION and D. SHUGAR

**ABSORPTION SPECTRA, STRUCTURE AND BEHAVIOUR
TOWARDS SOME ENZYMES OF DIHYDROPYRIMIDINES
AND DIHYDRO-OLIGONUCLEOTIDES**

Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, Warszawa

(Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw)

During the course of some investigations on the photochemistry of pyrimidine derivatives [31, 33, 35] and some oligonucleotides [36, 37, 38], it was found necessary to compare the ultraviolet absorption spectra of a number of photoproducts with those of reference compounds containing a 5,6 saturated linkage in the pyrimidine ring. The most suitable compounds for this purpose are obviously the dihydropyrimidines.

Of the various methods developed for the reduction of pyrimidine derivatives (see Cohn & Doherty [7] for bibliography), by far the most convenient is that of Cohn & Doherty [7] using a 5% rhodium-on-alumina catalyst, in the presence of which hydrogenation may be carried out in aqueous solution at atmospheric pressure. This procedure has been extensively applied by Green & Cohen [13, 14], but difficulties were encountered in the reduction of cytosine and its analogues as a result of overdehydrogenation and deamination. During the course of the present work it was observed that reduction of some cytosine derivatives proceeds more smoothly in anhydrous medium, while buffering to acid or slightly alkaline pH values is occasionally advantageous in aqueous medium.

It has also been found that reduction of the uracil rings in oligonucleotides of uridylic acid may be readily achieved in aqueous medium. The same apparently applies to the uracil rings in some heteropolymers of purine and uracil oligonucleotides, the purine rings being unaffected under these conditions, in agreement with Bendich's [2] observation that the biological purines are not readily reduced. The absorption spectra of such oligonucleotides are of some interest from the standpoint of the structure of oligonucleotide chains and in studies on the photochemistry of these latter [36, 38]. The reduced oligonucleotides have also been found to constitute a new series of substrates for enzymes

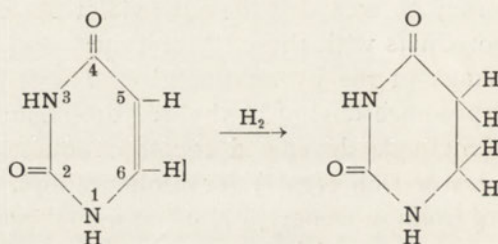
attacking nucleic acids and should therefore extend our knowledge regarding the specificity and mode of action of these enzymes.

Finally the biological importance of the dihydropyrimidines [4, 5, 10, 13, 14, 26] lends added interest to an investigation of their physico-chemical properties.

Several of the dihydroderivatives prepared during the course of this work have also been used as model substrates for an examination of the specificity of dihydropyrimidine dehydrogenase [15].

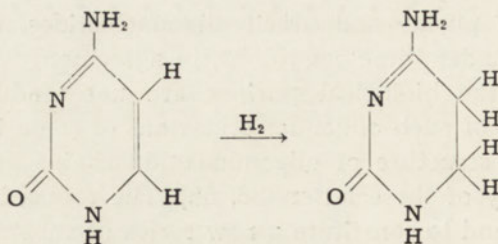
ULTRAVIOLET ABSORPTION SPECTRA OF DIHYDROPYRIMIDINES

It was shown by Batt *et al.* [1] that the dihydroderivatives of uracil, thymine and orotic acid do not exhibit a characteristic absorption maximum in the ultraviolet in neutral solution. This is in accord with the finding that uracil, thymine and orotic acid are all in the keto form in aqueous solution at neutral pH [21, 29], since the reduced pyrimidine ring then possesses no system of conjugated double bonds:



It has also been shown [1] that the dihydroderivatives of the above three compounds all exhibit a maximum in 0.1N-NaOH at 2300 Å. This was ascribed to enolization but with no indication as to which, or whether both, of the keto groups is involved. This maximum rapidly disappears following alkalization, due to opening of the pyrimidine ring with the resultant formation of ureido acid derivatives.

The foregoing findings have been widely assumed to apply also to other pyrimidine derivatives. Such a generalization is obviously unwarranted as can be seen from an examination of, e.g. cytosine and dihydrocytosine:



from which it is clear that dihydrocytosine should still exhibit selective absorption in the ultraviolet as a result of conjugation of the 2-carbonyl with the 3,4 double bond.

MATERIALS

Most of the pyrimidine derivatives were commercial products which, in some instances, were recrystallized and the purity checked by melting point, absorption spectroscopy and chromatography.

1-methyluracil was prepared according to Hilbert & Johnson [18]; 3-methyluracil was from the Levene collection of the Rockefeller Institute for Medical Research, obtained through the courtesy of Dr. A. E. Mirsky. Other methylated uracil derivatives were obtained by the action of dimethylsulphate on uracil, 5-methyluracil (thymine), 6-methyluracil and 5,6-dimethyluracil; the methylated products were repeatedly crystallized and checked for purity by chromatography and absorption spectroscopy as elsewhere described [37].

2,4-diethoxypyrimidine and 1-methyl-4-ethoxyuracil were prepared according to Hilbert & Johnson [18] and 2-hydroxy-4-ethoxyuracil [29] according to Hilbert & Jansen [19].

3-methyluridine and 3-methylthymidine were prepared by Mr. W. Szer according to the procedure of Miles [25].

Cytidine-2' : 3'-phosphate was prepared as elsewhere described [32], benzylidene cytidine according to Gulland & Smith [17] and 1-acetyl-dihydrouracil according to Spector & Keller [34].

We are indebted to Dr S. S. Cohen for samples of dihydrocytosine and dihydrodeoxycytidine and to Dr A. M. Michelson for A3'p5'U3'p (where A is adenosine, U is uridine and p is phosphate) and poly-U. The latter contains a mixture of 2', 5' and 3', 5' internucleotide linkages [see ref. 22, 23, 24].

EXPERIMENTAL

All compounds were hydrogenated with the 5% rhodium-on-alumina catalyst according to Cohn & Doherty [7] and Green & Cohen [13, 14]. In most instances the dihydroderivatives were not isolated and submitted directly to chromatography and spectral examination.

A Unicam SP500 spectrophotometer was used for most measurements. Subsequently when a similar instrument with fused quartz prism became available, a few compounds were examined at wavelengths down to 1900 Å. A Radiometer pH meter with glass electrode was used for pH control.

Detection of dihydropyrimidines on paper chromatograms was according to the procedure of Fink *et al.* [6, 9], which is based on the coloured product resulting from the reaction between ureido acid derivatives and *p*-dimethylaminobenzaldehyde. The dried chromatogram is sprayed with 0.5N-NaOH solution to open the dihydropyrimidine rings with formation of ureido acids. Following drying, the paper is again sprayed, this time with an acid alcoholic solution of 1% dimethylaminobenzaldehyde¹.

Table 1

R_F values of some pyrimidines and dihydropyrimidines and colour reaction with *p*-dimethylaminobenzaldehyde before and after treatment with alkali, 0.5 N-NaOH Ascending chromatography on Whatman No.1 paper in butanol-acetic acid-water (2:1:1) [6, 9]

Compound	R_F	Colour reaction	
		before alkali	after treatment
Dihydro-			
-uracil	0.57	none	yellow
-1-methyluracil	0.89	pink	pink
-3-methyluracil	0.88	pink	pink
-1,3-dimethyluracil	0.9	pink	pink
-1-acetyluracil	0.7	none	yellow*
-orotic acid	0.43	none	yellow
-thymine	0.68	none	yellow
-1,3-dimethylthymine	0.66	none	yellow
-6-methyluracil	0.7	none	yellow
-1,3,6-trimethyluracil	0.8	none	yellow
-uridine	0.45	none	yellow
-3-methyluridine	0.65	none	yellow
-uridylic acid	0.25	none	yellow
-thymidine	0.62	none	yellow
-3-methylthymidine	—	none	none
-thymidylic acid	0.37	none	yellow
1,3-dimethyluracil	—	none	yellow to pink**
1,3-dimethylbarbituric acid	—	orange	orange
1,3-dimethylbarbital	—	none	none

* Ring opening is probably preceded by deacetylation.

** After exposure to 1N-NaOH since rate of decomposition is very slow in 0.5 N-NaOH.

A number of dihydropyrimidine derivatives, following ring opening, give a yellow colour with the above reagent. However Fink *et al.* [6, 9] pointed out that 5-aminouracil and uramil (5-aminobarbituric acid) give

¹ Since completion of this work we have found that spraying with 1N NaOH (instead of 0.5 N NaOH) considerably enhances the sensitivity of the reaction, particularly for those dihydroderivatives which less readily undergo ring opening in alkali.

a yellow colour, and barbituric acid a pink colour, without prior ring opening. Because of this lack of absolute specificity, we have relied more on spectral observations to provide evidence of ring opening.

Table 1 presents the R_F values and colour reaction with *p*-dimethylaminobenzaldehyde of some of the compounds examined during the course of this work.

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1 exhibits the absorption spectra, at neutral pH, of uracil and dihydrouracil, as well as the spectrum of the latter in 0.1N-NaOH. In agreement with Batt *et al.* [1] the alkaline spectrum is only transitory and its rate of disappearance is a measure of the rate of decomposition in alkaline medium due to opening of the ring at the 3,4 bond; the curve shown in Fig. 1 was obtained by extrapolation to zero time.

As in the case of uracil itself [29] the change in spectrum of dihydrouracil with increasing pH is a continuous function of the latter and indicative of the existence of dissociating groups. The instability of dihydrouracil in alkaline medium renders even moderately accurate titrations rather tenuous. It was found more convenient to record the pH values at which apparent dissociation initially manifested itself and that

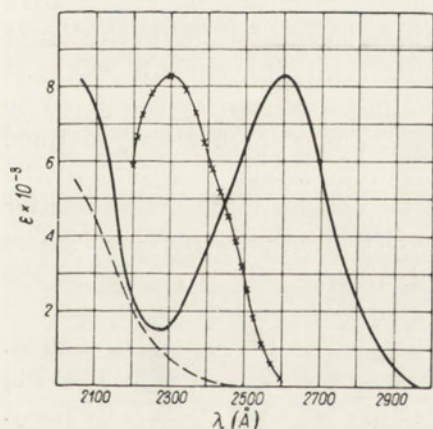


Fig. 1. Absorption spectra of uracil (—) in water (pH \sim 6); dihydrouracil (---) in water; and of dihydrouracil (- x -) in 0.1 N-NaOH, prior to alkaline decomposition

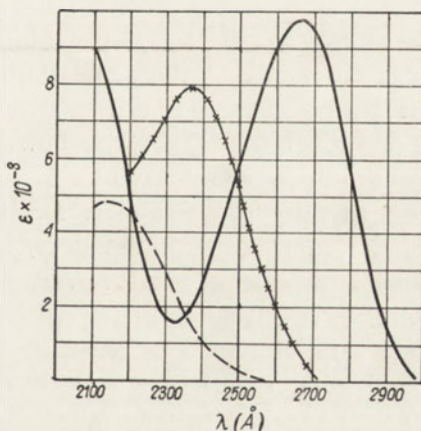
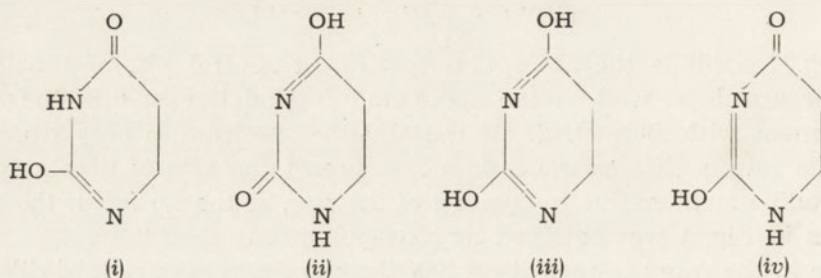


Fig. 2. Absorption spectra of 1-methyluracil in water (—); of 1-methyldihydrouracil in water (---); and of 1-methyldihydrouracil in 0.1 N-NaOH (- x -) prior to alkaline decomposition

at which it was complete. From such observations it was determined that the pK values for all derivatives involving the uracil ring are well above

pH 11. This is to be contrasted with the pK_a values for uracil and its methylated derivatives, which are in the neighbourhood of pH 9.7 [29] (also below).

While in the case of uracil indisputable evidence was presented for dissociation of both hydroxyl groups at sufficiently high pH [29], it was not possible to examine this possibility directly in the case of dihydrouracil because of the high alkaline instability (see, however, below). The theoretically possible tautomeric forms of dihydrouracil are as follows:



Of these four, (i) may be excluded since, in the absence of any system of conjugated double bonds, it would not be expected to give rise to the important selective absorption actually observed (Fig. 1) in this region of the spectrum. In attempts to determine which of the remaining three is involved, recourse was had to various methylated uracil derivatives.

The absorption spectra for 1-methyluracil and its dihydroderivative are shown in Fig. 2 and provide additional evidence for the exclusion of form (i), while at the same time excluding form (iii), since blocking of the N_1 position does not modify the alkaline spectrum as compared to uracil itself (Fig. 1). Note, however, the existence of a clearly defined maximum at about 2140 Å in neutral medium, which is absent in the case of dihydrouracil (Fig. 1). It might be expected that in the latter compound this maximum does, in fact, exist but that it is displaced to shorter wavelengths. However, an examination of dihydrouracil in the Unicam spectrophotometer with fused quartz prism indicated that, if such a maximum does exist, it must be located to the violet of 1900 Å.

The higher alkaline stability of 1-methyldihydrouracil (see Table 3) made it possible to determine its apparent pK with reasonable accuracy. This was done by rapid measurement of the absorption maximum in solutions previously adjusted to known pH values, to each of which a given quantity of the compound was added by means of micropipettes just prior to measurement. The results are shown in Fig. 3, from which it is found that pK_a is 11.9. This is to be compared with a pK_a for 1-methyluracil of 9.75 [29].

The spectral data for 3-methyluracil and its dihydroderivative (Fig. 4) for the latter of which the absorption spectrum exhibits no modification

in going from neutral to alkaline pH, suggests that enolization involves the number 3 nitrogen, but does not permit us to decide between forms (ii) and (iv). Note the inflexion in the neutral curve for the dihydroderivative at about 2125 Å, which undoubtedly bears some relation to the maximum exhibited by 1-methyldihydrouracil at neutral pH (Figs. 2 and 3), and to which we shall return later.

No additional information is furnished by the spectra of 1,3-dimethyluracil and its dihydroderivative (Fig. 5), which agree with that to be expected from those for 1-methyldihydrouracil and 3-methyldihydrouracil, including the maximum at shorter wavelengths exhibited by the former. It is relevant at this point to draw attention to the fact that the ultraviolet photolysis product of 1,3-dimethyluracil, which is known to be 1,3-dimethyl-5-hydro-6-hydroxyuracil [27, 33], and which therefore likewise possesses no system of conjugated double bonds, also exhibits such a maximum at 2180 Å. A similar situation prevails for barbituric acid, barbital and their N-methylated derivatives [12].

The dihydroderivatives of 5-methyluracil, 6-methyluracil and orotic acid exhibit only end absorption at neutral pH, similar to that for

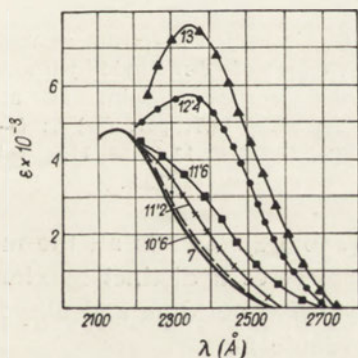


Fig. 3. Absorption spectrum of 1-methyldihydrouracil at various pH values indicated; note isosbestic point at about 2200 Å; pK \sim 11.9; pH: (—) 7; (---) 10.6; (· · ·) 11.2; (■) 11.6; (●) 12.4; (▲) 13.

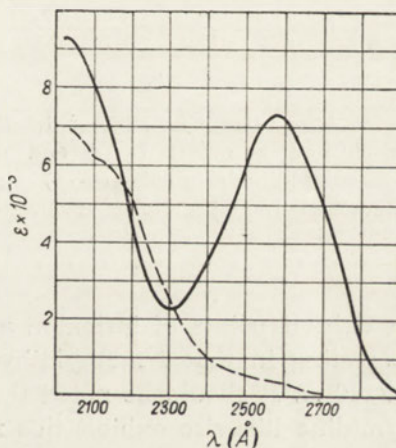


Fig. 4. Absorption spectra of 3-methyluracil in water (—) and of 3-methyldihydrouracil at neutral pH (---). The latter curve is unaltered in 0.1 N NaOH prior to alkaline decomposition

dihydrouracil. The alkaline absorption spectra are also similar to that for dihydrouracil, except for minor differences in extinction coefficients (Table 2). The relatively high alkaline stability of 6-methyluracil (Table 3), however, made possible a reasonably accurate determination of

its pK (Fig. 6), which is 11.7; as well as an examination of its spectrum in 1N-NaOH. At the latter pH the spectrum was identical with that at pH 13, thus indicating the absence of a second dissociating group and providing additional evidence for exclusion of form (iii) for dihydrouracil in alkaline medium.

It should be noted that whereas dihydrouracil and dihydrothymine exhibit only end absorption at neutral pH, their nucleosides and nucleoti-

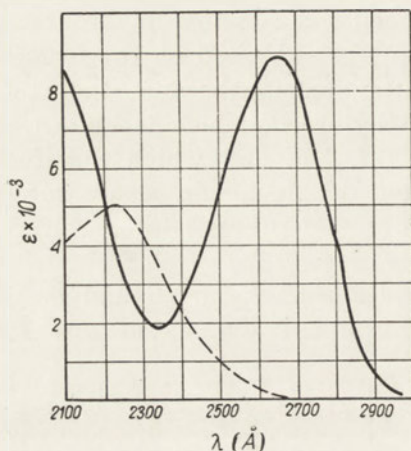


Fig. 5. Absorption spectrum of 1,3-dimethyluracil in water (—) and of 1,3-dimethyldihydrouracil in water and in 0.1 N-NaOH prior to alkaline decomposition

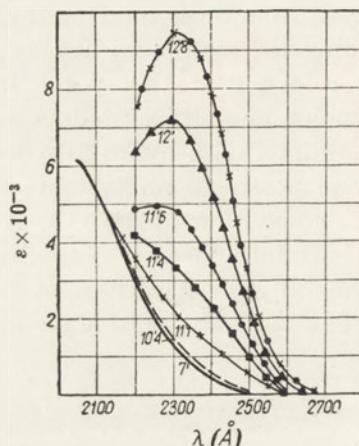


Fig. 6. Absorption spectrum at various pH values of 6-methyldihydrouracil, showing isosbestic point at about 2140 Å; pK = 11.7; pH: (—) 7; (---) 10.4; (×) 11.2; (■) 11.4; (●) 11.6; (▲) 12; (×—●) 12.8.

des exhibit points of inflexion at 2070 Å (Table 2). This is all the more interesting in that 1-methyldihydrouracil possesses a distinct maximum at 2140 Å. It should be noted that N-methyldihydrouridine and dihydrothymidine likewise exhibit this maximum (Table 2).

Rather striking are the wide variations in alkaline stability for the various derivatives examined (Table 3). Green & Cohen [13, 14] found the alkaline decomposition rates of dihydrouridine and dihydrothymidine to be the same as those for the corresponding bases and, in this respect, their results differ from ours for reasons which are not clear. From Table 3 it will be observed that nucleosides are more stable than the free bases, while still more pronounced stability is exhibited by the nucleotides.

For dihydrouracil at room temperature, the time for half-decomposition, $t_{1/2}$, is increased from 3.7 mins. in 0.1N-NaOH to 20 mins. in

0.01N-NaOH. This difference in rates is due in part to the difference in concentration of hydroxyl ions and, probably, in part to the concentration of the dissociated compound. A better estimate of the influence of hydroxyl ion concentration on decomposition rate is furnished by a comparison of the rates at pH 13 (where dissociation is almost complete) with that at 1N-NaOH. For 1-methyldihydrouracil the values of $t_{1/2}$ are 15 mins. in 0.1N-NaOH and 4 mins. in 1N-NaOH.

Since the decomposition rates at a given hydroxyl ion concentration correspond to a first-order reaction [cf. ref. 13, 14], while the rate constants at different temperatures were found to fit reasonably well to an Arrhenius plot, the activation energies for decomposition may be calculated. For 1-methyldihydrouracil in 0.1N-NaOH over the temperature range 22°–52° the activation energy for decomposition was found to be 7.5 kcal./mole, a rather low value.

Table 2
Spectral data for some dihydropyrimidines

	in H ₂ O (pH~6)		in 0.1N - NaOH*	
	λ_{\max} (Å)	$\epsilon_{\max} \times 10^3$	λ_{\max} (Å)	$\epsilon_{\max} \times 10^3$
Dihydro-				
-uracil	—	—	2300	8.3
-1-methyluracil	2140	4.8	2350	7.8
-3-methyluracil	2120**	6.1	2120	6.1
-1,3-dimethyluracil	2220	5.0	2220	5.0
-thymine	—	—	2300	7.9
-1,3,5-trimethyluracil	2220	4.8	2220	4.8
-6-methyluracil	—	—	2300	9.5
-1,3,6-trimethyluracil	2220	6.3	2220	6.3
-orotic acid	—	—	2300	8.7
-uridine	2070**	6.9	2350	10.1
-3-methyluridine	2170	6.2	2170	6.2
-uridylic	2070**	5.9	2350	10.1
-thymidine	2070**	6.2	2350	9.7
-3-methylthymidine	2160	6.7	2160	6.7
-thymidylic acid	2070**	6.0	2350	9.7
-1-acetyluracil	2140	15.0	2350	19.7

* Prior to decomposition (see Table 3).

** Point of inflexion.

In a recent publication dealing with acetylated uracil derivatives, Spector & Keller [34] present reasonable evidence for acetylation on the N₁ position of uracil, but do not regard their assignment as conclusive. We have confirmed their data for 1-acetyldihydrouracil in neutral medium (Table 2). Furthermore, a comparison of the spectrum of 1-acetyldihydro-

Table 3

Time for half-decomposition of dihydropyrimidines in 0.1 N-NaOH at 22°; and temperature necessary for ring closure in 0.1 N-HCl

	$t_{1/2}$ (mins.)	Temp. for ring closure in 0.1N-HCl
Dihydro-uracil	3.7 (2.5*, 5**)	heating required***
-1-methyluracil	15.0	room temp.
-3-methyluracil	very rapid	room temp.
-1,3-dimethyluracil	2.1	room temp.
-5-methyluracil (thymine)	6.2 (7*, 10**)	heating required
-1,3,5-trimethyluracil	11.0	room temp.
-6-methyluracil	14.5	heating required
-1,3,6-trimethyluracil	> 1 hour	room temp.
-orotic acid	10.3 (11**)	heating required
-uridine	4.8 (2.5*)	heating required****
-3-methyluridine	< 1 min.	room temp.
-uridylic acid	6.5	heating required
-thymidine	8.4 (7*)	heating required
-3-methylthymidine	< 1 min.	room temp.
-thymidylic acid	19.0	—
-1-acetyluracil	5.0	—

* Values reported by Green & Cohen [13] at 27°—29°.

** Values reported by Batt *et al.* [1] at 18°.

*** No attempt was made to determine exact temperature required.

**** For nucleosides and nucleotides there is, of course, partial cleavage of the glycosidic linkage on heating in acid medium.

uracil in neutral and alkaline media with the foregoing results for methylated dihydrouracil derivatives provides additional evidence that the acetyl group is on the number 1 nitrogen, and not on the number 2 oxygen. Such an assignment is also supported by the results for reduction of ethoxyuracils (see below). It should be noted that the alkaline lability of 1-acetyldihydrouracil is greater than that of 1-methyldihydrouracil (Table 3), due in large part to deacetylation in alkaline medium with resultant formation of dihydrouracil which, in turn, is more labile than 1-methyldihydrouracil.

ETHOXYPYRIMIDINES

It was hoped that an examination of the reduction products of 1-methyl-4-ethoxypyrimidine, 2-ethoxy-4-hydroxypyrimidine and 2,4-diethoxypyrimidine would assist in the assignment of the carbonyl group involved in the alkaline dissociation of the dihydrouracil derivatives.

While 1-methyl-4-ethoxypyrimidine readily underwent reduction, the other two compounds proved to be much more resistant and, even after 6 hours, only 30% had undergone hydrogenation. Furthermore all three

compounds proved to be unstable after reduction, even at neutral pH, as shown by modifications in absorption spectra and by the reaction with *p*-dimethylaminobenzaldehyde.

Since all three compounds are in the enol form in the 4 position, their instability following saturation of the 5,6 double bond might be regarded as indirect evidence that ring opening of dihydrouracil derivatives is preceded by dissociation of the 4 carbonyl. That this is, however, not a necessary condition is shown by the fact that 3-methyldihydrouracil also undergoes ring opening in alkaline medium.

The following table gives the R_F values (in methanol-acetic acid-water, 2 : 1 : 1) and colour reactions with *p*-dimethylaminobenzaldehyde following hydrogenation:

Compound	R_F		Colour reaction after reduction
	before hydrogenation	after hydrogenation	
1-methyl-4-ethoxypyrimidine	1.0	1.0	red
2,4-diethoxypyrimidine	0.87	0.65 1.0	yellow red
2-hydroxy-4-ethoxypyrimidine	0.85	0.85	red

It will be seen that 2,4-diethoxypyrimidine gives two products of decomposition.

ALKALINE LABILITY OF SOME DIMETHYLPYRIMIDINES

The behaviour towards alkali of some dimethylpyrimidines is of unquestionable interest in relation to the above observations on dihydropyrimidines. It has been previously reported that 1,3-dimethyluracil, but not 1-methyluracil or 3-methyluracil, is unstable in alkali, the rate of decomposition in 1*N*-NaOH being appreciable and accompanied by the formation of several products [29]. A similar situation prevails for dimethylbarbital and dimethylthiouracil, but not for their monomethylated derivatives [12, 30]².

We have now found that 1,3-dimethyluracil, following treatment with alkali at room temperature, reacts with *p*-dimethylaminobenzaldehyde to give a yellow colour, suggesting that at least one of the products of decomposition may result from ring opening at the 3,4 bond.

² 1,3,7-trimethylxanthine (caffeine) exhibits similar instability in alkali. (D. Shugar, unpublished). Because of the ease with which decomposition may be followed spectrally, this should prove useful in pharmaceutical analyses for caffeine in the presence of other methylated xanthines [28].

It is consequently of interest that 1,3,5-trimethyluracil, 1,3,6-trimethyluracil and 1,3,5,6-tetramethyluracil are all resistant to alkali. Furthermore, while 3-methyluridine is as alkali-labile as 1,3-dimethyluracil, 3-methylthymidine is as stable as 1,3,5-trimethyluracil.

DIHYDROCYTOSINE DERIVATIVES

Hydrogenation of cytosine derivatives poses considerable difficulties, not only because of deamination and overhydrogenation [14] but also because of the inherent lability of the resulting compounds. We were, in fact, unable to hydrogenate the cytosine derivatives prepared by Green & Cohen [14] under the conditions described by them. It was found necessary to vary the conditions of hydrogenation for each derivative, e.g. cytosine could not be hydrogenated in simple, aqueous solution, but the reaction proceeded quite smoothly either in methanol or in aqueous medium buffered at pH 4.5 (acetate); in phosphate buffer at pH 7.2–8.2, hydrogenation proceeded readily but was accompanied by rapid decomposition. On the other hand, two compounds which could be hydrogenated in unbuffered medium were cytidine-2':3'-phosphate and benzylidene cytidine.

As pointed out in the Introduction, cytosine derivatives would be expected to exhibit an absorption band in the ultraviolet resulting from conjugation of the 2-carbonyl with the 3,4 double bond. Such, indeed, proved to be the case in neutral medium as may be seen from Fig. 7a, which exhibits the spectra of cytidine-2':3'-phosphate and dihydrocytidine-2':3'-phosphate. Cytidine-2':3'-phosphate has been selected for purposes of illustration here because, in addition to the principal maximum at 2700 Å exhibited by cytosine nucleosides, it possesses a distinct, subsidiary maximum at 2340 Å [32] not normally present in other cytosine nucleosides with the exception of the pyranosylcytosines [11]. This second maximum undoubtedly bears some relation to that at 2400 Å exhibited by the dihydroderivatives, and is most likely a reflection of some type of interaction between the aromatic and carbohydrate rings in cytosine nucleosides [11].

The principal maximum of dihydrocytidine-2':3'-phosphate is shown by all hydrogenated cytosine analogues in neutral medium (see, e.g. Fig. 7b) and, in conjunction with the disappearance of the principal maximum at 2700 Å, provides a convenient tool for following the course of hydrogenation of cytosine derivatives, as well as for their identification in conjunction with the behaviour of the spectra in acid and alkaline media (see below and Fig. 7b).

It is pertinent to note that the spectral modifications resulting from

the hydrogenation of cytosine derivatives are completely analogous to those occurring during the ultraviolet irradiation of nucleosides and nucleotides of cytosine unsubstituted in the 5-position of the pyrimidine ring [31, 33, 35]. These photoproducts have been postulated as being the 5-hydro-6-hydroxy derivatives, but proof of this by direct chemical analysis is lacking because of their instability (they revert readily to the parent compound in the dark). The absorption spectra of dihydrocytosines, however, provide additional evidence for the above suggestion as to the nature of the photoproduct [35]; at the same time they indicate that

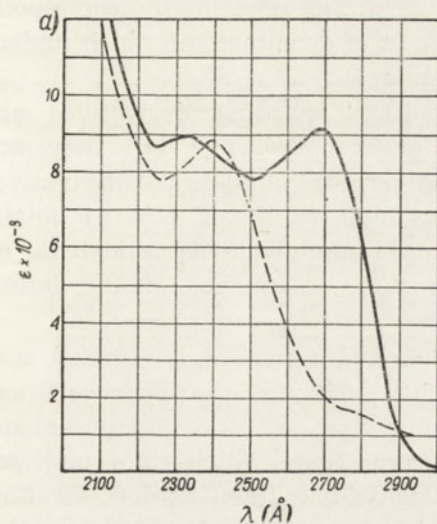


Fig. 7a. Absorption spectra of cytidine-2':3'-phosphate (—) and dihydrocytidine-2':3'-phosphate (---) at neutral pH

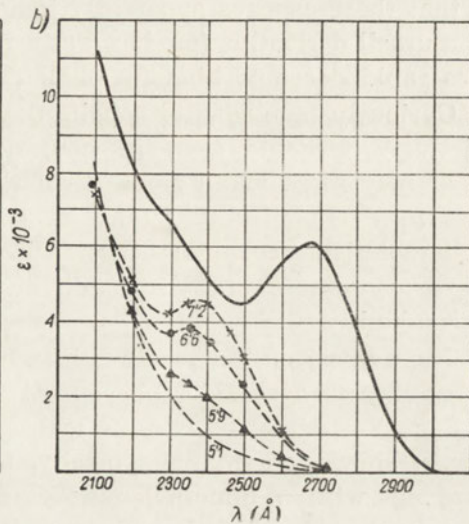


Fig. 7b. Absorption spectrum of cytosine at neutral pH (—) and of dihydrocytosine at various pH values indicated, with isosbestic point at about 2125 Å, and $pK \sim 6.3$; (---) 5.1; (\blacktriangle) 5.9; (\bullet) 6.6; (\times) 7.2,

the photoproducts of cytosine and 1-methylcytosine are not the 5-hydro-6-hydroxy derivatives, although kinetic measurements in light and heavy water suggest a similar reaction mechanism [see refs, 31, 33, 35]³.

Fig. 7b shows the absorption spectrum, at neutral pH, of cytosine before and after hydrogenation in 0.1M-acetate buffer pH 4.5, or in

³ Note added in proof: We have now found that the apparent failure of the photoproducts of cytosine and 1-methyl cytosine to exhibit a maximum at about 2400 Å is due to their extreme instability so that they revert spontaneously to the parent compounds, even during irradiation. A similar behaviour is exhibited by some other cytosine derivatives, e.g. deoxycytidine-3', 5'-diphosphate. These results will be presented in a forthcoming publication (K. L. Wierzchowski & D. Shugar, in preparation).

methanol, as well as of dihydrocytosine at various acid pH values. The spectral variations in acid medium are common also to nucleosides and nucleotides, in which the number 1 nitrogen is blocked, and are completely reversible during the time required to carry out the measurements. They probably correspond, therefore, to dissociation of the amino group with pK values in the neighbourhood of 6 as compared to about 4.4 in the parent compounds [11]. At pH values above 9.5 the extinction of the dihydro band at about 2400 Å may exhibit a further increase, but this latter is not reversible and also decreases with time of exposure to alkali, so that these changes apparently indicate the presence of the corresponding uracil derivative (produced as a result of deamination) which undergoes rapid decomposition in alkali (Table 3).

Curiously enough, although the dihydrocytosine derivatives are relatively unstable even in neutral medium [cf. ref. 14], they are apparently more alkali stable than the corresponding uracil derivative. This may explain the failure of Grossman & Visser [16] to obtain a characteristic colour reaction with *p*-dimethylaminobenzaldehyde of dihydrocytidine-5'-phosphate "directly after treatment" of the latter with alkali.

The nature of the medium in which hydrogenation is effected also determines to a considerable extent the purity of the hydrogenation product. For example, cytosine hydrogenated at pH 7.2 or 8.2 (phosphate buffer) shows, chromatographically, several spots which stain pink on spraying with *p*-dimethylaminobenzaldehyde (without prior alkaline treatment) and with R_F values superior to that for cytosine in the butanol-acetic acid-water solvent system. Preparations of dihydrocytosine kept for some time, even in the dry state, show these spots with greater intensity, plus spots due to dihydrouracil and the product of ring opening of the latter, ureidopropionic acid. This latter must have resulted from opening of the dihydrocytosine ring, followed by deamination, since dihydrouracil itself is quite stable under these conditions.

HYDROGENATION OF OLIGONUCLEOTIDES

Attempts to hydrogenate uracil and cytosine rings in natural polynucleotide chains such as RNA, DNA and APA, (apurinic acid), under the same conditions as those used for the individual pyrimidine derivatives, were only partially successful in the case of APA, as estimated by modifications in absorption spectrum. Reduction or deamination of APA facilitated hydrogenation but, even under these conditions, only to a maximum of about 15-20%. In view of the results obtained with synthetic oligonucleotides (see below), it is conceivable that these results

could be considerably improved upon by varying the conditions of hydrogenation.

Synthetic oligonucleotides of uridylic acid readily underwent complete reduction in aqueous solution, irrespective of chain length; and the absorption spectrum of poly-U·H₂ differs only slightly from that for free uridylic acid in both neutral and alkaline medium (see Fig. 8). In alkaline medium the uracil rings are opened as for free uridylic acid, and the half-time for completion of this reaction in 0.1 N-NaOH at room temperature was 11.5 mins. as compared to 5.2 mins. for uridylic acid (Table 3).

Moreover, although poly-U exhibits only slight metachromasia against basic dyes, it was observed that freshly prepared poly-U·H₂ still exhibits an appreciable percentage of this metachromasia. Biosynthetic poly-U, in which all the internucleotide linkages are 3',5', would be a more suitable material for quantitative measurements; but it would appear from the

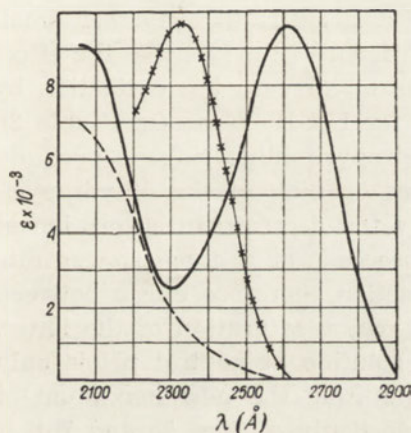


Fig. 8. Absorption spectrum of poly-U at neutral pH (—) and of poly-dihydrouridylic and neutral pH (---) and in 0.1 N-NaOH prior to alkaline decomposition (-·-·)

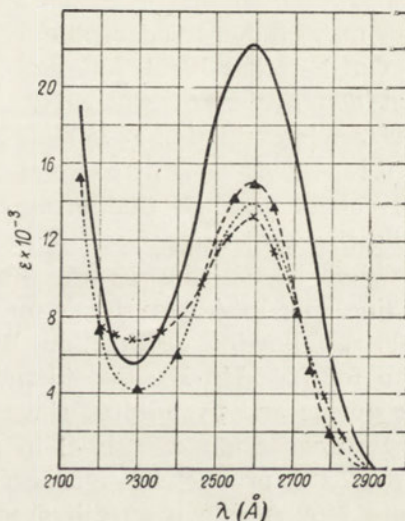


Fig. 9. Absorption spectra of: (a) (—) ApUp at neutral pH; (b) (\blacktriangle), Ap + Up·H₂ in equimolar concentrations at neutral pH; (c) (...), ApUp·H₂ at neutral pH; (d) (-·-·), ApUp·H₂ in 0.1 N-NaOH

above finding that the loss of aromaticity of the uracil rings does not lead to the formation of a completely random chain for poly-U·H₂ and that there is still restricted rotation about the internucleotide linkages [cf. ref. 23]. This is supported also by the behaviour of poly-U·H₂ towards ribonuclease (see below and addendum on p. 329.)

Hydrogenation of the uracil ring in ApUp proceeds at about one-half the rate at which Up alone takes up hydrogen, but the reaction may be readily carried to completion and is easily followed by the decrease in extinction at 2600 Å. In a solvent system consisting of ethanol-1 M-ammonium acetate (5:2, v/v) the R_F values for ApUp and ApUp·H₂ are the same 0.08. The hydrogenated dinucleotide may be observed either under the ultraviolet lamp or by spraying with alkali and then with *p*-dimethylaminobenzaldehyde.

The absorption spectrum of ApUp at neutral pH is shown in Fig. 9; its extinction coefficient is 11% lower than that of the sum of its constituent mononucleotides at neutral pH [38]. In the same figure is also shown the absorption spectrum of an equimolar mixture of Ap and Up·H₂, which should coincide with that for hydrogenated ApUp (or ApUp·H₂) if we assume that the latter compound exhibits no hypochromicity. Actually the extinction coefficient of ApUp·H₂ at 2600 Å is about 7% lower than that expected on the basis of the foregoing assumption. This may be due to adsorption of some of the compound on the catalyst⁴.

On the other hand, referring once more to Fig. 9, it will be observed that alkalization of ApUp·H₂ to 0.1 N-NaOH leads to a further small decrease in extinction at 2600 Å. More significant is the fact that the effect of 0.1 N-NaOH on ApUp·H₂ at 2300 Å is to increase the extinction by only about one-half that to be expected for Up·H₂ alone (see Table 2), indicating that the dissociation of the hydroypyrimidine rings is partially inhibited in the dinucleotide. Furthermore opening of the dihydroypyrimidine ring in ApUp·H₂, as measured by the decrease in absorption at 2300 Å following alkalization, likewise proceeds at a much slower rate than for free Up·H₂. Considerable interaction therefore exists between the purine and pyrimidine rings even following saturation of the latter.

Hydrogenation of poly-C in aqueous solution at neutral pH is only partial, the product of hydrogenation exhibiting the new maximum at about 2400 Å shown by dihydrocytosine derivatives (Figs. 7a and 7b). It is our belief, however, that this reaction could be carried to completion under suitable conditions, perhaps in some anhydrous medium.

ACTION OF ENZYMES ON SOME DIHYDRODERIVATIVES

The dihydroderivative of cytidine-2':3'-phosphate (0.25 mg.), when incubated with 20 µg. ribonuclease in 0.05 M-tris buffer pH 7.4 overnight at 37°, was found to be completely hydrolyzed to dihydrocytidylic acid

⁴ If ApUp is submitted to ultraviolet irradiation until all the Up has been transformed to 5-hydro-6-hydroxyuridylic acid, then the absorption spectrum of the photoproduct, ApUp·H₂O, coincides exactly with the absorption spectrum of the sum of Ap and Up·H₂O [38].

(presumably the 3' isomer) as estimated by paper chromatography in isopropanol-water-ammonia (23 : 6 : 4). The substrate itself undergoes decomposition during the period of incubation, so that the reaction mixture must be compared with a control free of enzyme⁵.

Dihydro-poly-U (0.2 mg.) treated with 20 µg. ribonuclease in 0.12 ml. phosphate buffer pH 7.4 overnight at 37° underwent partial hydrolysis with the formation of smaller oligonucleotides and dihydrouridylic acid (presumably the 3' isomer). Incomplete hydrolysis is clearly due to the fact that the polymer contained a mixture of 2', 5' and 3', 5' internucleotide linkages, the former of which would not be expected to be attacked by ribonuclease.

However, when 0.2 mg. dihydro-poly-U was submitted to the action of 40 µg. snake venom (*Crotalus adamanteus*) in 0.1 ml. buffer pH 9.4 with Mg ions overnight at 37°, hydrolysis to dihydrouridine was complete as estimated by paper chromatography in butanol-acetic acid-water. It therefore follows that dihydrouridine-5'-phosphate is also susceptible to the 5'-nucleotidase contained in the snake venom. It should be recalled that dihydrocytidine-5'-phosphate, isolated from rat liver slices, is dephosphorylated by snake venom [16].

It consequently follows that reduction of the pyrimidine ring does not qualitatively affect the susceptibility of nucleotide analogues to enzymes attacking nucleic acids and their derivatives, at least at the phosphate linkages. On the other hand, although dihydrouridine-5'-phosphate is susceptible to 5'-nucleotidase, it is completely resistant following opening of the pyrimidine ring [26]. It should be recalled that susceptibility to ribonuclease is exhibited by "pseudouridine"-2' : 3'-phosphate [8] as well as poly-"pseudouridylic" acid [23, 24]. The situation is, however, apparently different when an enzyme must act directly on the pyrimidine ring, since deoxycytidine deaminase is inactive against dihydrocytosine derivatives [14] and dihydropyrimidine derivatives are totally insensitive to enzymes catalyzing nucleoside cleavage and pyrimidine exchange [13]. Finally, it should be recalled that ribonuclease is active against polyribosephosphate [39].

SPECIFICITY OF DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE

The activity of this enzyme was tested against several of the dihydropyrimidine derivatives prepared during the course of this study. The enzyme was isolated from beef liver according to Grisolia & Cardoso

⁵ Actually extensive deamination of substrate occurs during this period. With the alkaline solvent used, however, the R_F values of cytosine and uracil nucleoside phosphates are identical, so that one may conclude that the enzyme attacks both uracil and cytosine dihydronucleoside cyclic phosphates.

[15], but purification was not carried beyond the second precipitation with ammonium sulphate. The reaction system was also that described by the foregoing authors and, in agreement with them, it was found that dihydrothymine was twice as susceptible as dihydrouracil.

The following four compounds were tested in this system and found to exhibit no sensitivity: 6-methyldihydrouracil, 1,3-dimethyldihydrouracil, dihydroorotic acid, dihydrothymidine. Another compound found to be inactive was 1,3-dimethyl-5-hydro-6-hydroxyuracil [33].

CONCLUDING REMARKS

It remains to discuss the source of the absorption maximum in neutral medium of 1-methyldihydrouracil at 2140 Å, which is all the more puzzling in that this maximum also exists, but with a shift to 2220 Å, in 1,3-dimethyldihydrouracil where there are apparently no doubts as to the existence of the diketo form as well as the absence of any system of conjugated double bonds. An exactly analogous situation prevails for the keto forms of free and N-alkylated barbituric acids and barbital. If there were any suspicion that this might be due to the mobility of one of the number 5 or 6 hydrogens in the ring, such as has been demonstrated for some monohydroxydihydropyrimidines by Khromov-Borisov & Savchenko [20], this is at once dispelled by the fact that a similar maximum (with an extinction coefficient of $6.3 \cdot 10^3$ at 2280 Å) is exhibited by dimethylbarbital.

It is of interest that this maximum is more or less suppressed in dihydrouracil and dihydrothymine nucleosides and nucleotides, as compared to 1-methyldihydrouracil, although it appears once more on N-methylation of the former (see Table 2). It might, at first sight, appear most reasonable to ascribe it to simple carbonyl absorption. However, the major carbonyl absorption bands are normally located at shorter wavelengths and with extinction coefficients not usually exceeding about 1000 [3]. If, therefore, carbonyl absorption is involved, then the shift from shorter wavelengths and the increase in extinction coefficients must be due to some activating effect of N-methylation [cf. ref. 20].

Infra-red observations might help in resolving this problem, but existing data are insufficient for this purpose. Batt *et al.* [1] observed a band in the infra-red spectrum of dihydrouracil at 3090 cm.^{-1} due to enolic OH, but measurements were made on Nujol mulls and the authors themselves question the validity of this observation which could be due to scattering or to the crystal structure of the suspended particles in the mull. More pertinent are the observations of Spector & Keller [34] on chloroform solutions; whereas 1-methyluracil, 1-acetyluracil and 1-ace-

tylthymine all exhibit two carbonyl frequencies in the 1700 cm^{-1} region, the corresponding dihydroderivatives exhibit only one such frequency. It would undoubtedly be worth while repeating these observations and extending them to the model compounds embraced in the present study. In particular, such measurements would be most desirable in aqueous solution, using light and heavy water, if the solubilities of these compounds so permit.

SUMMARY

1. An examination has been made of the ultraviolet absorption spectra of various dihydropyrimidines, including nucleosides and nucleotides.

2. Keto forms predominate in neutral solution. The alkaline absorption spectrum of dihydrouracil derivatives is due to dissociation involving the number 3 nitrogen and probably the number 4 carbonyl. Dihydrocytosine derivatives exhibit a characteristic maximum at about 2400 \AA at neutral pH due to conjugation of the 2-carbonyl with the 3,4 double bond.

3. The absorption spectra in neutral medium of 1-methyldihydrouracil and 1,3-dimethyldihydrouracil exhibit maxima at 2140 \AA and 2220 \AA , respectively, similar to those shown by the keto forms of barbituric acids and barbital. The possible sources of these maxima are discussed.

4. The spectral data for dihydrocytosine derivatives are of assistance in establishing the structure of the photoproducts resulting from ultraviolet irradiation of cytosine derivatives.

5. Spectral methods have been used for measurement of dihydropyrimidine dissociation constants, alkaline labilities, etc. The alkali lability of some dimethyl pyrimidines has also been examined.

6. The uracil and cytosine rings in oligonucleotides may be hydrogenated and some results are presented for poly-U, ApUp and poly-C. Attempts with natural nucleic acids were less successful.

7. Dihydroneucleotides and dihydrooligonucleotides exhibit qualitatively the same specificity towards ribonuclease, snake venom phosphodiesterase and 5'-nucleotides as the parent compounds.

REFERENCES

- [1] Batt, R. D., Martin J. K., Ploeser J. M. & Murray J. J. *Am. Chem. Soc.* **76**, 3663, 1954.
- [2] Bendich A. in *The Chemistry and Biology of Purines*, Ciba Foundation Symp., Churchill Ltd., London, 1957.
- [3] Braude E. A. in *Determination of Organic Structures by Physical Methods* (E. A. Braude & F. C. Nachod, eds.), Chapt. 4, Academic Press, New York, 1955.
- [4] Campbell L. L. *J. Bacteriol.* **73**, 220, 225, 1957.

- [5] Canellakis E. S., Jaffe J. J., Mantsavino R. & Krachow J. S. *J. Biol. Chem.* **234**, 2096, 1959.
- [6] Cline R. E. & Fink R. M. *Anal. Chem.* **28**, 47, 1956.
- [7] Cohn W. E. & Doherty D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2863, 1956.
- [8] Davis F. F. & Allen F. W. *J. Biol. Chem.* **227**, 907, 1957.
- [9] Fink R. M., Cline R. E., McGaughey C. & Fink K. *Anal. Chem.* **28**, 4, 1956.
- [10] Fink R. M., McGaughey C., Cline R. E. & Fink K. *J. Biol. Chem.* **218**, 1, 1956.
- [11] Fox J. J. & Shugar D. *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 369, 1952.
- [12] Fox J. J. & Shugar D. *Bull. Soc. Chim. Belge* **61**, 293, 1952.
- [13] Green M. & Cohen S. S. *J. Biol. Chem.* **225**, 397, 1957.
- [14] Green M. & Cohen S. S. *J. Biol. Chem.* **228**, 601, 1957.
- [15] Grisolia S. & Cardoso S. S. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 430, 1957.
- [16] Grossman L. & Visser D. W. *J. Biol. Chem.* **216**, 775, 1955.
- [17] Gulland J. M. & Smith H. *J. Chem. Soc.*, 1527, 1948.
- [18] Hilbert G. E. & Johnson T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 1152, 2001, 1930.
- [19] Hilbert G. E. & Jansen E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 552, 1935.
- [20] Khromov-Borisov N. V. & Savchenko A. M. *Zhur. Obschei Khim.* **22**, 1680, 1952.
- [21] Marshall J. R. & Walker J. J. *J. Chem. Soc.* 1004, 1951.
- [22] Michelson A. M. *J. Chem. Soc.* 1371, 1959.
- [23] Michelson A. M. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 335, 1959.
- [24] Michelson A. M. *J. Chem. Soc.* 3655, 1959.
- [25] Miles H. T. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2565, 1957.
- [26] Mokrasch L. C. & Grisolia S. *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 165, 1959.
- [27] Moore A. M. & Thomson C. H. *Science* **122**, 594, 1955.
- [28] Shugar D. unpublished, 1956.
- [29] Shugar D. & Fox J. J. *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 199, 1952.
- [30] Shugar D. & Fox J. J. *Bull. Soc. Chim. Belge* **61**, 293, 192.
- [31] Shugar D. & Wierzchowski K. L. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 657, 1957.
- [32] Shugar D. & Wierzchowski K. L. *Bull. Acad. Polon. Sci., CL II*, **6**, 283, 1958.
- [33] Shugar D. & Wierzchowski K. L. *Postępy Biochemii* **4**, suppl., 243, 1958.
- [34] Spector L. B. & Keller E. B. *J. Biol. Chem.* **232**, 185, 1958.
- [35] Wierzchowski K. L. & Shugar D. *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 355, 1957.
- [36] Wierzchowski K. L. & Shugar D. *Acta Biochim. Polon.* **6**, 313, 1959.
- [37] Wierzchowski K. L. & Shugar D. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 63, 1960.
- [38] Wierzchowski K. L. & Shugar D. *Acta Biochim. Polon.* **7**, 377, 1960.
- [39] Zamenhof S., Leidy G., Fitzgerald P. Z., Alexander W. E. & Chargaff E. *J. Biol. Chem.* **203**, 695, 1953.

WIDMA ABSORPCYJNE, BUDOWA I ZACHOWANIE SIĘ WOBEC PEWNYCH ENZYMÓW DWUHYDROPIRYMIDYN I DWUHYDROOLIGONUKLEOTYDÓW

Streszczenie

1. Przebadano widma absorpcyjne w świetle ultrafioletowym dla różnych dwuhydropirymidyn, nukleozydów i nukleotydów.

2. W roztworach obojętnych związki te występują przeważnie w formie ketonowej. Alkaliczne widmo absorpcyjne pochodnych dwuhydrouracylu jest wynikiem dysocjacji między azotem nr 3 i prawdopodobnie

grupą karbonylową nr 4. Pochodne dwuhydrocytozyny posiadają w obojętnym pH, charakterystyczne maksimum około 2400 Å spowodowane sprzężeniem grupy karbonylowej nr 2 z podwójnym wiązaniem występującym między N₃ i C₄.

3. Widma absorpcyjne w środowisku obojętnym wykazują maksimum przy 2140 Å dla 1-metyldwuhydrouracylu, a przy 2220 Å dla 1,3-dwumetyldwuhydrouracylu, podobnie do widm form ketonowych kwasu barbiturowego i barbitali. Możliwe źródła tych maksimów omówiono w dyskusji.

4. Widma pochodnych dwuhydrocytozyny są pomocne w ustalaniu budowy fotoproduktów powstałych przez naświetlenie pochodnych cytozyny w świetle ultrafioletowym.

5. Metody widmowe zostały użyte dla oznaczenia stałej dysocjacji, labilności alkalicznej, itp. u dwuhydropirymidyn. Przebadano także labilność alkaliczną niektórych pirymidyn.

6. Pierścienie: uracylowy i cytozynowy mogą być wodorowane w łańcuchach oligonukleotydowych, przedstawiono niektóre wyniki dla poly-U, ApUp i poly-C. Wyniki wodorowania naturalnych kwasów nukleinowych były mniej zadowalające.

7. Dwuhydnukleotydy i dwuhydrooligonukleotydy wykazują jakościowo tę samą specyficzność dla rybonukleazy, fosfodiesterazy jadu węży i 5-nukleotydu jak macierzyste związki.

Otrzymano 5.2.1960 r.

Addendum: Since completion of the above we have been able to prepare high molecular weight poly-U by enzymatic procedures. Such samples of poly-U were found to be resistant to hydrogenation under the conditions used in the above investigation.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.

CECYLIA LUTWAK-MANN

**O NATURZE I SKŁADZIE CHEMICZNYM PŁYNU
W BLASTOCYSTACH KRÓLIKA**

*Pracownia Fizjologii i Biochemii Reprodukcyjnej, Molteno Institute,
Uniwersytet w Cambridge, Wielka Brytania*

Niewiele istnieje badań nad chemią wczesnych płynów płodowych u ssaków. Składa się na to kilka przyczyn. Przede wszystkim, jest to materiał biologiczny ilościowo ograniczony, poza tym, przeważnie trudno dostępny dla większości biochemików. Drobne rozmiary wczesnych materiałów embrionalnych powodują, że do zapewnienia ciągłości badań pracownik powinien by dysponować hodowlą złożoną co najmniej z kilkuset zwierząt doświadczalnych. Na ogół też, zainteresowanie wczesnymi stadiami ciąży jest względnie słabe w przeciwieństwie do ciąży zaawansowanej, nad której chemią pracowano wydatnie od kilkudziesięciu lat.

W ostatnich czasach wprowadzenie szeregu czułych metod mikroanalizy (mikrobiologiczne testy, izotopy, immunochemia, histochemia, itp.) ułatwiło podjęcie badań nad najwcześniejszym płynem płodowym ssaków, tj. płynem, który wypełnia jamę blastocelomu [9, 11—15, 17, 21, 22]. Badania nad chemią blastocyst tu zacytowane są prawie całkowicie oparte na materiale embrionalnym królika. Wybór tego kosztownego zwierzęcia do celów doświadczalnych był spowodowany następującymi względami. W odróżnieniu od innych zwierząt laboratoryjnych, blastocysty królika są stosunkowo wielkie, bo już 6 dnia ciąży osiągają średnicę 3 - 4 mm; ponieważ więc są widoczne gołym okiem, można je z łatwością zebrać wprost z powierzchni śluzówki macicznej, bez przemywania macicy, co by, oczywiście, uniemożliwiło wykonanie niektórych typów analiz chemicznych. Następnie, przeciętnie znajduje się 10 blastocyst u jednego zwierzęcia, a liczbę tę można podwoić lub potroić przez superowulację. Poza tym, ponieważ królik owuluje z dużą regularnością w 10 - 12 godzin po kopulacji, wiek młodych embrionów daje się dokładnie określić, co jest istotne dla celów doświadczalnych.

Podstawowe wiadomości z zakresu wczesnych stadiów rozwoju płodowego królika (i innych ssaków) najlepiej zaczerpnąć z dzieła zbiorowego „Physiology of Reproduction“ Marshall'a [24]. Szereg pożytecznych danych morfotycznych jest podany w pracy Adams'a [1]. Poniżej, zebrano tylko parę danych ogólnych, które dotyczą pewnych punktów istotnych dla zrozumienia doświadczeń chemicznych nad blastocystami. W większości prac nad fizjologią i biochemią płodu, dzień kopulacji królików nazywany jest dniem „zerowym“ ciąży. Przez pierwsze 3 dni po zapłodnieniu dzielące się jaja przebywają w jajowodzie, przesuując się z wolna ku rogom macicy. Rozwój embrionów w jajowodach zazwyczaj nie wykracza poza stadium moruli, jednakowoż u niektórych embrionów zaznacza się zaczątek jamki blastocystowej już pod koniec 3 dnia. Około 4 dnia morule, względnie wczesne blastocysty, wchodzą do macicy i rozprze-strzeniają się wzdłuż odpowiednio na ich przyjęcie przygotowanej błony śluzowej śródmacicznej. Okres ten cechuje się niezwykle szybkim wzrostem embrionów: świeża waga 5-dniowej blastocysty nie przekracza 1 - 2 mg, natomiast 6 dnia blastocysty ważą po 25 - 45 mg. Ten imponujący przyrost wagi odbywa się kosztem zwiększenia ilości płynu, który wypełnia jamę blastocelomu; ilość komórek w embrionach również wzrasta, lecz nawet 6 dnia liczba ich nie przekracza 1000 - 2000, a sucha waga jest znikoma (por. Tabl. 1). W ciągu 6 dnia blastocysty usadowiają się w rogach macicy, w mniej więcej równych od siebie odstępach. Tego rodzaju rozmieszczenie jest bardzo charakterystyczne i podlega ścisłej kontroli hormonów jajnikowych. Szereg badaczy dyskutowało mechanizm rozmieszczenia embrionów (np. [4]). Przez podanie królikowi w 5 dniu ciąży paru μg estrogenu można poważnie zaburzyć fenomen rozmieszczenia blastocyst; także superowulacja daje nie-fizjologiczny obraz rozmieszczenia embrionów. W tym okresie, tj. w 5 lub 6 dniu, blastocysta królika przedstawia się makroskopowo jako przejrzysty, bezbarwny pęcherzyk. Mikroskopowo można w niej rozróżnić okrągłą, zbitą centralną masę komórkową, czyli właściwy embrion, i jednowarstwowy trofoblast, który otacza blastocelom, mający za zadanie odżywanie oraz wnikanie w tkanki maciczne. Od zewnątrz blastocysta jest pokryta otoczką bezkomórkową i elastyczną, zwaną *zona pellucida*, która w miarę postępu ciąży cienieje, aż wreszcie całkowicie zanika z chwilą, kiedy blastocysty zagnieżdżają się w macicy.

Szesty dzień ciąży jest ostatnim, w którym blastocysty królika występują w stanie wolnym, gdyż między 7 a 8 dniem następuje implantacja, a z nią rozpoczyna się zupełnie odmienna fizjologicznie faza rozwoju płodowego. Podczas gdy wolno leżące blastocysty posiadają jako łącznik z otoczeniem macierzyńskim jedynie produkowaną przez gruczoły błony

śródmaciczej wydzielinę, która stanowi ich materiał odżywczy (często zwany *histotrophe*), to proces implantacji pociąga za sobą stopniowe tworzenie się coraz to ściślejszych materialnych związków z ustrojem matki, jako też zaopatrzenie odżywcze płodu poprzez skomplikowany system łożyskowy (*haemotrophe*).

Technika zbierania do celów badawczych płynu, który wypełnia jamę blastocystową, jest stosunkowo prosta. Dnia 5 i 6 przeważnie stosowano, do cytowanych tutaj doświadczeń, całe wolno leżące blastocysty, albo wprost, albo po przemyciu odpowiednim płynem. Przemywanie nieraz jest konieczne, gdyż powierzchnia zewnętrzna blastocyst jest obficie pokryta lepka wydzieliną maciczną, bogatą w wiele różnych składników chemicznych, oraz, która między innymi, zawiera też enzymy. Ponieważ *zona pellucida* jest w tym okresie jeszcze stosunkowo odporna mechanicznie, więc po prostu zbiera się blastocysty odpowiednią szpatułką czy też łyżeczką, szklaną lub stalową, i przenosi do odpowiedniego naczynia. Równie dobrze można zebrać wolne blastocysty na szkiełku zegarkowym i pobrać z nich płyn przy pomocy rurek kapilarnych, rozumie się pod kontrolą mikroskopową. Począwszy od 7 dnia pobiera się płyn z zagnieżdżonych blastocyst aspirując go do strzykawki cienką igłą wprowadzoną przez ścianę macicy do woreczka płodowego. Ilość płynnego materiału zebrana w powyższy sposób jest bardzo skąpa jeszcze 7 dnia, lecz wzrasta szybko w miarę wzrostu płodu, tak że 8 - 9 dnia można wydobyć co najmniej 0,7 - 1,0 ml z pojedynczego woreczka płodowego, co umożliwia wykonanie analiz w płynie z pojedynczych embrionów.

Właściwie, można by uważać wydzielinę śluzówki macicznej również za *sui generis* płyn płodowy. W odróżnieniu od płynu blastocystowego, który dla komórek embrionalnych przedstawia środowisko wewnętrzne, wydzieliną maciczną stanowi środowisko zewnętrzne dla embrionów przed implantacją. Wiadomości dotyczące składu chemicznego tej niezwykłej cieczy biologicznej byłyby, oczywiście, bardzo cenne. Niestety, ilość lepkiej i gęstej wydzielinę macicznej jest tak ograniczona między 4 a 7 dniem ciąży u królika, że niepodobna jej zebrać np. przy pomocy rurek kapilarnych. W pewnej mierze pokonano tę trudność w następujący sposób. Do błony śródmaciczej rogów rozciętych wzdłuż długiej osi macicy przykładano się brzegiem uprzednio odważony skrawek bibuły, mniej więcej długości macicy. Po minucie, pozwoleńszy na wsiąknięcie wydzielinę, waży się bibułę ponownie i eluuje materiał wchłonięty. Metody tej użyto z powodzeniem do oznaczenia w wydzielinie macicznej zawartości cyjanokobalaminy i kwasu foliowego [9], a także w doświadczeniach nad przechodzeniem jonów znakowanych z ustaju matki do tkanek płodowych [2, 3, 23].

SKŁAD CHEMICZNY PŁYNU W BLASTOCYSTACH KRÓLIKA

Dane o składnikach płynu zawartego w blastocystach królika, dnia 6, 7 i 8 ciąży, to jest w okresie tuż przed i w czasie implantacji, są, jak na razie, niekompletne. Daleko do tego, byśmy uzyskali pełną znajomość składu chemicznego, czy też dokładne pojęcie o mechanizmie fizjologicznym powstawania i gromadzenia się tego płynu płodowego. Poniżej zebrano sumaryczne wiadomości, które udało się do tej pory zebrać autorce i jej współpracownikom.

Tablica 1

Własności płynu blastocystowego, 6, 7 i 8 dnia ciąży u królika

Niektóre właściwości ogólne blastocyst		Wiek blastocyst (dni od czasu zapłodnienia)		
		6*	7	8
Stosunek do otoczenia		wolnoleşące	implantujące	implantowane
Kształt		okrągłe	owalne	—
Rozmiar (średnica, mm)		3—4	5—7	—
Sucha waga (%)		2,0	2,2	5,6
Składniki chemiczne	Stężenie (świeża waga)			
Azot całkowity	mg/100g	30—35	40—78	300—420 (845)**
Fosfor całkowity	mg/100g	2,0—2,5	2,8—3,2	4,2—5,0 (10,4)
Jony	Sodowy	m-equiv./l	137—139	128—145 (150)
	Potasowy	m-equiv./l	10—12	4,5—6,5 (7,1)
	Chlorowy	m-equiv./l	71—74	78—89 (106)
Cukier redukujący	mg/100g	3—10	46—68	66—77 (95)
Glikoza	mg/100g	?	42	62
Fruktoza	mg/100g	0	0	0
Inozytol	mg/100g	0	0	śląd
Dwuwęglan	μ l CO ₂ /ml	1500	800—1100	480—500 (520)
Kwas nikotynowy	μ g/g	1,5	0,9	2,0
Tiamina	μ g/g	0,08	0,07	0,1
Ryboflawina	μ g/g	0,03	0,05	0,1
Cyjanokobalamina (B ₁₂)	μ g/g	0,2—0,4	0,6	0,5
Kwas foliowy	μ g/g	0,0025—0,0050	—	—

* Dnia 6 używano do analiz całych, nieprzemysłowanych blastocyst; wartości dotyczące dnia 7 i 8 odnoszą się do płynu aspirowanego z jamy blastocystowej.

** Wartości w nawiasach odnoszą się do osocza lub krwi matki.

Przegląd danych liczbowych w tablicy 1 od razu zwraca uwagę na pewne uderzające cechy płynu blastocystowego. Przede wszystkim, zaznacza się szybkość, z jaką — nieomal w godzinach — w miarę rozwoju płodowego, zachodzą zmiany w zawartości poszczególnych składników. Nie jest to, oczywiście, rzeczą nieoczekiwaną, gdyż mamy tu do czynienia z fazą bardzo szybkiego wzrostu, w ciąży trwającej tylko 30 dni. Następnie, zastanawiają różnice w zawartości pewnych składników, które się zaznaczają między płynem embrionalnym a osoczem lub krwią matki. Wprawdzie przed implantacją płód nie pozostaje w bezpośrednim związku z krwiobiegiem matki, lecz wyżej wspomniany brak danych o wydzielinie macicznej powoduje konieczność porównania z krwią matki. Wiele faktów wskazuje na to, że skład wydzieliny macicznej i płynu blastocystowego różni się od siebie zasadniczo, w każdym razie pod względem ilościowego występowania składników. Wnioski te wyciągamy m. in. na podstawie doświadczeń przeprowadzonych nad rozmieszczeniem jonów znakowanych, które wskazują, że włączanie się niektórych jonów, np. ^{32}P , w wydzielinie śluzowej przekracza 100-krotnie wartości ustalone dla płynu w 6 dniowych blastocystach [2, 23].

Wartości dla azotu i fosforu są — jak się tego można było spodziewać — niskie w wolno leżących blastocystach; szybko jednak, z chwilą implantacji, poziom zaczyna zbliżać się do poziomu krwi matki. Z dalszego przeglądu danych wynika, że w okresie poprzedzającym implantację, komórki blastocyst posiadają niewiele glikozy do swej dyspozycji. Jak dotąd, brak jest wiadomości dotyczących źródła energii wytwarzanej u wczesnego płodu ssaków. Być może, pochodzi ona nie tyle z węglowodanów, ile z innych metabolitów, jak aminokwasy lub kwasy tłuszczowe. Fruktaza nie występuje w płynach płodowych królika. Inozytol, którego stężenie w zaawansowanej ciąży jest pokaźne, pojawia się zaledwie w śladach 8 dnia.

W przeciwieństwie do niskiego poziomu glikozy, uderza wysokie stężenie dwuwęglanu w płynie blastocystowym, 6 i 7 dnia ciąży. O znaczeniu dwuwęglanu i o roli tego metabolitu w przemianie embrionalnej trudno w obecnej chwili coś więcej powiedzieć ponad to, iż ustalony jest fakt niezbędności dwuwęglanu dla wzrostu komórkowego [5], a także wiadomo, że dwuwęglan jest prekursorem w biosyntezie kwasów nukleinowych [6]. Występowanie dwuwęglanu w wysokim stężeniu w płynie blastocystowym królika jest prawdopodobnie związane z obecnością anhydryzy węglanowej w błonie śluzowej śródmacicznej [16, 18, 19, 20, 10]. Enzym ten istnieje w śródmacicy królicy nieciążarnej, lecz w niewielkiej ilości. W miarę postępu wczesnej ciąży aktywność anhydryzy w śluzówce gwałtownie narasta i maksimum zostaje osiągnięte między 6 a 8 dniem.

Przyrost anhydryzy węglanowej w śluzówce macicy królika zależy od progesteronu, a zależność ta jest tak ścisła, że autorka zastosowała oznaczanie macicznej anhydryzy jako test enzymatyczny, dziś ogólnie przyjęty do oznaczania progesteronu [19]. Po dokonanej implantacji ilość anhydryzy węglanowej stopniowo zmniejsza się w śluzówce; natomiast sporo enzymu pojawia się wówczas w łożysku, zwłaszcza w części macierzyńskiej. Mimo licznych prób, nie udało się autorce w 100 procentach zahamować anhydryzy macicznej *in vivo* przy pomocy wysoce specyficznych sulfamidowych inhibitorów tego enzymu, jak np. Diamox lub Neptazane (Lederle). We wszystkich doświadczeniach tego rodzaju, pewna aktywność anhydryzy w macicy pozostawała, mimo że równocześnie badana anhydraza krwi matki była prawie całkowicie nieczynna. Gdyby powiodło się w jakiś sposób zupełnie zahamować *in vivo* enzym w śluzówce macicy, dałoby to z jednej strony możliwość badania, czy istnieje bezpośrednia korelacja między stężeniem dwuwęglanu w płynie blastocystowym a aktywnością anhydryzy, a powtórnie uzyskanoby wskaźnik, w jakim stopniu obecność dwuwęglanu jest niezbędna dla ciągłości rozwoju płodu. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń nie odnosi się wrażenia, by inhibitory typu sulfamidowego były do tego celu przydatne.

Stężenie jonów sodowego i chlorkowego stosunkowo nie bardzo odbiega od wartości w osoczu matki [12]. Natomiast ciekawe jest, że potasu jest około dwa razy więcej w blastocystach przed implantacją niż w 1-2 dni później. Obecność wapnia w blastocystach została stwierdzona, lecz na razie brak dokładnych danych ilościowych.

Przy pomocy czułych metod analitycznych udało się ustalić w wolnych blastocystach dane ilościowe dotyczące kwasu nikotynowego, tiaminy i ryboflawiny [11], a także cyjanokobalaminy i kwasu foliowego [9]. Wiadomo jest, jak istotne dla rozwoju płodowego u ssaków są witaminy grupy B, których brak u matki uniemożliwia ciążę. Wykazanie ich obecności w tak wczesnym stadium rozwojowym jest także ważne z tego względu, że daje nam to pewnego rodzaju wskazówkę co do potencjału metabolicznego młodych embrionów. Jeśli przeliczyć dane z tablicy 1 na przeciętną świeżą wagę pojedynczej blastocysty, to wynika, iż 6-dniowy embrion zawiera około 30 m μ g kwasu nikotynowego, przypuszczalnie w formie kozymazy, 1,9 m μ g tiaminy i 0,6 m μ g ryboflawiny. Wysoka zawartość cyjanokobalaminy, 4,0 - 8,0 m μ g na blastocystę, jest uderzająca, imponuje również zawartość kwasu nikotynowego. Przy tej sposobności należy dodać, że śluzówka maciczna jest bogata w kwas nikotynowy, tiaminę i ryboflawinę, właśnie w okresie odpowiadającym blastocystyce. Jeśli idzie o cyjanokobalaminę, to występuje ona, wraz z kwasem foliowym,

w poważnym stężeniu w wydzielinie macicznej w okresie przed implantacją. Na razie nie wiadomo, czy czynniki grupy B przechodzą do wolno leżących blastocyst drogą dyfuzji, czy są wybiórczo absorbowane przez trofoblast, czy też są wytwarzane przez same komórki embrionów. Przypuszczalnie można by próbować rozwiązać tego rodzaju podstawowe zagadnienie przez wprowadzenie do ustroju matki odpowiednio znakowanych witaminów grupy B i badanie szybkości, z jaką rozmieszczają się w blastocystach.

Stopień zależności wczesnych embrionów od zmian, które zachodzą w ustroju matki, czy to doświadczalnie, czy też pod wpływem czynników patologicznych, jest niezwykle ciekawym problemem. W badaniach, w których wprowadzano do krwiobiegu matki proste cukry i inne drobno-cząsteczkowe substancje [13, 14, 17, 21, 22] okazało się, że w krótkotrwałych doświadczeniach (30 - 60 minut) substancje te nie przenikają do wolnych blastocyst. Dopiero w miarę postępującej implantacji, niektóre z badanych substancji można było wykazać w płynie blastocystowym aspirowanym z woreczków płodowych. Niezależność wolnych blastocyst od zmian w ustroju matki łatwo, między innymi, wykazać wstrzykując ciężarnemu zwierzęciu roztwór zawierający błękit trypanu: mimo że na drugi dzień całe otoczenie maciczne wraz z wydzieliną jest silnie zabarwione, barwik nie jest w stanie przeniknąć do blastocyst w okresie przed implantacją.

Jednakże ta „autonomia“ blastocyst jest raczej względna. Jeśli bowiem podać zwierzęciu ciężarnemu pewne substancje o wysokim potencjale embriotoksycznym, jak np. pochodne kolchicyny, iperytów azotowych, analogi puryny itd., w dawkach obojętnych dla matki, to już w przeciągu paru godzin zaznacza się poważne uszkodzenie w centralnej masie komórkowej blastocyst, a w mniejszym stopniu także i w komórkach trofoblastu [7]. Nie tylko embriony przebywające w macicy, lecz także dzielące się zygoty w jajowodzie szybko ulegają zahamowaniu pod wpływem wyżej wspomnianych substancji farmakologicznych, działających poprzez ustrój matki.

Nie ulega wątpliwości, że można by posunąć naprzód nasze wiadomości dotyczące selektywnej przepuszczalności blastocyst, gdyby się udało zbadać tę fazę rozwojową w warunkach pozamacicznych, *in vitro*. Jednakże, w odróżnieniu od dzielących się zygot, blastocysty obumierają bardzo szybko w roztworach soli [25], takich jakie są, na przykład, używane do doświadczeń manometrycznych w celu pomiaru oddychania i glikolizy. Toteż ukazującym się od czasu do czasu pracom nad metabolizmem blastocyst ssaków nie można przypisywać zbyt wiele wagi, gdyż brak w nich przekonujących dowodów na przeżywanie blastocyst

w ciągu tych doświadczeń. Ostatnio powiodła się 24-godzinna inkubacja 6-dniowych blastocyst królika w surowicy krwi koguciej [8], która jest często używana do hodowli tkankowych. Dowód przeżycia blastocyst w tych doświadczeniach osiągnięto w ten sposób, że po ukończonej inkubacji przetransplantowano blastocysty do macicy królików, które były dokładnie synchronizowane hormonalnie z wiekiem i fazą rozwojową embrionów doświadczalnych. Okazało się wówczas, że mimo inkubacji, doświadczalne blastocysty zachowały swą fizjologiczną zdolność implantacji.

Wyniki te otwierają drogę do dalszych prac nad biochemią wczesnych embrionów. Postępy będą w pewnej mierze zależały od wypracowania sprawdzianów przeżywalności blastocyst, które byłyby mniej - zawile i długotrwałe, jak i mniej kosztowne niż wyżej wspomniana technika transplantacji płodowej. Badania są obecnie w toku nad tym niezbyt prostym, lecz podstawowym zagadnieniem. Nic by autorce nie przyniosło więcej radości, niż możliwość doniesienia w przyszłości o pomyślnym tych badań wyniku, jej drogiemu Nauczycielowi, Włodzimierzowi Mozołowskiemu.

STRESZCZENIE

Opisano niektóre cechy blastocyst królika i podano dane dotyczące składu chemicznego płynu blastocystowego w 6, 7 i 8 dniu ciąży, tj. w okresie tuż przed i w czasie implantacji embrionów.

Wśród danych chemicznych zaznacza się obecność w blastocystach szeregu czynników należących do grupy witaminów B. Fakt ten przypuszczalnie wskazuje na stosunkowo daleko posunięty potencjał metaboliczny wczesnego płodu. Poza tym płyn blastocystowy cechuje się wysoką zawartością dwuwęglanu a niską glikozy.

Przedyskutowano mechanizm regulujący przechodzenie metabolitów do blastocyst z ustroju matki.

Jako jeden z ważniejszych celów w dalszych badaniach nad fizjologią wczesnego płodu u ssaków, wskazano wypracowanie prostego i niezawodnego sprawdzianu przeżywalności blastocyst w doświadczeniach *in vitro*.

LITERATURA

- [1] Adams C. E., *J. Endocrinol.* **16**, 283, 1958.
- [2] Bennett J. P., Bournsnel J. C. & Lutwak-Mann C., *Nature, London* **181**, 1715, 1958.
- [3] Bennett J. P., Bournsnel J. C. & Lutwak-Mann C., *J. Endocrinol.* **18**, ii, 1959.
- [4] Böving B. G., *Amer. J. Anat.* **98**, 403, 1956.
- [5] Chang R. S., *J. Exp. Med.* **109**, 229, 1959.
- [6] Chargaff E. & Davidson J. N., *The Nucleic Acids*, N. Y. Academic Press, Inc. 1955.

- [7] Hay M. F., Adams C. E. & Lutwak-Mann C., *J. Endocrinol.* **20**, ii, 1960.
[8] Hay M. F., 1959, nieopublikowane doświadczenia.
[9] Jacobson W. & Lutwak-Mann C., *J. Endocrinol.* **14**, xix, 1956.
[10] Johnson T. H., Lutwak-Mann C. & Shelesnyak M. C., *Nature, London* **184**, 961, 1959.
[11] Kodicek E. & Lutwak-Mann C., *J. Endocrinol.* **15**, liii, 1957.
[12] Lewis P. R. & Lutwak-Mann C., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 589, 1954.
[13] Lutwak-Mann C., *J. Embryol. Exp. Morph.* **2**, 1, 1954.
[14] Lutwak-Mann C., *Studies on Fertility* **6**, 33, 1954.
[15] Lutwak-Mann C. & Laser H., *Nature, London*, **173**, 268, 1954.
[16] Lutwak-Mann C. *J. Endocrinol.* **13**, 26, 1955.
[17] Lutwak-Mann C., *Proc. IIIrd Intern. Congress Anim. Reprod.*, Cambridge., 1956.
[18] Lutwak-Mann C., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* **32**, 511, 1956.
[19] Lutwak-Mann C. & Adams C. E., *J. Endocrinol.* **15**, 43, 1957.
[20] Lutwak-Mann C. & Adams C. E., *Acta Endocrinol.* **25**, 405, 1957.
[21] Lutwak-Mann C., *Memoirs Soc. Endocrinol.* **6**, 35, 1959.
[22] Lutwak-Mann C., *Physiology and Biochemistry of the Mammalian Blastocyst* w „*Cell, Growth & Milieu*”, The Ronald Press Co., N. Y. 1959.
[23] Lutwak-Mann C., Bournsnel J. C. & Bennett J. P., *J. Fertil., & Reprod.*, w druku, 1960.
[24] Marshall F. H. A., *Physiology of Reproduction*, 3rd ed., London, Longmans, Green & Co., Parkes Editor, 1954.
[25] Moog F. & Lutwak-Mann C., *Embryol. Exp. Morph.* **6**, 57, 1958.

SOME PROPERTIES OF EARLY EMBRYONIC FLUID IN THE RABBIT

Summary

Some properties of the rabbit blastocyst are described. Data are given on the chemical composition of the blastocyst fluid, at 6, 7, and 8 days after mating, that is at stages of gestation immediately preceding, and accompanying, the process of implantation.

The presence in the pre-implantation blastocyst of several factors of the B-group of vitamins is stressed, as presumably indicative of the metabolic potential at this early stage of embryonic development. Another characteristic feature of the early blastocyst fluid is its high content of bicarbonate, which contrasts with the low content of glucose.

The mechanism of entry of metabolites from the maternal organism into the blastocyst, is discussed.

The desirability of *in vitro* biochemical studies is indicated, and the need is underlined for a simple and reliable test of blastocyst viability following prolonged periods of incubation.

Otrzymano 10.2.1960 r.

TADEUSZ MANN

**ZASTOSOWANIE ANALIZY CHEMICZNEJ PŁYNU NASIENNEGO
DO BADAŃ NAD CZYNNOSCIĄ MĘSKIEGO HORMONU PŁCIOWEGO
W USTROJU ZWIERZĘCYM**

Pracownia Fizjologii i Biochemii Reprodukcyjnej
(A. R. C. Unit of Reproductive Physiology and Biochemistry)
Uniwersytetu w Cambridge

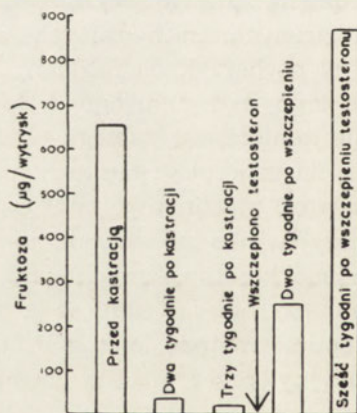
Włodzimierzowi Mozolowskiemu, kochanemu przyjacielowi, pod którego kierownictwem dane mi było stawiać pierwsze kroki w biochemii, pracę poświęcam.

Stwierdzenie działania męskiego hormonu płciowego w ustroju zwierzęcym polegało do niedawna prawie wyłącznie na mierzeniu zmian anatomicznych i histologicznych, zachodzących w męskich gruczołach dodatkowych, zwłaszcza w pęcherzykach nasiennych i w gruczole krokowym, po wykastrowaniu i po wstrzyknięciu testosteronu. Metoda ta pociąga jednak nieodzownie konieczność zabiegu operacyjnego, tj. otwarcia jamy brzusznej i wydobycia gruczołów męskich, i z tego powodu nadaje się do badań nad małymi, stosunkowo niekosztownymi zwierzętami, jak mysz, szczur, królik czy świnka morska, ale nie może być zastosowana na dużą skalę do badań nad kosztownymi dużymi zwierzętami hodowlanymi, jak tryk, byk, knur czy ogier. Trudność tę jednak można pokonać w znacznej mierze zastępując metodę anatomiczno-histologiczną i związany z nią zabieg operacyjny przez metodę chemicznego badania płynu nasiennego.

Płyn nasienny (plazma nasienna) stanowi środowisko, w którym podczas wytrysku nasienia zawieszane są normalnie plemniki. Jest on mieszaniną płynów wydzielanych przez szereg dodatkowych gruczołów męskich, które, oprócz wspomnianych już pęcherzyków nasiennych i gruczołu krokowego, obejmują najądrza, nasieniowody, gruczoły Cowpera i różne inne pomniejsze gruczoły umieszczone w ścianie cewki moczowej. Pod względem chemicznym wydzieliny te cechują się wysoką zawartością szeregu ciekawych substancji, których nie napotyka się na ogół w tak

znacznym stężeniu ani we krwi, ani w innych płynach ustrojowych. Jako najbardziej charakterystyczne, wymienić należy kwas cytrynowy (Scherstén, 1929; Humphrey i Mann, 1949), fosfatazę „kwaśną“ (Kutscher i Wolbergs, 1935), 5-nukleotydazę (Reis, 1937; Mann, 1945), fosfocholinę (Lundquist, 1946), glicerofosfocholinę (Diament, Kahane i Levy, 1952; Dawson, Mann i White, 1957), ergotioneinę (Mann i Leone, 1953; Mann, 1958a), fruktozę (Mann, 1946, 1956a), inozytol (Mann, 1954) i sorbitol (King i Mann, 1959); szczegóły dotyczące większości z tych substancji, a zwłaszcza ich stężenia w płynie nasiennym i w wydzielinach męskich narządów dodatkowych, podane zostały w książce *Biochemia Nasienna* (Mann, 1958b).

Zdolność dodatkowych gruczołów męskich do tworzenia i wydzielania wyżej wymienionych składników płynu nasiennego jest zależna od szeregu czynników, spośród których jednak najważniejszym jest hormon płciowy męski, pochodzący z jąder (Mann, 1956b). Badania wykonane na królikach i szczurach (Mann i Parsons, 1947, 1950; Lutwak-Mann, Mann i Price, 1949) wykazały, że charakterystyczne składniki płynu nasiennego, a zwłaszcza fruktoza i kwas cytrynowy, znikają z wytrysków nasiennych w ciągu kilku dni lub co najwyżej tygodni po usunięciu jąder, i pojawiają się równie szybko po wstrzyknięciu podskórnym albo wszczepieniu testosteronu. Doświadczenie tego rodzaju, wykonane na



Rys. 1. Spadek zawartości fruktozy w nasieniu królika wywołany kastracją i wzrost pod wpływem podskórnego wszczepionego testosteronu (100 mg)

królika, zobrazowane jest na rys. 1, który pokazuje, że zawartość fruktozy w wytrysku króliczym spadła pod wpływem kastracji z 670 µg do 20 µg, a po wszczepieniu podskórnym tabletki testosteronu podniosła się szybko do 870 µg. Wyniki analogiczne otrzymano także u innych gatunków

zwierzęcych, a przede wszystkim u byka (Mann, Davies i Humphrey, 1949). Istnieje też szereg nowych danych na to, że „próba fruktozowa“ i „próba kwasu cytrynowego“ okażą się w przyszłości pożyteczne w badaniach nad zaburzeniami w czynności hormonu jądrowego u człowieka. Tak np. udało się wykazać (Nowakowski i Schirren, 1956), że u mężczyzn dotkniętych aspermią i zanikiem włóknistym jąder, poziom fruktozy w płynie nasiennym jest wybitnie niższy niż u osobników zdrowych, ale daje się podwyższyć szybko i wielokrotnie, bądź to za pomocą zastrzyków heptanoatu testosteronu, bądź też przez wszczepienie podjęzykowe metylotestosteronu.

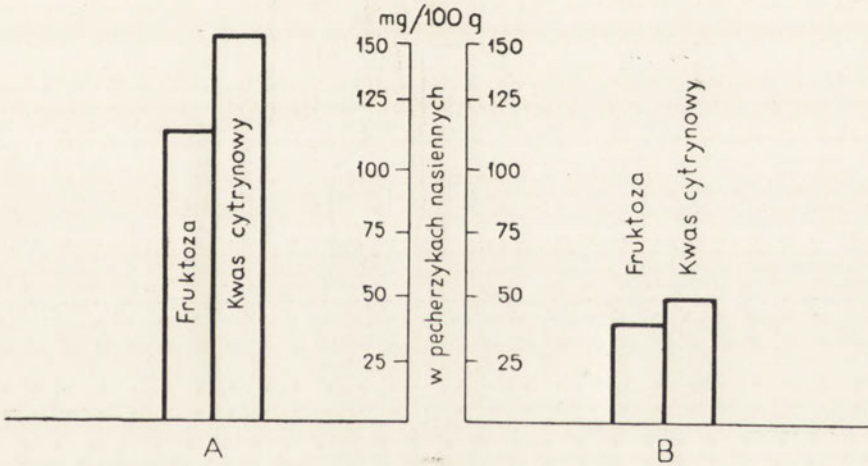
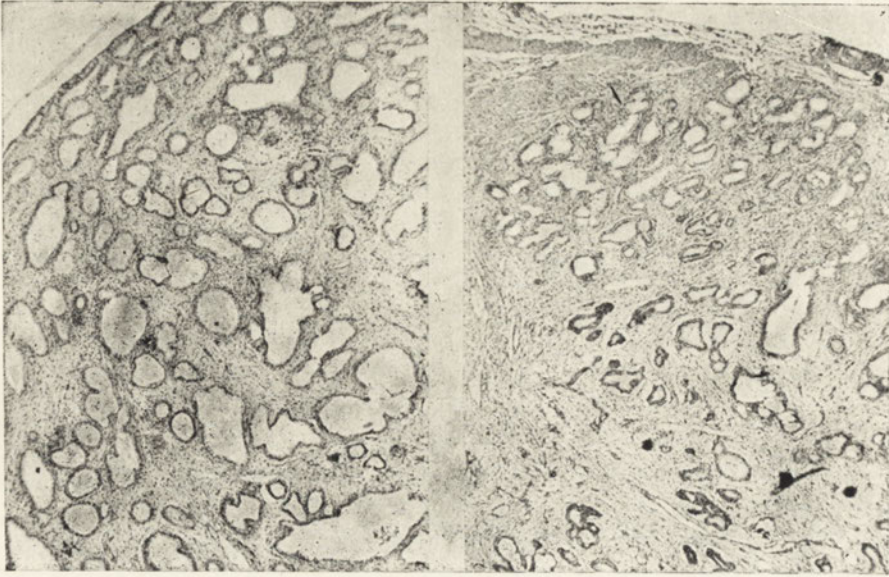
Doświadczenia nasze wykazały również, że istnieje ścisła i znamienne zależność między pojawieniem się pierwszych objawów czynności męskiego hormonu płciowego w ustroju młodego dojrzewającego samca a początkiem wydzielania fruktozy i kwasu cytrynowego w dodatkowych gruczołach męskich. Doświadczenia te wykonano głównie na młodych bykach, a to z następujących przyczyn: Jądro byka jest narządem, z którego testosteron został po raz pierwszy wyosobniony w stanie chemicznie czystym (David, Dingemans, Freud i Laqueur, 1935), i w którym stężenie testosteronu jest szczególnie wysokie. Wiadomo również, że jądra byka wykazują wcale wyraźną zależność między czynnością androgeną a stopniem rozwoju komórkowego tkanki interstycjalnej (Hooker, 1944). Pęcherzyki nasienne byka są zarówno źródłem fruktozy nasienia, jak i kwasu cytrynowego, a poziom obydwu tych substancji w wydzielinie pęcherzykowej jest wyższy u byka niż u innych gatunków zwierzęcych (Mann, Davies i Humphrey, 1949). W dodatku, otrzymanie płynu nasiennego u byków jest szczególnie łatwe, dzięki wysoce udoskonalonym metodom pobierania nasienia, zarówno za pomocą „sztucznej pochwy“, jak i przez zastosowanie „bodźców elektrycznych“ (Rowson i Murdoch, 1954). Co najważniejsze, metoda „elektryczna“ może być zastosowana nie tylko do zwierząt dorosłych, ale i do młodych byczków, które jeszcze nie dojrzały płciowo.

U młodych byków fruktoza i kwas cytrynowy dają się wykazać w pęcherzykach nasiennych już około 3 miesiąca życia, a w płynie nasiennym, pobranym metodą „bodźców elektrycznych“, można zwykle odnaleźć obydwie substancje już około 5 miesiąca życia (Mann i Rowson, 1957; Davies, Mann i Rowson, 1957). Nasze najnowsze badania (Lindner i Mann, 1960) wskazują również na to, że właśnie około 3 miesiąca życia, kiedy rozpoczyna się funkcja wydzielnicza pęcherzyków nasiennych, udaje się w jądrach byka wykazać za pomocą metody chromatograficznej pierwsze wyraźne ilości testosteronu. Ze wszystkich tych obserwacji wynika, że testosteron rozpoczyna swoje działanie w ustroju byka około 3 miesiąca

życia, a zatem bardzo wcześnie w rozwoju płciowym, jeżeli wziąć pod uwagę fakt, że pierwsze dojrzałe plemniki nie zjawiają się na ogół w wytrysku byka przed jakimś 8 miesiącem życia, a nieraz i później. Tak więc upływa szereg miesięcy w rozwoju byka i w procesie dojrzewania płciowego od czasu pojawienia się hormonu jądrowego do czasu, kiedy jądra są w stanie produkować również plemniki.

Nie wolno zapominać jednak, że poszczególne samce, nawet należące do tej samej rasy, mogą się różnić znacznie pod względem składu chemicznego wydzieliny pęcherzykowej i płynu nasiennego, mimo dokładnie tego samego wieku i identycznych warunków chowu. Fakt ten musi być wzięty pod uwagę zwłaszcza w badaniach doświadczalnych nad wpływem czynników, które bądź to pobudzają, bądź też hamują czynność wydzielniczą dodatkowych gruczołów męskich. Tak np. wiadome jest, że niedostateczne ukrwienie pęcherzyków nasiennych może spowodować spadek w funkcji wydzielniczej tychże narządów. Wiadomo jest również, że pewne zaburzenia w ogólnej przemianie materii mogą mieć poważny wpływ hamujący na czynność sekretoryczną dodatkowych gruczołów męskich. W latach ostatnich zainteresowaliśmy się specjalnie wpływem odżywiania samców na początek czynności androgennej jąder i czynności wydzielniczej pęcherzyków nasiennych. Do badań tych posługiwaliśmy się prawie wyłącznie parami tzw. bliźniaków identycznych, czyli pochodzenia jednojajowego. Szczegóły dotyczące składu diet stosowanych w tych doświadczeniach podane zostały w jednej z poprzednich prac (Davies, Mann i Rowson, 1957). Użycie jednego bliźniaka z każdej pary jako „kontrolni“, tzn. jako zwierzęcia normalnie odżywianego, a drugiego bliźniaka jako zwierzęcia „doświadczalnego“, czyli niedożywianego, umożliwiło nam przeprowadzenie daleko ściślejszych badań nad wpływem karmienia na procesy toczące się w jądrach i w dodatkowych narządach męskich, aniżeli można by to uczynić przy użyciu nie-bliźniaków.

Jako przykład doświadczeń tego rodzaju posłużyć mogą następujące dwa eksperymenty, każdy wykonany na oddzielnej parze „jednojajowych bliźniaków“. Obydwie pary byczków odżywiane były w sposób normalny i identyczny, aż do czasu, kiedy osiągnęły wiek $2\frac{1}{2}$ miesięcy. Od tej chwili sposób odżywiania uległ zmianie, a mianowicie podczas kiedy jeden bliźniak z każdej pary był nadal karmiony normalnie, drugi bliźniak dostawał codziennie tylko jedną trzecią tej racji żywnościowej, którą zwierzę kontrolne spożyło dnia poprzedniego. W pierwszym z tych dwóch doświadczeń, fruktoza i kwas cytrynowy pojawiły się w wytrysku zwierzęcia kontrolnego, tj. normalnie odżywianego, przy końcu 5 miesiąca życia, a w dwa tygodnie później osiągnęły już wysoką wartość 21, wzgl. 49 mg/100 ml. W tym czasie waga zwierzęcia kontrolnego wynosiła



Rys. 2. Wpływ niedokarmiania na obraz histologiczny (skrawki w pow. 95 ×) i na zawartość fruktozy i kwasu cytrynowego w pęcherzykach nasiennych byczków bliźniaczych, 5 $\frac{1}{2}$ -miesięcznych. A — zwierzę normalnie odżywiane (146 kg). B — zwierzę niedożywiane (102 kg)



44

... ..

... ..

... ..

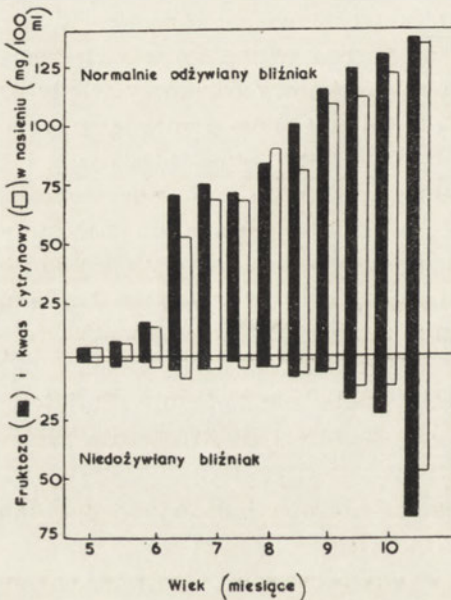
150 kg, a waga bliźniaka doświadczalnego 105 kg. Kiedy w jeden dzień później zwierzęta te zabito, wydobyto z nich pęcherzyki nasienne i narządy te poddano zarówno badaniu histologicznemu, jak i analizie chemicznej. Wynik tych badań podano na rys. 2, z którego widać, jak poważny wpływ hamujący wywarło nieodpowiednie odżywianie zwierzęcia zarówno na rozwój strukturalny, jak i na czynność wydzielniczą pęcherzyków nasiennych.

W drugim doświadczeniu fruktoza i kwas cytrynowy pojawiły się w wytrysku zwierzęcia kontrolnego również około 5 miesiąca życia, i podobnie jak w doświadczeniu poprzednim nie udało się w tym czasie stwierdzić ani fruktozy, ani kwasu cytrynowego w wytrysku bliźniaka nie dożywionego. W odróżnieniu jednak od poprzedniego doświadczenia, tym razem badanie kontynuowano jeszcze przez szereg dalszych miesięcy, pobierając regularnie i analizując wytryski obydwu bliźniaków. Wynik tego doświadczenia podano na rys. 3, z którego widać, że u zwierzęcia kontrolnego zarówno fruktoza, jak i kwas cytrynowy osiągnęły w płynie nasiennym poziom kilkudziesięciu mg/100 ml już około 7 miesiąca życia, podczas kiedy w tym samym czasie obydwie substancje znajdowały się tylko w śladach u bliźniaka doświadczalnego. W rezultacie niedożywiania, poziom fruktozy i kwasu cytrynowego w płynie nasiennym pozostały bardzo niskie aż do 9 miesiąca życia i dopiero potem zaczęły się podnosić. Tak znaczna różnica w zachowaniu się bliźniaków była tym bardziej znamienna, że u obydwu zwierząt plemniki pojawiły się w niezbyt różnym czasie, a mianowicie około 9 miesiąca życia. Nie ulega więc wątpliwości, że niedożywianie zwierzęcia odbiło się znacznie silniej na funkcji hormonalnej jąder, aniżeli na ich zdolności do tworzenia plemników.

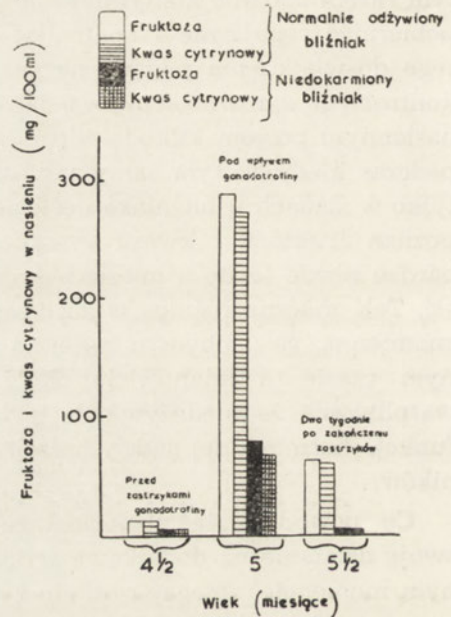
Co powoduje, że u normalnego samca hormon jądrowy rozpoczyna swoje działanie na dodatkowe gruczoły męskie w pewnym ściśle określonym momencie, zbiegającym się z tak zwanym czasem pokwitania, a nie wcześniej lub później? Dlaczego u samca niedokarmionego zachodzi tak znaczne opóźnienie w początku czynności hormonalnej jąder? Są to pytania, na które możemy na razie tylko częściowo odpowiedzieć. Badania nasze wskazują jednak na to, że głównym czynnikiem, decydującym o początku funkcji hormonalnej jąder, jest zdolność przedniego płata przysadki mózgowej do produkowania gonadotrofiny i do pobudzania jąder za jej pomocą (Rys. 4). Niedokarmianie ma wpływ wybitnie opóźniający na pojawienie się bodźców gonadotrofinowych w ustroju młodego, dojrzewającego samca, i w ten sposób opóźnia ono również normalny początek czynności wydzielniczej dodatkowych gruczołów męskich. Jeżeli zwierzęciu niedokarmianemu wstrzyknąć hormon gonadotrofinowy otrzy-

many z moczu kobiet ciężarnych, spowodować można rychle uczynnienie procesu powstawania i wydzielania fruktozy i kwasu cytrynowego. Pokazuje to na przykład doświadczenie przedstawione graficznie na rys. 4.

Stwierdzić jednak trzeba od razu, że brak bodźca gonadotropinowego nie jest jedynym czynnikiem, który ogranicza, czy wręcz uniemożliwia, zdolność jąder do produkcji testosteronu. Tak np. wykonaliśmy ostatnio (Mann i Rowson, 1960) szereg doświadczeń na bliźniakach kastrowanych, aby przekonać się, czy bliźniak-kastrat normalnie odżywiany zareaguje na zastrzyki testosteronu równie silnie jak bliźniak-kastrat niedokarmiany. Przekonaliśmy się, że pęcherzyki nasienne kastrata niedożywionego produkują pod wpływem wstrzykniętego testosteronu znacznie mniej fruktozy i kwasu cytrynowego niż narządy bliźniaka kontrolnego. Za



Rys. 3. Wpływ niedokarmiania na wydzielanie fruktozy i kwasu cytrynowego w płynie nasiennym młodych byczków



Rys. 4. Wpływ hormonu gonadotropinowego (osiem zastrzyków "Follutein Squibb"; co drugi dzień zastrzyk 2000 jednostek międzynarodowych) na poziom fruktozy i kwasu cytrynowego u zwierzęcia normalnie odżywianego i u zwierzęcia niedokarmianego

przykład posłużyć może następujące doświadczenie, wykonane na parze bliźniaczych byczków, które poddano kastracji w wieku 8 miesięcy, ale odżywiano w sposób identyczny, zarówno przed kastracją, jak i przez okres 3 miesięcy po kastracji, tak że waga ich w wieku 11 miesięcy róż-

niła się tylko bardzo nieznacznie; jedno zwierzę ważyło 309 kg, a drugie 306 kg. Od chwili jednak, kiedy bliźniaki osiągnęły wiek 11 miesięcy, odżywiano je w sposób różny, a mianowicie, podczas kiedy jeden z nich odżywiany był normalnie, drugi otrzymywał stale tylko 1/3 tej racji żywnościowej, którą zwierzę kontrolne spożyło dnia poprzedniego. Na skutek tego odżywiania, waga bliźniaka niedokarmionego spadła w ciągu pięciu następnych miesięcy do 282 kg, podczas kiedy waga zwierzęcia kontrolnego podniosła się w tym samym czasie do 406 kg. Doświadczenie to kontynuowano jeszcze przez dalsze 4 miesiące, w ciągu których jednak obydwa bliźniaki traktowano testosteronem, a mianowicie, przez pierwsze dwa miesiące wstrzykiwano obydwu bliźniakom 50 mg testosteronu co trzeci dzień, a przez dalsze dwa miesiące 150 mg co drugi dzień. W ciągu tego czteromiesięcznego okresu pobierano od obydwu kastratów regularnie wytryski za pomocą metody bodźców elektrycznych i tak otrzymany płyn nasienny, który naturalnie pozbawiony był plemników, analizowano chemicznie. W ciągu pierwszego miesiąca stosowania testosteronu zwierzę kontrolne wyprodukowało 7 mg fruktozy i 13 mg kwasu cytrynowego, podczas kiedy niedokarmiany bliźniak wyprodukował tylko 2 mg fruktozy i 4 mg kwasu cytrynowego. W ciągu drugiego miesiąca stosowania testosteronu ilość całkowita fruktozy i kwasu cytrynowego w wytryskach nasiennych wynosiła 27 mg i 33 mg u bliźniaka odżywianego dostatecznie, a tylko 17 mg i 18 mg u bliźniaka niedożywianego. Dopiero w trzecim i czwartym miesiącu stosowania testosteronu różnica między składem płynu nasiennego obydwu bliźniaków zaczęła się zmniejszać.

Jako inny jeszcze przykład zastosowania analizy chemicznej do badań nad czynnością męskiego hormonu w ustroju zwierzęcia przytoczyć należy następujące zagadnienie. W toku doświadczeń nad czynnością hormonalną jąder u młodych byków, przekonaliśmy się, że moment zjawienia się fruktozy i kwasu cytrynowego w pęcherzykach nasiennych u dojrzewających samców zbiega się w sposób charakterystyczny z momentem, kiedy w jądrach tych zwierząt udaje się po raz pierwszy wykazać chemicznie obecność testosteronu. W toku tych doświadczeń okazało się jednak, że w kilka tygodni przed pojawieniem się testosteronu w jądrach zjawia się regularnie inny steroid, a mianowicie androstendion (Lindner, 1959). Nasunęło to natychmiast pytanie, czy i w jakim stopniu androstendion jest w stanie naśladować działanie testosteronu na pęcherzyki nasienne i pobudzić wydzielanie fruktozy i kwasu cytrynowego. Aby zbadać to zagadnienie (Mann i Rowson, 1960), użyto dwóch par bliźniaków. Obydwie pary poddano kastracji, kiedy osiągnęły wiek 9 tygodni. Odżywianie obydwu par było identyczne i normalne. Kiedy osiągnęły one wiek 15 tygodni, użyto jednego bliźniaka z jednej pary do zastrzyków androstendio-

nu (100 mg co drugi dzień, przez okres 3 tygodni), a jednocześnie jednego bliźniaka z drugiej pary poddano zastrzykom takiej samej dawki testosteronu (100 mg co drugi dzień, przez okres 3 tygodni). Dwa pozostałe byczki, tzn. jeden bliźniak z jednej pary i jeden bliźniak z drugiej pary, posłużyły jako zwierzęta kontrolne. Gdy tylko skończył się okres stosowania androstendionu względnie testosteronu, tzn. kiedy zwierzęta osiągnęły wiek 18 miesięcy, wydobyto ze wszystkich czterech pęcherzyki nasienne w drodze operacji, a organy w ten sposób otrzymane poddano analizie na fruktozę i kwas cytrynowy. W pęcherzykach nasiennych dwóch zwierząt kontrolnych, tj. tych, które nie otrzymały żadnych zastrzyków, znaleziono 0,318 mg i 0,320 mg fruktozy, a zatem ilości identyczne, oraz 0,320 mg i 0,121 mg kwasu cytrynowego. U zwierzęcia, które otrzymało trzytygodniową serię zastrzyków androstendionu, znaleziono w pęcherzykach nasiennych 0,603 mg fruktozy i 0,337 mg kwasu cytrynowego. U zwierzęcia potraktowanego testosteronem znaleziono natomiast w pęcherzykach nasiennych daleko większe ilości, a mianowicie 5,550 mg fruktozy i 3,190 mg kwasu cytrynowego. Z danych tych nie tylko wynika, że androstendion jest bez porównania słabszym androgenem aniżeli testosteron, jeżeli chodzi o wpływ pobudzający na funkcję wydzielania fruktozy i kwasu cytrynowego w pęcherzykach nasiennych, ale tłumaczące one, dlaczego zwierzęta bardzo młode, które w jądrach mają tylko androstendion i które nie są jeszcze zdolne do produkcji testosteronu, nie są jednocześnie zdolne do tworzenia i wydzielania fruktozy i kwasu cytrynowego w męskich gruczołach dodatkowych.

STRESZCZENIE

Płyn nasienny ssaków zawiera szereg charakterystycznych składników, m. in. fruktozę i kwas cytrynowy, które pochodzą z dodatkowych gruczołów męskich i które wydzielają się pod wpływem męskiego hormonu płciowego. Oznaczenie ilościowe fruktozy i kwasu cytrynowego w płynie nasiennym umożliwia nie tylko dokładną ocenę funkcji wydzielniczej dodatkowych gruczołów męskich, ale stanowi jednocześnie czuły sprawdzian aktywności męskiego hormonu płciowego w żywym ustroju zwierzęcym. W artykule niniejszym podano szereg przykładów, wskazujących na istnienie ścisłej zależności między początkiem czynności hormonu płciowego w ustroju młodego samca a pojawieniem się fruktozy i kwasu cytrynowego w męskich gruczołach dodatkowych i w płynie nasiennym. Podano również przykłady dowodzące, że niedożywianie samca w okresie poprzedzającym czas normalnego dojrzewania płciowego opóźnia znacznie początek czynności dodatkowych gruczołów męskich. Bada-

nia nasze wskazują na to, że opóźnienie to jest wywołane częściowo niedostateczną aktywnością gonadotropinową przysadki mózgowej, a częściowo zmniejszoną wrażliwością dodatkowych gruczołów męskich na testosteron.

L I T E R A T U R A

- David K., Dingenanse E., Freud J. & Laqueur E., *Z. Physiol. Chem.* **233**, 281, 1935.
 Davies D. V., Mann T. & Rowson L. E. A., *Proc. Roy. Soc. B*, **147**, 332, 1957.
 Dawson R. M. C., Mann T. & White I. G., *Biochem. J.* **65**, 627, 1957.
 Diamant M., Kahane E. & Levy J., *Arch. Sci. Physiol.* **7**, 45, 1953.
 Hooker C. W., *Amer. J. Anat.* **74**, 1, 1944.
 Humphrey G. F. & Mann T., *Biochem. J.* **44**, 97, 1949.
 King T. E. & Mann T., *Proc. Roy. Soc. B*, **151**, 226, 1959.
 Kutscher W. & Wolbergs H., *Z. Physiol. Chem.* **236**, 237, 1935.
 Lindner H. R., *Nature, London*, **183**, 1605, 1959.
 Lindner H. R. & Mann T., praca w druku, 1960.
 Lundquist F., *Nature, London*, **158**, 710, 1946.
 Lutwak-Mann C., Mann T. & Price D., *Proc. Roy. Soc. B*, **136**, 461, 1949.
 Mann T., *Biochem. J.* **39**, 451, 1945.
 Mann T., *Biochem. J.* **40**, 481, 1946.
 Mann T., *Proc. Roy. Soc. B*, **142**, 21, 1954.
 Mann T., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 459, 1956a.
 Mann T., *Rec. Progr. Horm. Res.* **12**, 353, 1956b.
 Mann T., *Postępy Biochemii*, **4**, 89, 1958a.
 Mann T., *Biochemia Nasienia*, 1958b. Państw. Wydaw. Rolnicze i Leśne, Warszawa.
 Mann T., Davies D. V. & Humphrey G. F., *J. Endocrinol.* **6**, 75, 1949.
 Mann T. & Leone E., *Biochem. J.* **53**, 140, 1953.
 Mann T. & Parsons U., *Nature, London*, **160**, 294, 1947.
 Mann T. & Parsons U., *Biochem. J.* **46**, 440, 1950.
 Mann T. & Rowson L. E. A., *Proc. Nutr. Soc.* **16**, XVIII, 1957.
 Mann T. & Rowson L. E. A., *Endocrinol.* **20**, i, 1960.
 Nowakowski H. & Schirren C., *Klin. Wschr.* **34**, 19, 1956.
 Reis J., *Enzymologia* **2**, 183, 1937.
 Rowson L. E. A. & Murdoch M. I., *Vet. Rec.* **66**, 326, 1954.
 Scherstén B., *Skand. Arch. Physiol.* **58**, 90, 1929.

CHEMICAL ANALYSIS OF SEMEN IN THE STUDY OF MALE SEX HORMONE ACTIVITY IN THE ANIMAL

S u m m a r y

Mammalian seminal plasma contains a number of highly characteristic chemical constituents such as fructose and citric acid, which are produced and secreted in the accessory organs of reproduction under the influence of the male sex hormone. The determination of these substances makes

it possible to assess quantitatively the secretory activity of the male accessory glands, and it provides at the same time, a highly sensitive criterion for the appraisal of androgenic activity in the living animal. There is a close relationship between the onset of androgenic activity in the young sexually maturing male, and the appearance of fructose and citric acid in the male accessory organs of reproduction and in the seminal plasma. Underfeeding of young males at the time when they approach sexual maturity, delays considerably the onset of secretory activity in the accessory organs of reproduction, due partly to lowered gonadotrophic activity of the pituitary gland, and partly to lowered responsiveness of the male accessory glands to testosterone.

Otrzymano 11.2.1960 r.

W. BRZESKI

**DYNAMIK DER INKORPORATION DER GLYKOKOLL-
-KOHLENSTOFFATOME IN CHLOROPHYLL *a* UND *b***

Katedra Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Kierownik: Prof. dr Ignacy Reifer

Radiochemische Abteilung des Anorganisch- und Physikalisch-Chemischen

Institutes der Universität, Wien

Kierownik: Prof. Dr Engelbert Broda

EINFÜHRUNG

Die heutige Anschauung über die Biosynthese der grünen Pflanzenpigmente stimmt im Prinzip mit dem vor zehn Jahren von Granick formulierten Schema überein [22]. Ebenso wie die früheren Hypothesen beruht dieses Schema auf der Idee der Identität der Bildungsprozesse von Chlorophyll in Pflanzen und von Häm in Tieren. Jedoch zum ersten Male wurde diese Idee in Form einer Kette der stufenweisen Umwandlungen ausgedrückt; auch wurde die dargestellte Formulierung auf Grund der bisher durchgeführten Untersuchungen eingehend analysiert [23]

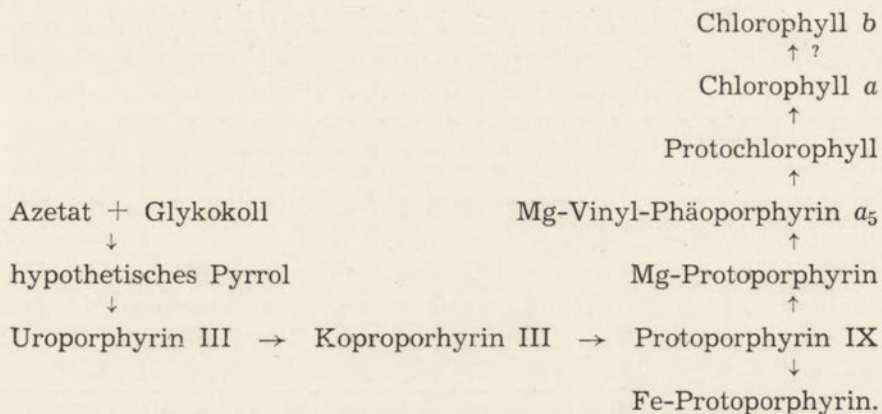


Abb. 1. Schema der Chlorophyll-Biosynthese nach Granick [22]

Der vorgeschlagene Weg der Chlorophyll-Biosynthese war jedoch zum grössten Teil hypothetisch und nur einige ihre Teile konnten damals für teilweise bewiesen angesehen werden. Man hat nämlich die Inkorporation von Glykokoll- α - ^{14}C und Azetat- α - ^{14}C in Chlorophyll in *Chlorella vulgaris* aufgezeigt [31]. In den Zellen einiger *Chlorella*-Mutanten wurden Protoporphyrin IX [19], Magnesium-Protoporphyrin [20] und Magnesium-Vinyl-Phäoporphyrin a_5 [21] gefunden. Die Angaben über die Umwandlung des Protochlorophylls in Chlorophyll *a* bei der Belichtung der etiolierten höheren Pflanzen sind etwas zahlreicher [23].

In späteren Jahren erzielte man neue Beweise für das vorgeschlagene Schema der Biosynthese des Chlorophylls, da von Granick *et al.* in weiteren Untersuchungen über die *Chlorella*-Mutanten die Synthese einiger Porphyrine mit verschiedenen Zahlen von Karboxylgruppen [8], u. a. des Hämatoporphyrins [24], nachgewiesen wurde. Gleichzeitig konnte man mit zellfreien Extrakten feststellen, dass Porphobilinogen *in vitro* ein Vorläufer der Porphyrine ist [9]. Dann wurde die Anwesenheit der PBG¹-Desaminase in zahlreichen höheren Pflanzen festgestellt und gereinigte Enzympräparate wurden erhalten [2, 3, 4]. Gibson *et al.* [15] fanden in Pflanzen eine δ -Aminolävulinsäure-Dehydrogenase, die die PBG-Synthese aus ALS¹ katalysiert.

In weiteren Untersuchungen von Bogorad über den Mechanismus der PBG-Umwandlungen konnte man bestätigen, dass diese Prozesse auf einer höheren Hydrierungsstufe der Metabolite als im Falle der Porphyrine verlaufen [5]. Besonders interessant ist die PBG-Umwandlung zum Uroporphyrinogen III unter Einwirkung der PBG-Desaminase und Isomerase [6]. In den Homogenaten der *Chlorella*-Zellen bestätigte man die Anwesenheit einer spezifischen Dekarboxylase, die die Umwandlung des erwähnten Produktes zum Koproporphyrinogen III katalysiert [7]. Die Gruppe von Shemin untersuchte die enzymatische Synthese und die Umwandlung von ALS, des PBG-Vorläufers, und erhielt Extrakte aus photosynthesefähigen Bakterien, welche die ALS-Synthese aus Succinyl-CoA und Glykokoll katalysierten [27].

Gleichzeitig mit den durch die Amerikaner durchgeführten Untersuchungen wurde eine Mitteilung aus dem Laboratorium von Roux [14] in Frankreich veröffentlicht, welche über eine in den Tabakpflanzen beobachtete Inkorporation von ^{14}C -ALS sowohl in Protochlorophyll (bei Dunkelheit) wie auch in Chlorophyll *a* und in geringeren Mengen in Chlorophyll *b* (bei Tageslicht) berichtete. Die Endetappe der Biosynthese des Chlorophylls *a* wurde neuerdings in verschiedenen Laboratorien untersucht, wobei im Granick-Schema eine Modifikation eingeführt

¹ PBG — Porphobilinogen, ALS — δ -Aminolävulinsäure.

wurde, nach welcher Magnesium-Vinyl-Phäoporphyrin α_5 zunächst einer Photoreduktion zum Chlorophyllid *a* und später einer Esterifikation unterliegen kann [17, 18, 44, 45]. Die Beziehungen zwischen den beiden Chlorophyll-Komponenten bei der Biosynthese stellen in den letzten Jahren das Objekt einer ganzen Reihe von Untersuchungen sowjetischer Forscher mit $^{14}\text{CO}_2$ dar. Diese Autoren neigen zur Ansicht, dass das Chlorophyll *b* in den höheren Pflanzen aus dem Chlorophyll *a* entsteht [34, 35, 36].

In dieser Weise werden die einzelnen Glieder in der Kette bewiesen. Für diese Reaktionskette sprechen besonders auch die viel umfangreicheren Ergebnisse der Untersuchungen über die Häm-Biosynthese in den Erythrozyten. Diese Untersuchungen, welche mit der Entdeckung des Glykokolls als Protoporphyrinvorläufers durch Shemin und Rittenberg [33] begonnen wurden, ergeben ein prächtiges Bild von logisch verbundenen experimentellen Daten. Schon im Jahre 1955 konnte Shemin [32] auf dem Kongress für Biochemie in Brüssel die Lösung der wichtigsten Probleme dieser Biosynthese mitteilen. Er bewies, dass alle Kohlenstoffatome aus der ALS entstehen, welche im sogenannten Bernstein-säure-Glykokoll-Zyklus gebildet wird. Dieser ist nach Shemin ein universeller Weg für die Biosynthese aller Porphyrine, einschliesslich des Chlorophylls, und steht mit dem hypothetischen Schema von Granick im Einklang.

So hätte man den Eindruck, dass nur das Schliessen des fünften Ringes in dem Magnesium-Protoporphyrin-Molekül mit Bildung von Protochlorophyllid *a* (Magnesium-Vinyl-Phäoporphyrin α_5) das fehlende Glied in der Kette darstellt. Anderseit ergeben sich unvermeidlicherweise bis zur endgültigen Lösung des Problems immer neue Zweifel. Ausser dem erwähnten Glied in der Chlorophyll-Biosynthese sind bisher auch die Umwandlung des Koproporphyrinogens III zum Protoporphyrin wie auch die Magnesium-Inkorporation nicht aufgeklärt worden. Ferner konnte bisher die Synthese der ALS aus Glykokoll in den höheren Pflanzen nicht bestätigt werden.

Es ist möglich, dass in Bezug auf die Porphyrin-Biosynthese einige Unterschiede im Tier und der Pflanze bestehen. Darauf weist hin, dass das Häm in den Erythrozyten der Säugetiere keiner Erneuerung unterliegt, während das Chlorophyll sich in einem dynamischen Zustand befindet [30, 42]. In der Tat zeigt sich, dass in *Chlorella* ^{14}C aus der Karboxylgruppe des Glykokolls in das Chlorophyll aufgenommen wird [13]. Eine ähnliche Inkorporation hat man auch beim Häm in den Knöllchen der Soja-Bohne beobachtet [29]. Im Gegensatz dazu nimmt das Karboxylkohlenstoffatom des Glykokolls an der Häm-Synthese in Tieren keinen Anteil, weil es bei der ALS-Bildung als CO_2 abgespalten wird.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die Dynamik der Inkorporation des Karboxyl- und Methyl-Kohlenstoffs des Glykokolls in Chlorophyll *a* und *b* durch *Chlorella vulgaris* mitgeteilt.

MATERIAL UND METHODEN

Chlorella vulgaris - Kulturen. Die Alge *Chlorella vulgaris* (Stamm „211/11m“, auch „Cornell 11“ genannt, aus der „Culture Collection of Algae and Protozoa“, Universität Cambridge, Grossbritannien) wurde auf steriler Nährflüssigkeit vom Volumen 100 ml je Kölbchen gezüchtet. Die Nährlösung wurde nach Della Rosa *et al.* bereitet [13]. Die Ausgangskultur wuchs 5 - 6 Tage lang bei 18 - 20° unter normalen Belichtungsbedingungen. Sodann wurde die Algensuspension in parallele Versuchskulturen verteilt.

In den Vorversuchen wurden „normale“ Kulturen (bei etwa 20° mit weissem Licht 1 K-Lux ununterbrochen belichtet) verwendet. Sie wurden nach 6 Tagen, d.h. bei maximalem Ergrünen, zur Inkubation benutzt.

Die „synchronisierten“ Kulturen andererseits wurden erhalten, indem man die Algen 4 Tage lang wechselweise belichtete (16 Std. weisses Licht 1 K-Lux bei 25 - 30° und 8 Std. Dunkelheit bei 20 - 25°) und dann 2 Tage in Dunkelheit hielt. Die mikroskopische Untersuchung der Suspension zeigte in Übereinstimmung mit dem Tamiya-Zyklus [26, 41], dass die anwesenden Zellen sich grösstenteils im Teilungsstadium befinden. Man belichtete dann die Kulturen 2 Std. mit weissem Licht 1 K-Lux, um aktive Zellen D_0 zu erhalten. Diese wurden dann zur Inkubation benutzt.

Inkubation mit ^{14}C -Glykokoll. Als markierte Substrate wurden $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glykokoll und $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Glykokoll der spezifischen Aktivität von etwa 50 μC per mg angewendet. Die Präparate waren chromatografisch auf Reinheit untersucht worden, wobei keine anderen radioaktiven Substanzen vorgefunden wurden. Die Isotopendosis betrug 5 bzw. 10 μC per Kultur, d.h. per etwa 100 ml Suspension. In allen Fällen wurden je 2 - 3 parallele Proben inkubiert.

Die Zeitdauer der Inkubation lag zwischen 15 min. und 24 Std. In kurzzeitigen Versuchen (bis 6 Std.) wurden die Isotope unter aseptischen Bedingungen eingeführt. Im Falle der 24-Stunden-Inkubation wurde steril gearbeitet. Während der Inkubation wurden die Kulturen mit weissem Licht 1 K-Lux belichtet und oft geschüttelt. In dynamischen Versuchen wurden nach verschiedener Zeit je 100, 50 oder 30 ml Suspension entnommen. Die Angabe „Nullzeit“ bezieht sich auf Proben,

die nicht später als 10 bis 15 min. nach der Einführung des Isotops entnommen wurden.

Das Material wurde zunächst nach der Inkubation im kochenden Wasserbad 5 min. erhitzt. Da aber dieses Verfahren zu einer teilweisen Zersetzung des Chlorophylls führte, wurde es in späteren Untersuchungen verlassen; die Reaktionen wurden dann durch Zugabe von 0,2% HgCl_2 zum Stillstand gebracht. Die Suspension wurde zentrifugiert (5000 U/min., 15 min. bei 0°), vier bis fünfmal mit Wasser gewaschen und nach dem Einfrieren in der Dunkelheit aufbewahrt. Die Ausbeute aus einer 100-ml-Probe betrug etwa 500 - 750 mg frischer bzw. 100 - 150 mg trockener Algensubstanz.

Isolierung und Bestimmung von Chlorophyll a und b. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden in grünem Lichte 25 Lux durchgeführt. Gefrorenes Material wurde unter Zugabe von mit Methanol gewaschenem Sand und eines kleinen Volumens Azeton im Mörser gepulvert. Aus diesem trockenen Materiale wurde mit Methanol „Roh-Chlorophyll“ nach Strain und Manning [39] ausgezogen. Der Extrakt wurde dann mit Petroläther (Kp. $30 - 50^\circ$) ausgeschüttelt. Die so bereitete, xanthophyllfreie Lösung wurde mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und dann zentrifugiert.

Die Lösung wurde im CO_2 -Strom zum Volumen von 0,5 ml eingedampft und dann auf eine Startlinie auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen. Das Papier war vorher mit Saccharose imprägniert worden [38]. Die Chromatogramme wurden aufsteigend mittels einer Mischung von Benzin (Kp. $50 - 70^\circ$), Petroläther (Kp. $30 - 50^\circ$) und Azeton im Verhältnis 10 : 2,5 : 2 entwickelt (Bauer [1]). Bei einer Entwicklungszeit von 2 Std. und bei $5 - 10^\circ$ betrug die Weglänge 25 - 30 cm. Dabei wurde das Chlorophyll in zwei Komponenten mit R_f von ungefähr 0,65 (Chlorophyll *a*) und 0,35 (Chlorophyll *b*) geteilt. Die Papierstreifen über, zwischen und unter den Chlorophyllflecken zeigten eine Radioaktivität, die einige Prozent der Gesamtaktivität des Chlorophylls *a* nicht überstieg.

Mit Hilfe von Äthyläther wurden Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* separat in Envolumina von 10 und 5 ml eluiert. Die spektrophotometrische Extinktion wurde bei den zwei Wellenlängen maximaler Absorption gemessen. Der Gehalt an Chlorophyll *a* wurde auf Grund der Messungen bei 430 und 662 $m\mu$ und der Gehalt an Chlorophyll *b* aus den Messungen bei 455 und 644 $m\mu$ berechnet wobei die Absorptionskoeffizienten nach Smith und Benitez [37] benutzt wurden. Die Ausbeute aus einer 30-ml-Probe betrug ungefähr 50 μg Chlorophyll *a* und 5 μg Chlorophyll *b*.

Die Eluate wurden unter Zugabe einer bekannten Menge (etwa 10 mg C) inaktiver Glucose als Träger bis zur Trockne eingedampft und

dann nach Van Slyke und Folch [43] nass verbrannt. Hierauf wurde das CO_2 in Bariumkarbonat übergeführt.

Radioaktivitätsmessungen. Man bestimmte ^{14}C als CO_2 im hochempfindlichen Gas-Geiger-Zählrohr nach Broda *et al.* [11, 40]. Zu diesem Zwecke wurde das $^{14}\text{CO}_2$ aus dem Bariumkarbonat im Vakuum mit Perchlorsäure befreit, mit Magnesiumperchlorat getrocknet und in einem in flüssige Luft eingetauchten U-Rohr kondensiert. Nachdem die letzten Luftspuren durch Pumpen entfernt worden waren, wurde das CO_2 aufgetaut, sein Druck manometrisch gemessen und das Gas (nötigenfalls unter Zugabe von etwa 5% Benzol) ins Zählrohr eingebracht. Das Zählrohr wurde mit einem elektronischen Löschkreis verbunden und nach Feststellung des Konstanzbereiches (ungefähr 400 Volt) die $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität gemessen.

Die Gesamtaktivität der Probe in Stößen/min. (A) wird aus der gemessenen Aktivität (A_m) unter Berücksichtigung folgender Angaben berechnet [39a]: Leerwert (L), Zählausbeute (f), CO_2 -Druck in mm Hg (p), Vakuum-Apparatur-Volumen in ml (v), Temperatur in $^\circ\text{K}$ (T) und Gehalt an Kohlenstoff in der Probe in mg (C).

$$A = (A_m - L) f \frac{760}{p} \frac{22,4}{v} \frac{T}{273} \frac{C}{12}$$

ERGEBNISSE

In Vorversuchen mit 1- ^{14}C -Glykokoll und 2- ^{14}C -Glykokoll wurde der Einfluss der Menge an markiertem Substrat auf den ^{14}C -Gehalt in *Chlorella vulgaris* untersucht. Es wurde festgestellt, dass in beiden Fällen die Aktivität des Pflanzenmaterials der in die Kultur eingeführten Menge annähernd proportional ist (Tabelle 1).

Tabelle 1

Gehalt an ^{14}C in Algen nach 24-Stunden-Inkubation mit verschiedenen Mengen an radioaktivem Glykokoll

^{14}C -Menge (μC)	Spezifische Aktivität der Algen nach der Inkubation (St. /min $\cdot 10^{-3}$ per mg C)	
	1- ^{14}C	2- ^{14}C
0,05	0,17	0,13
0,15	0,48	0,60
0,5	1,22	1,16

Auf Grund einiger weiteren Versuche [10] wurden im allgemeinen 5 μC per Kultur als minimale Menge angewandt. Bei dieser Menge zeigten

sowohl das Pflanzenmaterial wie auch das Chlorophyll nach 24-Stunden-Inkubation unter den Versuchsbedingungen eine spezifische Aktivität von einigen tausend Stößen per Minute per mg C auf; die Messungen sind dann bequem.

In diesen Experimenten konnte festgestellt werden, dass von der eingeführten ^{14}C -Menge nach 24 Std. etwa 30% in den Algenzellen und etwa 50% in der Nährlösung enthalten waren. Es scheint, dass die Zellen in dieser Zeit ungefähr die Hälfte des markierten Glykokolls aus der Nährlösung aufnehmen, aber einen Teil des ^{14}C durch Atmung ausscheiden.

In der ersten Serie unserer Versuche über die Chlorophyll-Synthese beabsichtigten wir die Ergebnisse von Della Rosa *et al.* [13] zu prüfen. Die genannten Autoren haben nämlich festgestellt, dass an der Chlorophyll-Synthese in *Chlorella* nicht nur das Methylenkohlenstoff (C_{Meth}) sondern auch das Karboxylkohlenstoff (C_{Karb}) des Glykokolls teilnimmt. Deshalb haben wir den ^{14}C -Gehalt des Chlorophylls nach Inkubation mit Glykokoll-1- ^{14}C und -2- ^{14}C verglichen und zwar wurde das Isotop erst nach dem Ergrünen der Kulturen hinzugefügt und die Inkubation dann nur 24 Std. fortgesetzt. Es wurde nämlich angenommen, dass bei relativ kurzer Inkubation mögliche Sekundäreffekte („Wanderung“ von ^{14}C) geringe Bedeutung haben würden. Einige Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Gehalt an ^{14}C im Chlorophyll a und b nach 24-Stunden-Inkubation mit $5 \mu\text{C}$ Glykokoll

Kulturen bei ununterbrochenem Licht gezüchtet

Eingesetztes Glykokoll	Spezifische Aktivität der Chlorophylle (St./min $\cdot 10^{-4}$ per mg C)			
	a		b	
	Kultur I	Kultur II	Kultur I	Kultur II
1- ^{14}C	1,82	1,69	0,63	1,13
2- ^{14}C	2,17	2,58	2,20	2,12

Die in der Tabelle angeführten Werte der Inkorporation ^{14}C in Chlorophyll nach 24 Std. Inkubation stimmen im Wesentlichen mit den Ergebnissen von Della Rosa *et al.* überein, die die Inkubationsdauer auf einige Tage ausgedehnt haben. Die Inkorporation von C_{Karb} ist kleiner als die von C_{Meth} . Die Grössenordnung des Verhältnisses $\text{C}_{\text{Meth}}/\text{C}_{\text{Karb}}$ ist in beiden Chlorophyllen ungefähr dieselbe, es ist aber in Chlorophyll a etwas kleiner als in Chlorophyll b.

In der zweiten Serie unserer Versuche wurde die Zeit der Inkubation weiter eingeschränkt und auf Änderung der Inkorporation geprüft. Die Experimente wurden nun dynamisch eingeordnet, d.h. jeder Kultur wurden in gewissen Abständen mehrere Proben entnommen. Die ersten Beobachtungen wurden nach einer „Nullzeit“ (10 - 15 min.) und weitere Beobachtungen nach einer Stunde vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten, dass im „Nullzeit“-Experiment die C_{Karb} -Aktivität im Chlorophyll *a* grösser war als die C_{Meth} -Aktivität; dagegen war nach einer Stunde die C_{Meth} -Aktivität grösser. Jedoch stimmten die Ergebnisse mit verschiedenen Kulturen bei „Nullzeit“ nicht überein. Deshalb wurde bei späteren Versuchen die erste Beobachtung erst eine Stunde nach der Einführung des ^{14}C vorgenommen. Ausserdem wurden von nun an nur „synchronisierte“ Kulturen zur Anwendung gebracht.

Tabelle 3

^{14}C -Aktivitätsänderungen im Chlorophyll *a* und *b*
„synchronisierte“ Kulturen, Aktivität des Glykokolls: $10 \mu\text{C}$

Substrat	Inkubationsdauer (Std.)	Kultur Nr	Spezifische Aktivität der Chlorophylle (St./min $\cdot 10^{-4}$ per mg C)	
			<i>a</i>	<i>b</i>
1- ^{14}C -Glykokoll	1	I	1,29	0*
		II	0,91	0
		III	0,85	0
	6	I	4,96	5,36
		II	5,17	6,71
		III	5,62	6,43
2- ^{14}C -Glykokoll	1	I	0,59	3,09
		II	0,75	—
		III	0,70	1,73
	6	I	8,80	21,8
		II	6,55	9,72
		III	12,8	—

* Bei den drei genannten Proben liess sich keine Aktivität über dem Leerwert feststellen.

Ehe die weiteren Ergebnisse besprochen werden, soll auf die beobachteten Schwankungen der gemessenen Aktivitäten in parallel gezüchteten Kulturen hingewiesen werden. Diese Schwankungen lassen sich mit der Ungleichmässigkeit einer „normalen“ *Chlorella*-Population (d.h. einer Population von bei ununterbrochener Belichtung gezüchteten Algen) erklären. Infolge des Mangels an Belichtungsrythmik sind in diesen Kulturen Zellen verschiedener Entwicklungsstadien vorhanden. Offenbar

stellt eine ungleichmässige Zellpopulation kein gutes Ausgangsmaterial für Untersuchungen über die Chlorophyll-Biosynthese dar. Diese Vermutung wurde durch den Vergleich mit Versuchen mit „synchronisierten“ Kulturen, die aktive Zellen von Typus D_e enthielten, bestätigt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse von Versuchen über die Inkorporationsdynamik von C_{Karb} und C_{Meth} zusammengestellt, die bei 1- und 6-stündiger Inkubation solcher Kulturen erhalten wurden. Die angegebenen Zahlenwerte müssen als zuverlässig betrachtet werden, weil die Übereinstimmung zwischen parallelen Kulturen gut war.

Diese Resultate beweisen, dass der Einbau von Glykokoll-Kohlenstoffatomen in Chlorophyll *a* und *b* in verschiedener Weise verläuft. Nach einer Stunde werden die beiden Arten von C-Atomen fast in gleichem Masse in Chlorophyll *a* aufgenommen. Dagegen war zu diesem Zeitpunkt im Chlorophyll *b* nur $^{14}\text{C}_{\text{Meth}}$ zu finden und $^{14}\text{C}_{\text{Karb}}$ war abwesend. Die C_{Meth} -Konzentration war im Chlorophyll *b* höher als im Chlorophyll *a*.

Die Verhältnisse ändern sich nach 6-stündiger Inkubation deutlich. In beiden Chlorophyll-Komponenten erfolgt ein intensiver Einbau von C_{Meth} und ihre spezifischen Aktivitäten steigen während dieser Zeit auf ein Vielfaches an. Noch deutlicher war der Unterschied zwischen den Änderungen der Aktivitäten nach Inkubation mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glykokoll. Im Falle von Chlorophyll *b* ändert sich die spezifische Aktivität von Null bis auf $6,16 \cdot 10^4$ (Mittelwert), d.h. die spezifische Aktivität ist dann dieselbe wie jene des Chlorophylls *a* nach 6 Std. Die Unterschiede zwischen der Inkorporation des Glykokolls in Chlorophyll *a* und *b*, die nach einer Stunde so deutlich waren, verschwinden nun völlig. Die Ergebnisse werden nun jenen ähnlich, die in unserer Arbeit nach 24 Std. und in den Versuchen von Della Rosa *et al.* nach mehrtägiger Inkubation erhalten wurden.

DISKUSSION

In der Porphyrin-Biosynthese nach dem Schema von Shemin [32] ist die Anwesenheit des ganzen Glykokoll-Moleküls notwendig, das zwei Kohlenstoffatome zur Ausgangsreaktion liefert. Glykokoll kann nicht durch C_1 -Verbindungen wie Methylamin, Methanol, Formaldehyd oder Ameisensäure ersetzt werden. Trotzdem ist im Häm nur ein C-Atom des Glykokolls — und zwar aus seiner Methylengruppe — vorhanden; dagegen ist das C-Atom aus der Karboxylgruppe abwesend.

Ein indirekter Beweis für die Richtigkeit des Shemin-Schemas in Beziehung auf die Chlorophyll-Biosynthese war die Feststellung von Salomon *et al.* [31], dass die α -C-Atome des Glykokolls und der Essigsäure als Prekursoren des Chlorophylls angesehen werden können. Ähnlich wie

in der Häm-Synthese nimmt ^{14}C -Ameisensäure an der Bildung der Phorbinstruktur des Chlorophylls fast keinen Anteil, doch werden 90% des im Chlorophyll enthaltenen Isotops in der Ester-Methylgruppe vorgefunden [25]. Ausserdem konnten Duranton *et al.* [14] in den letzten Jahren feststellen, dass der Karbonyl-Kohlenstoff der ALS sich in beiden Chlorophyll-Komponenten befindet. Dagegen haben Della Rosa *et al.* [13] bewiesen, dass — im Gegensatz zum Häm — nicht nur der Methylen-Kohlenstoff (C-2), sondern (in etwas kleinerem Masse) auch der Karboxyl-Kohlenstoff des Glykokolls (C-1) sich nach einige Tage dauernder Inkubation der *Chlorella*-Zellen in der Phorbinstruktur des Chlorophylls *a* und *b* befindet.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse werfen neues Licht auf die Frage des Einbaus des Karboxyl-Kohlenstoffs des Glykokolls in die Chlorophyll-Moleküle. Das nach 24 Std. erhaltene Bild der Inkorporation (Tabelle 2) ist mit den Ergebnissen der Arbeit von Della Rosa *et al.* im Einklang, d.h. in beiden Chlorophyllen konnte annähernd die gleiche Inkorporation des $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Atoms des Glykokolls festgestellt werden. Ganz anders dagegen ist die Verteilung dieses Atoms zwischen Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* nach einstündiger Inkubation (Tabelle 3).

Der Karboxyl-Kohlenstoff — wie auch der Methylen-Kohlenstoff des Glykokolls — wird bereits eine Stunde nach Zufuhr des Isotops zur *Chlorella*-Kultur in beträchtlicher Menge im Chlorophyll *a* vorgefunden. Im Chlorophyll *a*-Molekül ist die C-1-Konzentration nach Ablauf dieser Zeit nicht kleiner als die C-2-Konzentration. Allerdings kann aus diesen Ergebnissen der Mechanismus der Inkorporation noch nicht erschlossen werden. Aus den Ergebnissen nach einstündiger Inkubation müsste die Möglichkeit einer Inkorporation des C-1 des Glykokolls über den Zitronensäurezyklus ausfallen, obwohl Godnev [16] wie auch Loomis und Stumpf [28] diesen Weg für wahrscheinlich halten. So z. B. schreibt Godnev [16] wörtlich: „...dass der Einbau der Carboxyl-Gruppe des Glykokolls nur ein Zehntel des Grammatoms darstellt, also ein verschwindend kleiner Wert ist, und dass also die Teilnahme dieses Carboxyls nur eine indirekte sein kann“. Eine solche Inkorporation des Karboxyl-Kohlenstoffs müsste nämlich im Verhältnis zur primären ALS-Synthese aus dem Methylenkohlenstoff ein Sekundäreffekt sein. Ein Solches wird aber durch die gleich grosse, in unserer Arbeit nach 1 Std. beobachtete Inkorporation der beiden Arten von Atomen in das Chlorophyll *a* ausgeschlossen. Wenn man den Einbau der beiden C-Atome des Glykokolls in Form eines intakten C_2 -Körpers annimmt, dann müsste man eher vermuten, dass nicht die ALS, sondern ein anderes Produkt einer Glykokoll-Umwandlung der unmittelbare Ausgangsstoff in der Biosynthese des Chlo-

rophylls *a* wäre. Fernerhin kann man die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass mehrere Inkorporationsmechanismen von C-1 und C-2 des Glykokolls in Chlorophyll *a* bestehen. Doch muss eine Sekundärinkorporation des Karboxylatoms C in Chlorophyll *a* auf dem Weg über eine Assimilation von vorher abgespaltenem CO₂ im 1-Stunden-Experiment als unwahrscheinlich abgelehnt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über das Chlorophyll *b* sprechen dafür, dass zwei verschiedene Mechanismen für die C-1- und C-2-Inkorporation aus dem Glykokoll bestehen. Die Inkorporation des von C-1 in das Chlorophyll *b* gestaltet sich nach 6-Stunden-Inkubation der Algen ähnlich wie im Falle von Chlorophyll *a* und ist nur ein wenig in quantitativer Hinsicht verschoben; die Inkorporation von C-1 ist kleiner als die von C-2. Dagegen herrschen in Bezug auf den Einbau des Karboxyl-Kohlenstoffs des Glykokolls in das Chlorophyll *b* nach einstündiger Inkubation ganz andere Verhältnisse. Unerwarteterweise fehlte er nach Ablauf dieser Zeit im Chlorophyll *b*, obgleich die eingebaute Menge des C-2 sogar grösser war als im Chlorophyll *a*. Wir vermuten daher, dass die Mechanismen der Inkorporation von Karboxyl-Kohlenstoff und Methylen-Kohlenstoff verschieden sein müssen.

Della Rosa *et al.* beobachteten nach mehrtägiger Inkubation der *Chlorella* zwar verschiedene Inkorporation von C-1 und C-2, aber der Einbau eines und desselben C-Atoms des Glykokolls war in beiden Chlorophyllen fast gleich. Diese Beobachtungen führten die obgenannten Forscher zur Schlussfolgerung, dass die beiden Chlorophyll-Komponenten demselben unmittelbaren Ausgangsstoff entstammen und dass das Chlorophyll *b* nicht aus dem Chlorophyll *a* entsteht. Nach unseren Ergebnissen scheint aber diese Erklärung nicht richtig zu sein, da das Verhältnis der Inkorporation der verschiedenen C-Atome des Glykokolls in den beiden Chlorophyllen sich mit der Zeit in verschiedener Weise ändert (Tabelle 3). In den Untersuchungen über die Dynamik der Inkorporation von ¹⁴C aus Kohlendioxyd in die beiden Chlorophyll-Komponenten in höheren Pflanzen konnten Shlyk und Mitarbeiter feststellen, dass der ¹⁴C-Gehalt im Chlorophyll *b* immer geringer war als im Chlorophyll *a* [34, 35, 36]. Im Gegensatz zu Della Rosa *et al.* vermuteten die erwähnten Autoren, dass die Biosynthese von Chlorophyll *b* über das Chlorophyll *a* vor sich geht.

Die Frage des Mechanismus der Biosynthese der beiden Chlorophyll-Komponenten kann auf Grund der bisherigen Forschungen noch nicht einwandfrei beantwortet werden. Es kann noch nicht entschieden werden, ob die Chlorophylle *a* und *b* gleichzeitig und unabhängig voneinander in der Pflanze entstehen. Aus der vorliegenden Arbeit ist jedoch ersichtlich, dass das Bild der Inkorporation sich mit der Inkubationsdauer mit mar-

kiertem Substrate ändert. Es scheint daher, dass $^{14}\text{CO}_2$ in Untersuchungen über den Mechanismus der Chlorophyll-Biosynthese kein passendes Substrat darstellt.

Im Zusammenhang mit den in kurzzeitigen Versuchen beobachteten Unterschieden zwischen der C-1- und der C-2-Inkorporation aus Glykokoll in beide Chlorophylle haben wir an anderer Stelle [12] die Vermutung ausgesprochen, dass die Wege der Biosynthese des Chlorophylls *a* und *b* verschieden sein können. Man müsste aber noch die Möglichkeit berücksichtigen, dass die Mechanismen des Einbaus von Glykokoll-Karboxyl-Kohlenstoff im Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* identisch sind, aber mit verschiedenen Geschwindigkeiten verlaufen.

Unsere Beobachtungen stehen mit dem Schema von Shemin nicht im Widerspruch. Sie können erklärt werden, wenn man die Möglichkeit verschiedener Mechanismen der Inkorporation von C-1 und C-2 des Glykokolls annimmt. Wir haben den Eindruck, dass der Methylen-Kohlenstoff auf dem für das Häm bewiesenen Weg eingebaut sein könnte, dagegen die Fähigkeit zur Inkorporation des Karboxyl-Kohlenstoffs eine spezifische Eigenschaft des Chlorophylls wäre. Die in der Inkorporation dieses Atoms nach einer Stunde ersichtlichen Unterschiede und das ähnliche Isotopen-Bild in beiden Chlorophyllen nach 6 Std. sprechen dafür, dass ^{14}C -1 des Glykokolls nicht nur in der Biosynthese *de novo*, sondern auch in einem Austauschvorgang der schon gebildeten Moleküle der beiden Chlorophylle eingeschlossen sein könnte.

Zum Schluss möchte ich Frau Dr. W. Rücker (Anorganisch- und Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Wien), die mir mit den Radioaktivitätsmessungen im hohem Masse behilflich war, herzlich danken. Herrn Professor E. Broda in Wien, wo diese Arbeit begonnen wurde, und Herrn Professor I. Reifer in Warschau, wo sie zum Abschluss gelangte, bin ich für Anregung und Diskussionen sehr dankbar.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Inkorporationsdynamik der Kohlenstoffatome 1 und 2 des Glykokolls in Chlorophyll *a* und *b* in Kulturen von *Chlorella vulgaris* wurde unter Anwendung von Radiokohlenstoff untersucht.

2. Es wurde bewiesen, dass nach einstündiger Inkubation beide Atome im Chlorophyll *a* eingebaut werden. Im Chlorophyll *b* wurde nach dieser Zeit kein Karboxyl-Kohlenstoff des Glykokolls gefunden, dagegen war die Inkorporation des Methylen-Kohlenstoffs nicht kleiner

als im Chlorophyll *a*. Gleiche ^{14}C -Konzentrationen in beiden Chlorophyllen wurden erst bei 6-stündiger und längerer Inkubationsdauer beobachtet; dabei waren die spezifischen Aktivitäten der Chlorophylle im Falle des 2- ^{14}C -Glykokolls höher als im Falle von 1- ^{14}C -Glykokoll.

3. Es wird angenommen, dass die beiden C-Atome des Glykokolls auf verschiedenen Wegen in die Chlorophyll-Moleküle eingeschlossen werden, wobei für das Methylen-Kohlenstoff der für das Häm bewiesene Weg gelten könnte. Die in der Inkorporation des Karboxyl-Kohlenstoffs nach einer Stunde ersichtlichen Unterschiede im Zusammenhang mit dem fast identischen Bild in beiden Chlorophyllen nach 6 Std. sprechen dafür, dass dieses Atom nicht nur in der Biosynthese *de novo*, sondern auch in einem Austauschvorgang der schon gebildeten Chlorophyll-Moleküle eingebaut sein könnte.

L I T E R A T U R

- [1] Bauer L., *Naturwiss.* **39**, 88, 1952.
- [2] Bogorad L., *Federation Proc.* **14**, 184, 1955.
- [3] Bogorad L., *Plant Physiol.* **30**, XIV, 1955.
- [4] Bogorad L., *Science* **121**, 878, 1955.
- [5] Bogorad L., *J. biol. Chem.* **233**, 501, 1958.
- [6] Bogorad L., *J. biol. Chem.* **233**, 510, 1958.
- [7] Bogorad L., *J. biol. Chem.* **233**, 516, 1958.
- [8] Bogorad L., Granick S., *J. biol. Chem.* **202**, 793, 1953.
- [9] Bogorad L., Granick S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **39**, 1176, 1953.
- [10] Broda E., Brzeski W., Rücker W., *I krajowe sympozjum poświęcone stosowaniu izotopów promieniotwórczych w biologii, medycynie i rolnictwie*, Warszawa 1959.
- [11] Broda E., Rohringer G., *Z. Elektrochem.* **58**, 634, 1954.
- [12] Brzeski W., Rücker W., *Nature* **185**, 922, 1960.
- [13] Della Rosa R. J., Altman K. I., Salomon K., *J. biol. Chem.* **202**, 771, 1953.
- [14] Durant J., Galmiche J. M., Roux E., *C. R. Acad. Sci., Paris* **246**, 992, 1958.
- [15] Gibson K. D., Neuberger A., Scott J. J., *Biochem. J.* **61**, 618, 1955.
- [16] Godnev T. N., in: *The Origin of Life on the Earth*, Reports on the International Symposium (ed. A. Oparin), Moscow 1957, S. 383.
- [17] Godnev T. N., Shlyk A. A., Lakhnovitch J. P., *Biull. Inst. Biol. A. N. BSSR*, **2**, 79, 1957.
- [18] Godnev T. N., Shlyk A. A., Lakhnovitch J. P., *Fiziol. Rastanii* **4**, 393, 1957.
- [19] Granick S., *J. biol. Chem.* **172**, 717, 1948.
- [20] Granick S., *J. biol. Chem.* **175**, 333, 1948.
- [21] Granick S., *J. biol. Chem.* **183**, 713, 1950.
- [22] Granick S., *Harvey Lectures* **44**, 220, 1950.
- [23] Granick S., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **2**, 115, 1951.
- [24] Granick S., Bogorad L., Jaffe H., *J. biol. Chem.* **202**, 801, 1953.
- [25] Green M., Altman K. I., Salomon K., *Nature* **179**, 375, 1957.
- [26] Hase E., Morimura Y., Tamiya H., *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 149, 1957.

- [27] Kikuchi G., Kumar A., Talmage P., Shemin D., *J. biol. Chem.* **233**, 1214, 1958.
- [28] Loomis W. D., Stumpf P. K., in: *Handbuch der Pflanzenphysiologie* (Herausg. W. Ruhland), Band 8, S. 262, Springer-Verlag Berlin 1958.
- [29] Richmond J. E., Salomon K., Caplin S., *Nature* **174**, 34, 1954.
- [30] Roux E., Husson C., *C. R. Acad. Sci. Paris* **235**, 1154, 1952.
- [31] Salomon K., Altman K. I., Della Rosa R. J. *Federation Proc.* **9**, 222, 1950.
- [32] Shemin D., *Conférences et rapports, 3ème Congrès International de Biochimie Bruxelles 1955*, Liège 1956, S. 197.
- [33] Shemin D., Rittenberg D., *J. biol. Chem.* **159**, 567, 1945.
- [34] Shlyk A. A., Godnev T. N., Rotfarb R. M., Lakhnovitch J. P., *Biull. Inst. Biol. A. N. BSSR*, **2**, 59, 1957.
- [35] Shlyk A. A., Godnev T. N., Rotfarb R. M., Lakhnovitch J. P., *Dokl. AN SSSR* **113**, 1324, 1957.
- [36] Shlyk A. A., Godnev T. N., Lakhnovitch J. P., Rotfarb R. M., Junevitch W. I., *Biull. Inst. Biol. A. N. BSSR* **2**, 65, 1957.
- [37] Smith J. H. C., Benitez A., in: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Herausg. K. Paech und M. V. Tracey), Band 4, S. 142, Springer-Verlag, Berlin 1955.
- [38] Sporer A. H., Freed S., Sancier K. M., *Science* **119**, 68, 1954.
- [39] Strain A. H., Manning W. M., *J. biol. Chem.* **144**, 625, 1942.
- [39a] Suschny O., Kellner G., Broda E., Figdor B., Rucker W., *Exptl. Cell Research* **14**, 316, 1958.
- [40] Sverak L., *Mikrochim. Acta*, Heft 1—6, 1068, 1956.
- [41] Tamiya H., Iwamura T., Shibata K., Hase E., Nihei T., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 23, 1953.
- [42] Turtchin F. V., Guminskaja M. A., Plyshevskaja E. G., *Fiziol. Rastanii* **2**, 3, 1955.
- [43] Van Slyke D. D., Folch J., *J. biol. Chem.* **136**, 509, 1940.
- [44] Wolff J. B., Price L., *Plant Physiol.* **31**, XXXI, 1956.
- [45] Wolff J. B., Price L., *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 293, 1957.

DYNAMIKA INKORPORACJI ATOMÓW WĘGLA GLICYNY
DO CHLOROFILU *a* i *b*

Streszczenie

1. Zbadano dynamikę inkorporacji atomów C-1 i C-2 ^{14}C -glicyny do chlorofilu *a* i *b* w kulturach *Chlorella vulgaris*.

2. Wykazano, że obydwa atomy ulegają włączeniu do chlorofilu *a* w ciągu 1-godzinnej inkubacji. W chlorofilu *b* nie znaleziono po tym czasie karboksylowego węgla glicyny, podczas gdy inkorporacja węgla metylenowego nie była mniejsza niż w chlorofilu *a*. Dopiero po 6 godzinach i dłuższych okresach inkubacji obserwowano jednakowe stężenia ^{14}C w obydwóch chlorofilach, przy czym ich aktywności właściwe były wyższe w przypadku użycia 2- ^{14}C -glicyny jako substratu w porównaniu z 1- ^{14}C -glicyną.

3. Wnioskuje się, że obydwa atomy C glicyny włączają się do cząsteczek chlorofilu za pomocą różnego mechanizmu, przy czym metylenowy węgiel byłby wbudowywany na drodze udowodnionej dla hemu. Różnice w inkorporacji karboksylowego węgla po 1 godzinie, a zbliżony obraz po 6 godzinach w obydwóch chlorofilach nasuwają przypuszczenie, że atom ten może włączać się w procesie wymiany do już utworzonych cząsteczek chlorofilu a nie tylko w procesie ich syntezy *de novo*.

Otrzymano 13.2.1960.

JOAN KEILIN

**THE NATURE OF THE HAEMOPROTEIN IN THE EGGS
OF *PLANORBIS CORNEUS***

*Department of Veterinary Clinical Studies, School of Veterinary Medicine,
University of Cambridge*

The freshwater snail *Planorbis*, which is commonly found in ponds, has haemoglobin as its oxygen carrier instead of haemocyanin, the copper-containing respiratory pigment present in all other molluscs with the exception of a few species of lamellibranchs. This haemoglobin, which was first described by Lankester in 1869, has a molecular weight of 1,539,000 (Svedberg & Pedersen, 1940) and is dissolved in the plasma. Certain tissues of *Planorbis*, the muscles of the pharynx, radula and stomach and the connective tissue sheath surrounding the cerebral nerve ganglia were also found to contain a haemoglobin differing slightly from the blood haemoglobin in its spectroscopic properties (Berthier, 1947, 1948). The well known pink colour of the egg vesicles of *Planorbis* was shown by Berthier (1947) to be due to a haemochromogen with absorption bands at 563 and 532 m μ approximately. This haemochromogen appears to be secreted by the albumin gland which, in *Planorbis*, is bright red and turgid before laying, and shows the same absorption spectrum as the egg vesicle.

The haemochromogen in the eggs of *Planorbis* is of particular interest since its absorption spectrum resembles that of the haemochromogen which was first observed in the intestinal tract and digestive gland (hepatopancreas) of land snails by Sorby in 1876 and was later named hellicorubin by Krukenberg (1882). Sorby (1876) also claimed to have found this pigment in *Planorbis* in the digestive gland "and in another glandular organ with a granular structure" (most probably the albumin gland) but MacMunn (1883, 1885, 1886 *a* & *b*) who surveyed the distribution of this pigment in different animals and studied its properties, believed this haemochromogen to be absent in *Planorbis*. Since the amount of haemochromogen in the albumin gland is known to vary considerably,

according to the degree of reproductive activity, it is likely that the specimens examined by MacMunn must have been quiescent, since he could hardly have missed the brilliant colour and vivid spectrum of the fully active albumin gland.

Haemochromogens with absorption spectra very similar to those of the *Planorbis* egg and helicorubin, with α -bands lying in the region of 561 - 563 $m\mu$, have also been observed in a number of different invertebrates, molluscs and crustacea which have either haemoglobin or haemocyanin as their oxygen carrier. For example, the crustacean *Daphnia* has a haemochromogen, Daphniarubin, in its digestive tract while in the crustacean *Triops*, the eggs in the oviduct are bathed in a fluid red with haemochromogen which later passes into the egg shells (Fox, 1948, 1949, 1955). So far only some of the factors influencing the degree of formation of these pigments and their spectroscopic properties have been described but nothing is known of their biochemical reactions or possible biological function.

When helicorubin from the intestinal fluid of *Helix pomatia* and the haemochromogen from the digestive gland were purified and their properties compared, it was found that there were certain differences in their electrophoretic behaviour and absorption spectra. The term helicorubin was retained for the extracellular, intestinal haemochromogen, while the intracellular pigment from the digestive gland was named cytochrome *h* and it was tentatively suggested that helicorubin might possibly be derived from cytochrome *h*. In most of their other properties, however, no differences were found between helicorubin and cytochrome *h* and, as will be mentioned again later, both these haemoproteins have many properties in common with other cytochromes, particularly cytochromes *b* and *c* (J. Keilin, 1956, 1957).

The object of the present study was to determine some of the properties of the haemochromogen found in the egg vesicle of *Planorbis* and to compare them with those of helicorubin, cytochrome *h* and cytochrome *c*.

EXPERIMENTAL

Source of material

Large specimens, 2.5 - 3 cm. in diameter, of *Planorbis corneus* L., both black and red varieties, were obtained from dealers and kept in a glass tank. The eggs, which are embedded in a clear, firm jelly-like substance, are laid on the walls of the tank in flat oval masses about 8×15 mm. and containing a single layer of eggs.

As the clear jelly surrounding the eggs sets to a rubbery consistency,

it is extremely difficult to dissect out the eggs without rupturing them. They can only be removed from the mass immediately after laying before the jelly has had time to harden or towards the time of hatching of the young snails when it again becomes softer probably due to bacterial action. The quickest method to collect the haemochromogen was to withdraw the rather viscous egg contents by suction through a very fine capillary. As each egg mass contains an average of 40 egg vesicles of about 1.0 - 1.3 mm. diameter, spectroscopic techniques had to be adapted to deal with the very small amounts of material available.

Spectroscopic methods

For direct observation of the absorption spectrum of the haemoprotein a low dispersion microspectroscope was used. Solutions were examined in narrow flat-bottomed tubes (2.5×0.5 cm.) which were stood upright on the stage of the microspectroscope.

To examine an individual egg and the developing embryo within it, an objective was attached to the microscope, the prism of the microscope ocular swung aside and the slit opened to its full extent. The spectroscope could now be used as a microscope and focussed on a selected part of the field; the absorption spectrum of this area could then be examined after closing down the slit and replacing the prism. This instrument and the use of the double wedge trough to determine the concentration of a pigment in terms of a standard solution of the pigment contained in one compartment of the trough, were previously described by Keilin & Wang (1946).

The absorption spectrum in the visible and near ultraviolet region of the extracted haemochromogen was measured with a Unicam SP 500 spectrophotometer with a micro-cell attachment. Silica micro-cells of 1 cm. optical light path and requiring only 0.5 ml. solution were used. As the concentration of the pigment was not determined, the absorption spectrum was plotted in terms of the extinction E which is $\log I_0/I$ where I_0 and I are the intensities of the incident and transmitted light respectively.

Cytochrome *c* was prepared from horse heart by the method of Keilin & Hartree (1945).

RESULTS

THE HAEMOPROTEINS IN THE EGG VESICLE

When first laid, the eggs are pink and examination of a single egg with the microspectroscope shows only the absorption bands of the haemochromogen with an α -band at 560 $m\mu$ and a β -band at 530 $m\mu$.

Later when the embryo has grown and occupies more than half the volume of the egg, two types of absorption spectra may be seen: the haemochromogen bands in the vesicular fluid surrounding the embryo and in the embryo itself and the bands of oxyhaemoglobin at 575 and 550 $m\mu$ in the embryo. The newly hatched snails can be seen by transillumination to contain both haemoglobin and the haemochromogen, but it is difficult to assess the anatomical localisation of the latter pigment. After several days only the haemoglobin is seen; this may indicate either that the haemochromogen has disappeared or that it is merely masked by the haemoglobin and the increasing opacity of the shell.

When a newly laid egg mass is soaked in pyridine, to which sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) has been added, the absorption bands of the haemochromogen at 560 and 530 $m\mu$ gradually change to the positions of those of pyridine protohaemochromogen at 557 and 528 $m\mu$ respectively. The amount of pigment in an individual egg vesicle may therefore be determined with the microspectroscope by matching the intensity of its absorption bands with those of a standard solution of pyridine haemochromogen prepared from crystalline haemin and placed in one compartment of the double wedge trough standing on a platform in the light path of the comparative prism of the microspectroscope. Knowing the diameter of the egg vesicle, it is thus possible to calculate the concentration of the haemochromogen in a newly laid egg, or the total haemoprotein in an egg with a growing embryo. In the case of an average egg vesicle within a few days of being laid, the concentration of haemochromogen was 1.09×10^{-4} M. This concentration is about 50 times less than that of the haemoglobin in the mammalian red blood corpuscle which contains 34% haemoglobin.

PROPERTIES OF THE *PLANORBIS* EGG HAEMOCHROMOGEN

The nature of the prosthetic group

The fact that the haem prosthetic group of the egg haemochromogen will react with pyridine to give a typical pyridine haemochromogen with an α -band at 557 $m\mu$ shows that the egg haemochromogen is a protohaem compound. This reaction normally takes some time to reach completion even when carried out with the extracted egg fluid. If, however, the prosthetic group of the egg haemochromogen is detached from the protein by treating the egg fluid with acetone containing 1% v/v of concentrated HCl at room temperature, the pyridine haemochromogen is obtained immediately on the addition of pyridine and sodium dithionite.

Oxidation and reduction

On withdrawal from the egg vesicle the fluid is slightly alkaline (pH 6.7 to 0.8) and the haemoprotein is mostly reduced. (The addition of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ produces a slight intensification of the bands). It remains reduced on aeration in alkaline solution even in 0.1 N-NaOH, but it becomes autoxidisable in acid solutions, the colour changing from pink to orange. Autoxidation begins at about pH 6 and becomes rapid at about pH 5.1. These reactions of the haemoprotein with oxygen are the same as those of helicorubin and cytochrome *h* but whereas crude, or only partially purified helicorubin, immediately becomes reduced merely on the addition of alkali due to the presence of some other substances which have a reducing action in alkaline solution, the addition of alkali to autoxidised egg haemoprotein does not cause any reduction showing that such reducing systems are not present in the *Planorbis* egg vesicle.

While the *Planorbis* egg haemoprotein is readily reduced by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, it is only partially reduced (to about 20%) by potassium ferrocyanide. The reduced haemoprotein is oxidized by ferricytochrome *c* and the reaction may be observed directly with the microspectroscope: if oxidized cytochrome *c* is added to the reduced egg haemoprotein, the α -band at 560 $m\mu$ of the egg haemochromogen immediately fades while the α -band of reduced cytochrome *c* appears at 550 $m\mu$. Soon an equilibrium is reached in which both spectra are seen together, a strong cytochrome *c* α -band at 550 $m\mu$ beside the just discernible α -band of the egg haemochromogen at 560 $m\mu$. These results indicate that the oxidation-reduction potential of the *Planorbis* egg haemoprotein must be less than that of cytochrome *c*, and that it is capable of reacting with the components of the respiratory chain of the mammalian heart muscle preparation.

Absorption spectrum

To obtain the spectrophotometric curve of the haemoprotein in its fully reduced state (Fig. 1), the egg vesicle fluid was diluted with 0.1 M-phosphate buffer pH 7.5 and a few mg. of solid $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ were added. The extinction *E* was measured from 600 $m\mu$ to 385 $m\mu$ where the absorption due to the dithionite begins.

The absorption curve obtained closely resembles that of purified helicorubin with respect to both the positions and shape of the absorption bands, but the valleys are less deep owing to the presence of diffusely absorbing impurities especially in the visible region of the spectrum. The spectrum consists of a sharp α -band at 561 $m\mu$, a lower β -band at 530 $m\mu$ and a sharp Soret band at 426 $m\mu$, the ratio of the heights of the Soret band to the α -band being 4.4.

On oxidation the colour of the solution turns from pink to orange and the haemochromogen spectrum is replaced by that of a typical

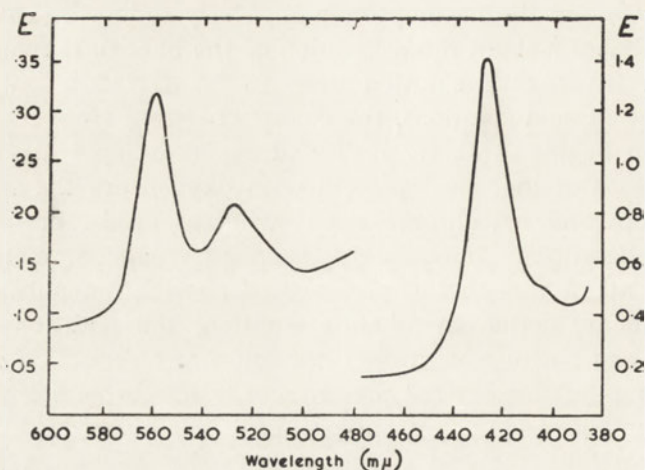


Fig. 1. The absorption spectrum of the *Planorbis* egg haemoprotein in 0.1M-phosphate buffer pH 7.5, reduced with sodium dithionite. The concentration of haemoprotein is the same for the whole spectrum. Ordinates on the left for the extinction (E) of the α - and β -bands (600 - 480 m μ), ordinates on the right for the extinction of the Soret band (480 - 385 m μ)

parahaematin, consisting of two very diffuse and weak bands in the visible region and a well defined Soret band. This lies at 414.5 m μ , and is somewhat lower than the Soret band of the reduced form.

Reaction with ligands

Non-fertile egg masses kept for several weeks in an atmosphere of CO showed no change in their haemochromogen spectrum; neither was any change observed on bubbling CO through a solution of the reduced haemoprotein within the physiological range of pH or even in 0.1 N-NaOH. If, however, the haemoprotein is first acidified to pH 2 with HCl and then neutralised, reduced and treated with CO, the spectrum of a CO-haemochromogen appears.

Similarly no reaction was obtained between the haemoprotein and cyanide unless the haemoprotein had first been treated with acid.

These results show under physiological conditions and even in very alkaline solutions the haem iron is firmly linked in coordination positions 5 and 6, one on each side of the flat haem molecule, to the protein which is very resistant to alkali denaturation. It is only when the protein has been irreversibly denatured by acid treatment that this haem linking is altered in such a way that the haem iron now becomes accessible to ligands such as CO and cyanide.

DISCUSSION

It has been shown previously that helicorubin and cytochrome *h*, which is closely associated with it, can be separated electrophoretically and that they differ only in the positions of their absorption bands and the type of linkage of their prosthetic groups to their respective proteins. No differences were found in the other properties studied which in many ways resemble those of cytochrome *c*, although the absorption spectrum of cytochrome *h* and particularly that of helicorubin is closer to cytochrome *b* (J. Keilin, 1956, 1957).

The observations which have been made so far on the untreated haemoprotein of the *Planorbis* egg vesicle have shown that all its properties agree very closely with those of purified helicorubin.

The *Planorbis* egg haemoprotein is a protohaem compound. The prosthetic group may be separated quite easily from the protein either by treatment with 1% v/v acid acetone or by denaturation with pyridine, giving a typical pyridine protohaemochromogen with its α -band at 557 m μ .

As shown in Fig. 1 and Table 1, the positions of the absorption bands of the untreated haemoprotein in both its reduced (haemochromogen) and oxidized (parahaematin) forms are almost identical with those of reduced and oxidized helicorubin.

Table 1

Positions of the absorption band (m μ) of the haemoprotein in untreated fluid from Planorbis egg vesicles compared with those of purified helicorubin, cytochrome h and cytochrome c

Haemoprotein	Reduced			Oxidized Soret
	<i>a</i>	β	Soret	
<i>Planorbis</i> egg haemochromogen*	561	530	426	415.5
Helicorubin ⁺	561.5	530	427	415
Cytochrome <i>h</i> ⁺	556	526.5	422	408
Cytochrome <i>c</i> ⁺	550	521	415	407

* Reduced spectrum at pH 7.5; oxidized at pH 5.1.

⁺ J. Keilin (1956).

⁺ Keilin & Slater (1953).

In vivo and in the fluid removed from the egg vesicle, the haemoprotein is in the reduced form. It is stable throughout the physiological range of pH and even when treated with 0.1 N-NaOH at room temperature but begins to undergo autoxidation below pH 6 becoming completely oxidized at pH 5. In its reduced form it does not react with either carbon monoxide

or cyanide either in strongly alkaline solution or when it becomes autoxidizable on the acid side; it is only when the protein has been irreversibly altered as by treatment for a few minutes with 0.1 N-HCl at room temperature with subsequent neutralisation and reduction that it can react with these ligands. These properties are the same for heliocorubin and cytochrome *h*, whereas reduced cytochrome *c* reacts with CO under the same conditions as when it becomes autoxidisable, that is, well outside the physiological range of pH (below pH 4 and above pH 12) when it becomes reversibly altered and undergoes autoxidation. On the alkaline side it will then also combine with cyanide.

With regard to its oxidation-reduction potential, the *Planorbis* egg haemoprotein is probably very close to heliocorubin and cytochrome *h* since, like these two haemoproteins, it is only partly reduced (to about 20%) by potassium ferrocyanide and is readily oxidized by ferricytochrome *c*. It would be interesting to know whether, like heliocorubin and cytochrome *h*, the *Planorbis* haemoprotein would also be reduced by a mammalian heart muscle preparation in the presence of succinate or by reduced diphosphopyridine nucleotide and whether this reduction would also be inhibited by Antimycin A.

On the basis of the great similarity between the properties of the *Planorbis* egg haemoprotein and heliocorubin it seems to be justifiable to regard the *Planorbis* haemoprotein as heliocorubin although final identification would only be possible after purification and further studies of its physical and chemical properties.

In view of the possible derivation of heliocorubin from cytochrome *h*, it would be interesting to follow the haemoproteins of the albumin gland during various phases of the reproductive activity of the snail, to see whether a compound similar to cytochrome *h* can be detected during any one of these phases.

A part of this work was carried out while in receipt of a grant from the Wellcome Trust. I wish to thank Miss S. Sandy for her skilful technical assistance.

SUMMARY

The egg vesicles of the freshwater snail *Planorbis corneus*, which has haemoglobin as its respiratory carrier, contain a haemoprotein with a haemochromogen absorption spectrum.

The fluid withdrawn from the egg vesicle was used for studies of the absorption spectra in the visible and near ultra-violet regions, the nature of the prosthetic group, oxidation and reduction, the effect of pH

on autoxidation, reaction with cytochrome c and reactions with ligands under various conditions.

The properties of the haemoprotein were found to agree very closely with those of heliocorubin, the cytochrome-like haemoprotein found in other molluscs; it is therefore suggested that the *Planorbis* egg haemochromogen may be tentatively regarded as heliocorubin.

REFERENCES

- Berthier J., *C. R. Acad. Sci., Paris* **225**, 957, 1947.
Berthier J., *C. R. Soc. Biol., Paris* **142**, 417, 1948.
Fox H. Munro, *Proc. Roy. Soc. B.* **135**, 195, 1948.
Fox H. Munro, *Proc. Roy. Soc. B.* **136**, 378, 1949.
Fox H. Munro, *Proc. Roy. Soc. B.* **143**, 203, 1955.
Keilin J., *Biochem. J.* **64**, 663, 1956.
Keilin J., *Nature, London* **180**, 427, 1957.
Keilin D. & Hartree E. F., *Biochem. J.* **39**, 289, 1945.
Keilin D. & Slater E. C., *Brit. Med. Bull.* **9**, 89, 1953.
Keilin D. & Wang Y. L., *Biochem. J.* **40**, 855, 1946.
Krukenberg C. F. W., *Vergleichende Physiologische Studien*, series 2, part 2, p. 63. Heidelberg 1882.
Lankester E. R., *Proc. Roy. Soc.* **21**, 70, 1872.
MacMunn C. A., *Proc. Roy. Soc.* **35**, 370, 1883.
MacMunn C. A., *Phil. Trans.* **176**, 641, 1885.
MacMunn C. A., *Phil. Trans.* **177**, 235, 1886(a).
MacMunn C. A., *Phil. Trans.* **177**, 267, 1886(b).
Sorby H. C., *Quart. J. micr. Sci.* **16**, 76, 1876.
Svedberg T. & Pedersen K. O., *The Ultracentrifuge*, Clarendon, Oxford, 1940.

BUDOWA HEMOPROTEIDU JAJ *PLANORBIS CORNEUS*

Streszczenie

Pęcherzyki jajowe ślimaka słodkowodnego *Planorbis corneus*, u którego przENOŚNIKIEM tlenu jest hemoglobina, zawierają hemoproteid o widmie absorpcyjnym hemochromogenu.

W płynie pobranym z pęcherzyków jajowych badano: widmo absorpcyjne w zakresie od widzialnego aż do bliskiego ultrafioletu, rodzaj grupy prostetycznej, utlenianie i redukcję, wpływ pH na autooksydację, reakcję z cytochromem c, oraz reakcję z tlenkiem węgla i cyjankiem w różnych warunkach.

Stwierdzono, że własności badanego hemoproteidu wykazują zgodność z własnościami helikorubiny; jest to podobny do cytochromu hemoproteid znajdujący u innych mięczaków. Opierając się na dotychczasowych badaniach hemochromogen jaj *Planorbis* można uważać za helikorubinę.

Otrzymano 17.2.1960 r.

K. L. WIERZCHOWSKI and D. SHUGAR

PHOTOCHEMISTRY OF MODEL OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES

II. HOMOPOLYMERS OF ADENYLIC, GUANYLIC AND CYTIDYLIC ACIDS AND SEVERAL HETEROPOLYMERS*

Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, Warszawa

(Institute of Biochemistry & Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw)

Under the influence of ultraviolet irradiation a number of pyrimidine derivatives do not initially undergo ring rupture but take up a water molecule at the 5, 6 double bond with resultant saturation of the latter; subsequently under the influence of acid, alkali, or heating at neutral pH, the photoproduct may eliminate the molecule of water and revert to the original compound (see ref. [28] for review). Since pyrimidine nucleotides undergo a similar reaction, the question arises as to whether this phenomenon may not be related to that of biological photoreactivation [13, 28]. One is therefore logically led to an examination of the possibility of such reversible photolytic reactions in polynucleotide chains.

Initial investigations demonstrated that reversible photolysis of some uracil and cytosine nucleotides¹ does, in fact, occur in polynucleotide chains obtained from natural sources [27, 28, 29]; and that the quantitative extent to which such photoreversibility takes place is approximately equal to the degree of photoreactivation observed for various ultraviolet inactivated living organisms [13]. It consequently became of interest to examine in greater detail the photochemical behaviour of individual pyrimidine nucleotides in nucleotide chains of various lengths, as well as the influence of different adjacent nucleotides in the chain. The results of such investigations may also be expected to be useful in attempts to

* Part I. [40].

¹ Unsubstituted in the 5 or 6 positions of the pyrimidine ring. A separate investigation has now been made of the photochemical behaviour of such derivatives, e.g. thymine, 5-methylcytosine, etc. [41].

interpret the differences in radiation sensitivity of nucleic acids from various sources and of the different genetic markers in a given preparation of transforming DNA, particularly with regard to base composition and sequences in a given nucleic acid preparation. It should be noted that a correlation between base composition and thermal "denaturation" profile has been found for deoxyribonucleic acids [19].

We have previously reported the results of an investigation on the photochemistry of oligonucleotides of Up² of various chain lengths [40]. This is undoubtedly the simplest model of a nucleotide chain available for quantitative photochemical studies since the hyperchromic effect³ for even highly polymerized poly-U is relatively low, of the order of 5% [37]. Consequently spectral modifications resulting from irradiation reasonably accurately reflect the extent to which the individual rings in a given oligonucleotide chain have reacted. It was found that whereas the degree of TR at neutral pH for irradiated Up is 100%, it varies for oligonucleotides of Up from a maximum of 75% for a dinucleotide to 55% for highly polymerized poly-U [40].

In this communication we present results for the reversible photolysis of cytosine oligonucleotides and some model hetero-oligonucleotides containing mixtures of purine and pyrimidine bases, as well as the photochemical behaviour of some purine oligonucleotides. Since all the foregoing exhibit appreciable hyperchromicity, it becomes necessary to take this into account if spectral methods are to be used to determine the extent to which a given residue has reacted photochemically and also to follow the reaction kinetics.

In dealing with hetero-oligonucleotides containing both purine and pyrimidine rings, one might expect to encounter considerable simplification because of the fact that the resistance of purines to irradiation is about two (or even more) orders of magnitude greater than that of pyrimidines [25]. Hence for the radiation doses used in these experiments,

² The following symbols are used in this text: Up, uridine-2'(3')-phosphate; Cp, cytidine-2'(3')-phosphate; Ap, adenosine-2'(3')-phosphate; Gp, guanosine-2'(3')-phosphate; Tp, thymidine-5'-phosphate; poly-U, polyuridylic acid, with corresponding symbols for the oligo- or polynucleotides of the other nucleosides; for model oligonucleotides numbers are used to indicate the point of attachment of the phosphate groups, e.g. A2'p5'C, where p is the phosphate group, is a dinucleoside monophosphate in which the internucleotide linkage is between the 2' of adenosine and the 5' of cytidine; RNA, ribonucleic acid; DNA, deoxyribonucleic acid, APA, apurinic acid; PR, photoreactivation or photoreversibility; TR, thermal reactivation or thermal reversibility.

³ The hyperchromic effect, or hyperchromicity, of an oligonucleotide chain is the % increase in extinction of the ultraviolet absorption maximum following its hydrolysis to mononucleotides (see refs. [3, 22]).

which are generally of the order of magnitude of those required for biological inactivation, one might expect radiation-induced modifications of ultraviolet absorption to result only from reactions of the pyrimidine rings. This assumption has been examined in the present work and shown to be in accord with expectations.

MATERIALS

We are indebted to Dr. S. Ochoa for a sample of enzymatically synthesized poly-A [10] and to Dr. M. Grunberg-Manago for a sample of poly-C [11]. We are particularly grateful to Dr. A. M. Michelson who kindly made available the following: chemically synthesized preparations of poly-G and poly-C, both of which contain mixtures of 2', 5' and 3', 5' internucleotide linkages and purified preparations of A3'p5'A, A3'p5'U3'p, A3'p5'C3'p and A3'p5'A3'p5'C3'p [20, 21, 22]. The poly-C was exhaustively dialyzed against 2 M-NaCl and then against water, so that the mean chain length is of the order of 15 residues.

CpCp and CpCpCp, containing a mixture of internucleotide linkages, were obtained from chemical poly-C by paper chromatography [21]; C2'p5'C2'p was obtained from chemical poly-C by hydrolysis of the latter with ribonuclease, followed by paper chromatography [22, 23]; C3'p5'U was prepared according to Heppel *et al.* [12].

RNA core was obtained according to the usual procedure by prolonged enzymatic hydrolysis of commercial RNA with ribonuclease, followed by prolonged dialysis against distilled water and lyophilization of the dialysis residue [18].

Poly-T is one of the products of thermal degradation of APA [1] and was eluted at high salt concentration from a column of Dowex 1 or ECTEOLA. It was dialyzed exhaustively against 2 M-NaCl and then against water, and its mean chain length is probably of the order of 10 or more residues. Treatment of this oligonucleotide with snake venom (*Crotalus adamanteus*) resulted in 90% hydrolysis to thymidine, the remaining 10% being an as yet unidentified (oligo?) nucleotide containing only cytosine; hyperchromicity resulting from hydrolysis was 10%.

EXPERIMENTAL

Most of the experimental procedure has been adequately described in preceding publications [29, 39, 40]. Samples were irradiated in spectrophotometer cuvettes with a British Thermal Syndicate mercury resonance lamp through an acetic acid filter to eliminate radiations below 2200 Å.

The intensity incident on the samples (2537 Å) was 2.6×10^{-7} einsteins/cm.²/min. or 1.5×10^{17} quanta/cm.²/min.

All samples were irradiated in 10-mm. cuvettes at such concentrations as to give an initial optical density at the principal maximum of 0.5 - 0.8. This corresponds to a concentration of about 10^{-4} M in terms of mononucleotides.

A Unicam SP 500 spectrophotometer was used for most measurements. For some experiments where irradiation had to be conducted at temperatures above or below room temperature, this was achieved by means of the Hilger Uvispek with temperature controlled compartment through which was circulated water from a Hoeppler ultrathermostat. Temperature measurements in the cuvettes were carried out with thermocouples.

A Radiometer pH-meter, with glass electrodes, was used for pH control. Measurements were usually made directly in the cuvettes.

Streptolysin S formation was measured according to known procedures [4, 33]. We are indebted to Miss H. Tomerska for these measurements.

Unless otherwise stated, measurements of hyperchromicity are taken to apply at the wavelength of the principal absorption maximum of an oligonucleotide in the region 2600 - 2700 Å.

Following completion of this work, it was noted that one of the instruments used exhibited some stray light at 2100 Å and lower wavelengths. Although this region of the spectrum was not used in any of the calculations, the spectra have nonetheless been corrected for scattered light, this latter being estimated from a Beer's law curve in this region of the spectrum.

RESULTS

Purine oligonucleotides

Despite the well-known higher radiation resistance of purines as compared to pyrimidines [7, 28], referred to above, it nonetheless appeared to us desirable to establish whether this is equally valid for purines incorporated into polynucleotide chains, particularly in view of the fact that such incorporation does influence markedly the quantum yield for Up [40], Cp and Tp (see below).

Interestingly enough, it was found that the purine nucleotide residues in both poly-A and poly-G were more radiation resistant than the free nucleotides themselves.

Thus, whereas the quantum yield for Ap was found to be of the order of 0.5×10^{-4} , or about the same as for adenine [28], that for ApA and poly-A is at least one order of magnitude lower, all measured at neutral

pH. If poly-A is irradiated at acid pH under conditions where it is presumed to form an internal double helix [3] its radiation resistance is relatively unaltered.

For Gp the quantum yield at neutral pH is 1.5×10^{-4} as compared to 2×10^{-4} for guanine [28]. For poly-G the corresponding value was found to be 0.5×10^{-4} .

In practically all the instances cited above, the initial effect of irradiation is to produce a small drop (of about 2%) in the extinction coefficient at the maximum, following which the above cited radiation resistance is observed. In the case of ApA at pH5, this initial drop in absorption amounted to about 1%. It should be recalled that, for much higher radiation doses, Kland & Johnson [15] found a lag period for the initial rate of photolysis of free purines in unbuffered aqueous medium.

RNA core

Although the preceding results for poly-A and poly-G demonstrate unequivocally the relatively high radiation resistance of purine, as compared to pyrimidine⁴, nucleotides in polynucleotide chains, it would obviously be desirable to confirm this biologically. Such a possibility exists by taking advantage of the ability of the RNA core to promote streptolysin S formation in hemolytic streptococci [26].

RNA core was irradiated in 1-mm. cuvettes at a concentration of 10^{-3} M at neutral pH with a 30-watt Phillips germicidal lamp at an intensity of 10^{17} quanta/cm.²/min. It was found that even after irradiation with such a source for 15 hours there was a drop of only 50% in biological activity, corresponding to a quantum yield considerably less than 10^{-4} . In addition there was only a 10% decrease in metachromasia against basic dyes. It consequently follows that, with the doses normally used for biological inactivation, the effect on purine residues in a polynucleotide chain should be extremely small, if at all detectable. It is worth recalling, in this connection, that irradiation of DNA to the point where 30% of the pyrimidine residues are destroyed leaves the guanine residues intact and gives a recovery of more than 90% of the adenine [7].

Poly-T

The course of the photochemical transformation of poly-T, illustrated in Fig. 1, differs appreciably from that for free thymidylic acid. This difference in behaviour is characterized not so much by the modification

⁴ Pyrimidine nucleotides substituted in the 5 or 6 positions of the pyrimidine ring are excluded from this comparison; see footnote on page 377 and refs [23, 41].

of the absorption spectrum, which involves a decrease in the extinction of the principal maximum at 2670 Å as for free Tp, but rather by the increased sensitivity to small irradiation doses as compared to free Tp.

As can be seen from Fig. 1 the initial rate of photolysis proceeds with a quantum yield comparable in magnitude to that for Up and Cp in oligonucleotides. However, following photodecomposition of about 25% of the Tp residues, the rate decreases rapidly until the quantum yield approaches that for free Tp, about 10^{-3} [28]. The course of photolysis differs very markedly from that for a first-order reaction either for the

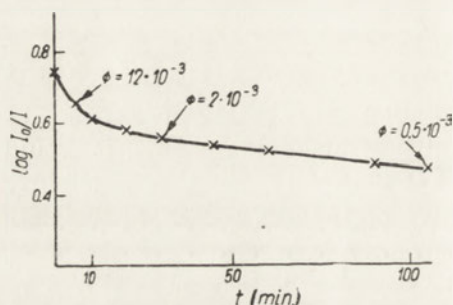
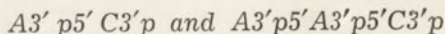


Fig. 1. Course of photodecomposition of poly-T in 0.02M-phosphate buffer pH 7, followed by decrease in optical density of principal absorption maximum at 2670 Å with time of irradiation. Incident radiation intensity 2.6×10^{-7} einstein/cm²/min. The calculated quantum yield varies during the course of the reaction as indicated by the arrows and drops to a limiting value of 0.5×10^{-3} equal to that for free Tp

oligonucleotide as a whole or on the assumption that higher radiation sensitivity is exhibited by those Tp residues which are flanked on either side by other Tp residues.

Attempts to exhibit TR, following about 30% photolysis, were negative.



The procedure employed for following quantitatively the photochemistry of these two compounds by spectral methods is typical of that

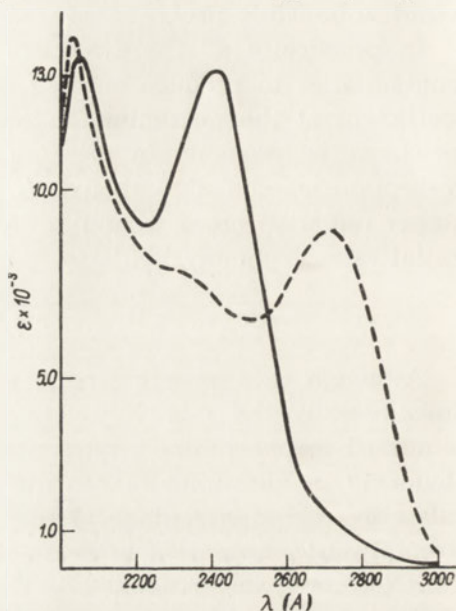


Fig. 2. Absorption spectrum of cytidine-3'-phosphate (C3'p) (—) and its photoproduct 5-hydroxy-6-hydroxy-cytidine-3'-phosphate (C3'p.H₂O) at pH 7. The corresponding spectra for C2'p and C5'p are qualitatively similar, but the ratios of molar extinction at 2400 Å to that at 2700 Å are quantitatively the same

generally applicable to various oligonucleotides and we shall therefore present the pertinent data in some detail.

Effect of radiation on Ap. From the results presented above it is clear that Ap is much more radiation resistant than Cp, both in the free form and when incorporated in an oligonucleotide; furthermore it does not form reversible photoproducts. Since the photoproduct of Cp (which is $Cp \cdot H_2O$) reverts to Cp in the dark with an efficiency of practically 100% [32, 39] and initial experiments showed that the photoproducts of ApCp and ApApCp were completely reversible, it may be assumed that the Ap components were unaffected, a conclusion fully substantiated by spectral observations of the photoproducts (see below). Actually calculation shows that, with the radiation doses used, a sample of free Ap with a concentration equivalent to that contained in the above oligonucleotides should undergo a 2% loss in absorption; experimentally this will be even less, since the Ap is one of the components of an oligonucleotide.

Hyperchromicity of ApCp and ApApCp. The hyperchromicity of ApCp at neutral pH was determined by alkaline hydrolysis to mononucleotides; the value thus obtained was 7%, in good agreement with that of 8% at alkaline pH reported by Michelson [21, 22]. For the tri-nucleotide, hyperchromicity was measured by hydrolysis with snake venom, the value thus obtained being 22.5%, again in good agreement with that of Michelson [21, 22] on an alkaline hydrolyzate at alkaline pH.

Absorption spectrum of $Cp \cdot H_2O$. The photoproducts of uracil nucleotides exhibit practically no absorption at wavelengths to the red of 2400 Å and are also relatively stable at room temperature (see below). By contrast the photoproducts of cytosine nucleotides exhibit a new maximum at 2400 Å, the extinction of which decreases gradually to zero only in the neighbourhood of 2900 Å. Furthermore these photoproducts are relatively labile and tend to revert to the original compound even at room temperature. The spectrum of $Cp \cdot H_2O$ was therefore determined by photolysis of C3'p at a temperature of 5°, which proved sufficiently low to inhibit the reverse, dark, reaction. From Fig. 2 it will be seen that the extinction of $C3'p \cdot H_2O$ is 13.0×10^3 at 2400 Å and 1.5×10^3 at 2700 Å.

The quantum yield is calculated to be 13.5×10^{-3} , a value somewhat higher than that previously reported [39], due to the fact that the latter value was obtained by irradiation at room temperature and with a radiation intensity insufficient to overcome the partial spontaneous reversibility of the photoproduct (see also Discussion).

The absorption spectra of ApCp and its photoproduct, following irradiation at pH 7 and a temperature of 5.5°, are shown in Fig. 3.

Heating of the photoproduct transforms its spectrum back again to that for ApCp. If account is taken of the hyperchromicity of ApCp and the absorption spectrum of Cp·H₂O, then photolysis of ApCp to the point where all the Cp has been converted to photoproduct should be accompanied by a drop in extinction of 34% at 2700 Å. The experimental value from Fig. 3 is 30%. Actually the agreement is better than this since, in fact, the photochemical reaction did not go to completion (see Fig. 4) because at 5.5° there is still some spontaneous reversibility of the Cp component. In the foregoing calculation it was assumed that the photochemically transformed ApCp would exhibit no hyperchromicity since the 5,6 double bond in the cytosine ring of Cp·H₂O is saturated; and the prevailing agreement at 2700 Å provides supporting evidence for

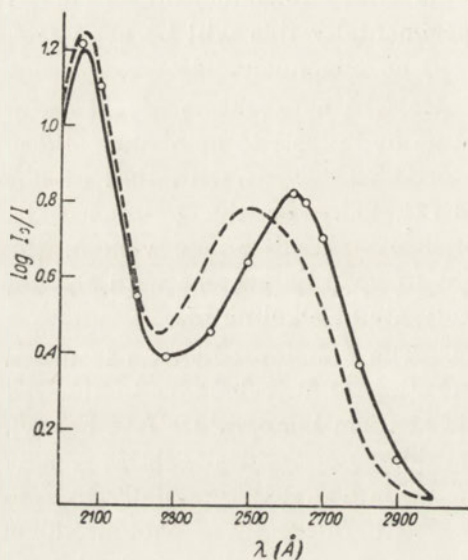


Fig. 3. Photochemical transformation of ApCp and subsequent thermal reactivation (TR) of photoproduct in 0.02 M-phosphate buffer pH 7: (—) prior to irradiation (---) following irradiation for 150 mins. at an intensity of 2.6×10^{-7} ein./cm²/min. and at a temperature of 6°C to inhibit the reverse, dark reaction; (o) after removal of irradiation source and warming of solution 180 mins. at 30°C

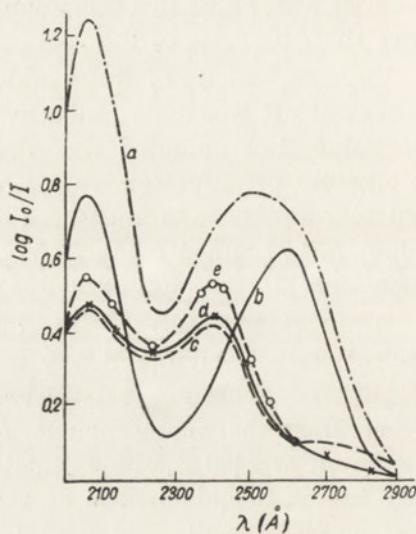


Fig. 4. Absorption spectra at neutral pH of: a — ApCp·H₂O taken from Fig. 3; b — Ap; c — Difference spectrum between a and b; this shows presence of some unreacted Cp at 2700 Å. d — Curve c as it would appear if all the Cp component were photochemically transformed; e — Theoretically expected difference spectrum between a and b or, in other words, Cp·H₂O from Fig. 2

the postulate that hyperchromicity in small oligonucleotides is due to interaction between adjacent aromatic rings [16, 17, 20, 21, 22].

Another way of arriving at the above result is to subtract the absorption spectrum of Ap from that for ApCp·H₂O in Fig. 3. The resulting difference spectrum should correspond to that for Cp·H₂O in Fig. 2. When this is done (see Fig. 4) it is at once evident that at shorter wavelengths the agreement is less satisfactory. At 2400 Å the experimental difference spectrum (curve c) exhibits an extinction 15% lower than that to be expected (curve e). The cause of this discrepancy is not immediately obvious although, in part, it may result from hyperchromicity of ApCp·H₂O itself at shorter wavelengths where the maximum exhibited by Cp·H₂O (Fig. 2) is due to partial aromatic character of the hydrated cytosine ring [14]. Consequently, in following the kinetics of the reaction, changes in optical density at 2700 Å were used to estimate the amount of Cp·H₂O in ApCp·H₂O.

It should be mentioned that the photoproduct of ApCp may be made to revert to the parent compound by acidification at room temperature. Such is not the case for ApUp (see below).

The kinetics of photolysis of ApCp, calculated according to the difference method of van't Hoff (see ref. [40]), and on the assumption that only quanta absorbed by the cytosine ring are photochemically effective, is illustrated in Fig. 5 from which it is clear that the reaction order for ApCp is constant during the entire course of the reaction. This again substantiates the above arguments to the effect that only the Cp component undergoes photolysis.

The quantum yield for photoproduct formation is also constant during the entire reaction, with an average value of 8.2×10^{-3} as compared to 13.5×10^{-3} for free C3'p under analogous conditions.

At room temperature (about 24°) the tendency of Cp·H₂O to revert spontaneously to Cp is such that, with the same incident light intensity, the final spectrum of the photoproduct of ApCp shows equilibrium to be attained when about 2/3 of the cytosine rings have reacted photochemically.

The reverse reaction is accurately first order and the dependence of the rate constant on temperature conforms to an Arrhenius plot. Measurements of the rate of the reverse reaction over the temperature range 30 - 65° give an activation energy for this process of 18 kcal. (see below for detailed calculations in case of ApUp). This is to be compared with an average value of about 15 kcal. for free C3'p which we have calculated from the data of Sinsheimer [32].

The course of photolysis of ApCp was also examined at pH 8.5 where the phosphoric acid groups are completely dissociated, all other conditions such as incident dose, temperature, concentration, being unchanged. As at

pH 7, an equilibrium state was established when 2/3 of the Cp had been transformed to photoproduct, at room temperature.

Insofar as ApApCp is concerned, its photochemical behaviour is completely analogous to that for ApCp. The spectral variations resulting from irradiation are quantitatively accounted for by the photochemical transformation of the Cp residue, after correcting for the hyperchromicity of the dinucleotide portion of the molecule. Following complete transformation of the Cp residue to Cp·H₂O, the resulting corrected

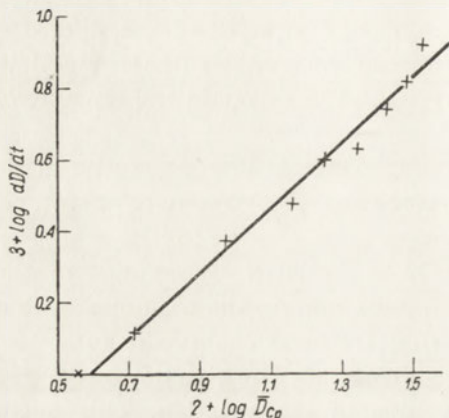


Fig. 5. Course of photochemical transformation of Cp residue in ApCp (pH 7, incident dose 2.6×10^{-7} ein./cm²/min.), plotted according to the difference method of van't Hoff (\bar{D}_{Cp} is the corrected optical density at time t due to the Cp residue and therefore proportional to the concentration of Cp at time t ; and dD/dt is the rate of change of optical density of solution at time t , which is proportional to the rate of change of concentration of Cp at time t , since the Ap is unaffected). The slope of the straight line is unity, indicating a 1st order reaction. Calculated quantum yield is 8.2×10^{-3} moles/einstein

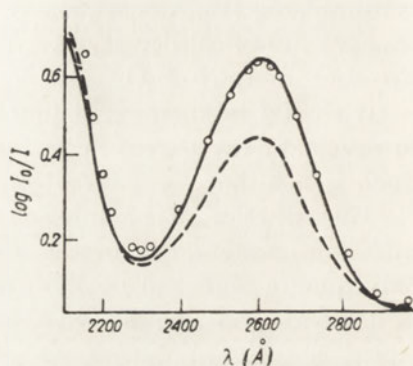


Fig. 6. Absorption spectrum at pH 7 of ApUp: (—) prior to irradiation; (---) following irradiation for 70 mins. at a dose rate of 2.6×10^{-7} ein./cm²/min., resulting in complete photochemical transformation of the uracil rings; (o) following removal of irradiation source and heating the solution for 180 mins. at 80°C to obtain complete TR

absorption spectrum corresponds quantitatively to that for ApAp. Reversibility of the photoproduct of the tri-nucleotide to the original compound under the influence of heat is likewise quantitative.

A3' p5'U3'p

The hyperchromicity of this dinucleotide at neutral pH was obtained following prior hydrolysis in 0.2 N-NaOH and is equal to 13%. Assuming

Table 1

First-order rate constants for thermal reactivation of Up in ApUp solution in 0.02 M-phosphate buffer pH 7

Temp. (°C)	$k \times 10^5$ sec ⁻¹	Activation energy (kcal./mol)
51	1.83	26.2
65	10.0	
76	33.4	
86	96.0	

the radiation resistance of Ap in ApUp to be such that, with the doses used, it is practically unaltered, it is a simple matter to show that complete photolysis of the Up component in ApUp should lead to a decrease in absorption at 2600 Å of 32%. The experimental value found was 31 - 32%, thus confirming the above assumptions.

Additional confirmation is forthcoming from the observation that the photolysis of ApUp is completely reversible (Fig. 6), which suggests not only that the Ap component was unaffected as a result of irradiation, but

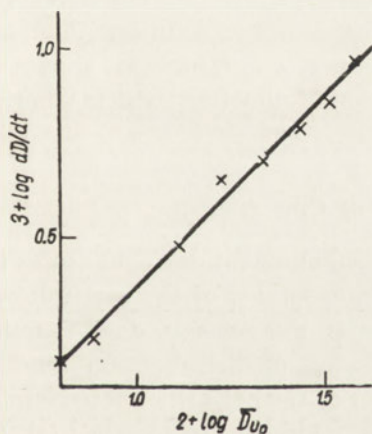


Fig. 7. Estimation of reaction order for photochemical transformation of uracil ring in ApUp by van't Hoff difference method. Slope of line corresponds to 1st order reaction and calculated quantum yield is 7.0×10^{-3}

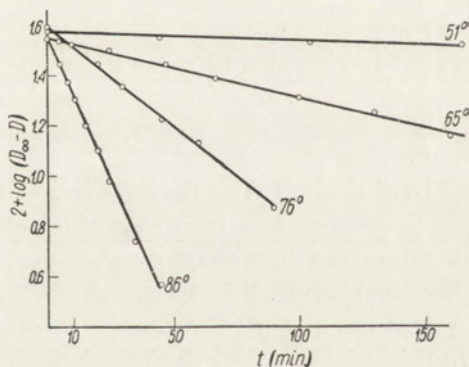


Fig. 8. Semi-logarithmic plots for TR of Up · H₂O component of ApUp · H₂O at various temperatures. D_∞ (optical density following complete TR) and D (optical density at time t) are proportional to the concentrations of Up formed by TR from Up · H₂O.

also that the photolysis of the Up residue proceeds *via* uptake of a water molecule at the 5,6 double bond. It was, on the other hand, observed that the Up component of ApUp was considerably less radiation sensitive

than free Up, the calculated quantum yield for the former being 7×10^{-3} , or one third of that for free Up [25, 28, 31], and is constant for practically the entire course of the reaction.

Both the photochemical reaction and the reverse thermal reactivation reaction appear to be strictly first-order. Fig. 7 shows the plot of the photochemical reaction according to the difference method [40], from which it will be seen that the straight line has a slope of unity; while Fig. 8 exhibits the course of the reverse reaction at various temperatures at neutral pH. The rate constants for the reverse reaction (Table 1) give a straight line Arrhenius plot (Fig. 9) from which the activation energy for thermal reactivation works out to 26.2 kcal./mole, a value not very much different from that found by Moore & Thomson [25] for 1,3-dimethyluracil, viz. 22.6 kcal./mole.

From the curves in Fig. 8 it will be seen that the rate of the reverse reaction at room temperature is infinitesimally low and hence could be ignored above in calculating the rate of the forward reaction.

Somewhat unusual is the fact that the photochemical reaction is not reversible in acid medium. Exposure of the photolysis product of ApUp to pH 2 or pH 1 for several hours is without effect on the absorption spectrum even after subsequent neutralization of the solution. That acid treatment has nonetheless had some deleterious effect is shown by subsequent neutralization of the solution, following which thermal reactivation can no longer be observed.

Oligonucleotides of Cp

In the same way as for Cp and heterooligonucleotides containing Cp, the photochemical transformation of oligonucleotides of Cp was followed at a temperature of 6-8° in order to inhibit the reverse, dark reaction, and render possible reasonable measurements of the reaction kinetics. In addition, calculations of the reaction kinetics for both the photochemical and reverse, dark reactions were made taking into account (a) the hyperchromicity of the oligonucleotide, which was assumed to decrease linearly with the course of the reaction, (b) the absorption spectrum of the photochemically transformed rings, which is the same as for the free nucleotides, (c) the fact that some of the residues underwent irreversible photochemical transformation. With regard to point (a), it was found that the hyperchromicity of C2'p5'C2'p was essentially the same in neutral and alkaline medium, as might be expected; hence for other oligonucleotides of Cp the values for alkaline hyperchromicity given by Michelson [21, 22] were taken to apply in neutral medium. Finally, in calculations of quantum yields, the extinction coefficient of

C2'p was used for oligonucleotides with 2',5' internucleotide linkages, that of C3'p for oligonucleotides with 3',5' linkages, and the mean value for oligonucleotides containing a mixture of 2',5' and 3',5' internucleotide linkages.

C2'p5'C2'p. With the dose rates used, the photochemical transformation of this dinucleotide attains an equilibrium state after reaction of about 90% of the pyrimidine rings. The equilibrium state is not as stable as for ApCp or ApApCp because of slight photodecomposition of the primary photoproducts (see Discussion).

The absorption spectrum of the photoproduct, which may be written as CpCp·2H₂O, is similar to that for Cp·H₂O (Fig. 2), but with an extinction coefficient at 2400 Å about 8% lower.

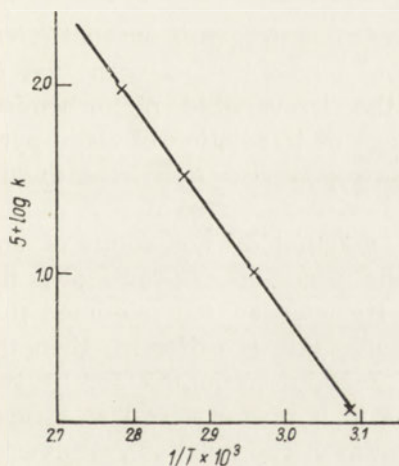


Fig. 9. Arrhenius plot of the 1st order rate constants for TR of ApUp·H₂O. The rate constants k are the slopes of the straight lines from Fig. 8. Calculated energy of activation 26.2 kcal./mole

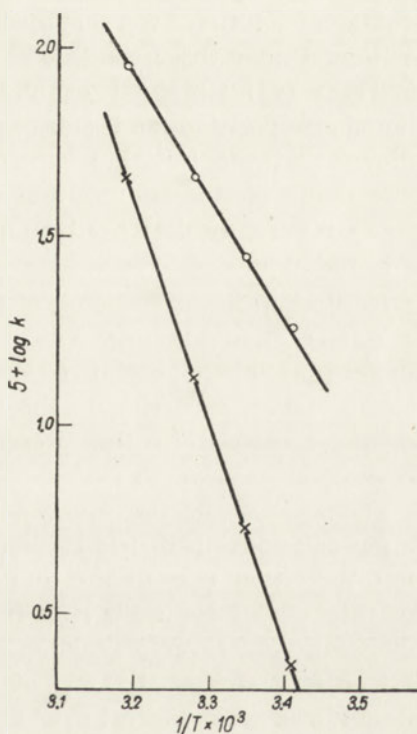


Fig. 10. Arrhenius plots for TR of each of the photochemically transformed rings in CpCp·2H₂O, in 0.02M phosphate buffer pH 7: (o) $E_1 = 14$ kcal./mole; (x) $E_2 = 26$ kcal./mole

On the other hand reversibility is incomplete and varies from 85 - 90%, depending on the extent to which the dinucleotide has been photochemically transformed.

If it is assumed that each of the rings in the dinucleotide is equally photosensitive, and if we exclude the data for the first few minutes of

the reaction, the photochemical transformation is found to be 1st order with a quantum yield of 7.5×10^{-3} . The initial stage of the reaction proceeds with a quantum yield of about 11×10^{-3} , this value gradually decreasing until it attains 7.5×10^{-3} after reaction of about 20% of the aromatic rings. The kinetic data cannot be fitted to any equation based on a difference in quantum yield between the two rings in the dinucleotide.

In order to determine whether this initial stage of the photochemical reaction is responsible for the 10 - 15% irreversible photodecomposition, irradiated solutions were subjected to TR following 20% photodecomposition. Under these conditions TR was equal to about 70%; this value of TR was maintained even following repeated irradiation to 20% photodecomposition and subsequent thermal reactivation. It therefore follows that the initial stage of photolysis is accompanied by the irreversible photodecomposition of only about 1/3 of the pyrimidine rings irreversibly destroyed when the photochemical reaction is carried to completion.

Irradiation in the presence of pure oxygen or nitrogen is without effect on the reaction kinetics. This result is to be contrasted with that of Beukers *et al.* [6] who report that the irreversible photochemical transformation occurring in the initial stage of irradiation of some pyrimidines increases in the presence of nitrogen and decreases in the presence of oxygen.

The kinetics of the reverse, thermal reaction do not admit of any simple relationship if it is assumed that the probability of reversal is the same for either ring in the dinucleotide. If, however, it is assumed that the rate of TR for each ring in the dinucleotide is different, then the kinetics of the reverse reaction may be readily accounted for by two first-order processes, i.e. one of the rings undergoes reversal at a rapid rate and the second at a lower rate. The ratio of the reaction rates varies from 2 to about 6 as the temperature is changed from 40° to 20° (see Fig. 10). From measurements conducted at various temperatures for the reverse reaction, it was found that the rate constants conform to the Arrhenius equation (Fig. 10) with activation energies of 14 kcal./mole for the first ring and 26 kcal./mole for the second ring.

$C2'(3')p5'C2'(3')p$. The photochemical transformation, and reaction kinetics, for this mixture of isomers does not differ from that for $C2'p5'C2'p$, from which it may be concluded that the behaviour of the two CpCp isomers is similar. The kinetics of the reverse reaction were not investigated because of the possible complexity expected; this would have to be done by isolating $C3'p5'C3'p$ from the mixture of isomers by

treatment with spleen phosphodiesterase. The behaviour of CpC is not essentially different from that of CpCp.

CpCpCp. This trinucleotide contained a mixture of 2'5' and 3',5' internucleotide linkages. Its photochemical behaviour was quite similar to that for CpCp as regards absorption spectrum of photoproduct, reaction order and quantum yield. As for CpCp the quantum yield for the initial stage of the reaction is somewhat higher, about 12×10^{-3} , and this decreases to about 7.5×10^{-3} following photochemical transformation of about 10% of the aromatic rings. TR, following photolysis, attained about 90% but the kinetics of this process were not investigated.

Poly-C. The results for this preparation are presented with some reserve since, although it was synthesized by means of polynucleotide phosphorylase [11], its hyperchromicity on heating to -80° was only about 5% at neutral pH. Furthermore its hyperchromicity in neutral medium, following hydrolysis to mononucleotides, was 85% as compared to the 40% reported by Warner [37]. On the other hand, chromatographically it was found to be at least greater than a pentanucleotide.

The photochemical behaviour of this compound is entirely analogous to that for di- and tri-nucleotides as regards quantum yields, absorption spectrum of the photoproduct and extinction coefficients for the latter. The kinetics for thermal reactivation may also be interpreted in terms of 2 rate-constants which are, respectively, 9.5×10^{-4} and 1.7×10^{-4} sec^{-1} at 30° .

C3'p5'U

As might be expected, irradiation of this dinucleotide leads to the photochemical transformation of both the uracil and cytosine rings.

The alkaline hyperchromicity of this dinucleotide has been determined by Michelson [21] and is equal to about 9%; this value has been assumed to apply also in neutral solution. Applying the necessary correction for the absorption of the photoproduct of Cp, the kinetics of photolysis of this dinucleotide approximate closely to a first-order reaction, excluding the initial phase for which the rate constant is somewhat higher until about 15% of the rings have reacted. The uracil ring reacts somewhat more rapidly (quantum yield about 10×10^{-3} as compared to 20×10^{-3} for free Up [28, 31]) than the cytosine residue for which the quantum yield is about 8×10^{-3} (as compared to 13.5×10^{-3} for free C3'p (see above). Consequently, as the photochemical reaction approaches completion, the absorption spectrum resembles that for Cp·H₂O plus some small absorption due to cytidylic acid (Fig. 11).

The reverse, dark reaction initially involves almost exclusively the cytosine residues, in accord with expectations. The first-order rate constants for reversal at 30°C are $1.8 \times 10^{-4} \text{ sec.}^{-1}$ for the cytosine residue and 1.5×10^{-6} for the uracil residue; at this temperature, therefore, only

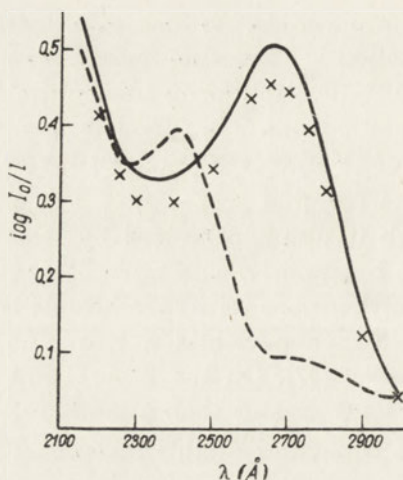


Fig. 11. Absorption spectrum of CpU in 0.02_M-phosphate buffer pH 7: (—) prior to irradiation; (---) following 90 mins. irradiation at an intensity of $2.6 \times 10^{-7} \text{ ein./cm}^2/\text{min.}$; (x) after removal of irradiation source and heating of solution for 40 mins. at 80°C. to give TR for both Cp and U components. (If solution is first warmed for 110 mins. at 30°C, then only Cp·H₂O undergoes TR

the cytosine residue exhibits complete reversibility. It is necessary to raise the temperature to provoke reversal of the uracil residue within a reasonable time interval; when this is done, reversal for the dinucleotide attains 90% and the resultant absorption spectrum is entirely analogous to the original.

DISCUSSION

The results described above, together with those previously presented for oligonucleotides of Up [40], strikingly confirm earlier data on natural polynucleotides [27, 28, 29] to the effect that the reversible photochemical transformations undergone by uridylic and cytidylic mononucleotides likewise take place when these are incorporated in polynucleotide chains. There is only a quantitative difference in behaviour in that incorporation in a polynucleotide chain may alter the quantum yield which, in part, is also influenced by the base sequence in the chain.

Particularly striking is the fact that in oligonucleotides containing both purines and pyrimidines, the photochemical transformation of the latter may be carried to completion without any observable effect on the former, and is completely reversible in the dark. Hence, in calculating the kinetics and quantum yields for the photochemical transformation of these oligonucleotides, account was taken only of that fraction of the incident radiation absorbed by the pyrimidine components. The validity of this procedure is testified to by the fact it gives first-order kinetics for the pyrimidine components such as is exhibited by free mononucleotides.

Since the hyperchromicity exhibited by oligonucleotides is due to interaction between electron orbitals of adjacent rings, it is also likely that transference of absorbed energy takes place between the aromatic rings, as has been demonstrated experimentally in the case of DPNH [38]. In view, however, of the accurate 1st order kinetics prevailing for photochemical transformation, it appears unlikely that such transference of energy is important enough to influence the reaction. Furthermore our observations do not exhibit a correlation between hyperchromicity (which is a measure of interaction between aromatic rings) and the photochemical behaviour of a given residue in an oligonucleotide; this is best illustrated by oligonucleotides of Up where hyperchromicity is very low, but the photochemical behaviour appreciably different from that for mononucleotides [40].

The changes in absorption spectrum of irradiated ApUp, as well as of ApCp and ApApCp at longer wavelengths, are in accord with the proposal that hyperchromicity in small oligonucleotides is due to interaction between electron orbitals of adjacent aromatic rings [17, 18, 20, 21, 22]. For CpCp the agreement is also reasonably satisfactory if we recall that 10 - 15% of the aromatic residues are photolysed irreversibly. On the other hand the source of the 15% difference between the observed and expected changes in absorption of irradiated ApCp at shorter wavelengths remains to be clarified.

The quantum yields for the reversible photochemical transformation of the uracil and cytosine rings in the above oligonucleotides are only one-half those for the free nucleotides. In homopolymers of Up the yields are higher than for free Up [40]. This modification in quantum yields is most likely due not only to interaction between adjacent aromatic rings, but also to steric effects since the aromatic rings are displaced from each other by only about 3 Å. Esterification of the carbohydrate moieties would also be expected to have some effect, since it was previously shown that the position of esterification in cytosine nucleotides influ-

ences the quantum yield [39]. It now appears, however, that this effect is not as important as originally believed and that the difference in quantum yields between the various cytidylic acid isomers was due in part to the failure to take fully into account the rate of the reverse reaction, which is so marked at room temperature and appreciably different for the different isomers (cf. also ref. [32]). This is illustrated in Fig. 2 where the photolysis of C3'p was carried out at 6°C to inhibit the reverse, dark reaction, and from the results of which the quantum yield is calculated to be 13.5×10^{-3} instead of 9.5×10^{-3} at neutral pH previously reported [40]. We have, however, found that the quantum yield for the 5' isomer does differ significantly from the 2' and 3' (unpublished), in agreement with the previous results [39].

The rates of the reverse reaction are also known to differ significantly for the various uridylic acid isomers [28, 31], although the difference in rates between the Up and Cp isomers is enormous. This is perhaps best illustrated by the results for CpU where, following complete photochemical transformation, the reverse reaction at room temperature proceeds only for the Cp component, and only heating at elevated temperatures provokes the reverse reaction in the uridine component.

In oligonucleotides it is also probable that the rate of the reverse reaction will be influenced by the presence of a neighbouring ring, most likely as a result of steric effects. In hydrogenated ApUp (i.e. ApUp·H₂) the dissociation of the reduced uracil ring is, in fact somewhat inhibited as compared to ApUp [14].

Irreversible photolysis. It is rather curious that the photochemical transformation of oligonucleotides containing only pyrimidine residues, e.g. CpCp, CpU, UpUp [40], is not completely reversible in the dark. Two possible interpretations of this phenomenon are the following: (a) It has been demonstrated that photochemically induced addition to the 5,6 double bond of pyrimidines may involve, in place of a water molecule, that of a molecule of alcohol [25, 28] or HCN [23]. Furthermore, irradiation of air-dried films of natural and synthetic polynucleotides results in extensive cross-linking involving the pyrimidine residues [2, 30] and accompanied by the disappearance of the characteristic absorption of these latter (unpublished observations); this could be due to the formation between pairs of rings of saturated C₅—C₅ and C₆—C₆ linkages. If so, it is conceivable that the irreversible photodecomposition of a fraction of the pyrimidine rings in oligonucleotides consisting exclusively of pyrimidines might be due to a reaction of this type between neighbouring rings. This would not be possible in mixed purine-pyrimidine oligonucleotides such as ApUp and ApCp where, in fact, reversibility is 100%.

(b) Another conceivable mechanism which may account for partial lack of reversibility would be the photochemical addition of water such that the photoproduct, for some of the aromatic rings, is a 5-hydroxy-6-hydro, instead of a 5-hydro-6-hydroxy, derivative. The 5-hydroxy photoproduct would not be expected to exhibit reversibility [24, 35].

UpUp. In view of the 1st order kinetics prevailing for the photochemical transformation of ApUp, ApCp, CpCp, etc., it is pertinent to re-examine the results previously obtained for UpUp [40]. The reaction order and quantum yield for the photochemical transformation of this dinucleotide were calculated on the assumption that the total radiation absorbed is photochemically active for the entire course of the reaction; in this way the transformation of UpUp was found to follow a 2nd order course until 50% of the uracil rings had reacted, following which the remainder of the reaction was strictly 1st order. If, however, we envisage the possibility that the radiation sensitivity of one of the rings in UpUp differs markedly from that for the other [40], one may calculate the reaction order and quantum yield first for the more sensitive of the two rings (even though we do not know which it is), and then for the other. When this is done, using the same experimental data [40], we find that the entire course of the photochemical reaction for UpUp is 1st order, with quantum yields for the two rings of 70×10^{-3} and 10×10^{-3} .

Although this alternative interpretation of the kinetics of photolysis of UpUp is perhaps more satisfying in relationship to those for the other dinucleotides, it is clear that additional data are required to establish which of the two mechanisms is operative. One argument against this alternative interpretation of the kinetics for UpUp is the fact that 25% of the uracil rings in UpUp are irreversibly transformed during the first half of the reaction [40], so that the photochemical transformation may involve, initially, two reaction paths.

Poly-T. The initial rapid rate of photodecomposition of this oligonucleotide, as compared to free Tp, is reminiscent of the behaviour of oligonucleotides of Up under similar conditions of irradiation [40]. This resemblance is, of course, only a qualitative one since the kinetics of the reaction are different for the two oligonucleotides. There is, on the other hand, no doubt that the increased sensitivity of poly-T, as compared to Tp, is due to interaction between neighbouring rings in the chain. Such increased radiation sensitivity of thymine residues in oligonucleotide chains had previously been observed by Beukers *et al.* [5] in APA; and this is undoubtedly the reason for our erroneous conclusion that the quantum yield for deoxycytidylic acid residues in APA is 3 times that

for free deoxycytidylic acid, since our calculations were based on the assumption that the Tp in APA is as radiation-resistant as free Tp.

It becomes of interest to examine the radiation sensitivity of thymine residues (a) in di-, tri- and tetranucleotides of Tp which are now available by synthetic procedures [34] or by enzymatic degradation of polyribose-thymine phosphate [9], and (b) in small oligonucleotides in which Tp is flanked by, or "sandwiched" between, residues other than thymine.

The lack of reversibility in irradiated poly-T may be contrasted with the indirect evidence adduced by Wang [36] that photodecomposition of thymine analogues proceeds *via* a 5-hydro-6-hydroxy derivative as for uracil analogues. The suggestion that such intermediates might be more stable in oligonucleotide chains is apparently not valid.

Purine oligonucleotides. The relatively high radiation resistance of purine residues, both in the free form and when incorporated in oligonucleotides, appears from the above results to be even more firmly established. It is, nonetheless, puzzling to account for the fact that irradiation of poly-G and poly-A provokes an initial small drop in extinction which, in all instances amounts to 1—2%. This may conceivably be due to some artifact. Furthermore in a dinucleotide such as ApUp this effect would be difficult to observe because of the appreciable change in absorption of the pyrimidine residue as a result of its photochemical transformation; and, if it exists at all in such a dinucleotide, it is also reversible since photochemically transformed ApUp reverts quantitatively to the parent compound.

It is therefore necessary to emphasize the fact that, in a purine residue, some minor modification of the imidazole ring would not necessarily provoke any appreciable change in absorption spectrum of the purine ring as a whole. Although the mass of evidence favours the involvement in TR of oligonucleotide chains only of the pyrimidines, it would undoubtedly be comforting to demonstrate by some technique other than spectroscopic that the purine rings are unaffected by radiation doses of the order of magnitude of those provoking biological effects.

Biological photoreactivation. The overall findings considerably extend those previously reported and further substantiate the proposal that the source of biological photoreactivation is the reversible photochemical transformation of pyrimidine derivatives in nucleic acids. If, in particular, it is recalled that photoreactivation in living organisms may be frequently attained instead by thermal reactivation, it becomes of interest to examine the values for the activation energies of these processes. According to Jagger [13] activation energies for thermal reactivation in living organisms vary from 9 to 17 kcal./mole, with the higher value as

the most probable. This is to be compared with the activation energy of TR for Up in ApUp, which is 26 kcal./mole; for Cp in CpCp which varies from 14 - 26 kcal./mole; and for Cp in ApCp, which is 18 kcal./mole. Although the *in vitro* values tend to be somewhat on the high side, the disagreement is not a serious one.

It would now be desirable to extend the above studies to model oligonucleotides in which one or more pyrimidines are sandwiched between purine residues; and to a system such as the poly-U-poly-A complex [37] where the influence of interchain bonding, so important in DNA, may be examined.

SUMMARY

1. The photochemistry of various homo- and hetero- oligonucleotides has been investigated. The experimental procedures are applicable to studies on the photochemistry of a wide variety of model oligonucleotides.

2. The high radiation resistance of the purines extends to these derivatives when incorporated in oligonucleotide chains.

3. Oligonucleotides of thymine exhibit enhanced radiation sensitivity as compared to free thymidylic acid and the photochemical reaction is not reversible in the dark.

4. In a dinucleotide containing a pyrimidine and a purine residue, and irradiated at doses sufficient to completely transform the pyrimidine residue, the purine ring is unaffected; the photochemically transformed pyrimidine also exhibits 100% reversibility in the dark.

5. Photochemical transformation of cytosine residues in oligonucleotides of cytidylic acid is 85 - 90% reversible in the dark.

6. The photochemical transformation of a dinucleotide containing cytosine and uracil exhibits 90% reversibility in the dark.

7. The kinetics of the photochemical and reverse dark reactions are mainly first-order, and quantum yields are calculated. The activation energies for the reverse dark reactions are of the same order as those encountered in biological thermal reactivation.

8. The results provide further evidence in favour of the hypothesis that biological photoreactivation proceeds *via* reversible photolysis of pyrimidine rings in polynucleotide chains.

9. The findings provide independent evidence to show that hyperchromicity in oligonucleotides is due to interaction between adjacent aromatic rings.

REFERENCES

- [1] Adamiec A. & Shugar D., *Naturwissenschaften* **44**, 356, 1959.
- [2] Baranowska J. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.*, in press, 1960.
- [3] Beaven G. H., Holiday E. R. & Johnson E. A. in *The Nucleic Acids* (E. Chargaff & J. N. Davidson, eds.), Vol. I, Chapt. 14, Academic Press, New York, 1955.
- [4] Bernheimer A. W., *J. Exp. Med.* **80**, 309, 1944.
- [5] Beukers R., Ijlstra J. & Berends W., *Rec. Trav. Chim.* **78**, 247, 1959.
- [6] Beukers R., Ijlstra J. & Berends W., *Rec. Trav. Chim.* **78**, 879, 1959.
- [7] Errera M., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 30, 1952.
- [8] Fresco J. R. & Doty P., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3923, 1957.
- [9] Griffin B. E., Todd A. R. & Rich A., *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.)* **44**, 1123, 1958.
- [10] Grunberg-Manago M., Ortiz P. J. & Ochoa S., *Science* **122**, 907, 1955.
- [11] Grunberg-Manago M. & Wiśniewski J., *C. R.* **245**, 750, 1957.
- [12] Heppel L. A., Whitfield P. R. & Markham R., *Biochem. J.* **60**, 8, 1955.
- [13] Jagger J., *Bacteriol. Rev.* **22**, 99, 1958.
- [14] Janion C. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 309, 1960.
- [15] Kland M. J. & Johnson L. A., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6187, 1957.
- [16] Laland A. G., Lee W. A., Overend W. C. & Peacocke A. R., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 356, 1954.
- [17] Lawley P. D., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 481, 1956.
- [18] Markham R. & Smith J. D., *Biochem. J.* **52**, 565, 1952.
- [19] Marmur J. & Doty P., *Nature* **183**, 1427, 1959.
- [20] Michelson A. M., *J. Chem. Soc.* p. 1371, 1959.
- [21] Michelson A. M., *J. Chem. Soc.* p. 3655, 1959.
- [22] Michelson A. M., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 335, 1959.
- [23] Moore A. M., *Can. J. Chem.* **37**, 1281, 1959.
- [24] Moore A. M. & Thomson C. H., *Science* **122**, 594, 1955.
- [25] Moore A. M. & Thomson C. H., *4th Intern. Conf. Radiobiol.*, Cambridge (Oliver & Boyd, Edinburgh), 1956.
- [26] Shugar D., *Postępy Biochemii* **1**, 269, 1955.
- [27] Shugar D. & Wierzychowski K. L., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 657, 1957.
- [28] Shugar D. & Wierzychowski K. L., *Postępy Biochemii* **4**, suppl., 243, 1958.
- [29] Shugar D. & Wierzychowski K. L., *J. Polymer Sci.* **31**, 269, 1958.
- [30] Shugar D. & Baranowska J., *Nature* **185**, 33, 1960.
- [31] Sinsheimer R. L., *Radiation Research* **1**, 505, 1954.
- [32] Sinsheimer R. L., *Radiation Research* **6**, 121, 1957.
- [33] Tanaka K., *J. Biochem. (Japan)* **45**, 1958.
- [34] Hener G. M., Khorana H. G., Markham R. & Pol. E. H., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6273, 1958.
- [35] Wang S. Y., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6196, 1958.
- [36] Wang S. Y., *Nature* **184**, B-59, 1959.
- [37] Warner R. C., *J. Biol. Chem.* **229**, 711, 1957.
- [38] Weber G., *J. Chim. Phys.* p. 878, 1958.
- [39] Wierzychowski K. L. & Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 355, 1957.
- [40] Wierzychowski K. L. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 313, 1959.
- [41] Wierzychowski K. L. & Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 63, 1960.

FOTOCHEMIA MODELOWYCH OLIGO- I POLINUKLEOTYDÓW

II. HOMOPOLIMERY KWASÓW ADENILOWEGO, GWANILOWEGO I CYTYDYLOWEGO
ORAZ SZEREG HETEROPOLIMERÓW

Streszczenie

1. Zbadano fotochemiczną przemianę różnych homo- i hetero-oligonukleotydów. Posługiwano się przy tym metodyką mającą ogólne zastosowanie w badaniach fotochemicznych modelowych oligonukleotydów.

2. Wysoka odporność fotochemiczna puryn zachowuje się po wbudowaniu ich do łańcucha polinukleotydowego.

3. Oligonukleotydy tyminowe charakteryzują się zwiększoną fotochemiczną czułością w stosunku do wolnego kwasu tymidyłowego. Reakcja fotochemiczna nie jest w tym przypadku spontanicznie odwracalna.

4. W dwunukleotydzie złożonym z reszt pirymidynowej i purynowej dawka promieniowania ultrafioletowego wystarczająca do całkowitej przemiany pierścienia pirymidynowego nie powoduje fotolizy puryny. Reakcja ciemna w 100% odtwarza wyjściowy pierścień.

5. Przemiana fotochemiczna reszt cytydyłowych w oligonukleotydach kwasu cytydyłowego jest odwracalna w 85 - 90% w ciemności.

6. Przemiana fotochemiczna dwunukleotydu złożonego z reszty urydynowej i cytydyłowej wykazuje 90% odwracalności w wyniku wtórnej ciemnej reakcji.

7. Reakcja fotochemiczna jak i ciemna reakcja odwrotna są w zasadzie reakcjami I rzędu. Obliczono wydajności kwantowe przemian. Energie aktywacji wyznaczone dla ciemnej reakcji odwrotnej są tego samego rzędu, jaki stwierdzono w procesach biologicznej termoreaktywacji.

8. Przedstawione wyniki dostarczają dalszych dowodów popierających hipotezę głoszącą, że proces biologicznej fotoreaktywacji przebiega poprzez odwracalną fotochemiczną przemianę zasad pirymidynowych w łańcuchach polinukleotydowych.

9. Dane doświadczalne w sposób niezależny pokazują, że hiperchromazja w oligonukleotydach następuje wskutek wzajemnych oddziaływań pomiędzy sąsiadującymi aromatycznymi pierścieniami.

Otrzymano 22.2.1960 r.

WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, BRONISŁAWA MORAWIECKA
i WANDA DOBRYSZYCKA

BADANIA NAD REGENERACJĄ BIAŁEK Z NIEROZPUSZCZALNYCH POŁĄCZEŃ BIAŁKOWO-TANINOWYCH

III. BIAŁKA ROZPUSZCZALNE W KWASIE SULFOSALICYLOWYM (GLIKOPROTEIDY)*

Zakład Biochemii Uniwersytetu i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Wrocław

W poprzednich pracach z tej serii [8, 9, 11] wykazano, że w reakcji, zachodzącej pomiędzy białkami surowicy, hemoglobina, żelatyną i lizozymem a kwasem taninowym otrzymuje się dwa typy nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych, określonych jako połączenia pierwotne i ostateczne. Pierwsze z nich powstają przy granicznym stosunku wagowym białka do taniny w punkcie izoelektrycznym białka, drugie natomiast przy nadmiarze taniny w środowisku silnie kwaśnym. Połączenia pierwotne wykorzystano do zagęszczania białek i ich regeneracji przy pomocy kofeiny [8, 9], natomiast — ostateczne do ilościowego oznaczania białek na zasadzie pomiaru zmętnienia, które w granicach czułości metody [7] jest proporcjonalne do wagi białka.

W tej pracy zajmowano się zagadnieniem powstawania nierozpuszczalnych połączeń gliko- i mukoproteidów z taniną. Badania przeprowadzono na białkach rozpuszczalnych w SSA¹, a mianowicie orosomukoidzie² surowicy ludzkiej, na mucynie ślinianek wołu oraz na seromukoidzie. Seromukoid jest heterogenną frakcją, zawierającą te wszystkie białka surowicy, które rozpuszczają się w SSA, TCA, względnie w kwasie nadchlorowym. Przebadano również występowanie białek rozpuszczalnych w SSA w różnych materiałach roślinnych i zwierzęcych.

* Część I i II: [9, 11].

¹ Używane w tej pracy skróty: SSA, kwas sulfosalicylowy; TCA, kwas trójchlorooctowy.

² Synonimy: kwaśny α_1 -glikoproteid, frakcja M-1 lub MP-1.

MATERIAŁY I METODY

Orosomukoid otrzymano z surowicy ludzkiej według Weimara i wsp. [15], mucynę ślinianek podszczękowych wołu metodą Hammarstena [2]. Sproszkowany preparat mucyny w ilości 300 mg zadawano małą ilością wody do napęcznienia i uzupełniano 0,1 N-NaOH do objętości 50 ml. Roztwór dializowano przez 36 godzin do wody destylowanej kilkakrotnie zmienianej i liofilizowano.

Liofilizowane preparaty orosomukoidu i mucyny suszono do stałej wagi w suszarce próżniowej w 100° nad P₂O₅ i przechowywano w eksykatrze próżniowym nad P₂O₅.

Do badań sporządzano następujące roztwory białek: orosomukoid rozpuszczano w wodzie, w 0,9% NaCl, 0,15 M-SSA i w 0,08 N-NaOH; mucynę rozpuszczano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej w wodzie destylowanej lub w 0,08 N-NaOH. Alkaliczne roztwory mucyny dializowano przez 36 godzin lub używano bez dializy; roztwór hemoglobiny ludzkiej otrzymywano według Drabkina [1].

Ziemniaki ucierano w móżdzierzu porcelanowym z jedną objętością 0,9% NaCl, po pół godzinie wirowano, osad przemywano taką samą objętością 0,9% NaCl. Po odwirowaniu osadu płyny łączono. Powietrzno-suche nasiona łubinu, grochu, pszenicy lub żyta mielono w młynie kulowym i zadawano 50-krotną ilością 10% NaCl. Po pół godzinie wirowano, osady przemywano taką samą objętością 10% NaCl. Po odwirowaniu osadu płyny łączono.

Płyny ustrojowe ludzi zdrowych: sok żołądkowy, pobrany na czczo, moczu, ślinie oraz krwi wirowano przez 10 minut przy 3000 obr./min., w celu usunięcia składników morfotycznych i ewentualnie śluzu. W niektórych doświadczeniach z moczu usuwano uromukoid metodą Tamma i Horsfalla [14]. Wody płodowe i mleko kobiece (9 dzień po porodzie) otrzymano z Kliniki Położniczej. Mleko kobiece i krowie wirowano przy 3000 obr./min. przez 30 minut, po czym pobierano ostrożnie spod warstwy tłuszczu płyn do oznaczania białka.

Używano preparatów kwasu sulfosalicylowego czystych, nie dających reakcji na jony SO₄²⁻. Sporządzano roztwory 0,45 M, kontrolując stężenie acydymetrycznie. Inne używane odczynniki były czyste do analizy (firmy Merck).

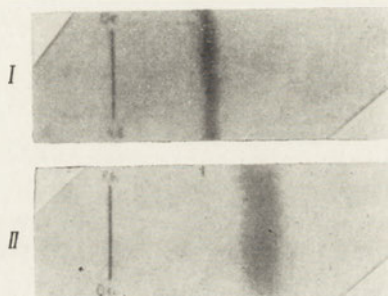
Elektroforezę bibułową i oznaczanie białka wykonano metodami podanymi poprzednio [7, 10]. Orosomukoid oznaczano również według Schmida [13] przy długości fali 278 mμ w spektrofotometrze marki „Algerie“. Elektroforogramy barwiono na cukry według Koiwa i Grönwalla [4]. Kwaśne mukopolisacharydy barwiono błękitem alcjanowym według Heremansa i Vaermana [3].

Białka strącano kwasem sulfosalicylowym przy stężeniu końcowym kwasu 0,15 M (Markham i wsp. [5]). Strącanie białek taniną i regenerowanie ich kofeiną przeprowadzano według postępowania podanego w poprzednich pracach [9, 11].

WYNIKI

ZASTOSOWANIE METODY TANINOWEJ DO OZNACZANIA BIAŁEK ROZPUSZCZALNYCH W 0,15 M-KWASIE SULFOSALICYLOWYM

Preparat orosomukoidu w elektroforezie bibułowej okazał się białkiem jednorodnym (Rys. 1), gdyż zarówno w pH 8,6, jak i 4,5 stanowił jedną frakcję o ruchliwości odpowiadającej α_1 -globulinom surowicy (pH 8,6) lub



Rys. 1. Elektroforegramy orosomukoidu: I — w pH 4,6, moderator octanowy $\mu = 0,1$; II — w pH 8,6, moderator wero-nalowo-octanowy $\mu = 0,06$. Na bibułę nanoszono po 100 μg białka. S — linia startu. Szczegóły w tekście

frakcji M-1 (pH 4,5) [5]. Elektroforegramy barwione na cukry [4] wykazywały również obecność tylko jednej frakcji glikoproteidowej. Po wyelucowaniu białka z barwionych elektroforegramów [10] znajdowano 100% białka poddanego elektroforezie.

W tablicy 1 porównano wyniki uzyskane w oznaczaniu stężenia orosomukoidu mikrometodą taninową i spektrofotometrycznie. Mikrometodą taninową [7] białko oznaczano w odniesieniu do krzywej standardowej sporządzonej dla żelatyny i znaleziono średnio 99,2% odważonego białka, rozpuszczonego w wodzie, w 0,08 N-NaOH lub w 0,15 M-SSA. Badany preparat rozpuszczony w 0,08 N-NaOH zawierał 97,8% białka, odnalezionego w oznaczeniu spektrofotometrycznym. Stężenie białka obliczano dla ekstynkcji właściwej $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 8,93 przy 278 m μ [13].

W tablicy 2 podano wyniki oznaczania stężenia mucyny w roztworach wodnych i alkalicznych w zależności od czasu rozpuszczania preparatu. W roztworach wodnych ilości białka oznaczanego metodą taninową nie

Tablica 1

Oznaczenie orosomukoidu mikrometodą taninową [7] i spektrofotometrycznie [13]

Rozpuszczalnik	Odważono (mg)	Znaleziono			
		metodą taninową		spektrofotometrycznie	
		(mg)	(%)	(mg)	(%)
H ₂ O	4,0	4,12	103,2	—	—
0,15 M-SSA	5,2	5,07	98,0	—	—
0,08 N-NaOH	5,6	5,40	96,4	5,47	97,6
		średnio	99,2		

zmieniają się nawet po 96 godzinach i wynoszą 100% odważonego białka. Natomiast mucyna rozpuszczona w 0,08 N-NaOH po 24 godz. ulega takim zmianom, że metodą taninową wykrywa się tylko 84% odważonego białka, a po upływie dalszych godzin stopniowo jeszcze mniejsze wartości. Po 96 godzinach wartość ustala się przy 52% odważonego preparatu. Spadek ilości białka, dającego się oznaczyć taniną, może być spowodowany nietrwałością mucyn w środowisku zasadowym [2]. 0,2% roztwór alkaliczny mucyny (0,08 N-NaOH) po 36 godzinnej dializie do wody destylowanej poddawano elektroforezie bibułowej w moderatorze weronalowo-octanowym w pH 8,6 przez 7 godzin. Elektroforogramy po wysuszeniu barwiono błękitem bromofenolowym i stwierdzono, że niezależnie od miejsca naniesienia białko pozostaje w miejscu startu i daje się w całości eluować z bibuły 0,1 N-NaOH. Równoległe elektroforogramy barwione błękitem alcjanowym nie wykazywały obecności kwaśnych mukopolisacharydów w plamie białkowej. Jako kontrolę na bibułę naniesiono

Tablica 2

Wpływ czasu przechowywania roztworu na oznaczenie mikrometodą taninową mucyny rozpuszczonej w wodzie lub 0,08 N-NaOH

Rozpuszczalnik	Mucyna (mg/100ml)	Czas (godz.)	Znaleziono	
			(mg)	(%)
H ₂ O	4,2	24	4,2	100,0
		24	4,4	104,8
		48	4,2	100,0
		110	4,4	104,8
0,08 N-NaOH	15,0	24	12,6	84,0
		48	9,45	63,0
		72	8,25	55,0
		96	7,8	52,0
		110	7,8	52,0
		134	7,8	52,0

Tablica 3

Zawartość białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym w materiałach zwierzęcych i roślinnych

Materiał	Białko całkowite (g/100 ml)	Białko w przesączu SSA	
		(g/100 ml)	(% białka całkowitego)
I. Standardy			
Mucyna	0,3	0,3	100
Orosomukoid	0,1	0,1	100
II. Płyny ustrojowe			
Surowica	8,0	0,08	1,0
Wody płodowe	0,18	0,015	8,4
Mleko krowie	3,4	0,3	8,8
Mleko kobiece (9 dzień laktacji)	1,4	0,8	57,0
Mocz	0,0114	0,0114	100
Mocz pozbawiony uromukoidu	0,0104	0,0084	80,8
Ślina	0,38	0,33	86,9
Sok żołądkowy na czczo pH 2,0	0,2	0,2	100,0
III. Wyciągi roślinne*			
Ziemiak	0,79	0,17	21,6
Groch zwykły	50,0	1,6	3,2
Łubin żółty	50,0	10,35	20,7
Pszemica	4,4	1,8	41,0
Żyto	6,5	6,03	92,7

* Podano gramy białka rozpuszczalnego w 0,9% NaCl w przeliczeniu na 100 g świeżej tkanki ziemniaka i w 10% NaCl na 100 g powietrzno-suchych nasion.

badany roztwór mucyny i bez przeprowadzania elektroforezy barwiono błękitem alcjanowym i wykazano obecność kwaśnych mukopolisacharydów w miejscu naniesionego białka.

Obydwa badane preparaty — orosomukoid i mucyna nie strącały się kwasem sulfosalicylowym. W obecności 0,15 M-SSA ilości białka, oznaczonego mikrometodą taninową, odpowiadają ilościom białka odważonego.

Nawiązując do powyższych wyników, oznaczano w niektórych płynach ustrojowych i wyciągach z tkanek roślinnych białko wprost i w przesączach po kwasie sulfosalicylowym. W tablicy 3 podano stężenie białka całkowitego i białek rozpuszczalnych w SSA w różnych płynach ustrojowych i wyciągach niektórych roślin. Ilości białek, rozpuszczalnych w SSA w badanych materiałach były bardzo różne. W soku żołądkowym, ślinie,

moczu i w nasionach żyta znaleziono w przesączu SSA powyżej 80% białka całkowitego, w mleku kobiecym i pszenicy od 40 - 80%, a w ziemniaku i łubinie od 10 - 40%. Poniżej 10% znaleziono w mleku krowim, grochu i wodach płodowych. Najmniejsze ilości białka w przesączu SSA, wynoszące poniżej 1% białka całkowitego znaleziono w surowicy ludzkiej.

W moczu normalnym białka rozpuszczalne w SSA stanowią około 80% białka całkowitego; w obecności jednak uromukoidu całość białka jest rozpuszczalna w kwasie sulfosalicylowym.

ZASTOSOWANIE TANINY I KOFEINY DO ZAGĘSZCZANIA BIAŁEK
ROZPUSZCZALNYCH W KWASIE SULFOSALICYLOWYM

Zastosowano postępowanie podane poprzednio [9, 11] do zagęszczania rozcieńczonych roztworów orosomukoidu i seromukoidu surowicy.

Orosomukoid

Ustalono zależność między pH środowiska a ilością taniny, potrzebnej do zupełnego wytrącenia orosomukoidu z rozcieńczonych roztworów w moderatorze weronalowo-octanowym lub 0,1 M-HCl. We wszystkich badanych pH przy stosunku wagowym białka do taniny równym 1 nie uzyskano nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. Jedynie w pH 2,6 zjawiała się po dodaniu taniny słaba opalescencja. Rys. 2 przedstawia wpływ pH na strącanie orosomukoidu taniną przy stosunku wagowym białka do taniny 1:10 i 1:40. W obydwu przypadkach uzyskano zupełne strącenie orosomukoidu jedynie w pH 2,6. Już w pH 1 i pH 3,2 nie można uzyskać nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych, nawet przy nadmiarze taniny (1:40). Nierozpuszczalne połączenia orosomukoidu z taniną o charakterze połączeń pierwotnych uzyskuje

Tablica 4

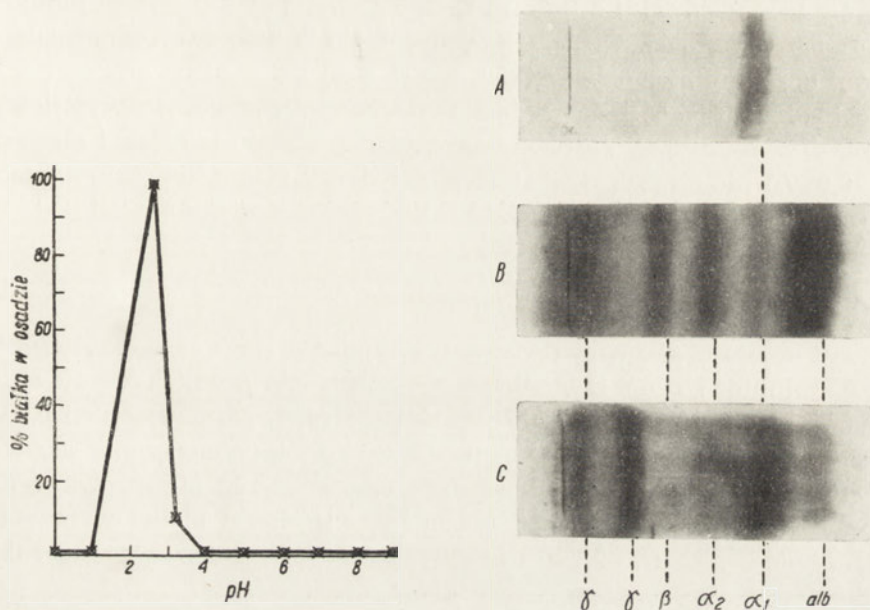
*Regeneracja orosomukoidu kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń
białkowo-taninowych*

Do doświadczenia brano po 3 ml roztworu zawierającego 1 mg białka; B:T = stosunek wagowy białka do taniny; dodawano 2 mg kofeiny. Szczegóły w tekście

Nr doświadczenia	Rozpuszczalnik	Białko całk. (mg/100 ml)	B:T	Białko zregenerowane		Białko nie zregenerowane	
				(mg/100 ml)	stopień zagęszczenia	(mg)	% białka całkowitego
1	woda	33	1:10	690	21	0,150	15
2	0,15M-SSA	33	1:10	700	21	0,120	12
3	0,15M-SSA	33	1:30	680	21	0,150	15

się jedynie w pobliżu punktu izoelektrycznego orosomukoidu, wynoszącym 2,6, przy granicznym stosunku wagowym 1 : 10.

Po rozpuszczeniu orosomukoidu w 0,15 M-SSA (pH około 1) uzyskiwano zupełne wytrącenie białka taniną przy stosunku wagowym 1 : 10. Fakt ten stoi w sprzeczności z poprzednim doświadczeniem, w którym w pH 1 nie uzyskiwano nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. Opierając się jednak na badaniach Schmida [13], który wykazał, że w obecności TCA punkt izoelektryczny orosomukoidu przesuwają się do pH 1, przypuszczamy, że podobne zjawisko zachodzi również w obecności SSA.



Rys. 2. Wpływ pH na strącanie orosomukoidu taniną. Stosunek wagowy białka do taniny (o) 1 : 10 i (x) 1 : 40. Dla pH 0—1 N-HCl; pH 1—0,1 N-HCl; dla pH 2,6 i wyższych 0,05 N-moderator weronalowo-octanowy

Rys. 3. Elektroforogramy orosomukoidu, białek surowicy i seromukoidu. A — orosomukoid zagęszczony z 0,033% roztworu w 0,15 M-SSA do 0,7%, naniesiono 0,02 ml (0,14 mg białka). B — surowica, naniesiono 0,02 ml (1,6 mg białka). C — orosomukoid zagęszczony przy pomocy taniny i kofeiny z przesączu SSA tej samej surowicy, naniesiono 0,04 ml (0,6 mg białka). Stężenia białka w poszczególnych frakcjach podano w tabelcy 5.

W tabelcy 4 przedstawiono wyniki uzyskane przy zagęszczaniu taniną i kofeiną orosomukoidu, rozpuszczonego w wodzie lub w 0,15 M-SSA. W doświadczeniu 1 dodawano do 3 ml roztworu wodnego orosomukoidu, zawierającego 1 mg białka, 0,4 ml 3% wodnego roztworu taniny o pH 2,6;

w doświadczeniu 2 i 3 do 3 ml roztworu orosomukoidu w 0,15 M-SSA dodawano 0,4 ml 3% lub 9% taniny. We wszystkich trzech doświadczeniach szybko sedymentował kłaczkowaty osad białkowo-taninowy. Po 15 minutach wirowano próby przez 30 min. przy 3000 obr./min. Osady przemywano dwukrotnie 0,9% NaCl. Płyny znad osadów nie zawierały białka. Do przemytych osadów białkowo-taninowych dodawano po 2 mg kofeiny i, po wymieszaniu, ok. 0,1 ml 0,9% NaCl. Po 15 minutach próbki wirowano. Płyny znad osadów ostrożnie lewarowano kapilarą i oznaczano białko. Osady kofeinowo-taninowe rozpuszczano w 3 ml 0,1 N-NaOH i oznaczano w nich pozostałe białko. Orosomukoid po regeneracji tak z roztworów wodnych, jak i z 0,15 M-SSA poddawano elektroforezie bibułowej w pH 8,6 (Rys. 3 A). Otrzymano jedną frakcję białkową, odpowiadającą frakcji α_1 -globulin. We wszystkich trzech doświadczeniach zregenerowano 85% białka, uzyskując 21-krotne zagęszczenie roztworów wyjściowych (Tabl. 4). Zagęszczony roztwór orosomukoidu (0,7%) tak jak i macierzysty (0,03%) nie strącał się 0,15 M-SSA i dawał nierozpuszczalne połączenia z taniną jedynie w pH 2,6.

Seromukoid

Do 1 objętości surowicy dodawano 1 obj. 0,9% NaCl i 1 obj. 0,45 M-SSA. Po 30 minutach próbki wirowano przy 3000 obr./min. przez 15 minut, uzyskując przejrzysty lub lekko opalizujący płyn, zawierający od 0,02 do 0,04 g białka w 100 ml. Uwzględniając trzykrotne rozcieńczenie surowicy, stężenie seromukoidu wynosi od 0,06 - 0,12 g w 100 ml surowicy. Przy końcowym stężeniu SSA, wynoszącym 0,15 M, ilości białka w przesączu były najniższe. Poniżej 0,1 M i powyżej 0,3 M w przesączu wzrastały ilości białka.

Uzyskano zupełne strącenie taniną białek rozpuszczalnych w SSA przy stosunku wagowym białka do taniny 1 : 10. Przy wyższych stężeniach taniny uzyskuje się szybsze wypadanie osadu białkowo-taninowego bez ujemnego wpływu na późniejszą regenerację kofeiną.

Osady białkowo-taninowe po dwukrotnym przemyciu wodą regenerowano kofeiną według postępowania, podanego przy orosomukoidzie. Zagęszczony po regeneracji z połączeń białkowo-taninowych seromukoid poddawano elektroforezie bibułowej w moderatorze weronalowo-octanowym w pH 8,6 i oznaczano stężenie białka w poszczególnych frakcjach, eluując je z bibuły 0,1 N-NaOH [10]. Rys. 3 przedstawia trzy elektroforegramy: A — orosomukoidu (0,14 mg białka), B — surowicy (1,6 mg białka), C — seromukoidu zagęszczonego z przesączu SSA tej samej surowicy (0,6 mg białka). W tablicy 5 podano wyniki oznaczania białka w poszcze-

Tablica 5

Stężenie frakcji białkowych w elektroforogramach białek surowicy, seromukoidzie i orosomukoidzie, przedstawionych na rys. 3

Orosomukoid zagęszczono z roztworu zawierającego 33 mg białka w 100 ml 0,15 M-SSA do stężenia 700 mg białka/100 ml 0,9% NaCl.

Seromukoid znajdujący się w przesączu białek strąconych 0,15 M-SSA zagęszczono ze stężenia 34 mg białka/100 ml SSA do 1500 mg/100 ml 0,9% NaCl.

Białko eluowano z barwionych elektroforogramów 0,1 N-NaOH. Szczegóły w tekście

Frakcja	Orosomukoid (A) 0,02 ml		Surowica (B) 0,02 ml		Seromukoid (C) 0,04 ml	
	eluat (ml)	białko (mg)	eluat (ml)	białko (mg)	eluat (ml)	białko (mg)
Albuminy	2	0	10	0,820	2	0,024
α_1 -globuliny	6	0,140	2	0,088	4	0,240
α_2 -globuliny	2	0	2	0,148	2	0,088
β -globuliny	2	0	4	0,176	2	0,064
γ_1 -globuliny	2	0	6	0,330	3	0,105
γ_2 -globuliny	2	0			4	0,088
Suma		0,140		1,562		0,609
Wzięto do rozdziału		0,140		1,600		0,600
Odnaleziono %		100,0		97,8		101,0

gólnych frakcjach przedstawionych elektroforogramów. Orosomukoid posiada taką samą ruchliwość jak frakcja α_1 -globulin surowicy i seromukoidu. W elektroforogramie A znaleziono w tej frakcji 0,14 mg białka, w B — 0,088 mg, w C — 0,24 mg. W surowicy jest to frakcja najsłabsza, natomiast w zagęszczonym seromukoidzie najsilniejsza i stanowi 40% białka całkowitego. Albuminy są w białkach surowicy frakcją najsilniejszą (0,82 mg) i zarazem najmniejszą w seromukoidzie (0,02 mg). Pomimo małego stężenia frakcja albuminowa barwi się dobrze błękitem bromofenolowym. α_2 -globuliny wynoszą w elektroforogramie B 0,15 mg, w seromukoidzie 0,09 mg. Frakcja β -globulin, wyraźna w surowicy (0,176 mg), w seromukoidzie jest prawie niewidoczna, jednak po elucji znaleziono 0,06 mg białka. Frakcja ta, pomimo że jest jej blisko trzy razy więcej niż albumin, jest niewidoczna w barwionych elektroforogramach, gdyż wykazuje słabe powinowactwo do błękitu bromofenolowego. Największe różnice stwierdza się w obrazie elektroforetycznym γ -globulin. W surowicy widoczna jest jedna rozlana frakcja, zawierająca 0,33 mg białka, podczas gdy w seromukoidzie uzyskano dwie ostro oddzielone frakcje o ruchliwościach zbliżonych do wolno wędrującej frakcji β -globulin i wolno wędrujących γ -globulin. Stężenie białka w obu frakcjach γ -globulinowych seromukoidu jest podobne. Elektroforogramy białek surowicy i zagęszczonego seromukoidu barwione fuksyną według Koïwa i Grönwalla

[4] wykazywały obecność komponenty cukrowej we wszystkich frakcjach białkowych.

W tabelicy 6 przedstawiono wyniki oznaczania stężenia białka w poszczególnych frakcjach surowicy i w zagęszczonym seromukoidzie. Oznaczając stężenie białek rozpuszczalnych w SSA przed zagęszczeniem i po zagęszczeniu obliczano ich stężenie w poszczególnych frakcjach białkowych surowicy, dzieląc wartości znalezione dla zagęszczonych białek przez stopień zagęszczenia. W ostatniej rubryce podano procentową zawartość białek rozpuszczalnych w SSA w poszczególnych frakcjach białkowych surowicy.

Tablica 6

Stężenie białka całkowitego i rozpuszczalnego w SSA (seromukoid) w poszczególnych frakcjach uzyskanych w elektroforezie bibulowej surowicy krwi

Seromukoid zagęszczony przy pomocy taniny i kofeiny 15-stokrotnie. Szczegóły w tekście

Fracja	Białko całkowite (g/100 ml)	Seromukoid		
		po zagęszczeniu (g/100 ml)	przed zagęszczeniem	
			(g/100 ml)	% białka całk.
Albuminy	4,1	0,06	0,004	0,1
α_1 -globuliny	0,44	0,60	0,040	9,1
α_2 -globuliny	0,74	0,22	0,015	2,0
β -globuliny	0,88	0,16	0,011	1,2
γ_1 -globuliny	1,65	0,26	0,017	1,9
γ_2 -globuliny		0,22	0,015	
Suma	7,81	1,52	0,102	
Przed rozdziałem	8,00	1,50	0,100	1,25

W 4,1 g albumin znaleziono 4 mg białek rozpuszczalnych w SSA, co stanowi zaledwie 0,1% białka tej frakcji. W α_1 -globulinach prawie 10% stanowi kwaśny α_1 -glikoproteid (orosomukoid). W pozostałych frakcjach białka rozpuszczalne w SSA stanowią od 1 - 2% białka całkowitego danej frakcji.

Wielka czułość przedstawionej metody, która pozwala na strącanie taniną białek nawet z mg% roztworów, nasuwa podejrzenie, że miligramowe ilości białek, strącających się SSA, przechodzą do przesączu i powinny się po zagęszczeniu roztworu strącić kwasem sulfosalicylowym. Wykazano, że zagęszczone roztwory seromukoidu, nawet do stężenia 4 g/100 ml zachowują całkowitą rozpuszczalność w SSA. Jako doświadczenie kontrolne wykonano badania nad rozpuszczalnością hemoglobiny w SSA. 4% roztwór hemoglobiny strącano 0,15 M-SSA i w przesączu nie znaleziono śladu białka, dającego się oznaczyć taniną.

DYSKUSJA

Wyniki tej pracy wskazują, że parametry reakcji ustalone poprzednio dla powstawania dwóch typów połączeń białkowo-taninowych, pierwotnych lub ostatecznych, nie zmieniają się dla białek rozpuszczalnych w SSA, a mianowicie dla mucyny, orosomukoidu i seromukoidu. Szczególnie interesujące okazało się zachowanie się mucyn, których budowę można by porównać do nukleoproteidów, gdyż zawierają łatwo odszczepiającą się pod wpływem zasad, soli lub pola elektrycznego komponentę wielocukrową, w tym przypadku kwas chondroitynosiarkowy. Wiadomo, że mukopolisacharydy nie strącają się taniną. Preparat mucyn, uzyskany wg Hammarstena zawierał wprawdzie kwas chondroitynosiarkowy, odszczepiający się w polu elektrycznym od części białkowej, jednak komponenta białkowa była zdenaturowana i straciła ruchliwość elektroforetyczną. Z tego powodu posiadany preparat nie nadawał się do badań nad regeneracją białek z pierwotnych połączeń białkowo-taninowych. Natomiast denaturacja białka nie wpływała na powstawanie połączeń ostatecznych, gdyż po rozpuszczeniu mucyny w wodzie uzyskiwano z nadmiarem taniny w środowisku silnie kwaśnym zmętnienia proporcjonalne do wagi preparatu. Stosując standard żelatynowy oznaczano mikrometodą taninową 100% odważonej mucyny. W roztworach alkalicznych zaobserwowano spadek stężenia mucyny, co można tłumaczyć dysocjacją cząsteczki w tym środowisku na komponentę białkową strącającą się taniną i na nie reagującą z nią kwas chondroitynosiarkowy. Z tych względów, przy ilościowym oznaczaniu mucyn metodą taninową, należy unikać czynników, które mogłyby spowodować dysocjację cząsteczki.

Drugim białkiem, zawierającym również duże ilości cukrów (40%), tym razem trwale związanych z białkiem, był orosomukoid. Orosomukoid jest białkiem niskocząsteczkowym (44 000), nie strącającym się SSA, zaliczonym do kwaśnych glikoproteidów. Połączenia pierwotne orosomukoidu z taniną uzyskiwano jedynie w P. I. (pH 2,6) przy stałym stosunku wagowym białka do taniny. Badania nad orosomukoidem potwierdziły poprzednią hipotezę, według której zasadniczym warunkiem powstawania połączeń pierwotnych jest stan izoelektryczny cząsteczki białkowej, a nie dysocjacja kwasu taninowego. Fakt, że z połączeń orosomukoidu z taniną można go regenerować kofeiną w identycznych warunkach jak inne białka, stanowi pośredni dowód na taki sam schemat budowy wszystkich połączeń białkowo-taninowych. Z nadmiarem taniny w środowisku silnie kwaśnym uzyskano połączenia ostateczne dające zmętnienia proporcjonalne do wagi preparatu. Obecność cukru trwale związanego z białkiem nie wpływa na sposób reagowania taniny z białkami.

W biochemii klinicznej duże zainteresowanie budzi frakcja białek surowicy rozpuszczalnych w SSA, TCA lub kwasie nadchlorowym. Frakcja ta została nazwana przez Zanettiego i wsp. [17] seromukoidem ze względu na dużą zawartość cukrów. W dalszych badaniach prowadzonych szczególnie przez Winzlera [16] i Schmida [13] wykazano, że seromukoid zawiera głównie kwaśny α_1 -glikoproteid. Seromukoid zawiera 10% całkowitych cukrów, związanych z białkami pełnej surowicy, licząc na heksozę. W stanach patologicznych zmiany w stężeniu seromukoidu występują równoległe do zmian w ilości cukrów związanych z białkiem pełnej surowicy. Do oznaczania glikoproteidów surowicy stosowane są obecnie dwie odmienne techniki. W jednej z nich oznacza się cukry związane z białkami w surowicy lub w poszczególnych jej frakcjach uzyskiwanych metodą Cohna lub elektroforezą bibułową. W drugiej oznacza się stężenie białka w przesączu SSA surowicy, zakładając, że frakcja ta zawiera wyłącznie orosomukoid. Białko z przesączu SSA strąca się kwasem fosforowolframowym i w osadzie po rozpuszczeniu oznacza się białko lub cukier. Dotychczas nie poddawano seromukoidu frakcjonowaniu w elektroforezie bibułowej, prawdopodobnie ze względu na duże trudności w usuwaniu kwasu sulfosalicylowego i w otrzymaniu pożądanego stężenia niezdenaturowanego białka. Dzięki zastosowaniu taniny i kofeiny do zagęszczania seromukoidu, uzyskano z około 6 ml surowicy zagęszczoną frakcję białkową wolną od SSA i zdenaturowanego białka. Zagęszczony roztwór seromukoidu poddany elektroforezie bibułowej wykazywał większą heterogenność niż dotychczas przyjmowano, gdyż zawierał nie tylko frakcje α_1 - i α_2 -globulinowe, lecz również albuminy oraz β - i γ -globuliny.

Frakcjonowanie białek na zasadzie ich rozpuszczalności w SSA nie jest dotychczas stosowane do innych materiałów poza surowicą. Już w przypadkowo przez nas dobranym materiale pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego zaobserwowano szereg ciekawych różnic. Przede wszystkim należy stwierdzić, że białka rozpuszczalne w SSA są rozpowszechnione w przyrodzie i stężenie ich niezależne jest od stężenia białka całkowitego. Ciekawe są również różnice w stężeniach obu frakcji — rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w SSA, występujące, np. w mleku kobiecym i krowim lub w wyciągach solnych z nasion pszenicy i żyta.

W niektórych materiałach, jak np. ślina, sok żołądkowy lub mocz, białka rozpuszczalne w SSA stanowią ponad 80% białka całkowitego. Z nieogłoszonych badań wynika, że np. białka śliny lub soku żołądkowego regenerowane kofeiną z połączeń białkowo-taninowych i poddane elektroforezie bibułowej w pH 8,6 zawierają charakterystyczne frakcje białkowe o ruchliwościach anodowych i katodowych.

Fakt, że białka rozpuszczalne w SSA reagują z taniną dając oba typy połączeń (pierwotne i ostateczne [8]), posiada duże znaczenie tak dla ich ilościowego oznaczania, jak i dla badań nad strukturą i własnościami biologicznymi gliko- i mukoproteidów.

STRESZCZENIE

Stwierdzono, że białka pochodzenia roślinnego i zwierzęcego rozpuszczalne w 0,15 M-kwasie sulfosalicylowym (SSA) reagują z taniną, dając połączenia ostateczne. Pozwala to na ich ilościowe oznaczanie turbidymetryczną mikrometodą taninową.

Orosomukoid i seromukoid reagują z taniną w pH 2,6 w stosunku wagowym białka do taniny 1 : 10 dając połączenia pierwotne, z których białko regeneruje się kofeiną. Zregenerowany orosomukoid posiada niezmienną ruchliwość elektroforetyczną zarówno w moderatorze octanowym o pH 4,6, jak i w weronalowym o pH 8,6. Zregenerowany seromukoid poddany elektroforezie bibułowej w moderatorze weronalowym o pH 8,6 rozdziela się na sześć frakcji białkowych odpowiadających ruchliwością frakcjom pełnej surowicy. Stężenie białek rozpuszczalnych w SSA wynosi we frakcji albuminowej 4,4, α_1 -globulinach 40, α_2 -globulinach 15, β -globulinach 11, γ_1 -globulinach 17 i w γ_2 -globulinach 15 mg/100 ml surowicy. Całkowite stężenie seromukoidu wynosiło 100 mg/100 ml surowicy.

Zbadano następujące płyny ustrojowe na zawartość białek rozpuszczalnych w SSA: wody płodowe, ślinę, mleko, surowicę, sok żołądkowy oraz mocz i stwierdzono, że białka te stanowią od 1 do 100% białka całkowitego. W wyciągach z tkanek roślinnych: ziemniaka, nasion łubinu, grochu, pszenicy i żyta ilość białek rozpuszczalnych w SSA wynosiła od 3 do 92% białka wyciągu solnego.

LITERATURA

- [1] Drabkin D. L., *Arch. Biochem.* **21**, 222, 1949.
- [2] Hammarsten Z., *Physiol. Chem.* **12**, 163, 1888.
- [3] Heremans J., Vaerman J. P., *Clin. Chim. Acta* **3**, 430, 1958.
- [4] Koiv E., Grönwall A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **4**, 244, 1952.
- [5] Markham R. L., Jacobs J. H., Fletcher E. T. D., *J. Lab. Clin. Med.* **48**, 559, 1956.
- [6] Mehl J. W., Golden F., Winzler R. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**, 110, 1949.
- [7] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 279, 1959.
- [8] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 375, 1959.
- [9] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 385, 1959.
- [10] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Dobryszczyka W., *Clin. Chim. Acta* **4**, 515, 1959.
- [11] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Morawiecka B., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 453, 1959.
- [12] Meyer K., *Adv. Protein Chem.* **2**, 310, 1948.

- [13] Schmid K., *J. Am. Chem. Soc.* 75, 60, 1953.
[14] Tamm I., Horsfall F. L., *J. Exptl. Med.* 95, 71, 1952.
[15] Weimar H. E., Mehl J. M., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* 185, 561, 1950.
[16] Winzler R. J., *Methods of Biochemical Analysis* (wyd. D. Glick), Vol. 2, p. 279. Interscience Publ. Inc. New York, 1955.
[17] Zanetti H., Rimington B. J., Bywaters D. cyt. wg: Winzler R. J. w *Glycoproteins of Plasma, Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Churchill Ltd. London 1958.

STUDIES ON REGENERATION OF PROTEINS FROM INSOLUBLE PROTEIN-TANNIN COMPOUNDS

III. PROTEINS SOLUBLE IN SULPHOSALICYLIC ACID (GLYCOPROTEINS)

Summary

It was stated that the plant and animal proteins soluble in 0.15 M sulphosalicylic acid (SSA) react with tannin to give the final compounds, allowing thus to determine them by the tannin turbidimetric method.

Orosomuroid and seromuroid reacted with tannin at pH 2.6 and at the weight ratio 1:10 producing the primary compounds from which protein could be regenerated with caffeine.

The regenerated orosomuroid showed an unchanged electrophoretical mobility both in acetate buffer, pH 4.6, and in veronal one, pH 8.6. The regenerated seromuroid was separated by paper electrophoresis in veronal buffer into six fractions, corresponding by their mobilities to the fractions of whole serum. The concentration of the SSA-soluble proteins in albumin fraction was 4.4, in α_1 -globulins 40, in α_2 -globulins 15, in β -globulins 11, in γ_1 -globulins 17, and in γ_2 -globulins 15 mg. per 100 ml. of serum. The total concentration of seromuroid was 100 mg. per 100 ml. of serum.

The SSA-soluble proteins were examined in amniotic fluid, saliva, milk, serum, gastric juice and urine. It was found that these proteins accounted for 1 to 100 per cent of total protein. Contents of the SSA soluble protein in extracts deriving from plant tissues, namely from potatoes and from seeds of lupine, peas, wheat and rye, varied from 3 to 92 per cent of the total proteins in saline extracts.

Otrzymano 25.2.1960 r.

D. KEILIN

HAEMERYTHRIN

Molteno Institute, University of Cambridge

Haemerythrin, which is an Fe-protein compound, shares with the three other types of oxygen carriers, haemoglobin, chlorocruorin and haemocyanin, the property of combining reversibly with molecular oxygen (Keilin, 1956, Table 1).

Although the presence of red cells in the coelomic fluid of Sipunculid worms has been known since the early observations of Rouget (1859) and Schwalbe (1869), the name haemerythrin for the red pigment of these cells was introduced only in 1880 by Krukenberg. The work on haemerythrin can be divided into three periods separated by two long intervals during which interest in this pigment markedly declined.

The first period (1859 - 1903) covered numerous scattered observations on some of the properties of this pigment, which can be summarised as follows:

The pigment becomes red when exposed to air or oxygen and colourless when the oxygen is removed by evacuation. The pigment, although it contains iron, shows no absorption spectrum characteristic of haemoglobin and forms no Teichmann or haemin crystals. Outstanding during this period were the contributions of Lankester (1872), Krukenberg (1880), Andrews (1890), Cuénot (1900) and Kobert (1903).

To the second period (1927 - 1935) belong the important contributions of Marrian (1927), Florkin (1933) and Roche (1933 - 1935) which established the fundamental properties of this pigment. Haemerythrin was now purified and crystallised. Its molecular weight, determined by an osmometric method (Roche and Roche, 1935), gave an average value of about 66,000. Since the iron content was approximately 1.01% each molecule of haemerythrin would contain about 12 iron atoms. The spectrophotometric curve of purified oxyhaemerythrin plotted between 230 and 560 m μ revealed three diffuse absorption bands at 270, 350 and 502 m μ . The liberation of O₂ from oxyhaemerythrin by treatment with potassium

ferricyanide was of great help in establishing more precisely several properties of this pigment, such as the S-shaped oxygen dissociation curve, absence of Bohr effect and the ratio of Fe/O₂ which according to Florkin was approximately 3.

The work of the third period (from 1951 until the present time) concentrated mainly on the re-estimation of the molecular weight by modern methods, the re-determination of the Fe/O₂ ratio, the study of the nature of the bonds and of the valency of Fe in haemerythrin during oxygenation and the comparative study of the absorption spectra of haemerythrin, oxyhaemerythrin and methaemerythrin. The main object of the present study is the critical examination of some of the results obtained in the study of these aspects of haemerythrin, especially the valency of the iron in oxyhaemerythrin and the nature of the methaemerythrin compound. However, before dealing with these problems it is appropriate to consider the distribution of this pigment in nature.

DISTRIBUTION OF HAEMERYTHRIN

Haemerythrin, unlike haemoglobin, but like chlorocruorin and haemocyanin, has a very limited distribution in nature, being found only in some invertebrates. As it is present in all species of Sipunculid worms, it is not surprising that the main bulk of work on this pigment was carried out on representatives of this family: *Sipunculus nudus*, *Phascolosoma elongatum*, *P. vulgare* and *P. gouldii*. Haemerythrin was recently found by Fänge and Åkesson (1952) in Priapulid worms belonging to the genera *Priapulid* and *Halicryptus*. Its presence has also been recorded by Benham (1897) in the blood of a Polychaete worm *Magelona*, but this observation has not yet been corroborated. Although the presence of a red pigment in the blood cells of a Brachiopod: *Lingula anatifera* was known since the early observations of François (1891), the nature of this pigment isolated from the blood cells of *Lingula unguis* was re-investigated only 50 years later by Kawaguti (1941) and identified as haemerythrin. The presence of haemerythrin in *Lingula* is of special interest because this Brachiopod persisted without much change since the Cambrian period. Delage and Hérouard (1897) wrote in this respect: „La persistance ininterrompue de cette forme depuis les premiers temps de l'ère palaeozoïque jusqu'à nos jours est un de plus frappants exemples de la possibilité d'une vie sans évolution modificatrice, au milieu des variations des conditions ambiantes" (p. 324). One can therefore assume that the Cambrian *Lingula* living several hundred million years ago were already provided with haemerythrin. In dealing with the problem of the origin and evolution of oxygen carriers, one could be tempted to speculate on

the possibility that haemerythrin was probably one of the first attempts by nature to produce an oxygen carrier. However, the recent discoveries of haemoglobin in the cells of yeast, moulds, protozoa and nodules of leguminous plants dispose of such speculations (See Keilin, 1956).

MOLECULAR WEIGHT OF HAEMERYTHRIN

The molecular weight of haemerythrin, according to Roche and Roche (1935), is about 66,000. However, it must be noted that this value, which is often referred to in the literature, was obtained by them from osmotic pressure measurements on material of unknown homogeneity, and was an average of values varying between 57,000 and 69,000. Moreover, the values they obtained with haemerythrin purified by crystallization, or ultrafiltration, varied between 74,000 and 89,000. It is also important to remember that osmometric determination of molecular weight gives only the average value of molecules of different sizes present in the solution.

The molecular weight of haemerythrin calculated by Love (1957) from the values of the sedimentation velocity constant 6.2×10^{-13} sec. obtained by Resnik and Klotz (1951) and the diffusion coefficient of about 5.8×10^{-7} cm.²/sec. given by Brill and Olson (1953), assuming the value of the partial specific volume to be 0.75, was $105,000 \pm 4,000$. On the other hand, the X-ray determination of the molecular weight carried out by Love (1957) on crystals of haemerythrin obtained from *Phascolosoma gouldii* gave a value of about 120,000. Since the iron estimation carried out on the same material gave the value of 0.88%, each molecule of haemerythrin of this size would contain about 19 atoms of Fe.

MAGNETIC SUSCEPTIBILITY MEASUREMENTS

On measuring the magnetic susceptibility of haemerythrin and oxyhaemerythrin solutions of the same concentration, Kubo (1953) found that, as in the case of haemoglobin, the paramagnetic susceptibility decreases on oxygenation. The results he obtained indicate that the bonding of the iron atoms in deoxygenated haemerythrin is of the ionic type. On oxygenation an "oxygen molecule not only loses its own paramagnetism but also affects all the three iron atoms in the group in such a way that the bond type is essentially covalent". The number of unpaired electrons in the group of iron atoms was calculated by Kubo to be twelve in deoxygenated and zero in oxygenated haemerythrin.

THE VALENCY OF THE IRON ATOMS IN OXYHAEMERYTHRIN

By analogy with haemoglobin and oxyhaemoglobin, it was tacitly assumed, but never clearly formulated, that the iron atoms both of

haemerythrin and oxyhaemerythrin are in the divalent state. Haemerythrin, on combining reversibly with molecular oxygen, undergoes oxygenation which is not accompanied by the oxidation of its divalent iron atoms, and the oxygen dissociated from oxyhaemerythrin is ordinary molecular oxygen.

This view was recently challenged by Klotz and Klotz (1955) who made an attempt to determine the valency state of the iron in haemerythrin and oxyhaemerythrin directly. On treating them with a solution of *o*-phenanthroline in dilute sulphuric acid, which gives a deep orange colour with divalent iron, they found that while in deoxygenated haemerythrin two of the three iron atoms are in a divalent state, in oxyhaemerythrin all the three iron atoms are trivalent. Thus haemerythrin, according to them, on reacting with oxygen becomes both oxygenated and oxidized. Moreover, since the treatment of haemerythrin with a mercurial compound (salyrganic acid) abolishes the oxygenation reaction (Klotz, Rapoport and Rosenberg, 1953) they believe that the iron atoms are linked to protein through sulphur groups. The oxygen molecule on combining with haemerythrin takes up one electron from each of the two iron atoms and becomes reduced to a peroxide ion O_2^{--} ; the third iron atom does not take part in the reaction. The ferric state of oxyhaemerythrin explains, according to them, its failure to react with carbon monoxide. In the interpretations of some of the results of their experiments they used for the ratio of Fe/O_2 the value 3 given by Florin (1933). It was recently shown that correct value for this ratio is 2.

The view of Klotz and Klotz (1955) was adversely criticized by Williams (1955) who believed that the negative colour reaction they obtained was due to the fact that their reagent failed to liberate the iron atoms which may be more firmly bound to the protein in oxyhaemerythrin than in haemerythrin. Although, as will be shown further, other and more important objections can be raised against the view put forward by Klotz and Klotz (1955), they were nevertheless right in rejecting Williams' criticism in bringing forward strong evidence demonstrating that all iron atoms of oxyhaemerythrin were liberated by the reagent they used.

Haemerythrin of *Sipunculus nudus* was recently re-investigated by Boeri and Ghiretti-Magaldi (1957) who found: 1) that on oxygenation, haemerythrin combines with one molecule of oxygen for each of the two iron atoms ($Fe/O_2 = 2$), 2) that oxyhaemerythrin, treated with potassium ferricyanide, liberates the theoretical amount of oxygen both *in vacuo* and in air, 3) that only a small fraction ($\approx 10\%$) of the bound oxygen is liberated from oxyhaemerythrin on acidification, which they believe is

due to "a competition between the rate of release and the rate of disappearance in oxidation reaction" and 4) that haemerythrin, as had already been shown by Marrian (1927) can exist in three states recognizable by their colour and absorption spectra: haemerythrin (deoxygenated), oxyhaemerythrin (oxygenated) and methaemerythrin (oxidized by potassium ferricyanide). They also gave the absolute absorption curves of these three derivatives of haemerythrin for the first time (see Fig. 1).

As to the valency of the iron in oxyhaemerythrin, their findings that the oxygen released on acidification is involved in some oxidation reaction, according to them "set a limitation to the conclusions by Klotz and Klotz who used acidification of oxyhemerythrin solutions to liberate

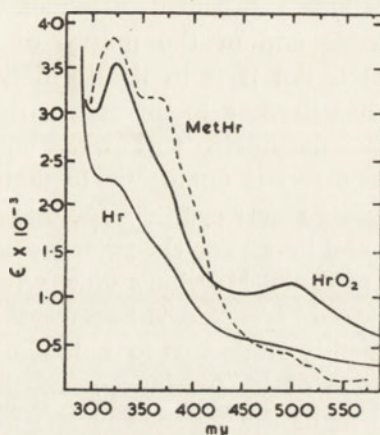


Fig. 1. Absorption curves of haemerythrin — Hr, oxyhaemerythrin — HrO₂, and methaemerythrin — MetHr of *Sipunculus nudus* according to Boeri and Ghiretti-Magaldi (1957). The original figure was slightly modified in replacing the ordinate values by those of the extinction coefficient

$\epsilon = \log_{10} \frac{I_0}{I} \times \frac{1}{c \times l}$, where I_0 and I are the intensities of the incident and transmitted light respectively, c = concentration of haemerythrin in gram-atoms of Fe per litre, and l = optical path of the cell = 1 cm. Abscissa = wavelengths in $m\mu$

the iron from the protein in order to measure its valence with *o*-phenanthroline". However, following this mild criticism they concluded: "It seems at present difficult to decide whether the oxygen is bound to bivalent iron atoms as is held by Kubo, or whether it is bound in a peroxy form to trivalent irons as is held by Klotz and Klotz. The decision between

either alternative, however, is not a question of prime importance and is dependent on the point from which the matter is viewed“.

While the statement of the first sentence of this conclusion is in complete disagreement with the important results they themselves obtained, the statement of the second sentence, if accepted, defeats the main object, not only of their own work, but also of the experiments carried out by Klotz and Klotz (1955) and of their discussion with Williams (1955) which followed.

CRITICAL EXAMINATION OF THE VIEW OF KLOTZ AND KLOTZ
AND PERSONAL OBSERVATIONS

It is indeed unfortunate that workers endeavouring to solve the problem of the valency state of the iron in oxyhaemerythrin tacitly avoided in their discussions the consideration of the mechanism of its reaction with ferricyanide and of the nature of the methaemerythrin derivatives thus obtained. Yet it is in the formation and in the nature of this derivative that lies the key to the solution of this problem.

The nature of methaemerythrin was well understood by Marrian (1927) who rightly considered it analogous to methaemoglobin. Florkin (1933), who used potassium ferricyanide for the liberation of oxygen from oxyhaemerythrin and hence for the proper estimation of the oxygen bound to this pigment, accepted Marrian's view with some reservation by concluding that "ferricyanide transforms haemerythrin into a form which does not oxygenate, probably analogous to methaemoglobin". He considered neither the mechanism of its formation, nor the reversibility of the reaction, nor the problem of the valency of the iron in any one of the derivatives of haemerythrin. Roche (1933) on the other hand, stated that the compound described by Marrian (1927) as methaemerythrin is not analogous to methaemoglobin since, unlike Marrian, he failed to reduce it to haemerythrin. Although Boeri and Ghiretti-Magaldi (1957) used ferricyanide for the manometric estimation of bound oxygen and plotted the absorption spectrum of methaemerythrin, they failed to appreciate the full significance of their experimental results, and did not make proper use of them in the discussion of the valency of iron in oxyhaemerythrin.

One of the properties of methaemerythrin which is of paramount importance for the study of its nature is the reversibility of its formation which appeared to have been demonstrated by Marrian (1927), denied by Roche (1933), and not considered at all by other workers.

To throw further light on the nature of methaemerythrin, some experiments were carried out on the reversibility of formation. For this purpose a batch of about 20 living *Phascolosoma elongatum* was obtained from the Marine Biological Laboratory at Plymouth.

The coelomic fluid of *Phascolosoma*, diluted with an equal volume of filtered sea water, was centrifuged in narrow centrifuge tubes, which made it possible to remove by suction the supernatant fluid and the white cells covering the cake of dark red cells. This manipulation was repeated several times; the red cells collected were mixed with 0.005 M-phosphate buffer pH 7.3, just sufficient to produce complete lysis of the cells. The cellular debris was centrifuged off, and the clear dark red solution was kept at 0°C. After two days standing an appreciable precipitate of colourless protein formed was centrifuged off, and the solution was dialysed against 0.25 M-tris buffer pH 9 [tris(hydroxymethyl)amino methane]. The clear red solution thus obtained, unlike Marrian's preparations, was free from fluorescence. Without further purification by crystallization, this solution was used for the study of the main properties of haemerythrin especially the mutual convertibility of its three derivatives. For spectrophotometric and other studies, deoxygenated haemerythrin was prepared in a Thunberg tube to the bottom of which was fused a silica cell with 1 cm. optical path. The tube was evacuated and washed with oxygen-free nitrogen, this being repeated several times until the haemerythrin solution became as colourless as a similar solution of the pigment treated with sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). On releasing the vacuum and shaking the solution with air it regained its characteristic red colour of oxyhaemerythrin.

On treating oxyhaemerythrin with potassium ferricyanide, its colour rapidly changes from red to yellow. The methaemerythrin thus obtained after dialysis overnight against cold tris buffer gives a solution of a lemon-yellow colour which is not affected by either aeration or evacuation. On treating this solution with a very small amount of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ it becomes reduced to a colourless solution of haemerythrin, which on aeration regains the red colour of oxyhaemerythrin.

A solution of oxyhaemerythrin left standing even in the cold undergoes partial autoxidation to methaemerythrin. This reaction becomes more rapid and complete if the solution is acidified to about pH 3.6.

The absorption spectra of haemerythrin, oxyhaemerythrin and methaemerythrin were measured on two Hilger Uvispek spectrophotometers, one fitted with a glass, the other with a quartz prism. The material available, however, was not sufficient for the determination of the absolute absorption spectra and since the patterns of the curves obtained were very similar to those given by Boeri and Ghiretti-Magaldi (1957), the absolute absorption curves recorded by these workers are given with only slight modifications in Fig. 1.

The results of the experiments described above clearly show: 1) that methaemerythrin formation is a perfectly reversible process, 2) that the

liberation of oxygen by treating oxyhaemerythrin with potassium ferricyanide is due to the oxidation of its divalent iron atoms to the trivalent state of methaemerythrin, 3) that in this respect methaemerythrin is analogous to methaemoglobin, and 4) that methaemerythrin can also be slowly formed by the autoxidation of oxyhaemerythrin. The value of about 2.4 obtained by Love (1957) for the Fe/O₂ ration, which was ascribed by Boeri and Ghiretti-Magaldi to "some inactivation during the crystallization procedure or to the different origin of the biological material", was most likely due to the partial autoxidation of oxyhaemerythrin to methaemerythrin. In fact, myoglobin during its purification followed by crystallization is known to undergo more or less complete autoxidation to metmyoglobin.

All this strongly supports the view that the iron atoms in oxyhaemerythrin are in a divalent state, and that oxygenation of haemerythrin is not accompanied by oxidation of its iron atoms.

That Klotz and Klotz (1957) failed to detect the divalent iron atoms in oxyhaemerythrin treated with an acid solution of *o*-phenanthroline is not surprising. In fact, the divalent iron atoms, as soon as they are split off by acid from the specific protein which imparts to them the unique property of oxygenation, would be oxidized by the oxygen linked with them much faster than they would react with *o*-phenanthroline. This oxidation reaction is not unlike that which would take place if oxyhaemoglobin would be treated in a similar way. Acidification of oxyhaemoglobin liberates the prosthetic group not as ferrous haem but as ferric haematin. That the oxygen on its liberation by the acidification of oxyhaemerythrin or of oxyhaemoglobin is immediately involved in the oxidation reaction is clearly shown by the fact that only a fraction of bound oxygen is recovered as molecular oxygen (Boeri and Ghiretti-Magaldi, 1957). On the other hand, the liberation of the theoretical amount of O₂ from oxyhaemerythrin treated with ferricyanide, like a similar reaction in the case of oxyhaemoglobin, can only be explained by the oxidation of its iron atoms to the trivalent state of methaemerythrin which, like methaemoglobin, does not combine with molecular oxygen.

The fact that oxyhaemerythrin does not combine with CO cannot be used, as has been done by Klotz and Klotz, as evidence that its iron atoms are in trivalent state, because neither does deoxygenated haemerythrin combine with CO. Moreover, even in different haemoglobins, the relative affinities of the divalent iron for O₂ and CO expressed as the partition constant $K = \frac{[\text{HbCO}] p\text{O}_2}{[\text{HbO}_2] p\text{CO}}$ varies between 0.67 and 570 (Keilin and Wang, 1946; Keilin, 1956).

SUMMARY

1. Haemerythrin, which is an iron-protein oxygen carrier, exists in three mutually convertible forms, colourless deoxygenated or "reduced" haemerythrin, burgundy-red oxygenated oxyhaemerythrin and lemon-yellow oxidized methaemerythrin.

2. These three forms also differ in their absorption spectra.

3. Treatment of oxyhaemerythrin with potassium ferricyanide oxidizes its divalent iron atoms to the trivalent state of methaemerythrin and liberates the theoretical amount of O₂ bound to the divalent iron atoms in ratio Fe/O₂ = 2.

4. The iron atoms are divalent both in haemerythrin and oxyhaemerythrin and trivalent in methaemerythrin.

5. The failure to detect divalent iron atoms in oxyhaemerythrin treated with an acid solution of *o*-phenanthroline is due to the fact that the divalent iron atoms, on being split off from the specific protein which imparts to them the property of oxygenation, will react much more rapidly with the O₂ attached to them, becoming oxidized to the trivalent state, than with *o*-phenanthroline.

6. Haemerythrin has a very limited distribution in nature being present in all representatives of Sipunculid and Priapulid worms, in a Polychaete worm belonging to the genus *Magelona*, and in the genus *Lingula* among the Brachiopods.

7. Haemerythrin, oxyhaemerythrin and methaemerythrin are analogous to haemoglobin, oxyhaemoglobin and methaemoglobin.

REFERENCES

- Andrews E. A., *Johns Hopkins Univ. Circ.* 9, 65, 1890.
 Benham W. B., *Quart. J. micr. Sci.* 39, 1, 1897.
 Boeri E. & Ghiretti-Magaldi A., *Biochim. Biophys. Acta* 23, 489, 1957.
 Brill A. S. & Olson J. M., *Biol. Bull. Wood's Hole* 105, 370, 1953.
 Cuénot L., *Trav. Lab. d'Arcachon* p. 107, 1900-1901.
 Delage I. & Hérourard E., *Traité de Zoologie Concrète. Les vermiédiens* 5, 1897, see p. 324, Paris, Schleicher.
 Fänge R. & Åkesson B., *Ark. Zool.* 3, 25, 1952.
 Florkin M., *Arch. int. Physiol.* 36, 247, 1933.
 François Ph., *Arch. Zool. exp.* 2^e s. 9, 229, 1891.
 Kawaguti S., *Mem. Fac. Sci. Agr. Taihoku* 23, 95, 1941.
 Keilin D., *Acta Biochim. Polon.* 3, 439, 1956.
 Keilin D. & Wang Y. L., *Biochem. J.* 40, 855, 1946.
 Klotz I. M. & Klotz T. A., *Science* 121, 477 & 122, 558, 1955.
 Klotz I. M., Rapoport A. & Rosenberg E., *Biol. Bull. Wood's Hole* 105, 377, 1953.
 Kobert R., *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 48, 411, 1903.

- Krukenberg C. F. W., *Verg. Physiol. Studien an den Küsten der Adria*, III Abt. p. 66 and 82, 1880 - 1882.
- Lankester E. R., *Proc. Roy. Soc. London* **21**, 70, 1872.
- Love W. E., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 465, 1957.
- Marrian G. F., *J. exp. Biol.* **4**, 357, 1927.
- Resnik R. A. & Klotz I. M., *Biol. Bull. Wood's Hole* **101**, 227, 1951.
- Roche A. & Roche J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **17**, 1494, 1935.
- Roche J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **15**, 1415, 1933.
- Roche J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **17**, 793, 1934.
- Rouget Ch., *J. Physiol.* **2**, 660, 1859.
- Schwalbe G., *Arch. micr. Anat.* **5**, 248, 1869.
- Williams R. J. P., *Science* **122**, 558, 1955.

HEMERYTRYNA

Streszczenie

1. Hemerytryna, przenoszący tlen żelazoproteid, występuje w trzech formach, które mogą wzajemnie w siebie przechodzić. Są to: bezbarwna odtlenowana, względnie „zredukowana“ hemerytryna, czerwona, o kolorze burgunda, utlenowana oksyhemerytryna oraz cytrynowo-żółta utleniona methemerytryna.

2. Te trzy formy różnią się również widmem absorpcyjnym.

3. Traktowanie oksyhemerytryny żelazicyjankiem potasu utlenia dwuwartościowe atomy żelaza na trójwartościowe methemerytryny, i równocześnie uwalnia się teoretyczna ilość O_2 , związana z dwuwartościowymi atomami żelaza w stosunku $Fe/O_2 = 2$.

4. W hemerytrynie i oksyhemerytrynie atomy żelaza są dwuwartościowe, zaś w methemerytrynie trójwartościowe.

5. Niemożność wykazania dwuwartościowych atomów żelaza w oksyhemerytrynie po zadaniu kwaśnym roztworem *o*-fenantroliny spowodowana jest faktem, że dwuwartościowe atomy żelaza pozostają odszczępione od specyficznego białka, które nadaje im własność utlenowania się, reagują dużo szybciej z przyłączonym do nich O_2 utleniając się na trójwartościowe, aniżeli z *o*-fenantroliną.

6. Występowanie hemerytryny w przyrodzie jest bardzo ograniczone. Znalazono ją u wszystkich badanych robaków należących do *Sipunculidae* i *Priapulidae*. Spośród Wieloszczetów zawiera ją rodzaj *Magelona*, a spośród *Brachiopoda*e rodzaj *Lingula*.

7. Hemerytryna, oksyhemerytryna i methemerytryna odpowiadają hemoglobinie, oksyhemoglobinie i methemoglobinie.

Otrzymano 3.3.1960 r.

A. KALICINSKI

GLIKOZAMINA W KRWI PEPOWINOWEJ I W KRWI MATKI*I Klinika Chorób Wewnętrznych AM, Białystok**Kierownik: doc. dr med. W. Zankiewicz*

Surowice krwi płodu matki rodzącej oraz zdrowej nie ciężarnej kobiety różnią się między sobą stężeniem białek, odsetkowym składem frakcji białkowych i niektórymi własnościami fizycznymi. Różnice te obserwowali liczni autorzy, np. Longsworth i wsp. [4], Brown [2], Stary i wsp. [8], Charvillat i wsp. [3], Pfau [7], Paaby [6] i inni. Mozołowski i wsp. [5] wykazali doświadczalnie i omówili inne zachowanie się frakcji wysolonych i pewnych własności fizycznych białek osocza u noworodka niż u kobiety rodzącej.

Wydało się możliwe, że określenie zawartości pewnych składników nieaminokwasowych białek pozwoli również odróżnić krew pępowinową od krwi matki rodzącej.

W tej pracy postawiono sobie zadanie: 1. Sprawdzić, jaka jest zawartość glikozaminy przypadającej na gram białka w surowicy noworodka i porównać ją z zawartością glikozaminy w białkach surowicy matki rodzącej. 2. Zbadać, w jakim stopniu ewentualne zmiany w zachowaniu się glikozaminy w badanych surowicach idą w parze ze zmianami w odsetkowym składzie frakcji białkowych.

METODY

Krew z żyły pępowinowej (8 - 10 ml) pobierano w 5 - 7 min. po porodzie po zaciśnięciu peanem pępowiny. Bezpośrednio po tym pobierano 10 ml żyłnej krwi matki. Badano krew noworodków i kobiet rodzących klinicznie zdrowych; porody przebiegały prawidłowo. Próby krwi zhemolizowanej odrzucano. Surowicę oddzielano przez kilkakrotne odwirowanie.

W otrzymanych próbkach surowicy oznaczano: (1) Stężenie białek obliczone ze wskaźnika refraktometrycznego. (2) Glikozaminę metodą

Elsona i Morgana w modyfikacji Bechlera i wsp. [1]. (3) Frakcje elektroforetyczne elektrofrezą bibułą w moderatorze weronalowym o pH 8,6, mocy jonowej 0,1. Paski barwiono błękitem bromofenolowym, eluowano i określano kolorymetrycznie. Wyniki podano we względnych odsetkach. Pobrano po 24 próbki krwi pępowinowej i krwi matek rodzących.

WYNIKI I DYSKUSJA

Jak widać z tablicy 1, różnica stężenia białek pomiędzy surowicą matki rodzącej a surowicą krwi pępowinowej jest statystycznie znamienne. Najmniejsza różnica wynosiła 0,44 g⁰%, największa — 2,87 g⁰%. Krew pępowinowa odznacza się w porównaniu do krwi żyłnej matki większą zawartością albuminów, zmniejszeniem α_1 - i β -globulinów. Nie znaleziono statystycznych różnic w zachowaniu się α_2 - i γ -globulinów. Frakcje białkowe u matki i u dziecka odznaczają się dość dużym rozrzutem.

Glikozaminę oznaczono w 18 przypadkach; jej zawartość w żyłnej krwi matki wyraża się wielkością 12,5 mg \pm 0,45 mg na 1 g białek. Najwyższa wartość wynosi 15,2 mg, a najniższa 9,6 mg. W krwi pępowinowej stężenie glikozaminy jest wyraźnie mniejsze: na 1 g białka przypada 7,7 mg \pm 0,46 mg glikozaminy; wartość najwyższa wynosi 11,5 mg, a najniższa 5,7 mg. Zmniejszenie stężenia glikozaminy w surowicy krwi pępowinowej jest statystycznie istotne w porównaniu z zawartością glikozaminy w krwi matki.

Tablica 1

Ilość glikozaminy przypadająca na 1 g białka oraz względne stężenie frakcji białkowych w surowicy krwi pępowinowej i w surowicy krwi matki rodzącej

Podano wartości średnie, \pm średni błąd wzorcowy; liczby w nawiasach oznaczają ilość doświadczeń

	Surowica żyłnej krwi matki	Surowica krwi pępowinowej
Białko całkowite (g/100 ml) (24)	7,50 \pm 0,09	5,72 \pm 0,07
Glikozamina (mg/g białka) (18)	12,5 \pm 0,45	7,7 \pm 0,46
Frakcje białkowe (względny procent) (18)		
Albuminy	42,0 \pm 1,6	49,5 \pm 0,8
Globuliny α_1	7,2 \pm 0,11	6,1 \pm 0,17
Globuliny α_2	10,5 \pm 0,42	8,3 \pm 0,45
Globuliny β	15,5 \pm 0,4	11,0 \pm 0,65
Globuliny γ	24,0 \pm 0,9	24,5 \pm 1,2

Różnicę między stężeniem białek w surowicy noworodka a w surowicy matki obserwują również i inni autorzy. Mozołowski i wsp. [5] znaleźli u 10 rodzących kobiet średnią wartość 1,07 g \pm 0,04 g azotu białkowego,

a u 10 noworodków w krwi pępowinowej $0,94 \pm 0,14$ g azotu w 100 ml surowicy. Brown [2] podaje, że średnia zawartość białek (oznaczonych metodą biuretową) wynosi u 50 matek rodzących $6,32 \pm 0,52$ g na 100 ml surowicy, a u noworodków $6,13 \pm 0,64$ g na 100 ml. Autor ten nie stwierdza więc istotnych różnic. Ten fakt, że w niniejszej pracy różnica pomiędzy stężeniem białek w surowicy krwi matki a stężeniem w surowicy krwi pępowinowej jest wyraźnie większa niż u innych autorów wydaje się zależeć od sposobu oznaczania stężenia białek. Wyniki oznaczeń frakcji elektroforetycznych w czasie porodu u matki i noworodka są podobne jak u Browna [2]. Autor ten obserwował również mniejszy procent albuminów w surowicy krwi kobiety rodzącej niż w krwi pępowinowej, a równocześnie mniejszy odsetek α - i β -globulinów u noworodków niż w surowicy krwi matki. Stary i wsp. [8] stwierdzili zwiększoną zawartość glikoproteidów surowicy krwi w ciąży, zwłaszcza w jej ostatnich miesiącach w porównaniu do kobiet ciężarnych. Istnieje więc możliwość, że i odsetek

Tablica 2

Różnica pomiędzy zawartością glikozaminy w białkach surowicy krwi pępowinowej, stężeniem białka w surowicy krwi pępowinowej a tymi samymi wartościami w surowicy żyłnej krwi matki

Liczby oznaczają procent, o jaki dana wartość jest mniejsza w krwi pępowinowej w stosunku do żyłnej krwi matki

Lp.	Glikozamina	Białko	Lp.	Glikozamina	Białko
1	57	13	11	39	13
2	43	21	12	39	13
3	33	21	13	17	45
4	41	30	14	30	33
5	48	15	18	18	30
6	41	20	19	41	21
7	44	28	21	51	19
9	33	36	23	40	18
10	56	7	24	24	39

glikozaminy wzrasta wraz z postępem ciąży. W dostępnym mi piśmiennictwie nie spotkałem danych o zachowaniu się tego aminocukru w krwi pępowinowej.

W tablicy 2 porównano różnice zawartości białka pomiędzy surowicą noworodka a surowicą jego matki z różnicami zawartości heksozaminy. Z tablicy wynika, że w większości przypadków spadek glikozaminy w białkach krwi pępowinowej jest większy aniżeli zmniejszenie się wskaźnika refraktometrycznego. Krew pępowinowa charakteryzuje się w porównaniu z krwią matki znacznie wyraźniejszym spadkiem zawartości glikozaminy w białkach niż zmniejszeniem się stężenia białek w surowicy.

STRESZCZENIE

W surowicy krwi pępowinowej i w krwi żyłnej rodzącej matki oznaczano zawartość glikozaminy przypadającej na 1 gram białek oraz frakcje elektroforetyczne. Stwierdzono statystycznie istotną mniejszą zawartość glikozaminy związanej z białkami surowicy u noworodków w porównaniu z surowicą matki.

L I T E R A T U R A

- [1] Bechler R., Nutten A. J., Sumbrock C. M., *The Analyst* **79**, 201, 1954.
- [2] Brown T., *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.* **61**, 781, 1954.
- [3] Charvillat L., Blanc P., Creyssel R., Charvat F., *Lyon Médical* **4**, 487, 1955.
- [4] Longworth L. G., Curtis K. M., Pembroke R. H., *J. Clin. Invest.* **24**, 46, 1945.
- [5] Mozołowski W., Żydowo M., Kalinowski J., Moszczyńska Z., *Bull. Int. Acad. Pol. Cl. Med.* s. 65, 1950.
- [6] Paaby P., *Acta Obst. et Gynec. Scand.* **37**, 69, 1958.
- [7] Pfau P., *Arch. Gynäk.* **185**, 208, 1954.
- [8] Stary Z., Frez N., Bodur H., Anhegger-Lisie G. G., Çepelöglu R., *Arch. Gynäk.* **184**, 239, 1954.

GLUCOSAMINE IN UMBILICAL AND MOTHER BLOOD

S u m m a r y

The amount of glucosamine per gram of protein as well as electrophoretical fractions were estimated in the sera of umbilical and mother's venous blood (on delivery). The level of serum protein bound glucosamine was lower in newborns than in mother's, the difference being statistically significant.

Otrzymano 4.3.1960 r.

I. CHMIELEWSKA, K. TOCZKO, Z. KANIUGA i J. MANICKI

WYKORZYSTANIE PRZEZ ORGANIZM LUDZKI SKŁADNIKÓW PODANEGO DOŻYLNIE HYDROLIZATU BIAŁKOWEGO

III.* SKŁADNIKI MOCZU INTERFERUJĄCE W OZNACZANIU AZOTU AMINOWEGO**

*Katedra Biochemii Uniwersytetu, Warszawa, i II Klinika Chirurgiczna Akademii
Medycznej, Warszawa*

Zagadnienie oznaczania azotu wolnych grup aminowych w moczu dotychczas nie zostało całkowicie rozwiązane. Stosowane metody, dające jednoznaczne wyniki dla roztworów mieszanin aminokwasów lub hydrolizatów białkowych, dają w zastosowaniu do moczu wyniki nie wyrażające rzeczywistej zawartości N-aminowego. Wywołane jest to występowaniem w moczu dotychczas nie zbadanych czynników interferujących, które w różnym stopniu, zależnie od stosowanej metody, wpływają na uzyskane wartości oznaczeń.

W poprzednich pracach [3, 4] w badaniu na ludziach zdrowych, którym podano dożylnie enzymatyczny hydrolizat białka krwi bydłej wzbogacony glikozą, stwierdzono występowanie w moczu znacznej ilości związków nie zawierających wolnej grupy aminowej, a tworzących rozpuszczalne kompleksy miedziowe. W oznaczaniu metodą Pope'a i Stevensa [7] w modyfikacji Albanese'a i Irby [1] związki te reagują jak aminokwasy i są powodem dużych wartości wyliczonego N-aminowego.

Charakterystyczną cechą tych składników interferujących w oznaczaniu N-aminowego metodą miedziową jest nietrwałość na ogrzewanie zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym. Ulegają one rozkładowi podczas hydrolizy kwaśnej moczu [3], jak również podczas usuwania amoniaku metodą Antener [2], tj. w czasie 15-minutowego przewietrzania zalkalizowanego moczu w temperaturze 80° [5].

* Część II [4].

** Praca subsydiowana częściowo przez Wydział VI Polskiej Akademii Nauk.

W badaniu nad wykorzystaniem przez organizm ludzki składników podanego dożylnie hydrolizatu białkowego mogą być w równej mierze interesujące związki zawierające wolną grupę aminową, jak i czynniki interferujące. Z tego względu przeprowadzono porównawcze oznaczenie N-aminowego kilku metodami, aby stwierdzić, w jakim stopniu sposób żywienia wpływa na ilość wydalonych w moczu związków z wolną grupą aminową oraz czynników interferujących.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Badania kliniczne

Badania kliniczne przeprowadzono na czterech zdrowych mężczyznach w wieku lat 21 i 24. Doświadczenia trwały pięć dób, licząc początek każdej doby od godziny 9 rano. Przez cały okres badani otrzymywali doustnie dietę o dużej zawartości białka. W 2, 3 i 4 dniu doświadczenia podawano ponadto dożylnie o godzinie 9 rano metodą wlewań kroplowych po 1000 ml hydrolizatu (czas podawania 1,5—2 godz.).

Podany hydrolizat przygotowywany był z białka krwi bydłęcej, trawionego mieszaniną enzymów trzustki [6]. 1000 ml hydrolizatu (pH 6,7) zawierało 10,4 g N-całkowitego i 6,4 g N-wolnych grup aminowych, oznaczonych miareczkową metodą miedziową według Albanese'a i Irby [1].

Mocz zbierano do naczyń szklanych, zawierających około 1 g tymolu i 50 ml toluenu, i przechowywano w chłodni. Dobowe próby moczu konserwowano przez dodanie większej ilości toluenu (wystarczającej do pokrycia powierzchni moczu) i trzymano w temperaturze 0°. Oznaczenia N-aminowego przeprowadzono w średniej dobowej próbie moczu po stwierdzeniu nieobecności białka.

Metody analityczne

N-aminowy oznaczano w stosowanym hydrolizacie białkowym i w moczu w następujący sposób:

1a — miareczkową metodą miedziową wg Albanese'a i Irby [1] w próbkach pobranych bezpośrednio po przesączeniu,

1b — tą samą metodą po uprzednim przewietrzeniu próby przez 15 minut w temperaturze 80°, w środowisku alkalicznym wg Antener [2],

2a — zmodyfikowaną kolorymetryczną metodą miedziową wg Sobela i wsp. [8] w próbach pobranych bezpośrednio po przesączeniu,

2b — tą samą metodą po wysuszeniu zalkalizowanej próby nad stężonym kwasem siarkowym, pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze pokojowej,

3 — kolorymetryczną metodą ninhydrynową wg Yemma i Cockinga [9] po wysuszeniu zalkalizowanej próby nad stężonym kwasem siarkowym w temperaturze pokojowej.

Oznaczenia kolorymetryczne przeprowadzano przy użyciu kolorimetru Metrohm Colorimeter E 1005, w kiuwetach o grubości 15 mm, stosując filtr Nr 1 (fioletowy) do metody 2a i 2b oraz filtr Nr 5 (pomarańczowy) do metody 3. Krzywe wzorcowe do metod kolorymetrycznych 2 i 3 sporządzono na podstawie oznaczeń N-aminowego w standardowym roztworze aminokwasów, którym był hydrolizat kwaśny białka krwi bydłowej. Zawartość N-aminowego w roztworze standardowym oznaczono miareczkową metodą miedziową [1].

Przygotowanie moczu do analiz metodą 2b i 3. 1 lub 2 ml moczu zalkalizowanego przez dodanie 0,03 - 0,05 ml około 18 N-wodorotlenku sodowego suszono w małych naczyniach pod zmniejszonym ciśnieniem w eksykatorze nad stężonym kwasem siarkowym w temperaturze pokojowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie destylowanej, pozabawionej amoniaku przez przepuszczenie jej przez kolumnę z permutytu (forma H). Roztwór doprowadzano kwasem solnym do pH 4 - 6 (uniwersalny papierek wskaźnikowy), po czym rozcieńczano wodą destylowaną bez amoniaku do objętości 50 ml.

Tablica 1

N-aminowy w roztworze wzorcowym aminokwasów oznaczony różnymi metodami
Wartości podane w mg/ml

Próba nr	Metoda miedziowa				Metoda ninhydrynowa 3
	1a	1b	2a	2b	
1	6,95	6,95	6,94	6,94	6,94
2	6,92	6,97	7,00	7,00	7,00
3	6,92	6,92	6,90	6,94	6,94
4	6,90	6,88	6,81	7,00	6,88

Adaptacja metody Sobela i wsp. [9] do oznaczania N-aminowego w moczu. 1 lub 2 ml moczu pobranego bezpośrednio z porcji dobowej rozcieńczano wodą nie zawierającą amoniaku do 50 ml. 5 ml tego roztworu, zawierającego 1,5 - 22 µg N-aminowego/ml, przenoszono do 10 ml kolby miarowej, dodawano jedną kroplę roztworu tymoloftaleiny, a następnie kroplami około 0,2 N-wodorotlenku sodowego do pojawienia się barwy fioletowej. Zawartość kolb uzupełniano do 10 ml zawiesiną fosforanu miedziowego, przygotowanego wg Sobela i wsp. [9], mieszano dokładnie, pozostawiano przez 10 - 20 minut (mieszając kilkakrotnie), a następnie przenoszono do probówek wirówkowych i wirowano przez 10 minut przy 2500—3000 obr./min. Do 2 ml klarownego płynu, pobranego z nad osadu,

dodawano 2 ml wody destylowanej, 0,2 ml świeżo przygotowanego roztworu dwuetylodwutiokarbaminianu sodowego (100 mg/5 ml) i natychmiast potem 6 ml alkoholu izopropylowego. Po wymieszaniu roztworów oznaczano intensywność zabarwienia wobec próby ślepej, zawierającej zamiast badanego roztworu 5 ml wody.

Oznaczenia 2b przeprowadzano w analogiczny sposób przy użyciu 5 ml roztworu przygotowanego z pozostałości po wysuszeniu moczu nad kwasem siarkowym.

Wartości oznaczeń N-aminowego w standardowym roztworze aminokwasów, oznaczone stosowanymi metodami w czterech równoległych próbach, zestawiono w tabelicy 1.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Wyniki oznaczeń N-aminowego w stosowanym do wlewań hydrolizacie białkowym, otrzymane miareczkową metodą miedziową (1a i 1b), kolorymetryczną metodą miedziową (2a i 2b) oraz kolorymetryczną metodą ninhydrynową [3], zestawiono w tabelicy 2. Jak widać z zestawienia, zarówno w próbach poddanych ogrzewaniu w środowisku alkalicznym, jak i wysuszonych w temperaturze pokojowej (metody 1b i 2b) obserwuje się wyższą zawartość N-aminowego w porównaniu z wartościami, uzyskanymi odpowiednio metodą 1a lub 2a. Wskazuje to, że w warunkach stosowanych w metodach 1b i 2b następuje częściowe uwolnienie związanych grup aminowych.

Tablica 2

N-aminowy w enzymatycznym hydrolizacie białka oznaczony różnymi metodami
Wartości podane w g/1000 ml

Próba nr	Metoda miedziowa				Metoda ninhydrynowa 3
	1a	1b	2a	2b	
1	5,88	6,38	6,19	6,58	6,47
2	5,93	6,32	6,25	6,56	6,47
3	5,84	6,34	6,13	6,53	6,38

Wyniki oznaczeń N-aminowego w moczu czterech zbadanych przypadków przeprowadzone metodami 1a, 1b, 2a, 2b i 3 zestawiono w tabelicy 3. Otrzymane wartości „N-aminowego“ są sumą azotu wolnych grup aminowych obecnych w moczu aminokwasów wolnych i związanych oraz czynników interferujących oznaczanych daną metodą.

Porównanie wyników oznaczeń przeprowadzonych miareczkową metodą miedziową 1a (oznaczenia bezpośrednio w moczu) i 1b (oznaczenia po przewietrzeniu na gorąco zalkalizowanej próby) oraz kolorymetryczną

metodą miedziową 2a (oznaczenia bezpośrednie) i 2b (po wysuszeniu zalkalizowanej próby w temperaturze pokojowej) wskazuje, że w moczu wydalonym w dniach 1 i 5 obok związków zawierających wolną grupę aminową występują składniki tworzące rozpuszczalne kompleksy z miedzią. Składniki te ulegają rozkładowi w środowisku alkalicznym w czasie

Tablica 3

N-aminowy w moczu dobowym oznaczony różnymi metodami

Wyniki podane w gramach. H — hydrolizat białka

Dzień	Wlew	Mocz (ml)	Metoda miedziowa				Metoda ninhydrynowa 3
			1a	1b	2a	2b	
Przypadek I, m. wiek 21 lat, waga 60 kg							
1	—	1580	0,68	0,59	0,65	0,66	0,42
2	H	1320	0,70	0,79	0,62	0,80	0,71
3	H	1400	0,81	0,85	0,70	0,82	0,77
4	H	1190	0,79	0,83	0,68	0,89	0,66
5	—	1620	0,43	0,40	0,38	0,45	0,39
Przypadek II, m. wiek 24 lat, waga 63 kg							
1	—	1100	0,51	0,43	0,46	0,47	0,31
2	H	1800	0,73	0,84	0,71	0,83	0,70
3	H	2650	0,71	0,85	0,72	0,95	0,89
4	H	1030	0,71	0,78	0,67	0,87	0,59
5	—	2500	0,34	0,29	0,30	0,37	0,38
Przypadek III, m. wiek 21 lat, waga 70 kg							
1	—	1440	0,80	0,58	0,72	0,73	0,57
2	H	1810	1,04	1,05	0,92	1,23	0,91
3	H	1620	1,04	1,01	0,88	1,24	0,97
4	H	1150	0,69	0,73	0,61	0,88	0,68
5	—	1560	0,74	0,51	0,51	0,59	0,56
Przypadek IV, m. wiek 24 lat, waga 67 kg							
1	—	1260	0,44	0,34	0,44	0,45	0,32
2	H	1540	0,67	0,75	0,70	0,95	0,84
3	H	1870	0,61	0,73	0,63	0,91	0,76
4	H	1220	0,46	0,59	0,46	0,77	0,63
5	—	1100	0,25	0,19	0,22	0,28	0,27

ogrzewania (metoda 1b) do związków nie reagujących z miedzią, natomiast nie ulegają zmianie w czasie suszenia zalkalizowanego moczu w temperaturze pokojowej (metoda 2b).

Porównanie wyników oznaczeń *N*-aminowego tymi metodami w moczu wydalonym po podaniu hydrolizatu wskazuje na obecność składników

nie oznaczających się w moczu (metoda 1a i 2a), lecz ulegających w środowisku zasadowym już w temperaturze pokojowej przemianie w związki, tworzące rozpuszczalne kompleksy z miedzią. Składnikami tymi mogą być wydalone peptydy podanego hydrolizatu lub związki wytworzone w organizmie. Uwalniane w czasie ogrzewania lub suszenia związki, powodujące przyrost „N-aminowego“ w metodzie 1b i 2b, zawierają prawdopodobnie grupę aminową. Wskazują na to wyniki oznaczeń N-aminowego metodą ninhydrynową 3, które w moczu wydalonym po podaniu hydrolizatu są przeważnie wyższe od wartości uzyskanych metodą 2a. Jest możliwe, że składniki te nie występują w moczu normalnym, lecz pojawiają się po podaniu dożylnym hydrolizatu białkowego.

W przeciwieństwie do nich składniki typu pierwszego, to jest ulegające w czasie ogrzewania w środowisku alkalicznym rozkładowi do związków nie tworzących kompleksów z miedzią, są prawdopodobnie normalnymi składnikami moczu.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono oznaczenia N-aminowego pięcioma różnymi metodami (1a, 1b, 2a, 2b, 3) w moczu czterech zdrowych mężczyzn, którzy w okresie badania otrzymywali wysokobiałkową dietę oraz w ciągu trzech dni (2, 3 i 4 dzień badań) dodatkowo dożylnie po 1 l hydrolizatu.

Stwierdzono, że w badanym moczu obok związków zawierających wolną grupę aminową występują dwa typy składników tworzących kompleksy z miedzią.

Składniki pierwszego typu, oznaczane metodami 1a, 2a i 2b, nie są oznaczane metodą 1b. Składniki drugiego typu, nie oznaczane metodą 1a i 2a, oznaczają się metodami 1b i 2b. W przeciwieństwie do składników pierwszego typu, składniki drugiego typu pojawiają się w moczu po dożylnym podaniu hydrolizatu białkowego.

LITERATURA

- [1] Albanese A., Irby V., *J. Biol. Chem.* **153**, 583, 1944.
- [2] Antener I., *Schweiz. Med. Wschr.* **83**, 426, 1953.
- [3] Bełżecka K., Chmielewska I., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 497, 1956.
- [4] Chmielewska I., Bełżecka K., Raczyńska-Bojanowska K., Manicki J., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 419, 1958.
- [5] Gorzkowski B., Frankowska K., Zimniak D. prace magisterskie, dane nie opublikowane.
- [6] Patent Polski nr. 34958, 1 czerwiec, 1951.
- [7] Pope C. G., Stevens M. F., *Biochem. J.* **33**, 1070, 1939.
- [8] Sobel Ch., Henry R. J., Chiamori N., Segalove H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **95**, 808, 1967.
- [9] Yemm E. W., Cocking E. C., *Analyst* **80**, 209, 1955.

UTILIZATION OF INFUSED PROTEIN HYDROLIZATE BY THE HUMAN ORGANISM

III. URINE CONSTITUENTS INTERFERING WITH THE AMINE NITROGEN DETERMINATION

SUMMARY

The excretion of N_{NH_2} was investigated on 4 men kept on a fully caloric, high-protein diet who received additionally on the 2nd, 3rd and 4th days of experiment 1 liter of protein hydrolyzate per day.

Assume nitrogen N_{NH_2} was determined as follows: 1a — in untreated urine samples by titration copper method of Albanese and Irby; 1b — in urine samples aerated at 80° and alkalified (according to Antener) as in 1a; 2a — in untreated urine samples by the modified colorimetric copper method of Sobel *et al.*; 2b — in alkalified urine samples dried in a dessiccator over conc. H_2SO_4 at room temperature by the method as in 2a; 3 — in samples treated as in 2b by the colorimetric method of Yemm and Cocking.

The results given in table 3 indicate that in the examined urine, beside the compounds containing the free amine group two groups of substances forming soluble copper complexes are present.

The substances of one group are thermolabile in alkaline solutions and therefore indeterminable by method 1b, they may be determined by method 1a, 2a, 2b. The substances of the other group indeterminable by method 1a and 2a were determined by method 1b and 2b.

It is possible that substances of the second group are not present in normal urine and appear after infusion of hydrolyzate. Contrary to the latter, the substances of the first group, i.e. thermolabile in the alkaline solutions are believed to be the normal constituents of urine.

Otrzymano 7.4.1960 r.

R. AMMON und E. ZOCH

DAS VORKOMMEN VON KETOSÄUREN UND AMINOSÄUREN IN DER MENSCHLICHEN PLACENTA

*Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität
des Saarlandes in Homburg/Saar*

*Herrn Wl. Mozolowski in Erinnerung an die gemeinsame Arbeit des
einen von uns (R. A.) bei E. J. Lesser in Mannheim (1927) zu seinem
65. Geburtstag gewidmet.*

Mit Hilfe des 2,4-Dinitrophenylhydrazins konnte seinerzeit das Vorkommen des Vitamins C in der menschlichen Placenta gesichert werden [2]. Es wurde als das sogenannte 2,4-Dinitro-Vitamosazon [8, 12] in kristalliner Form isoliert.

Bei der Behandlung von Placenta-Extrakt mit dem genannten Fällungsreagenz werden noch relativ grosse Mengen anderer Carbonylverbindungen erfasst, wobei neben dem genannten Vitamosazon vor allem an das Glucosazon, an Ketosäurehydrazone und aber auch an die Hydrazone von Steroidhormonen zu denken ist.

Da in unserem Institut die Frage des Nachweises von Ketosäuren im menschlichen und tierischen Harn bearbeitet wurde [3, 7], so haben wir mit demselben Verfahren geprüft, welche α -Ketosäuren in der Placenta zu finden sind.

Das Prinzip des Verfahrens ist: Der enteweißte Placentaextrakt wird mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt. Das erhaltene Osazon-Hydrazon-Gemisch wird mit HCl-Sn behandelt, wobei die isolierten Ketosäure-Derivate in die entsprechenden Aminosäuren überführt, die nun papierchromatographisch ermittelt werden.

Zusammen mit dem Vorkommen von Ketosäuren interessierte es uns gleichzeitig, zu untersuchen, welche freien Aminosäuren daneben in der Placenta nachgewiesen werden können.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

NACHWEIS DER KETOSAUREN

Aufarbeitung der Placenten

Sechs vom Bindegewebe befreite und vom Blut abgepresste Placenten (etwa 2680 g) werden unter wenig Wasserzugabe im Starmix homogenisiert und anschliessend abzentrifugiert. Zur Entfernung der Eiweisstoffe wird der Placentaextrakt mit 3 Liter 8% Trichloressigsäure versetzt, für die Dauer von 30 Min. geschüttelt und abfiltriert. Das Filtrat wird nochmals mit 2 Liter 8% Trichloressigsäure in derselben Weise behandelt. Die vereinigten Filtrate werden mit festem Na-bicarbonat neutralisiert.

Fällung der α -Ketosauren als 2,4-Dinitrophenylhydrazone und Reduktion der Hydrazone zu α -Aminosäuren

Zur Fällung der α -Ketosauren als 2,4-Dinitrophenylhydrazone wird der enteiweisste neutrale Placentaextrakt mit 1300 ml 2 N-HCl angesäuert und mit 2000 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (10 g 2,4-DNPh in 2,5 Liter 2 N-HCl) versetzt. Nach 4-tägigem Stehen im Brutschrank bei 38° scheidet sich ein roter, voluminöser Hydrazonniederschlag ab. Die Ausbeute an abgesaugtem und getrocknetem 2,4-Dinitrophenylhydrazon beträgt 1,1 g (Ausbeute 0,042%). Die Hydrazone werden in 50 ml Wasser aufgeschlämmt und 10 ml davon mit je 50 ml Chloroform-Äthanol (4:1) ausgeschüttelt. Als unlöslicher Rückstand verbleiben etwa 0,8 g (73%). Nach Abtrennung der wässrigen Phase wird die Chloroform-Äthanol-Lösung, die also 0,3 g Hydrazon (27% der Gesamthydrazone) enthält, 4 mal mit je 25 ml 10% wässriger Sodalösung ausgeschüttelt. Beim Eindampfen der Chloroform-Äthanol-Phase konnte man etwa 0,2 g Hydrazon wiedergewinnen, sodass nur 0,1 g (9,1%) Hydrazon in die Sodalösung gehen. Die Sodalösung der Ketosaurenhydrazone wurde unter Kühlung mit 6 N-HCl angesäuert und 3 mal mit je 20 ml Chloroform-Äthanol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit dem Föhn bis auf 1-2 ml eingeengt und über CaCl_2 in Exsikkator zur Trockne gebracht.

Der rote Rückstand wurde in 50 ml 95% Äthanol suspendiert, von den vorhandenen unlöslichen Bestandteilen abfiltriert, mit 6 g granuliertem Zinn versetzt und unter Kühlung 15 Min. gasförmiger HCl eingeleitet. Nach beendeter Reduktion (8 h) wird Sn^{2+} mit H_2S gefällt und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das in Wasser aufgenommene Filtrat wird auf eine Kolonne mit Amberlit IR 120 (20×2 cm) gegeben

und anschliessend werden die Aminosäuren mit 1 N-NH₃ eluiert. Das schwach bräunliche Eluat wurde im Vakuum auf 1 ml eingengt und zur papierchromatographischen Untersuchung benutzt.

Papierchromatographische Untersuchung der Aminosäuren

Die papierchromatographische Untersuchung wurde auf Schleicher und Schüll 2043b-Papier aufsteigend zweidimensional durchgeführt.

Auftragung: 0,1 ml Lösung. Als Fliessmittelsysteme dienen:

- A. 1. Dimension: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) [10],
 2. Dimension: α -Picolin-Eisessig-Wasser (75 : 2 : 23) [11].
- B. 1. Dimension: sek. Butanol-3⁰/₀ NH₃ (150 : 60),
 2. Dimension: sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser (150 : 30 : 20) [6].

Als Entwickler wurde Ninhydrin verwendet. Die Identifizierung der aufgetrennten Aminosäuren erfolgte durch: a) Mischchromatogramme mit Testaminosäuren in den genannten Fliessmittelsystemen, b) durch spezielle Farbreaktionen; Fleck 9 (Tyrosin): rotfärbung mit α -Nitroso- β -naphthol [1] und positive Pauly-Reaktion.

Die Identifizierung von Lysin erfolgte aus dem zweidimensionalen Chromatogramm (System A) mit Hilfe einer speziellen Technik aufsteigend in Phenol [13, 5].

NACHWEIS DER FREIEN AMINOSÄUREN

100 g von Blut ausgepresstes Placentagewebe werden 15 Min. mit Wasser ausgewaschen, im Starmix homogenisiert und abzentrifugiert. Anschliessend wird das Sediment mit 30 ml 95⁰/₀ Äthanol für die Dauer von 30 Min. extrahiert und der alkoholische Extrakt wird kurz aufgewärmt, um die Eiweissstoffe auszuflocken. Die alkoholische Lösung wird nun zur papierchromatographischen Analyse auf Aminosäuren benutzt.

Die papierchromatographische Untersuchung geschieht in der oben angegebenen Weise.

ERGEBNISSE

NACHWEIS DER KETOSÄUREN

Im enteiweissten Placentaextrakt konnten folgende α -Ketosäuren (entsprechend den jeweiligen α -Aminosäuren) nachgewiesen werden: Glyoxylsäure (Glycin) Brenztraubensäure (Alanin), Hydroxybrenztraubensäure (Serin), α -Keto-*n*-buttersäure (α -Amino-*n*-buttersäure), α -Keto-*iso*-valeriansäure (Valin), α -Keto-*iso*-capronsäure (Leucin), *p*-Hydroxyphe-

nylbrenztraubensäure (Tyrosin), Oxalessigsäure (Asparaginsäure), α -Ketoglutarsäure (Glutaminsäure), α -Keto- ϵ -aminocaprinsäure (Lysin).

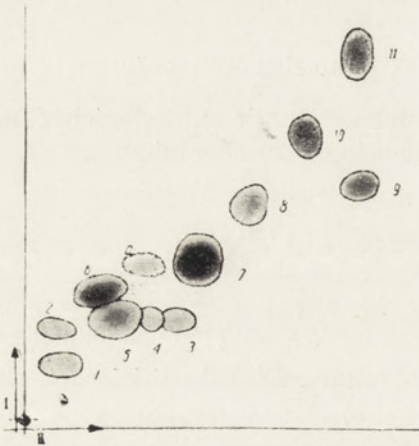


Abb. 1. Chromatogramm der Aminosäuren, die sich durch Reduktion von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen der Keto-säuren der Placenta herleiten

I. Dimension: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5)

II. Dimension: α -Picolin-Eisessig-Wasser (75 : 2 : 23)

Sprühreagens: Ninhydrin. Fleck Nr. und nachgewiesene Aminosäure: 1 — Lysin, 2 — Asparaginsäure, 3 — Serin, 4 — unbekannt, 5 — Glycin, 6 — Glutaminsäure, 7 — Alanin, 8 — α -Aminobuttersäure, 9 — Tyrosin, 10 — Valin, 11 — Leucin.

„a“ gibt mit Ninhydrin zunächst Gelbfärbung, die allmählich in Blau überwechelt. Man erhält „a“ auch bei der Aminierung einer beliebigen Ketosäure. Möglicherweise handelt es sich um verschiedene Reduktionsstufen des Dinitrobenzols, die bei der Reaktion entstehen. „a“ ist demnach kein Produkt aus der Placenta.

Die regelmässig vorkommende Substanz, die dem Fleck 4 entspricht, konnte noch nicht identifiziert werden. Die auffallend intensive Flecken von Alanin und Glutaminsäure deuten auf den hohen Gehalt des Placentagewebes an Brenztraubensäure und α -Ketoglutarsäure hin, die bekanntlich sowohl als Umaminierungspartner als auch im Citronensäurecyclus eine wesentliche Rolle spielen.

Die nachgewiesenen Ketosäuren sind als mögliche Teilnehmer der Umaminierung bekannt [4, 9].

Die im Serum gesunder Versuchspersonen vorkommenden Ketosäuren (entsprechende Aminosäuren) α -Keto- β -methyl-valeriansäure (Isoleucin), α -Keto- γ -methylmercaptobuttersäure (Methionin) und Phenylbrenztraubensäure (Phenylalanin) konnten von uns in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht gefunden werden. Die übrigen identifizierten Ketosäuren (Aminosäuren) sind die gleichen wie die im Serum befindlichen Ketosäuren (Aminosäuren) [7].

NACHWEIS DER FREIEN AMINOSAUREN

Von den im alkoholischen Placenta-Extrakt festgestellten 13 Aminosäuren konnten folgende Aminosäuren eindeutig identifiziert werden: Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Valin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Lysin, Arginin.

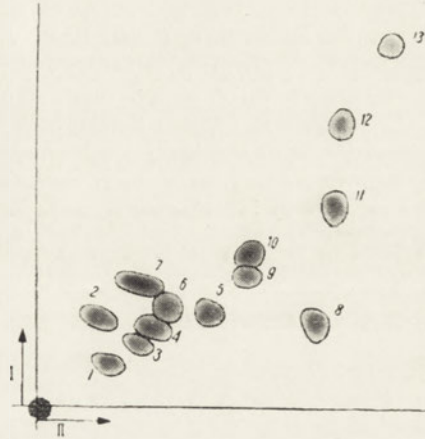
Auf dem Chromatogramm der freien Aminosäuren des alkoholischen Placenta-Extraktes konnte, im Gegensatz zum Chromatogramm der Aminosäuren, die den Ketosäuren entsprechen, weder Tyrosin noch α -Amino-

Abb. 2. Chromatogramm der freien Aminosäuren im alkoholischen Placenta-Extrakt

I. Dimension: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5)

II. Dimension: α -Picolin-Eisessig-Wasser (75 : 2 : 23)

Sprühreagens: Ninhydrin. Fleck Nr. und nachgewiesene Aminosäure: 1 — Lysin, 2 — Asparaginsäure, 3 — Arginin, 4 — Glutamin, 5 — Serin, 6 — Glycin, 7 — Glutaminsäure, 8 — unbekannt, 9 — Threonin, 10 — Alanin, 11 — unbekannt, 12 — Valin, 13 — Leucin.



buttersäure festgestellt werden. Möglicherweise dürften sich aber die letztgenannten Aminosäuren bei der Extraktion grösserer Placentamengen, also bei höherer Aminosäurekonzentration, ebenfalls nachweisen lassen.

Die Aminosäuren, die auf dem Chromatogramm den Flecken 8 und 11 entsprechen, konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Das 2,4-Dinitrosoazon- und 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Gemisch das aus Extrakten von menschlicher Placenta mit Hilfe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin erhalten wird, und in dem früher das 2,4-Dinitro-Vitamosazon nachgewiesen werden konnte wurde auf Ketosäuren untersucht.

Es konnten in der menschlichen Placenta die folgenden Ketosäuren qualitativ ermittelt werden: Glyoxylsäure, Brenztraubensäure, Hydroxybrenztraubensäure, α -Keto-*n*-buttersäure, α -Keto-*iso*-valeriansäure α -Keto-*iso*-capronsäure, *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Oxalessigsäure, α -Ketoglutarsäure und α -Keto- ϵ -aminocapronsäure.

An freien Aminosäuren enthält, ebenfalls papierchromatographisch bestimmt, die menschliche Placenta: Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Valin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Lysin, Arginin.

Es wird die Aufgabe weiterer Versuche sein, das Osazon-Hydrazon-Gemisch als Beitrag zur Chemie der Placenta noch mehr aufzuschlüsseln.

LITERATUR

- [1] Acher R. u. Crocker C., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 704, 1952.
- [2] Ammon R., *Biochem. Z.* **288**, 93, 1936.
- [3] Ammon R. u. Hennig U. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **306**, 214, 1957.
- [4] Cammarata P. S. u. Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **187**, 439, 1959.
- [5] Cramer F., „*Papierchromatographie*”, Verlag Chemie, 1953, S. 57.
- [6] Hausmann W., *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 3181, 1952.
- [7] Hennig U. u. Ammon R., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **306**, 221, 1957.
- [8] Kotake Y. u. Nishigaki M., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **219**, 224, 1933.
- [9] Meister A. u. Tice S. V., *J. Biol. Chem.* **187**, 173, 1956, u. a. m.
- [10] Partridge S. M., *Biochem. J.* **42**, 238, 1948.
- [11] Pfennig N., *Naturwissenschaften* **41**, 62, 1954.
- [12] Tatematsu T., Nogi K. u. Yoneda A., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **225**, 275, 1934.
- [13] Zoch E., *Arzneimittelforsch.* **8**, 236, 1958.

WYSTĘPOWANIE KETOKWASÓW I AMINOKWASÓW W LUDZKIM ŁOŻYSKU

Streszczenie

Mieszaninę 2,4-dwunitroosazonów i 2,4-dwunitrofenilohydrazonów otrzymaną z wyciągu ludzkiego łożyska za pomocą 2,4-dwunitrofenilohydrazyny badano na zawartość ketokwasów. W poprzedniej pracy stwierdzono w takiej mieszaninie 2,4-dwunitroosazon witaminu C.

Chromatografią bibułową wykazano w ludzkim łożysku następujące ketokwasy: kwas gliksalowy, pyrogronowy, hydroksypyrogronowy α -keto-*n*-masłowy, α -keto-*izo*-walerianowy, α -keto-*izo*-kapronowy, *p*-hydroksyfenilopyrogronowy, szczawiooctowy, α -ketoglutarowy i α -keto- ϵ -aminokapronowy.

Również chromatograficznie wykazano w ludzkim łożysku wolne aminokwasy; glicynę, alaninę, serynę, treoninę, walinę, leucynę, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, glutaminę, lizynę, argininę.

Tematem następnych doświadczeń będzie dalsze zbadanie mieszaniny osazonowo-hydrazynowej jako przyczynek do badań nad chemizmem łożyska.

Otrzymano 27.5.1960 r.