

P.939-9.58.

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK

TOM II

1956

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA



P O L S K A A K A D E M I A N A U K
K O M I T E T B I O C H E M I C Z N Y

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM II

1956

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Stanku
Stanku

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Józef Heller
Zastępca redaktora nacz. — Jerzy Meduski

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE · WARSZAWA 1956

Nakład 1044 + 90 egz.	Oddano do składania 13.8.56
Ark. wyd. 9,6. Ark. druk. 8,5	Podpisano do druku 6.12.56
Papier druk sat. kl. V, 70 gr, 70×100	Druk ukończono w grudniu 1956
Cena zł 15.—	Zam. 1193c/56. B-011.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

Stawne.

OD REDAKCJI

Poważnym wydarzeniem w historii biochemii światowej był niewątpliwie III Międzynarodowy Kongres Biochemików odbyty w Brukseli w dniach 1—8 sierpnia 1955 r. Ponad dwa tysiące uczestników wystąpiło na około dwudziestu posiedzeniach plenarnych czterdziestu wielkich wykładów i ośmiuset krótszych doniesień. Pobieżnie powiadomiliśmy naszych czytelników o kongresie w czwartym numerze „Postępów Biochemii” z ubiegłego roku. Dziś dajemy wybór ciekawszych materiałów kongresowych, by zorientować dokładniej szersze kręgi zainteresowanych we współczesnej tematyce laboratoriów biochemicznych świata.

Sposób przedstawienia materiału kongresowego nie jest jednolity. Daliśmy referentom swobodę wyboru formy ich sprawozdań. Obok krótkich omówień obrad sekcyjnych mamy w niniejszym tomie monograficzne opracowania poszczególnych zagadnień i szczegółowe zestawienia tematyki poszczególnych działów biochemii. Ta różnorodność formy zbliży — jak sądzimy — materiały kongresowe do czytelnika i lepiej odzwierciedli kierunki głównych zainteresowań biochemików polskich. Omówienia materiałów Kongresu Brukselskiego pojawiły się już w fachowej prasie zagranicznej (na przykład: w *Angewandte Chemie*, nr 21 z dnia 7 listopada 1955), a materiały kompletne pojawią się w formie książkowej w najbliższym czasie.

Treścią naszego omówienia są sprawozdania delegatów PAN na kongres oraz autoryzowany przekład odczytu wygłoszonego na kongresie przez P. Słonimskiego. Luki postaramy się uzupełnić w następnym numerze przez umieszczenie odpowiednich referatów przeglądowych.

Zeszyt uzupełniają aktualności biochemiczne i komunikatu Komitetu.

JÓZEF HELLER

Utlenienia i fosforylacje

(Na podstawie materiałów III Kongresu Biochemików w Brukseli)

Zagadnieniom oddychania i fosforylacji komórkowej poświęcono całkowicie obrady Sekcji VI. Poza tym zagadnienie to było przedmiotem inauguracyjnego wykładu C. Martiusa oraz wypełniło część obrad Sekcji VII, której właściwym problemem była sprawa regulacji biochemicznych.

C. Martius (Würzburg) — TYROKSyna I FOSFORYLACJE OKSYDATYWNE (Wykład inauguracyjny Zjazdu)

Martius wychodzi z założenia, że działanie tyroksyny wyraża się przede wszystkim podwyższeniem przemiany podstawowej oraz, że działanie to jest obwodowe, na poziomie samej komórki. W poszukiwaniu mechanizmu tego działania zwraca uwagę na fundamentalne odkrycie ostatniego 10-lecia w dziedzinie energetyki ustrojowej, mianowicie na możliwość eksperymentalnego oddzielenia procesów oddychania od fosforylacji. Oddychanie jest pierwotnym źródłem energii życiowej i polega w zasadzie na reakcji gazu piorunującego, tj. na łączeniu wodoru z tlenem. Energia tej reakcji może być jednak tylko wtedy zużytkowana jako źródło pracy jeżeli jej kosztem powstanie z ADP*) i nieorganicznego fosforanu nowa cząsteczka ATP. Przy rozkojarzeniu obu procesów możemy obserwować wzrost oddychania i produkcji ciepła w ustroju bez przyrostu ATP. Może to polegać bądź to na zahamowaniu powstawania ATP, bądź też na aktywowaniu jego hydrolitycznego rozkładu z bezpośrednim wyzwoleniem ciepła, bez uprzedniego wykorzystania tej energii na pracę. Tego rodzaju działanie rozkojarzające wykazuje tyroksyna, jak to znalezli równocześnie Martius w Niemczech i Lardy w USA w

*) Użyte skróty: ATP = kwas adenozynotrójfosforowy, ADP = kwas adenozynodwufosforowy, DPN = dwunukleotyd pirydinoadeninowy, DPNH = dwunukleotyd pirydinoadeninowy zredukowany, DNP = 2,4-dwunitrofenol, EDTA = kwas etylenodwuaminoczworoocowy, DPT = dwufosfotiamina, ETP = cząstka przenosząca elektrony (electron transport particle).

r. 1951. Martius ze swoją szkołą badał głównie wpływ tyroksyny na iloraz P:O przy zastosowaniu heksokinazy i glikozy do gromadzenia związanego fosforu. W ciągu 5-letnich badań, grupa Martiusa uwzględniając głosy krytyczne udoskonaliła swą technikę doświadczeń tak, że obecnie otrzymują powtarzalne i statystycznie ważne wyniki. Wychodząc z założenia, że pogarszająca się wydajność fosforylacji musi się wyrównać przez wzrost utlenienia, wyprowadził Martius liczbową zależność między oboma wielkościami. Potwierdził ścisłość swej formuły w doświadczeniach, w których przyżyciowo oznaczał przemianę podstawową zwierzęcia (szczury i świnki morskie) a następnie na mitochondriach wątroby i na kawałeczkach przepony oznaczał stosunek P:O. Z badań tych wyliczono, że jeśli procentowa zmiana wartości P:O wynosi x , to procentowa zmiana przemiany podstawowej wynosi

$$x \cdot \frac{1}{x - \frac{x}{100}}$$

Rachunek taki da się oczywiście przeprowadzić także w kierunku odwrotnym. Wyświetlona podczas wykładu tabela podająca wartości znalezione obok teoretycznie obliczonych, nie usprawiedliwiała moim zdaniem pewności, z jaką prelegent przedstawił ścisłość swojej formuły. Duże różnice występowały między ilorazem P:O w mitochondriach a w przeponie.

W dalszym ciągu wykazywał Martius na podstawie doświadczeń, że po działaniu propylotiouracylu równolegle do spadku przemiany podstawowej rośnie wartość ilorazu P:O. Efekt ten występuje regularnie w przeponie, ale w mitochondriach wątroby jest kapryśny. Podobnie w przebiegu wzrostu szczura daje się stwierdzić niższy stosunek P:O u młodych osobników, zgodnie z ich wyższą przemianą podstawową. Tak więc, wpływ tyroksyny na fosforylacje oksydatywne *in vivo* jest zdaniem Martiusa wystarczająco udowodniony.

Również *in vitro* wywołują duże dawki tyroksyny (rzędu 10^{-4} i 10^{-5} M) obniżenie fosforylacji oksydatywnej w mitochondriach i przeponie. 10-krotnie mniejsze dawki dają wyniki kapryśne, co Martius odnosi do różnego wysycenia komórek tyroksyną *intra vitam*. Działanie to wykazuje daleko idące podobieństwo z wpływem dwunitrofenolu.

Dla wytłumaczenia działania tyroksyny na przemianę zakłada Martius, że hormon ten działa na system enzymatyczny dostarczający wysokoenergetycznych związków. W tym miejscu zaczyna się właściwa hipoteza Martiusa. Zakłada on, że równolegle do ogólnie przyjętego łańcucha przenośników elektronów (kodehydraza — flawoproteidy —

cytochromy) włączony jest inny łańcuch i tylko w tym drugim odbywa się fosforylacja. Ogniwami tego łańcucha są dwa układy oksydo-redukcyjne, mianowicie formy chinonowe obok hydrochinonowych witaminu K czyli filochinonu, oraz witaminu E czyli tokoferolu, albo też tokochinonu. Udział witaminu K w fosforylacjach oksydacyjnych wynika z obserwacji Martiusa i Nitz-Litzowa w 1953 r. (1), że ciała o funkcji antywitaminu K rozkojarzają fosforylacje oddechowe. Należą więc tu różne antykoagulanty stosowane w lecznictwie, inne znane są jako środki przeciw gryzoniom. Wszystkie te pochodne 4-oksymaryny rozkojarzają oddychanie i fosforylacje w izolowanych mitochondriach i w preparatach z przepony. Między tym działaniem a hamowaniem krzepnięcia istnieje pewna równoległość. Na tej podstawie przypuszcza Martius, że działanie na krzepliwość nie jest specyficzne, lecz polega na zahamowaniu w wątrobie syntezy czynników krzepnięcia z powodu braku potrzebnych do tego ciał wysokoenergetycznych. To ostatnie twierdzenie nie wydaje mi się przekonujące.

Martius przeprowadził jednak również bezpośredni dowód udziału filochinonu w fosforylacjach oksydacyjnych (2). Mitochondria z wątroby kurcząt żywionych z wykluczeniem witaminu K wykazują zmniejszenie fosforylacji. Dodanie *in vitro* witaminu K 10^{-5} M, zwiększa w tych przypadkach fosforylację o 30 do 50%. Świadczyłoby to o tym, że filochinon jest niezbędny przy jednej z trzech kolejnych fosforylacji. Ponieważ wpływ witaminy *in vitro* nie występuje jeśli substratem jest bursztynian, można przypuszczać, że idzie tu o etap polegający na utlenieniu DPNH. Zachodzi tu przeniesienie wodoru z DPNH na witamin K₁ za pośrednictwem reduktazy filochinonowej, którą wyizolowali z mitochondrii Martius i Strufe w 1954 r. (3). Powstający filohydrochinon utlenia się pod wpływem cytochromu b. Fakt ten określający jednoznacznie położenie witaminu K w łańcuchu przenośników elektronów potwierdził Martius w r. 1954 spektroskopowo (4). Jeżeli preparat oksydazy bursztynowej z serca uzupełnić cytochromem c i reduktazą filochinonową, to po dodaniu DPNH można wykazać widmo zredukowanego cytochromu c i a. Natomiast nie pojawia się widmo zredukowanego cytochromu b. Na podstawie takich doświadczeń twierdzi wielu autorów, że cytochrom b nie wchodzi w skład głównego łańcucha przekazywania elektronów i lokowano go w bocznej gałęzi utleniania bursztynianu. Okazuje się jednak, że redukcja cytochromu b występuje natychmiast po dodaniu do takiego układu drobnych ilości filochinonu. W ten sposób odpadają trudności we wcieleniu cytochromu b jako ogniwa do głównego łańcucha. Widocznie przy preparatyce odpada filochinon normalnie w sercu zawarty. Opisane doświadczenie wykazuje zarazem,

że istnieją dwie różne drogi przenoszenia wodoru z DPNH. Jedna prowadzi przez filochinon i cytochrom *b* do cytochromu *c* i dalej, druga pomija witamin K i cytochrom *b* i prowadzi poprzez flawoproteidy do cytochromu *c*. Tylko pierwsza droga daje równoczesną fosforylację. Rozkojarzenie więc polegałoby na zablokowaniu drogi przez filochinon i skierowanie całego strumienia elektronów na drugą drogę. Metodą spektroskopową można wykazać, że czynniki rozkojarzające jak tyroksyna i dikumarol hamują *in vitro* przenoszenie wodorów z DPNH przez reduktazę filochinonową na witamin K.

Martius zwraca w tym miejscu uwagę, że wszystkie poznane dotąd substancje rozkojarzające mają charakter fenolowy. Mogłyby więc blokować reduktazę filochinonową.

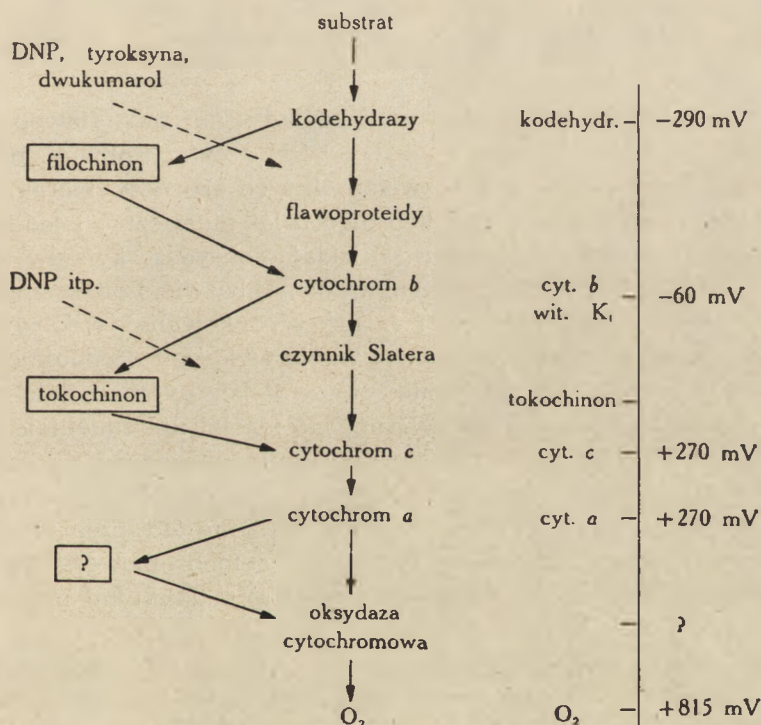
Inne ciała o działaniu witaminu K nie posiadające łańcucha fitolowego, nie tylko nie mogą zastąpić witaminu w działaniu podnoszącym fosforylację w mitochondriach z wątroby awitaminowych kurcząt, lecz nawet działają hamująco. Tak działa np. menadion i ftiokol. Zgadza się to z obserwacją Islera i współpr. z 1953 r. (5), że w eksperymentalnym zatruciu dikumarolem u królików i szczurów, leczą tylko takie pochodne 2-metylonaftochinonu, których łańcuch boczny długością dorównywa łańcuchowi bocznemu naturalnego witaminu. Martius wnioskuje stąd, że prostsze preparaty służą organizmowi jedynie do syntezy filochinonu. Rolę łańcucha pojmuję jako kotwicę umożliwiającą związanie się z tłuszczami podłoża. Zarówno bowiem mitochondria zwierzęce jak i chloroplasty roślinne zawierają lipidy w dużym stężeniu. Przemawiałaby za tym obserwacja Habermanna (6), że lecytynazy upośledzają fosforylację oksydacyjną w homogenatach wątrobowych, nie wpływając na samo oddychanie.

W analogii do omówionej roli witaminu K Martius przypuszcza, że także przy następnych dwóch etapach fosforylacji oksydacyjnej grają rolę podobne lipofilne układy chinonowe. Wskazuje tu przede wszystkim na witamin E, którego związek z przemianą fosforową, z oddychaniem i z gospodarką ATP przypuszczali już różni autorzy. Ostatnio w 1955 Nason przypuszcza związek między witaminem E, a transportem elektronów. W nieogłoszonych doświadczeniach wykazał Martius, że skrawki przepony królików w awitaminozie E wykazują zmniejszoną fosforylację przy nie obniżonym oddychaniu w stosunku do normalnych. Spadek przy silnej awitaminozie przy użyciu bursztynianu jako substratu, dochodzi do połowy wartości kontrolnej. Stosując kwas β -oksymasłowy jako substrat otrzymuje się mniejsze różnice, co by świadczyło o umiejscowieniu witaminu E na drugim lub trzecim etapie. Efektu tego nie obserwuje się w doświadczeniach z mitochondriami. Martius tłumaczy to tym, że brak witaminu łatwiej

występuje w mięśniach niż w komórkach wątrobowych. Wyniki do świadczeń *in vitro* nie były jednoznaczne. Niektóre obserwacje przemawiają za tym, że hipotetycznym czynnikiem jest nie tokoferol, ale tokochinon, którego biologiczne działanie, co prawda nie przeciw bezpłodności ale przy dystrofii mięśniowej królików jest znane. Przez redukcję powstawałby z tokochinonu tokohydrochinon a ten redukuje łatwo cytochrom *c*. Tokohydrochinon byłby więc naturalnym substratem układu: oksydaza cytochromowa/cytochrom *c*. W laboratorium używamy analogicznie hydrochinonu do oznaczenia aktywności tego układu.

Również dla trzeciego etapu fosforylacji przypuszcza Martius działanie podobnego układu np. tokoferol/tokoferoksyd, ale te wywody sam już określa jako spekulacje.

Poniżej podaję schemat łańcucha fosforylacji oksydatywnej wedle hipotezy Martiusa, oraz niektóre pozycje z piśmiennictwa.



Schemat 1. Powiązanie utlenień z fosforylacją według hipotezy Martiusa

PIŚMIENNICTWO

1. Martius C. und Nitz-Litzow D., *Biochim. et Biophys. Acta*, **12**, 134, 1953.

2. Martius C. und Nitz-Litzow D., *Biochim. et Biophys. Acta*, **13**, 152, 289, 1954.
3. Martius C. und Strufe R., *Biochem. Z.* **326**, 24, 1954.
4. Martius C., *Biochem. Z.* **326**, 26, 1954.
5. Isler O., Rüegg R., Studer A. und Jürgens R., *Z. physiol. Chem.* **295**, 290, 1953.
6. Habermann E., *Naturwiss.* **41**, 429, 1954.

*

Sekcja VI poświęcona była utlenianiom komórkowym i fosforylacjom oksydacyjnym. Wygłoszono na niej 53 komunikaty i 4 raporty: Słonimskiego, Mahlera, Slatera i Mary Jones. Z głosów w dyskusji, które rozwinęły się w koreferaty, specjalnie ważną i ciekawą jest wypowiedź Greena do raportu Slatera oraz Cohena do raportu pani Jones.

Wykład Słonimskiego w autoryzowanym przekładzie znajdzie czytelnik in extenso na str. 493.

H. R. Mahler (Inst. Badań nad Enzymami, Madison, USA) — METALO-FLAWOPROTEIDY A TRANSPORT ELEKTRONÓW

Mahler przedstawił klasyczne poglądy na rolę flawoproteidów jako związków pośredniczących między DPN a cytochromami, następnie naszkicował historię odkrycia w związkach tych obecności metali. Odkrycia tego dokonano w ciągu ostatnich dwóch lat niezależnie i jednocześnie w kilku laboratoriach. W Madison (1) badając oksydazę kwasów tłuszczowych wydzielono flawoproteid o ciemnozielonej barwie. Porównanie widma formy utlenionej tego barwika i formy zredukowanej wskazywało na obecność miedzi. Bezpośrednie poszukiwania wykazały obecność dwu atomów miedzi na cząsteczkę FAD'u. Dializa wobec cyjanku dała produkt żółty o typowym widmie FAD'u. Usunięcie miedzi nie zmieniało działalności diaforazowej, tj. przenoszenia dwu atomów wodoru na odpowiednie barwiki oksydoredukcyjne. Natomiast zupełnemu zahamowaniu uległa zdolność redukcji cytochromu c. Dodanie do preparatu jonów miedzi przywracało aktywność reduktazy cytochromowej. Wyniki te były punktem wyjścia dla badań Mahlera nad innymi metaloflawoproteidami.

Do podobnych wyników doszedł Albert (2) na innej drodze. Stwierdził on, że ryboflawina tworzy z ciężkimi metalami związki chelatowe i wskazał na potrzebę zbadania oksydazy ksantynowej na obecność metalu. Prawie równocześnie DeRenzo z laboratorium Lederle wykazał, że czynnik XO, niezbędny dla szczurów do wytworzenia oksydazy ksantynowej, jest po prostu nieorganicznym molibdenem. Kilka tygodni po ukazaniu się tych obu prac w 4 miejscach równocześnie stwierdzono, że oksydaza ksantynowa jest Mo-flawoproteidem. Dokonali tego: De-

Renzo (3), Totter (4) w Oak Ridge, Mahler (5) i odkrywcy XO: Richert i Westerfeld (6).

Niezależną znów drogą szli Nason i Nicholas (7) z Instytutu MacCollum Pratt, którzy odkryli że molibden jest czynnikiem wzrostowym dla *Neurospora crassa* i że pośredniczy pomiędzy flawinową reduktazą azotanową a substratem. Wreszcie niezależnie od wszystkich Harrison (8) wykazał, że hydrogenaza fumarowa Fischera aktywuje się jonami żelazawymi.

Dając przegląd ogólny enzymów flawinowych Mahler dzieli je na 3 grupy. Pierwszą stanowią enzymy, których substratem jest DPN, a akceptorem cytochrom lub inny pośrednik, lecz nigdy tlen. Drugą grupę stanowią flawiny nie używające pośrednictwa DPN, pośredniczące więc bezpośrednio między substratem a cytochromem. Trzecią wreszcie grupę stanowią oksydazy właściwe, pośredniczące od razu między substratem a tlenem. Wszystkie dotąd poznane enzymy metaloflawoproteidowe należą do dwu pierwszych grup. W enzymach trzeciej grupy nie wykazano dotąd obecności metalu, a widmo ich nie świadczy o prawdopodobieństwie obecności w nich metalu. Należą tu L- i D-oksydazy aminokwasowe i notatyna. Przegląd poznanych dotąd enzymów metaloflawoproteidowych podaje tablica 1.

Tablica 1
Metale w enzymach metaloflawoproteidowych

Metal	Enzym	Metal	Enzym
Miedź	Reduktaza DPNH-cyto- -CoA	Żelazo	Dehydrogenaza acylo-CoA (?)
Żelazo	Reduktaza DPNH-cyto- chromowa	Molib- den	Oksydaza ksantynowa Oksydaza aldehydowa Reduktaza azotanowa Hydrogenaza
	Oksydaza DPNH	Niezna- ny	Reduktaza azotynowa Reduktaza hydroksylami- nowa
	Dehydrogenaza bursztyno- wa		Oksydaza siarczynowa
	Reduktaza TPNH-cyto- chromowa		

Jaka jest rola metalu w tych enzymach? Pewne światło rzucają na to doświadczenia polegające na usunięciu lub inaktywacji metalu. Zmienne tak enzymy tracą zdolność reagowania z cytochromami, azotanami, azotynami, prawdopodobnie z hydroksylaminą, a także z żelazicjan-kiem i viologenami. Mogą natomiast reagować z błękitem metylenowym i podobnymi akceptorami przyjmującymi od razu dwa elektrony lub dwa atomy wodoru. W ten ostatni sposób reagują nukleotydy pirydynowe

i same flawiny. Metal jest zatem koniecznym pośrednikiem na drodze jednoelektronowej. Mahler zakłada więc, że między działaniem jedno- i dwuelektronowego przenośnika zachodzi nie tylko ilościowa, ale i jakościowa różnica. Przypuszcza, że przeniesienie jednego elektronu wymaga utworzenie formy semichinonowej flawiny, a to właśnie staje się możliwe przez połączenie flawiny z metalem. Metal bowiem stabilizuje układ semichinonowy przez umożliwienie nowych form rezonansowych. Poza tym metal umożliwia połączenie flawiny z dwoma cząsteczkami jednoelektronowego akceptora. Wreszcie dodatkowe formy rezonacyjne pozwalają założyć możliwość śródcząsteczkowego przenoszenia elektronów. Eksperymentalnie można wykazać, że akceptory jednoelektronowe istotnie wiążą się z metaloflawoproteidem po przez atomy metalu. Tak np. można zahamować bardzo wydatnie czynność reduktazy cytochromowej przez aniony tworzące z żelazem związki chelatowe, np. pirofosforan lub cytrynian. Zahamowanie to można kompetetywnie odwrócić przez zwiększenie stężenia cytochromu. Skoro więc hamowanie następuje przez wiązanie żelaza, to odhamowanie przez cytochrom musi następować przez jego reakcję z żelazem flawoproteidu.

Niektóre enzymy mają budowę jeszcze bardziej skomplikowaną, zawierając — oprócz metaloflawoproteidu — wbudowane hemoproteidy w różnej ilości. W ten sposób powstają całe „rodziny” enzymów. W Ma-

Tablica 2
Różne postacie oksydazy DPNH

Postać	Nazwa	Skład	Uwagi
Flawoproteid	Diaforaza	E-FAD	Rodzaj flawiny nieustalony
Metaloflawoproteid	Reduktaza DPNH cytochromowa	E-FAD-Fe ₄ ⁺⁺⁺	
Metalohemoflawoproteid		E-FAD-Fe ₂₀ - -cyt. b	Reaguje z cyt. c
Kompleks metalohemoflawoproteidowy	Oksydaza DPNH (postać otwarta)	E-FAD-Fe ₃₅ - -cyt. b-Cu ₅ - -cyt. oksydara	
ditto	Oksydaza DPNH (postać zamknięta)	ditto	Reaguje tylko z O ₂

dison prowadzą właśnie badania zmierzające do ustalenia takich rodzin enzymowych, gdzie poszczególne enzymy wywodzą się ze wspólnego pnia flawoproteidowego przez włączanie dodatkowych przenośników me-

talobiałkowych. Tablica 2 daje przykład tego rodzaju „rodziny” wywodzącej się od diaforazy.

Mahler przypuszcza, że „stary” żółty enzym Warburga może być początkowym członem takiej niezbadanej jeszcze grupy enzymów. Ciekawym jest, że wszystkie poznane dotąd dodatkowe przenośniki zawierają żelazo.

Bardzo ważną funkcją włączonego metalu jest przesunięcie potencjału oksydoredukcyjnego. Już samo połączenie z białkiem przesuwają potencjał flawiny, lecz przesunięcie to nie przekracza 0,1 V. Natomiast obecność metalu wywołuje znacznie silniejsze przesunięcia jak to widać z tablicy 3.

Tablica 3
Potencjał oksydoredukcyjny flawin
i flawoproteidów

Rodzaj	E'₀
Ryboflawina	—0,186
Nukleotydy flawinowe (FAD, FMN)	—0,180
Stary żółty enzym	—0,060
Oksydaza ksantynowa (Mo)	—0,350
Reduktaza DPNH-cyt. (Fe)	0,00
Dehydrogenaza butyrylo-CoA (Cu)	+0,187

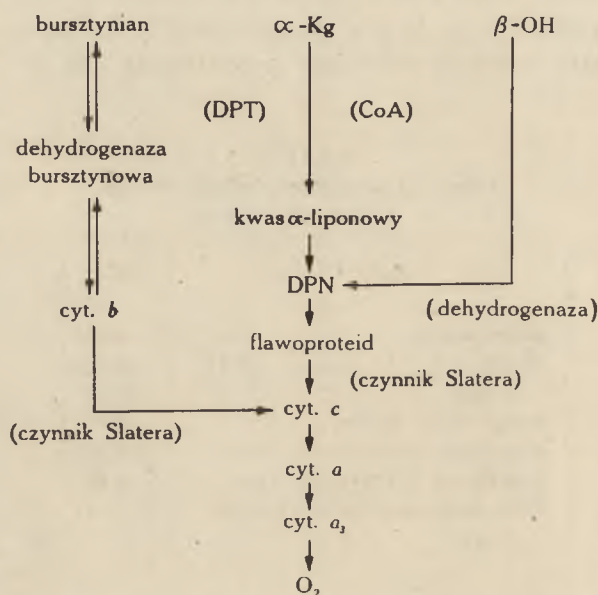
Wreszcie obecność metali wpływa na stosunek enzymu do grupy fosforanowej. Na tym oparto szereg hipotez usiłujących wyjaśnić mechanizm fosforylacji oksydatywnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Mahler H. R., J. Biol. Chem. **206**, 13, 1954.
2. Albert A., Biochem. J. **54**, 646, 1953.
3. DeRenzo E. C., Kaleita E., Heytler P., Oleson J. J., Hutlings B. L. and Williams J. H., Arch. Biochem. and Biophys. **45**, 247, 1953.
4. Totter J. R., Burnett W. T. Jr., Monroe R. A., Whitney I. B. and Comar C. L., Science **118**, 555, 1953.
5. Mackler B. Mahler H. R. and Green D. E., J. Biol. Chem. **210**, 149 1954.
6. Richert D. A. and Westerfeld W. W., J. Biol. Chem. **203**, 915, 1953.
7. Nason A. and Evans H. J., J. Biol. Chem. **202**, 655, 1953. Nicholas D. J. D. and Nason A., J. Biol. Chem. **207**, 353, **211**, 183, 1054.
8. Harrison J., Nature, **172**, 509 1953.

E. C. Slater (Zakład Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu w Amsterdamie) — FOSFORYLACJE W ŁAŃCUCHU ODDECHOWYM

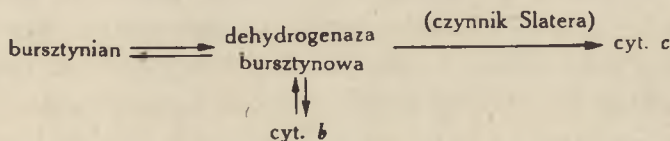
Obszerny wykład Slatera nie przyniósł nowych faktów ani koncepcji, stanowił raczej systematyczny i krytyczny przegląd znanych ogólnie pojęć. Specjalny nacisk położył na oddzielenie faktów wystarczająco sprawdzonych, od pojęć noszących jeszcze poniekąd charakter hipotezy. Za podstawę dyskusji przyjął podany poniżej schemat 2.



Schemat 2. (α-Kg = α-ketoglutaran; CoA = koenzym A; DPN = nukleotyd dwufosfopirydynowy; cyt. = cytochrom; β-OH = β-hydroksymaślan; DPT = dwufosfotiamina)

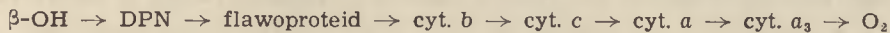
W schemacie tym zamieszczono tylko takie człony, które w kolejności ulegają redukcji i utlenieniu w ciągu każdego przejścia elektronów. W nawiasach umieszczono takie ciała, których udział jest niezbędny, ale które nie ulegają oksydoredukcji (DPT, CoA), albo dla których oksydoredukcji nie udowodniono. Tak samo potraktował Slater swój czynnik wrażliwy na BAL, bo chociaż uważa, że stanowi on ogniwo odwracalne między flawoproteidami a cytochromem c, ale niema na to wystarczających dowodów. Rola i miejsce zajmowane przez cytochrom b są jeszcze przedmiotem dyskusji. Tak np. Chance uważa, że cytochrom b stanowi jakby uchyłek boczny przy dehydrogenazie bursztynowej we fragmentach sarkosomalnych (schemat 3).

Slater zwraca jednak uwagę, że wyniki otrzymane przy użyciu fragmentów mitochondrialnych lub sarkosomalnych nie muszą odzwier-



Schemat 3

cedlać stanu w mitochondriach nie uszkodzonych. Sam Chance pisze łańcuch oddechowy przy utlenianiu kwasu β -hydroksymasłowego przez mitochondria tak:



Slater omówił również poglądy Martiusa nie zajmując wobec nich stanowiska. Jednak wedle świeżej publikacji (1) α -tokoferol znajduje w sarkosomach z mięśnia sercowego, dostarczając w ten sposób bardzo istotnego poparcia dla koncepcji Martiusa.

Z kolei dyskutuje Slater nad ilością możliwych fosforylacji w ciągu przenoszenia pary elektronów na tlen. Istotnym jest tu stwierdzenie, że fosforylacja polega zawsze na przyłączeniu reszty ortofosforanowej a nigdy pirofosforanowej. Wynika to z doświadczeń Lehningera i Smitha (2) Zatem związanie każdego atomu P odpowiada osobnej reakcji fosforylacji, i miarą ilości fosforylacji może być stosunek P:O. Ponieważ błędy metod używanych do oznaczenia tego stosunku mają tendencję do obniżania wartości ilorazu, przeto wszystkie wyniki zaokrąglą się ku górze. Slater twierdził dotąd, że najwyższa możliwa ilość fosforylacji wynosi 3. Używając bowiem jako substratu α -ketoglutaranu znajdował wartości P:O poniżej 3. Wielu innych autorów znajdowało jednak wartości 3,3 do 3,6 co Slater tłumaczył błędami w oznaczaniu zużycia tlenu prowadzącymi do zbyt niskich wartości dla oddychania. Stanowisko to poddał w wykładzie rewizji i przyznaje się obecnie, że przy użyciu mitochondriów wątroby należy z pewnością przyjąć 4 fosforylacje a być może, także dla sarkosomów mięśnia sercowego. Szereg wyznaczników z jego własnych doświadczeń, jak stosunek zestryfikowanego fosforu do zużytego kwasu ketoglutazarowego, wypadają zgodnie z innymi autorami. Wydaje mi się, że przyczyna dotychczasowych niezgodności może wynikać z użycia przez Slatera EDTA. W naszej pracowni wykazał bowiem Tysarowski (3), że sól żelazowa tego związku zwiększa zużycie tlenu przez mitochondria.

Przy substratach typu β -OH znajdowano wartości P:O około 2,5 dla mitochondriów wątroby (4) i dla sarkosomów z serca (5). Należy zatem

przyjąć 3 fosforylacje przy utlenieniu związków tego typu. Przy utlenieniu bursztynianu zachodzi trudność w oznaczaniu stosunku P:O ponieważ brak dotąd inhibitora, któryby hamował dalsze utlenianie kwasu fumarowego i związane z tym ewentualne dalsze fosforylacje. Nagromadzono jednak bardzo duży materiał doświadczalny, który dowodzi pośrednio, że utlenieniu kwasu bursztynowego odpowiadają 2 fosforylacje.

Następnie przeszedł Slater do zagadnienia lokalizacji poszczególnych fosforylacji. Na ogół przyjmuje się, że jedna fosforylacja zachodzi między DPNH a flawiną, druga między flawiną a cytochromem c, trzecia między cytochromem c a tlenem. Czwarta fosforylacja, zwana w odróżnieniu od powyższych oksydatywnych fosforylacją substratową, zachodzi między substratami typu kwasu α -ketoglutarynowego a DPN. Poglądy te wywodzą się z propozycji Lipmanna, który oparł się na potencjałach oksydoredukcyjnych poszczególnych ogniw łańcucha i założył dla każdej fosforylacji różnicę potencjałów co najmniej 0,25 V. Slater omówił eksperymentalne próby sprawdzenia tej lokalizacji. Polegały one na oznaczaniu P:O dla różnych odcinków łańcucha utlenień.

a) DPNH do tlenu. Utlenienie DPNH przez mitochondria udaje się tylko przy zastosowaniu mitochondriów nienapeężnionych w hipotonicznym roztworze. Otrzymuje się przy tym wyniki identyczne z tymi jakie daje użycie β -hydroksymaślanu jako substratu. Wynika stąd, że przeniesienie 2 H ze związków typu β -OH na DPN nie uwalnia energii w ilości, umożliwiającej fosforylację. Cały uzyskany efekt energetyczny z utlenienia tych związków lokalizuje się między DPNH a tlenem. Przyjmuje się, że otrzymuje się między DPNH a tlenem 3 fosforylacje, doświadczalnie jednak nie udało się tego zadawalająco udowodnić. Najwyższy iloraz otrzymany przez Lehningera wynosił 1,89. Jest to więcej, niżby można było oczekiwać, gdyby zachodziły tylko 2 fosforylacje, bo przeciętne straty przez reakcje wtórne przekraczają zwykle 0,25 na jedną fosforylację. Jednak za bezwzględny dowód moglibyśmy przyjąć tylko wynik, przekraczający choć minimalnie wartość 2.

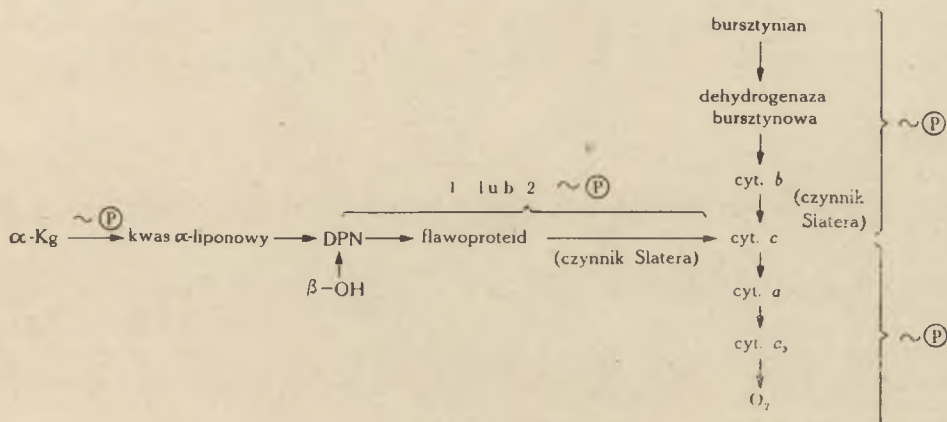
b) α -K g do DPN (fosforylacja substratowa). Sukcynyl-CoA reagując z ADP i fosforanem nieorganicznym daje bursztynian, CoA i ATP. W reakcji tej bierze udział dwufosforan gwanozyny (6).

c) α -K g do cytochromu c. Używając jako substratu α -ketoglutaranu, a jako akceptora cytochromu c, wykonał Slater bardzo wiele pomiarów fosforylacji. Stosował przy tym metodę przechwytywania fosforu przez glikozę i heksokinazę i otrzymywał P:O równe 2,16. Ponieważ analogiczne doświadczenia z dopuszczeniem tlenu jako akceptora

dawały wyniki P:O nieco wyższe tylko, niedochodzące do 3, sądził, że między cytochromem a tlenem niema już fosforylacji. Obecnie wykonał nowe doświadczenia, które w wykładzie szczegółowo omówił, otrzymując o wiele większe wartości przy użyciu tlenu, co go skłoniło do rewizji poprzedniego stanowiska. To z kolei było motywem do omówionej już zmiany jego zapatrywań na ilość możliwych fosforylacji.

d) Cytochrom c do tlenu. Fosforylację związaną z utlenieniem ferrocytochromu c w nieobecności czynników redukujących wykazali po raz pierwszy Nielsen i Lehninger (7) w mitochondriach. Slater potwierdził te wyniki stosując sarkosomy z serca. Znacznie łatwiej można wykazać tę fosforylację pośrednio, stosując jako substrat kwas askorbinowy. Uczynił to Judah już w 1951 r. (8).

Na podstawie opisanych doświadczeń proponuje Slater następujący schemat lokalizacji poszczególnych fosforylacji (schemat 4).



Schemat 4

Następnie Slater dał przegląd prac, w których różni autorzy starali się frakcjonować mitochondria i badali zachowane funkcje enzymatyczne. Jest to jedna z dróg umożliwiających wniknięcie w strukturę mitochondriów. Można mechanicznie lub działaniem hipotonicznym rozbić mitochondria lub sarkosomy, otrzymując drobne ziarnistości osiadające przy szybkim wirowaniu albo przy zakwaszeniu do pH 5,7. Ziarnistości te utleniają jeszcze DPNH i bursztynian. Slater twierdzi, że są one identyczne z fragmentami tworzącymi preparat Keilina i Hartree'ego i pochodzą z błony sarkosomalnej. Szerzej o tych cząstkach powiedział w dyskusji Green.

Lindberg i Ernster wykazali (9), że mangan wraz z ATP i DPN reaktywuje mitochondria, które straciły działanie przez inkubację z jonem wapniowym, i na tej podstawie uważają Mn za koferment oksy-

datywnych fosforylacji. Slater w obszernych doświadczeniach potwierdził to działanie zarówno w obecności jak i nieobecności EDTA, lecz uważa wpływ manganu za niespecyficzny.

W podsumowaniu stwierdza, że wprawdzie nie udało się ściśle umiejscowić żadnej fosforylacji ani nie znamy jej mechanizmu, ale możemy twierdzić z dużym prawdopodobieństwem, że fosforylacja zachodzi między:

- a) bursztynianem a cytochromem c,
- b) cytochromem c a tlenem,
- c) między DPNH a cytochromem c, gdzie prawdopodobnie zachodzą 2 fosforylacje. (Fosforylację substratową widocznie tu pomija jako wychodzącą poza temat wykładu.)

Dalszych postępów w tej dziedzinie oczekuje Slater bądź od dalszego rozwoju badań nad frakcjonowaniem mitochondriów, bądź też od wyjaśnienia mechanizmu powstawania związków wysokoenergetycznych przy łatwiej dostępnych fosforylacjach substratowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bouman J., Slater E. C., *Nature*, **177**, 1181, 1956.
2. Lehninger A. L. and Smith S. W., *J. Biol. Chem.* **181**, 415, 1949.
3. Tysarowski W., *Acta Physiol. Pol.* **5**, 597, 1954.
4. Copenhaver J. H. and Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **195**, 225, 1952.
5. Maley G. F. and Plaut G. W. E., *J. Biol. Chem.* **205**, 297, 1953.
6. Sanadi D. R., Gibson D. M.; Ayengar P. and Ouellet L., *Biochim. et Biophys. Acta* **13**, 146, 1954.
7. Nielsen S. O. and Lehninger A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3860, 1954.
8. Judah J. D., *Biochem. J.* **49**, 271, 1951.
9. Lindberg O., Ernster L., *Nature*, **173**, 1038, 1954.

*

D. E. GREEN (Madison) otworzył dyskusję nad referatem Slatera. Mówił na temat struktury układu transportującego elektrony w mitochondriach.

Układ przenoszący elektrony w mitochondriach serca dał się wyosobnić jako jednolita olbrzymia cząstka, którą nazwano „electron transport particle” czyli ETP. Wyjaśnione dotąd szczegóły składu chemicznego ETP podaje tablica 4.

ETP jest bogaty w tłuszcz, zawiera poza tym dwa rodzaje hemów, które w pewnym uproszczeniu można określić jako czerwony i zielony, żelazo niehemowe, miedź i flawiny. Na jeden mol flawiny zawiera około 8 moli hemu, 61 atomów niehemowego żelaza i 8 atomów miedzi.

ETP katalizuje utlenienie zarówno bursztynianu jak i DPNH w obecności tlenu. Dodanie cytochromu c nie zwiększa utleniania. Wszystkie hemy ulegają natychmiastowo całkowitej redukcji przy dodaniu DPNH lub bursztynianu. Cytochrom c zdaje się nie wchodzić w skład ETP, a dodany wraz z bursztynianem lub DPNH nie redukuje się wcale lub tylko nieznacznie. Dodany w formie zredukowanej nie utlenia się działaniem tlenu.

Chcąc wnikać w kolejność i funkcję poszczególnych składników rozbijano stopniowo ETP, badając skład i aktywność otrzymanych fragmentów. W ten sposób uzyskano preparaty czynne tylko wobec bursztynianu lub tylko wobec DPNH. Działaniem rozcieńczonego alkoholu amyłowego można otrzymać fragmenty zawierające osobno hemy czerwone i zielone. Częstki zawierające frakcję czerwoną hemów mają działanie dehydrogenazy bursztynowej. Z kompleksu tego można usuwać przez trawienie tryptyczne kolejno cząsteczki hemu aż pozostaje flawoproteid zachowujący działanie dehydrogenazy bursztynowej. Tablica 5 podaje skład preparatu w miarę postępującego rozbijania kompleksu.

Tablica 4
Skład preparatu ETP

	μmole lub μatomy/g enzymu (średnia wartość)
Fe niehemowe	18,3
Cu	2,4
Flawiny	0,3
Hemy	2,5
Tłuszczowce	35%

Tablica 5

Frakcjonowanie ETP alkoholem amyłowym i powstałego kompleksu dehydrogenazy bursztynowej (KDB) trypsyną

	Skład poszczególnych frakcji						
	Flawina	Całk. hem	Czerw. hem	Ziel. hem	Fe niehemowe	Cu	tłuszcz
I. ETP	1	8	+	+	61	+	+
II. KDB bogaty w tłuszcz	1	4	+	0	16	0	+
III. KDB ubogi w tłuszcz	1	4	+	0	16	0	+
IV. Rozp. flawohemoproteidy	1	4	+	0	+	0	0
V. Rozp. flawohemoproteidy	1	1	+	0	+	0	0
VI. Rozp. flawoproteidy	1	0	0	0	1	0	0

Tablica 6 wylicza akceptory elektronów dla poszczególnych preparatów. Dla całego ETP najlepszym akceptorem jest tlen, zaś cytochrom c jest nieczynny. Po zadziałaniu alkoholu amyłowego tlen nie przyjmuje już elektronów, natomiast zyskuje tę właściwość cytochrom c. Wreszcie

po usunięciu hemów przestaje działać i cytochrom c, akceptorem pozostaje żelazocjanek, fenazyne i podobne do niej barwiki. Singer i Kearney otrzymali jeszcze prostszy flawoproteid, który pracuje z fenazyną, ale już nie z żelazocyankiem.

Tablica 6
Akceptory elektronów dla ETP i jego frakcji

	O ₂	cyt. c	Żelazocjanek	Fenazyne	Indofenol
ETP	+	0	+	+	+
KDB	0	+	+	+	+
Flawoproteid	0	0	+	+	+

Wypracowano również podobną serię preparatów posiadających specyficzność dla DPNH i tą drogą spodziewa się Green i współpr. uzyskać dokładny wgląd w ułożenie poszczególnych składników.

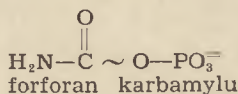
Zagadką pozostaje dotąd nieobecność cytochromu c w ETP, jakkolwiek stwierdzono jego obecność i czynną rolę w działaniu całych mitochondriów.

W związku z tymi badaniami należałoby zrewidować pogląd na układ przenoszący elektrony jako na łańcuch złożony z szeregu ogniów oksydoredukcyjnych. Green przypuszcza, że poszczególne ogniwa są powiązane w sposób umożliwiający występowanie rezonansu w całości. W pewnej dalekiej analogii możnaby mówić nie o przenoszeniu, lecz o przewodzeniu elektronów. Jakkolwiek analogia z metalami jest bardzo daleka i z pewnością istnieją zasadnicze różnice między nieograniczoną swobodą przesuwania się elektronów w metalach a naszym układem, to z drugiej strony zjawisko to nie mniej odbiega od dotychczasowego sposobu pojmowania go jako kolejnych reakcji między ogniwami łańcucha. Pewne jest, że klasyczna kinetyka reakcji da się zastosować do procesu przenoszenia elektronów tylko w fazie początkowej przy działaniu dehydrogenaz oraz w końcowej w reakcji między oksydazą cytochromową a tlenem. Nie da się natomiast zastosować do reakcji pośrednich. W układzie rezonansowym ruch π -elektronów z jednego ogniwa oksydoredukcyjnego do drugiego nie zależy od zderzeń międzycząsteczkowych, a więc pojęcie działania mas nie znajduje tu zastosowania.

Możliwe, że obecność licznych atomów niehemowego żelaza da się wytłumaczyć właśnie rolą żelaza w powiązaniu poszczególnych ogniów oksydoredukcyjnych w taki układ niby przewodnika. Jak to się dzieje, zostaje narazie zagadką, podobnie jak rola miedzi w zielonych hemach i duże stężenie lipidów.

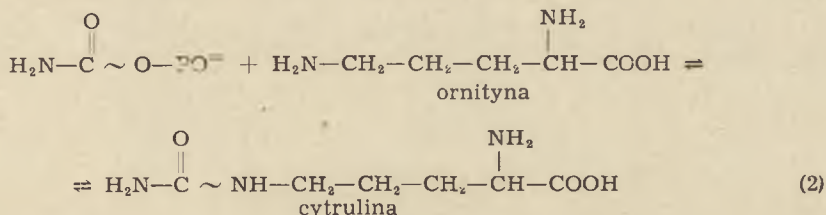
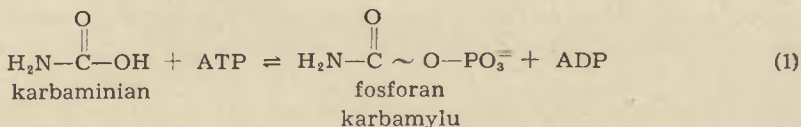
Mary E. Jones, L. Spektor, F. Lipmann (Boston, USA) — FOSFORAN KARBAMYLU

Fosforan karbamylu wykryli autorzy w czasie badań nad syntezą cytruliny. Okazało się, że związek ten służy jak źródło grupy karbamylowej w wielu układach enzymatycznych. Może on przenieść swą resztę fosforanową na ADP dając ATP, jest zatem związkiem wysokoenergetycznym. Charakter ten nadaje mu wiązanie między węglem a tlenem reszty fosforanowej. Jeśli fosforan karbamylu działa jako przenośnik grupy karbaminianowej z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu, to łańdunek energii towarzyszy grupie karbaminianowej.



Uderzająca jest łatwość z jaką ten wysokoenergetyczny związek powstaje. Tworzy się on samorzutnie przy zmieszaniu 1 molarnych roztworów KCN i KH_2PO_4 . Po pół godzinie w 30° ustala się równowaga przy 50% wydajności. Z takiej mieszaniny można go wytrącić alkoholem w postaci soli dwulitowej rozpuszczalnej w wodzie. Zachowuje się podobnie do fosforanów acylowych różni się jednak tym, że jest niewrażliwy na molibdenian tak jak fosfagen argininowy. W roztworach wodnych rozpada się samorzutnie, okres półtrwania w 37° wynosi 50 minut. Oznaczają go za pomocą metody Fiske Subbarowa po odbiałczeniu zimnym kwasem trójchlorooctowym. Jedno oznaczenie wykonuje się bezpośrednio, drugie po ogrzaniu w 0,01 N HCl przez minutę w 100° . W razie obecności dużych ilości ATP stosuje się hydrolizę 0,1 N ługiem w temperaturze pokojowej w ciągu 10 minut.

U bakterii (*Streptococcus faecalis*) cytrulina powstaje w 2 etapach. W pierwszym karbaminian z ATP daje fosforan karbamylu i ADP. W drugim etapie fosforan karbamylu reaguje z ornityną dając cytrulinę i wolny kwas fosforowy,

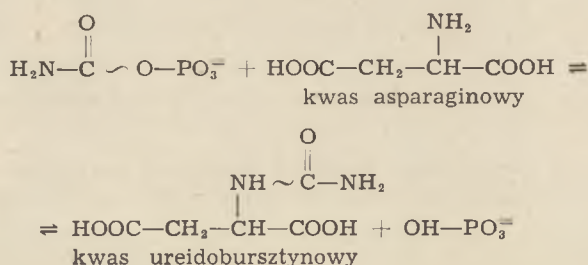


W reakcji pierwszej równowaga jest silnie przesunięta w stronę syntezy ATP, stąd dla otrzymania większych ilości fosforanu karbamylu trzeba podwyższyć potencjał grup fosforanowych. Można to uzyskać przez dodanie kwasu fosfopyrogronowego, który ma najwyższą energię „wiązania fosforowego”. W drugim etapie cytrulina powstaje łatwo, bowiem chociaż reakcja jest odwracalna, ale równowaga jest mocno przesunięta w prawo. Potencjał grupowy karbaminianu jest zatem wyższy w fosforanie karbamylowym aniżeli w cytrulinie.

Obie reakcje udało się rozdzielić — przez ogrzanie przez 3 minuty na 70° inaktywuje się enzym katalizujący pierwszy etap. Udało się również rozdzielić oba enzymy przez frakcjonowane wytrącanie siarczanem amonowym, przy czym pierwszy wypada enzym drugiego etapu. Magnez jest potrzebny tylko w pierwszym etapie.

Kwas karbaminowy powstaje z CO₂ i amoniaku, co przypomina syntezę kwasu węglowego, katalizowaną przez anhydrazę. Anhydraza jednak nie katalizuje tej reakcji i wogóle nie wykazano jej enzymatycznego charakteru.

Wyciągi bakteryjne zawierają poza tym drugi układ akceptorowy dla grupy karbamylowej, jest nim kwas asparaginowy, który reaguje z fosforanem karbamylu dając kwas ureidobursztynowy (kwas karbamylasparaginowy).



Między układem bakteryjnym syntezy cytruliny a układem występującym u ssaków zachodzi, jak wykazali Grisolia i Cohen (1) charakterystyczna różnica. U ssaków konieczna jest obecność N-acylowanego glutaminianu np. acetylo- lub karbamylglutaminianu. Grupa Lipman na potwierdziła rolę kwasu karbamylglutaminowego na preparacie uzyskanym z proszku acetonowego z wątroby wołu. Równocześnie jednak pokazało się, że pochodna glutaminowa może być zastąpiona przez fosforan karbamylu. Widocznie więc układ glutaminowy zastępuje u ssaków reakcję bakteryjną pierwszego etapu i wytwarza fosforan karbamylu.

Użyty preparat wytwarzał również kwas ureidobursztynowy z fosforanu karbamylowego i kwasu asparaginowego, podobnie jak i u drobnoustrojów. Widzimy więc, że przenoszenie grupy karbamylowej z ładunkiem wysokoenergetycznym stanowi reakcję szeroko występującą w świecie żywym i nie ograniczającą się tylko do udziału w cyklu mocznikowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Grisolia S. and Cohen P. P., J. Biol. Chem. **204**, 753, 1953.

*

W dyskusji do wykładu pani Jones opowiedział P. P. COHEN (Madison) o pracach swoich, Grisolii i innych nad syntezą cytruliny. Okazało się, że opisany przez nich dawniej związek pośredni „GD” nie zawiera kwasu glutaminowego, jak pierwotnie podawali. Błąd wyniknął stąd, że stracali ten związek jako sól cykloheksyloamonową. Sól ta, jak się okazało daje podobną reakcję barwną co pochodne kwasu glutaminowego. Nawiązując do pracy pani Jones potwierdzono w Madison, że fosforan karbamylu spełnia funkcje związku pośredniego, dając z ornityną cytrulinę. Kwas glutaminowy u *Streptococcus faecalis* nie jest wogóle potrzebny, zaś w wątrobie może być zastąpiony przez fosforan karbamylu. Być może więc u ssaków kwas glutaminowy służy wraz z ATP do syntezy fosforanu karbamylowego. Wynika z powyższego, że już kilka lat temu Cohen, z współpracownikami mieli w rękę fosforan karbamylu wydzielony z wątroby, ale nie znali jego składu i uważali go mylnie za pochodną kwasu glutaminowego.

Dalsze badania Cohena dotyczą kwasu karbamylasparaginowego; synteza tego związku wymaga obecności tego samego ciała pośredniego co synteza cytruliny. Doświadczalnie wykazali, że tym ciałem pośrednim jest fosforan karbamylu. W odróżnieniu od syntezy cytruliny, która ogranicza się tylko do wątroby, synteza kwasu karbamylasparaginowego zachodzi w różnych tkankach. Największą aktywność transkarbamylazy znaleźli w śluzówce jelita i w jądrach. Specyficzność tego enzymu obejmuje ornitynę, kwas asparaginowy, asparaginę, izoasparaginę i lizynę. Ostatnio wyosobnili kwas karbamylasparaginowy z wątroby szczura.

*

Sekcja VII poświęcona była regulacjom biochemicznym. Na sekcji tej wygłoszono 3 raporty i 34 komunikaty. Omówię z nich raporty Lardy'ego i Schneidera, które się łączą bardzo istotnie z zagadnieniem oddychania i fosforylacji.

H. A. Lardy (Madison, USA) — POWIĄZANIA ENERGETYCZNE A REGULACJA NATĘŻENIA METABOLIZMU

Jedną z najcharakterystyczniejszych cech żywej substancji jest jej zdolność dostosowania natężenia metabolizmu do zapotrzebowania energetycznego. Zdolność ta zaznacza się już u drobnoustrojów względnie beztlenowych jako efekt Pasteura, rośnie w szeregu ewolucyjnym świata zwierzęcego, osiągając najwyższy stopień u ssaków. Człowiek pracujący może dziesięciokrotnie zwiększyć produkcję energii w stosunku do stanu spoczynku. Największą zdolność w tym kierunku rozwinęły mięśnie prądkowane, które umieją zwiększyć swe ukrwienie stukrotnie, a dowóz tlenu i produkcję energii jeszcze znacznie. Nasuwa się pytanie, dlaczego mięsień w spoczynku, posiadając nadmiar substratów i tlenu produkuje tylko 1/100 tej energii, którą mógłby wytwarzać? Lardy wylicza następujące teoretycznie możliwe czynniki, które mogłyby decydować o poziomie przemiany:

1. stężenie enzymów,
2. stopień ich uaktywnienia (zymogeny = enzymy, fosforylaza a = fosforylaza b, itp),
3. rozmieszczenie enzymów w komórce,
4. stężenie metabolitów i ich potencjał oksydoredukcyjny,
5. stężenie koenzymów,
6. stężenie aktywatorów np. jonów metalicznych,
7. pH w miejscu reakcji (działanie na substrat lub na enzym),
8. inne czynniki otoczenia, np. siła jonowa, adsorbcja lub okluzja enzymu przez fazę tłuszczową, itd.,
9. temperatura, lokalnie może się wahać znacznie, nawet u stałocieplnych,
10. szybkość usuwania powstałych produktów,
11. obecność naturalnych inhibitorów.

Wszystkie te czynniki badano w prostych układach, obecnie bada się ich wpływ na bardziej już skomplikowane fragmenty komórek, próbuje się nawet ustalić ich wpływ na całe komórki. Z dotychczasowych wyników widać, że na pierwszy plan wybijają się: stężenie metabolitów, szybkość usuwania produktów, i stężenie pewnych jonów aktywujących. Z pośród metabolitów, których stężenie może ograniczać szybkość utleniania najważniejszymi są fosforany nieorganiczne i różne akceptory fosforu. Dwuwartościowe kationy są niezbędne dla sprzężenia fosforylacji z oddychaniem i dla przenoszenia energii fosforowych związków wysokoenergetycznych. Jedna co najmniej z transfosforylacji typu wysokoenergetycznego wymaga obecności jonów potasu.

Na rolę fosforanu zwrócili już wcześniej uwagę Engelhardt (1932) oraz Lennerstrand (1936) i Belitzer (1939). W r. 1941 Johnson (1) i Lynen (2) rozwinęli tę koncepcję o regulującej roli stężenia fosforanów w hipotezę mającą wytłumaczyć mechanizm efektu Pasteura. Doświadczalnie trudno było udowodnić słuszność tej hipotezy przy użyciu całych komórek. Jakościowo efekt dawał się wykazać, ilościowo był jednak nieznaczny i trudny do regulowania.

Sytuacja zmieniła się zasadniczo z wprowadzeniem techniki frakcjonowania komórki. W izolowanych mitochondriach można w określonych warunkach wykazać ściśle uzależnienie oddychania od nieorganicznych fosforanów i akceptorów fosforu. W obecności glikozy i heksokinazy mitochondria wykazują oddychanie na stałym poziomie i równocześnie wiąże się nieorganiczny fosforan, póki stężenie jego nie spadnie do $2 \cdot 10^{-4}$, po czym oddychanie ustala się na niższym poziomie. Dodatek fosforanu nieorganicznego przed spadkiem oddychania zapobiega mu, dodanie po spadku powoduje wzrost oddychania do pierwotnego poziomu. Przenosząc te obserwacje na żywy mięsień możemy sądzić, że wzmożone oddychanie w pracującym mięśniu będzie trwało dopóty, dopóki nieorganiczny fosforan, odszczepiony w czasie pracy od ATP i fosfagenu, nie zostanie wyczerpany.

Również i stężenie akceptorów fosforu kontroluje szybkość oddychania mitochondriów. Wykazano to w wielu laboratoriach i na najróżniejszych mitochondriach. Sprawność regulacji jest różna zależnie od substratu. Tak np. przy bursztynianie lub kwasie kaprylowym dodanie układu akceptorowego zwiększa oddychanie najwyżej 4-krotnie. Przy glutamianie można uzyskać 15-krotny wzrost oddychania, a przy kwasie β -hydroksymasłowym oddychanie może w zupełności zależeć od obecności układu akceptorowego. Ta zależność efektu od substratu pozwala wysnuć pewne wnioski co do miejsca, w którym wiąże się oddychanie z fosforylacją. Nie mamy w tej chwili danych pozwalających ocenić czy w mięśniu i innych tkankach silniejszy wpływ na regulację oddychania ma podać wolnego fosforanu, czy podaż akceptorów. Wprawdzie mięsień w spoczynku ma zawierać 7 mM P nieorganicznego, co jest znacznie powyżej zawartości, ograniczającej oddychanie w mitochondriach, ale trzeba pamiętać, że prawdziwa zawartość nieorganicznego fosforu w żywym mięśniu jest nam nieznana. Wszystkie bowiem odczynniki odbiałczające rozbijają wysokolabilne estry.

Należy się zastanowić, czy regulacja oddychania towarzyszy każdej fosforylacji oksydatywnej, czy też wiąże się wybiórczo z niektórymi fosforylacjami.

Okazało się, że przy utlenieniu kwasu askorbinowego lub adrenaliny, wpływ stężenia akceptorów fosforu na oddychanie jest mały. Wynika stąd, że ostatnia fosforylacja, związana z utlenieniem cytochromu c nie reguluje oddychania.

Przy utlenianiu bursztynianu obserwujemy łącznie fosforylacje na etapie ostatnim i przedostatnim. Jako miejsce przedostatniej fosforylacji przyjmuje Lardy za Chance m, utlenienie cytochromu b. Utlenienie bursztynianu nieznacznie tylko zależy od podaży akceptorów fosforu.

Przy utlenieniu takich substratów, z których wodory przenoszą się na DPN lub TPN (glutaminian, kwas β -hydroksymasłowy, cytrynian itp.) oddychanie jest ściśle zależne od stężenia akceptorów fosforu. W niektórych doświadczeniach w nieobecności glikozy i heksokinazy przez pierwsze 10 minut wogóle nie obserwuje się oddychania. Później zaczyna ono wolno narastać. Po dodaniu glikozy i heksokinazy oddychanie rusza od razu w pełnej wysokości. Wynika stąd, że oddychanie związane jest z fosforylacją umieszczoną na poziomie nukleotydów pirydynowych. Jeśli tak jest, to należy oczekiwać, że w spoczynku nukleotydy te będą przeważnie w stanie zredukowanym. Słuszność tego założenia udowodnił Chance i Williams (1954, 1955). Wedle ich badań DPNH utlenia się po dodaniu ADP. Mitochondria bardzo starannie wy-preparowane z uniknięciem mechanicznych uszkodzeń, wykazują w nieobecności akceptorów fosforu całą swą zawartość nukleotydów pirydynowych w formie zredukowanej.

Ostatnia wreszcie fosforylacja tj. substratowa wydaje się nie mieć wpływu na oddychanie.

Bardzo ważną konsekwencją powiązania oddychania z fosforylacją na poziomie DPN jest automatyczne regulowanie poziomu donatorów wodoru. Jest rzeczą zastanawiającą, że takie składniki tkankowe jak kwas askorbinowy i glutation występują przeważnie w formie zredukowanej, chociaż tak łatwo utleniają się w obecności cytochromu, katalazy, fenoloksydazy a nawet jonów metalicznych. Musimy przyjąć, że możliwość ich utrzymania się w stanie zredukowanym jest następstwem przewagi DPNH nad DPN. DPNH reaguje z utlenionym glutationem dzięki specyficznej reduktazie, zaś zredukowany glutation spontanicznie lub enzymatycznie reaguje z różnymi tiolami lub kwasem askorbinowym, odtworzając ich formy zredukowane.

Synteza kwasów tłuszczowych z cukrowców wymaga dużej podaży przenośników wodoru w formie zredukowanej. Są one w obfitości do dyspozycji, kiedy oddychanie jest ograniczone przez brak orto-fosforanów albo ADP (lub innych akceptorów fosforu). W konsekwencji należałoby przyjąć, że obniżenie sprawności fosforylacji oksydatywnej pogor-

szłyoby warunki syntezy tłuszczu, przeciwnie niż to wnioskuje Koch i Lipmann.

Na czym polega rozkojarzenie fosforylacji i oddychania? Lardy sądzi, że nie idzie tu o upośledzenie samego mechanizmu fosforylacji, ale raczej o aktywację procesów zwiększających rozpad ATP. W ten sposób automatycznie tłumaczyłby się wpływ czynników rozkojarzających na wzrost oddychania, dostarczałaby bowiem równocześnie fosforanu i ADP. Nie musi to być akcja samej ATP-azy, prawdopodobnie zachodzi tu defosforylacja jakiegoś labilnego, jeszcze nie zidentyfikowanego związku pośredniego („pierwotny ester”), który normalnie powstaje w fosforylacji oksydatywnej i reaguje z ADP dając ATP.

Doświadczenia Lardy'ego i Maleya (3) nad działaniem tyroksyny wskazują, że hormon ten rozkojarza fosforylację tylko na jednym poziomie, przy czym mogli wykluczyć poziomy I (substratowy) i IV (c-cytochromowy).

PIŚMIENNICTWO

1. Johnson M. J., Science, **94**, 200, 1941.
2. Lynen F., Naturwiss. **30**, 398, 1942.
3. Maley G. F. and Lardy H. A., J. Biol. Chem. **215**, 377, 1955.

*

Dyskusję nad wykładem Lardy'ego zapoczątkował F. LYNEN (Monachium). Przedstawione w wykładzie Lardy'ego powiązanie oddychania i fosforylacji daje nam obraz prostej i cudownie sprawnej samoczynnej regulacji procesów komórkowych. Istota automatyzmu tej regulacji polega na tym, że ten sam układ nukleotydów adeninowych działa równocześnie jako zbiornik i przenośnik energii, oraz jako regulator oddychania. Możemy istotę tej regulacji unaocznić przez następujące porównanie: układ ATP/ADP stanowi akumulator, ATP w stanie naładowanym, ADP w stanie rozładowanym. Akumulator ten ładuje się energią pochodzącą z utlenień i fermentacji, ADP wzmacnia te procesy, ATP je hamuje. Mamy więc akumulator, który w miarę wyładowania samoczynnie włącza ładowanie, zaś przy naładowaniu wyłącza je.

Badanie mechanizmu rozkojarzenia oddychania i fosforylacji może nam pomóc w zrozumieniu zupełnie dotąd ciemnego mechanizmu fosforylacji. Badania takie prowadzi się przeważnie na mitochondriach. Lynen ze współpracownikami próbuje zanalizować to zjawisko na całych komórkach. Używając drożdży na pożywcę glikozowej i w równowadze fosforanowej (tzn. że fosforylacje i defosforylacje przebiegają z równą intensywnością) starają się rozstrzygnąć zagadnienie, czy roz-

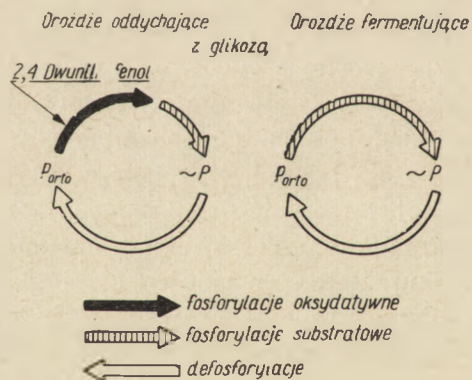
kojarzenie nie polega na zwiększeniu defosforylacji. Zatruwając drożdże cyjankiem, hamuje oddychanie a więc i fosforylację, przy czym defosforylacje biegają w niezmiennym tempie i mogą być dogodnie badane. Na takich hodowlach stwierdził, że DNP niema wpływu na natężenie defosforylacji.

Ten sam preparat służy również Lynenowi do oznaczania stosunku P:O. Mierzy on zużycie tlenu w hodowli niezatrutej, a zamiast fosforylacji oznacza natężenie defosforylacji w hodowli zatrutej cyjankiem, jako że przy równowadze fosforanowej natężenie obu tych procesów jest równe. Otóż doświadczenia te wykazały niezmiernie interesującą zależność stosunku P:O od stanu odżywienia komórek. W obecności glikozy, a więc w obfitości pokarmu, wartość ilorazu była niska, około 1. W miarę głodzenia, gdy drożdże przechodziły na czystą przemianę endogenną, wartość ilorazu wzrastała, dochodząc do 3, co stanowi górną granicę fosforylacji oksydacyjnych. Widać stąd, że drożdże umieją regulować sprawność fosforylacji.

Lynen widzi w tym ważne przystosowanie biologiczne: jeśli komórka nie dostaje z zewnątrz pokarmu i zużywa wewnątrzkomórkowe rezerwy (oddychanie endogenne), stara się jaknajwięcej energii przeprowadzić w użyteczną formę fosforanów wysokoenergetycznych. Jeśli natomiast obecność glikozy w pożywce zapewnia obfitość pokarmu,

komórka rośnie i rozmnaża się, do czego potrzebuje jako budulca znacznej liczby metabolitów pośrednich. Stężenie tych związków rośnie w miarę natężenia procesów oddechowych, oddychanie natomiast wzrasta pod wpływem ADP, hamuje się przez ATP. Wzrost oddychania wymaga zatem ograniczenia wydajności fosforylacji, na co komórka, przy nadmiarze pokarmu może sobie pozwolić.

Następną uwagę poświęca Lynen efektowi Pasteura po-



Rys. 1. Obieg fosforanów jako wytłumaczenie efektu Pasteura

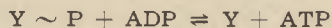
wołując się na dawniejsze swoje prace i daje graficzne przedstawienie tego efektu (rys. 1).

Rysunki te pokazują jak fosforylacje oksydacyjne odbierają część nieorganicznego fosforanu potrzebnego w fosforylacjach substratowych i w ten sposób hamują glikozę beztlenową.

Pozostawało do wytłumaczenia, dlaczego tlenowo zużywa się mniej cukru niż w beztlenowej glikolizie, dlaczego w obecności tlenu fosforylacja cukru przez heksokinazę idzie wolniej mimo, że przecież więcej ATP jest do dyspozycji. Udało się eksperymentalnie wykluczyć hipotezę bezpośredniego hamowania heksokinazy przez tlen oraz hamowanie jej przez powstające estry cukrowe. Lynen proponuje trzecią hipotezę: tlenowa przemiana cukrów odbywa się w mitochondriach, glikoliza natomiast w cytoplazmie. W czasie oddychania wędruje ATP pochodzący z glikolizy do mitochondriów i w ten sposób cytoplazmatyczna heksokinaza pozbawiona jest jednego z substratów.

Autor próbuje obecnie razem z Holzerem wykazać doświadczalnie wędrowkę związków fosforowych wewnątrz komórki, np. przez wykazanie, że przy wirowaniu homogenatów drożdżowych, zależnie od stanu fizjologicznego komórek przed roztarciem otrzymuje się różny rozdział fosforanów między osad zawierający składniki strukturalne komórki, a cytoplazmatyczny płyn.

Ciekawym uzupełnieniem wywodów Lardy'ego był głos w dyskusji F. R. HUNTERA Jr. (St. Louis). Tłumaczy on dlaczego DNP rozkojarza fosforylację, równocześnie aktywując ATP-azę, natomiast gramicydyna i p-chlorortęciobenzoesan, które również rozkojarzają, nie tylko nie aktywują ATP-azy, ale hamują jej aktywację przez DPN. Wedle Huntera DNP działa defosforylująco na hipotetyczny „pierwotny ester”, stanowiący pierwsze ogniwo fosforylacji oksydatywnej, który normalnie reaguje z ADP dając ATP:



Ester ten powinien pozostawać w równowadze z układem ATP, więc jego rozpad pod wpływem DNP powoduje przesunięcie równowagi w lewo i odtwarzanie „pierwotnego estru” kosztem ATP. Rozpad tego estru pozoruje więc hydrolizę ATP i to właśnie wedle Huntera stanowi istotę tzw. aktywowania ATP-azy przez DNP. Natomiast gramicydyna i p-chlorortęciobenzoesan prawdopodobnie hamują reakcję między „pierwotnym estrem” a ATP. W ten sposób ciała te hamują pośrednio fosforylację oksydatywną przez niedopuszczenie do wytwarzania ATP z wysoce labilnego „pierwotnego estru”, który rozpada się pod wpływem wody. Nie wpływa to jednak w tym przypadku na rozpad ATP, wobec zablokowania reakcji między oboma układami. Hunter polemizuje z poglądem niektórych autorów, którzy chcieliby aktywację ATP-azy przez DNP wytłumaczyć zmianami strukturalnymi w mitochondriach.

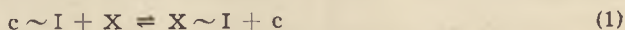
Ciekawe są również wywody Huntera dotyczące zagadnienia czy „pierwotny ester” jest członem łańcucha oddechowego, czy też już dalszą

pochodną. W pierwszym przypadku trzon „pierwotnego estru” musiałby występować na przemian w formie utlenionej: Y, i zredukowanej: YH_2 ; w myśl wzoru reakcji z ATP reaguje Y, wobec tego przesunięcie równowagi na rzecz YH_2 musiałoby zmniejszyć rozpad ATP. Istotnie Hunter zauważył mniejszą aktywność ATP-azy w warunkach beztlenowych, jakkolwiek różnica była za mała by stanowić przekonujący dowód.

Wreszcie podaje Hunter przykład jak wzajemne powiązanie oddychania i fosforylacji może wpływać na efekt różnych inhibitorów. Wiadomo, że skrawki kory mózgowej utleniające pirogronian oddychają normalnie przy małym stężeniu narkotyku. Zahamowanie oddychania nastąpi jednak, kiedy pobudzimy ich metabolizm prądem elektrycznym. Hunter stwierdził, że podobnie jak bodziec elektryczny działa dodatek DNP. Wspólnym elementem w działaniu prądu i DNP jest zwiększenie rozpędu ATP i z tego Hunter wnioskuje, że czynnikiem regulującym natężenie metabolizmu jest podaż ADP. Otóż okazało się, że doświadczenia tego nie udaje się powtórzyć, jeśli substratem jest zamiast pirogronianu — bursztynian. Metabolizm bursztynianu różni się od pirogronowego głównie tym, że omija DPN. Wynika stąd, że zgodnie z twierdzeniem Lardy'ego, regulacja oddychania przez fosforylację odbywa się na poziomie DPN.

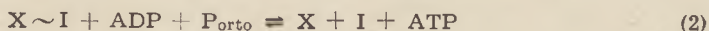
Dalszych argumentów na ten temat dostarcza wypowiedź D. CHANCE'A. Badacz ten opiera się na niezwykle ciekawej technice doświadczalnej, która polega na równoczesnym pomiarze polarograficznym zużycia tlenu przez mitochondria i na spektrofotometrycznym oznaczaniu stopnia utlenienia głównych przenośników oddechowych wewnątrz mitochondriów. Co do szczegółów doświadczeń muszę odesłać czytelnika do ogłoszonych tymczasem prac Chance'a.

Preparat Chance'a zaopatrzony w substraty, orto-fosforan i Mg, oddychał tylko w obecności ADP przy czym cytochromy, flawoproteidy i DPNH zwiększały swój stopień utlenienia. Redukcja ich zaczynała narastać, gdy ADP wyczerpywał się przez przejście w ATP. Jeśli zamiast ADP wprowadzał Chance czynniki rozkojarzające np. dikumarol, wszystkie przenośniki wodorowe wykazywały silniejsze utlenienie, podobnie jak pod wpływem ADP. Niesłuszne jest więc wiązanie działania rozkojarzającego z jakimś jednym ogniwem łańcucha oddechowego. Mechanizm rozkojarzenia wyobraża sobie Chance następująco: ogniwo oddechowe np. cytochrom c wykorzystuje energię swego utlenienia na wytworzenie wysokoenergetycznego związku $c \sim I$, związek ten reaguje z nieznanym intermediatem X w myśl równania:



W schemacie tym zamiast c możnaby podstawić cytochrom b lub

DPNH. Wedle tego sformułowania pierwszy związek wysokoenergetyczny nie jest związkiem fosforanowym. Następną reakcją według *Chance'a* byłyby:



W obecności czynników rozkojarzających na miejsce reakcji 2 zachodziłoby:



Jeśli *I* będziemy odczytywać jako grupę fosforanową, to schemat *Chance'a* nie będzie w zasadzie różnił się od schematu *Huntera*. Przy *I* różnym od *P* nie dałoby się wytłumaczyć aktywacji ATP-azy przez DNP w sposób proponowany przez *Huntera*. Alternatywą równania 3 mogłaby być wedle *Chance'a* także hydroliza związku $X \sim I$. Wtedy odpadłaby niezgodność z hipotezą *Huntera*.

Zauważono już dawno, że jon wapniowy jest czynnikiem rozkojarzającym. *Chance* wykazał, że w działaniu Ca należy odróżnić 2 efekty. Wapń dodany zamiast ADP w stężeniach do 0,5 μM działa pobudzająco na oddychanie zupełnie tak, jak ADP, przy czym na uzyskanie efektu jednej cząsteczki ADP trzeba użyć 2 do 3 Ca^{++} . Zjawisko to przebiega tak, jakgdyby wapń uwalniał związany ADP, albo powodował defosforylację ATP. Wpływ wapnia można odwrócić przez wprowadzenie magnezu. Stężenia Ca powyżej 0,5 μM powodują nieodwracalne zmiany w strukturze mitochondriów i większość dotychczasowych badań zajmowała się tą właśnie niespecyficzną formą działania wapnia. Przeciwnie niż Ca działa Mg. Jeśli go dodać do preparatu mitochondriów, w którym ADP słabo tylko wpływa na oddychanie, otrzymuje się obniżenie oddychania i uzależnienie go od obecności ADP. Magnez więc można nazwać elementem kojarzącym w przeciwstawieniu do rozkojarzających. *Chance* proponuje nazwę czynnika kontrolującego oddychanie dla Mg, a dekontrolującego dla Ca, ADP, DNP i innych rozkojarzających. W stanie pełnej kontroli znajduje *Chance* 99% nukleotydów pirydynowych w formie zredukowanej. Prawdopodobnie większość DPNH jest wtedy związana z hipotetycznym *I*, dodanie bowiem do takich zahamowanych mitochondriów DPNH zwiększa oddychanie.

Doświadczenia *Chance'a* z różnymi substratami potwierdzają poglądy *Lardy'ego* i innych dyskutantów, że DPNH jest jedynym ogniwem, w którym odbywa się regulacja oddychania przez fosforylacje.

PIŚMIENICTWO

1. *Chance B., Williams G. R., J. Biol. Chem.* **217**, 383, 395, 409, 429, 1955.

W. Schneider (Bethesda) — CZYNNIKI STRUKTURALNE W REGULACJACH METABOLIZMU

Schneider, jeden z zasłużonych pionierów badań nad frakcjonowaniem komórki, omówił zagadnienie rozmieszczenia poszczególnych enzymów między frakcje takie jak jądro, mitochondria, drobne ziarnistości i plazmę. Badania nad czynnością enzymatyczną poszczególnych frakcji nie są wolne od błędów. Jednym z poważniejszych, jest adsorbcja enzymów na fragmentach, z którymi silnie są związane. Metody izolowania frakcji są drastyczne i często prowadzą do uszkodzenia struktur śródkomórkowych. Metody te wymagają większej ilości materiału tak, że przeważnie mamy do czynienia z więcej niż jednym rodzajem komórek. Wszystkie te trudności powodują, że wiadomości o lokalizacji enzymów w określonych częściach komórki trzeba przyjmować z pewną ostrożnością. Tak np. przyjmowano, że wszystkie enzymy cyklu Krebsa związane są z mitochondriami, tymczasem okazało się, że dehydrogenaza izocytrynowa i akonitaza występują w przeważnej swej ilości poza mitochondriami. Schneider rozpatruje umiejscowienie enzymów i koenzymów transportu wodoru i elektronów, fosforylacji, przemiany tłuszczowej, nukleinowej oraz białkowej, omawiając pod tym kątem widzenia około 100 pozycji z piśmiennictwa przeważnie dotyczących komórek wątroby.

Chociaż Schneider stwierdza, że objął tylko mały wycinek zagadnienia, pomijając badania nad innymi organami zwierzęcymi poza wątrobą, pomijając cały bogaty materiał badań nad komórką roślinną, to i tak szczegółowe przytaczanie jego danych wychodziłoby poza zakres tego artykułu. Przejdę więc od razu do wniosków.

Enzymy są przeważnie ściśle zlokalizowane w obrębie komórki, wobec tego działanie każdego z nich jest ściśle związane z odpowiednim rozmieszczeniem innych enzymów, zapewniających wytwarzanie substratu właściwego dla danego enzymu. Czynniki strukturalne nabiera tu ogromnego znaczenia tym bardziej, że enzymy należące do tego samego ciągu reakcji nie muszą być umieszczone razem — widzieliśmy taki przykład w cyklu Krebsa. W świetle tego nabiera nowego znaczenia sprawa przepuszczalności powierzchni granicznych śródkomórkowych. Schneider powołuje się tu na wyniki badań mitochondriów w mikroskopie elektronowym, które wykazały w tych ciałkach istnienie rodzaju otoczki i szeregu równoległych blaszek biegnących przez całe prawie ziarenko. W tych warunkach wyniki badań cytochemicznych są trudne do interpretowania i nawet wnioski oparte na dobrych technicznie eksperymentach muszą być często rewidowane i interpretowane na nowo w miarę

jak wnikamy głębiej w mechanizm działania danego enzymu i uczymy się rozdzielać jednolite na pozór reakcje na kolejne etapy.

Uwagi końcowe

W sprawozdaniu swym miałem na uwadze 2 cele: omówić najważniejsze nowe osiągnięcia doświadczalne i nowe koncepcje o znaczeniu ogólno-biologicznym, oraz zapoznać czytelników z metodami podejścia eksperymentalnego i kierunkami badań najwybitniejszych przedstawicieli objętej sprawozdaniem dziedziny. Tym tłumaczy się szerokie uwzględnienie głosów w dyskusji.

Na szczególną uwagę zasługują:

1. Nowa koncepcja roli witaminów rozpuszczalnych w tłuszczach (Martius).

2. Wycofanie się Slatera z odrębnego poglądu na ilość i lokalizację fosforylacji oksydacyjnych.

3. Prace Greena, Chance'a i Schneidera, które stanowią próbę wniknięcia w procesy zachodzące wewnątrz mitochondriów. Badania te zmniejszają odległość między cytochemią a biochemią, która naogół bada zjawiska na poziomie molekularnym.

4. Prace pani Jones, Spector'a i Lipmanna, oraz P. P. Cohena i Grisolia nad fosforanem karbamylu. Obecność nowego typu wiązań „wysokoenergetycznych” (między węglem a azotem) w cytrulinie i kwasie ureidobursztynowym. Łatwość z jaką powstaje wysokoenergetyczny fosforan karbamylu.

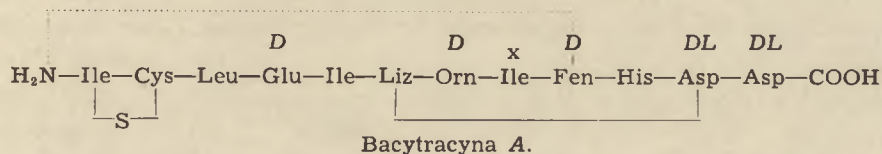
5. Za najważniejszą sprawę uważam sformułowanie zagadnienia na czym polega dostosowanie natężenia metabolizmu do każdorazowych potrzeb. Jest to moim zdaniem fundamentalne zagadnienie biologii i mieści już w sobie jako przypadek szczegółowy zagadnienie efektu Pasteura, któremu tyle dyskusji dotąd poświęcono.

TADEUSZ KORZYBSKI

Budowa i właściwości niektórych antybiotyków polipeptydowych i grzybobójczych antybiotyków o charakterze związków nienasyconych^{*)}

(Na podstawie materiałów III Kongresu Biochemików w Brukseli)

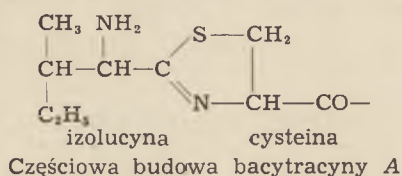
Bacytracyny. Ciekawe zagadnienie, mogące mieć znaczenie dla budowy białka, wynikło w związku z badaniami nad budową bacytracyny. Bacytracyna występuje w trzech postaciach *A*, *B* i *C*. Jest to peptyd złożony prawdopodobnie z 12 reszt aminokwasowych. Rodzaje *A* i *B* różnią się zapewne tylko tym, że jedna reszta izoleucyny (we wzorze oznaczona *x*) zawarta w bacytracynie *A* jest zastąpiona resztą waliny w bacytracynie *B*. Większość aminokwasów ma konfigurację *L*, z wyjątkiem fenyloalaniny, kwasu glutaminowego, ornityny i kwasu asparaginowego, które są szeregu *D*. Isoleucyna i fenyloalanina są częściowo zracemizowane. Kolejność aminokwasów jest znana. Tworzą one układ cykliczny sześcioczłonowy i boczny łańcuch (Hausmann, Weisiger i współprac.; Porath; Craig, Hausmann, Weisiger; Korzybski). Wątpliwości dotyczyły sposobu powiązania reszty cysteiny w cząsteczce. Bacytracyna nie daje bowiem reakcji z nitroprusydkiem sodowym i nie może tworzyć wiązania dwusiarczkowego. Jedna z reszt izo-



leucyny stoi na końcu, od strony aminowej łańcucha peptydowego. Reszta ta jest związana z sąsiednią resztą cysteiny tworząc pierścień tiazolinowy przez kondensację grupy karboksylowej reszty izoleucyny z grupami

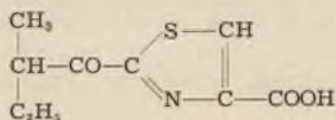
^{*)} Referowane prace były w większości przedstawione na III Międzynarodowym Kongresie Biochemii w Brukseli w 1955 roku. Omówiono głównie te prace, które nie zostały uwzględnione w pracy: Korzybski T., Kuryłowicz W. Antybiotyki, pochodzenie, rodzaje, właściwości. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa 1955.

aminową i tiolową cysteiny (Newton, Abraham). W ten sposób grupa tiolowa cysteiny jest zamaskowana. Dopiero hydroliza kwaśna



(na gorąco) uwalnia ją. Takie sformułowanie budowy bacytracyny jest zgodne z wynikami otrzymanymi po zadziałaniu niklu Raneya na bacytracynę A (Lockhart i Abraham). Otrzymano wtedy cztery lotne zasady, izoleucynol, 1-amino-2-metylo-n-butan, etyloaminę i amoniak. Gdy bacytracynę przed poddaniem działaniu niklu Raneya uprzednio inaktywowano kwasem, wtedy nie powstawała żadna z trzech wyżej wymienionych zasad organicznych, które powstają więc tylko z nienaruszonego fragmentu izoleucynowocysteinowego. Podobny układ z pierścieniem tiazolinowym znajduje się zapewne w glutationie. Calvin przypuszcza mianowicie, że glutation może występować w postaci zwykłego trójspeptydu będącego w równowadze z formą, w której brak wolnej grupy tiolowej; jest ona zamaskowana w pierścieniu tiazolinowym. Czy podobne struktury istnieją w białkach pozostaje sprawą otwartą.

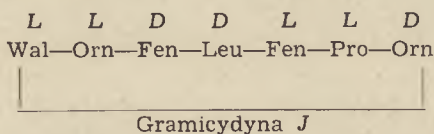
Drugim punktem wątpliwym w budowie cząsteczki bacytracyny jest wzajemny stosunek reszty fenyloalaninowej do tej reszty izoleucyny, która stanowi aminowy koniec łańcucha peptydowego. W produktach częściowej hydrolizy bacytracyny znaleziono mianowicie w niewielkiej ilości tetrapeptyd fenyloalanilo-izoleucylo-cysteinilo-leucynę, który nie jest zgodny z podaną we wzorze sekwencją; wszystkie inne są z nią zgodne. Craig na podstawie wyników badań nad tiokwasami i tioestrami sądzi, że wiązania znajdujące się dokoła atomu siarki w bacytracynie możnaby nazwać rodzajem wiązań wysoko energetycznych. Wskazuje na to także łatwość z jaką bacytracyna A (w temperaturze pokojowej w pH 7 lub tylko nieco wyżej) traci jeden azot w postaci amoniaku i przechodzi w bacytracynę F (artefakt), w której hydrolizacie kwaśnym stwierdzono krystaliczny związek będący kwasem bez własności zasadowych o składzie $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{NS}$ i budowie wskazanej we wzorze, gdzie po dezaminacji i utlenieniu powstał z końcowej reszty izoleucyny związek ketonowy (Weisiger i współprac.). Craig na podstawie wyżej



powiedzanego przypuszcza, że grupa karbonylowa fenyloalaniny w jakiś nieznany sposób bierze udział w powstaniu ugrupowania związku $C_9H_{11}O_3NS$, a po hydrolizie mała część fenyloalaniny występuje jako związana z izoleucyną we wzmiankowanym tetrapeptydzie. Fenyloalanina występuje w całkowitym hydrolizacie bacytracyny jako aminokwas częściowo zracemizowany, co również wskazuje na jakieś niezwykle ugrupowanie w tym miejscu. Stosunki te są zaznaczone w podanym wzorze bacytracyny *A* za pomocą linii kreskowanej.

Zadaniem Craiga, struktura naturalnego polipeptydu bynajmniej nie jest jeszcze wyjaśniona, gdy kolejność aminokwasów w cząsteczce została ustalona; badania nad bacytracyną wskazują na fakt, że metody hydrolityczne mogą niekiedy zaciemnić bardziej subtelne szczegóły budowy peptydu.

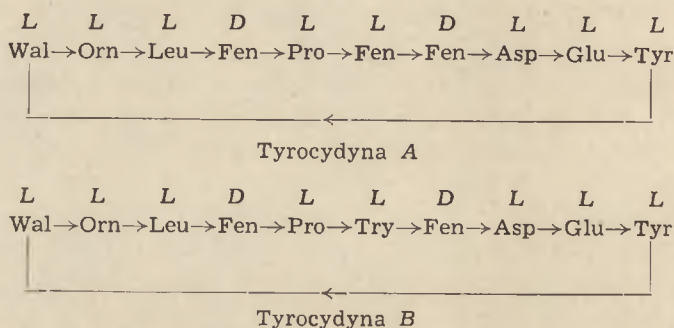
Gramicydyna *J*. Nowy naturalny rodzaj gramicydyny oznaczony literą *J* opisali autorzy japońscy, Otani i Saito. Antybiotyk został izolowany z hodowli *B. brevis*. Budowa gramicydyny *J* jest bardzo zbliżona do budowy gramicydyny *S*. Wyjaśniono ją po przeprowadzeniu następujących badań. Uzyskano surowy preparat krystaliczny gramicydyny *J* przez wytrącanie w oddziaływaniu słabo kwaśnym. Dalsze oczyszczanie nastąpiło na drodze przeciwprądowej ekstrakcji. Oznaczano w hydrolizacie poszczególne aminokwasy, każdy z nich izolowano w stanie krystalicznym i oznaczano skręcalność optyczną. Za pomocą 2,4-dwunitrofluorobenzenu sporządzono z gramicydyny *J* dwie pochodne zawierające jedną i dwie reszty dwunitrofenylowe. Analiza tych związków wykazała, że w cząsteczce antybiotyku znajdują się dwie wolne grupy aminowe będące grupami δ -aminowymi dwóch reszt ornityny. Ciężar cząsteczkowy gramicydyny *J* wynosi 792. Oznaczono go z porównania zawartości azotu pochodnej bis-dwunitrofenylowej i cząsteczki oryginalnej. Ta wartość wraz z danymi analitycznymi prowadzi do ustalenia wzoru cząsteczkowego w postaci $C_{44}H_{65}O_7N_9 \cdot 2HCl$. Dla oznaczenia kolejności aminokwasów w cząsteczce poddawano częściowej hydrolizie zarówno gramicydynę *J* jak i jej pochodną dwunitrofenylową, poczym oznaczano za pomocą chromatografii bibułowej skład fragmentów. Stwierdzone rodzaje tych fragmentów, a także ilościowy skład aminokwasowy cząsteczki gramicydyny *J* są zgodne z podanym wzorem.



Gramicydyna *J*

Tyrocydyna *B*. Craig i King (cyt. Craig) wyjaśnili całkowicie budowę tyrocydyny *B*. Analiza produktów częściowej hydrolizy

tego antybiotyku była bez wyjątku zgodna z budową wskazaną we wzorze. Okazało się przy tym, że reszta *L*-fenyloalaniny rodzaju *A* została zastąpiona resztą *L*-tryptofanu w tyrocydynie *B*.



Kierunek strzałki oznacza wiązanie peptydowe od C do N. Tyrocydyny *A* i *B*, podobnie do gramicydyny *S*, zawierają więc układy peptydów pierścieniowych, których budowa została całkowicie wyjaśniona. W pierścieniach tych bierze w każdym wypadku udział po 10 wiązań peptydowych, są to więc układy pierścieniowe złożone z 30 atomów o dokładnie ustalonej kolejności.

Analogi gramicydyny. *S. Katchalski* i współpracownicy podali wyniki swych badań nad zagadnieniem stosunku budowy syntetycznych analogów gramicydyny *S* do ich aktywności. Gramicydyna *S* jest cyklicznym deka-peptydem, w którym występuje 5 rodzajów aminokwasów. Każdy z nich powtarza się w cząsteczce dwukrotnie w kolejności: *L*-walina, *L*-ornityna, *L*-leucyna, *D*-fenyloalanina, *L*-prolina, poczym znowu *L*-walina, *L*-ornityna, *L*-leucyna, *D*-fenyloalanina, *L*-prolina, przy czym grupa karboksylowa tej ostatniej jest związana z grupą aminową *L*-waliny pierwszej piątki przez co powstaje zamknięty pierścień deka-peptydu. Syntetyczne di-, tri-, tetra- i pentapeptydy zawierające takie same aminokwasy jakie znajdują się w oryginalnej cząsteczce gramicydyny *S*, a ponadto w takiej samej kolejności i konfiguracji przestrzennej — okazały się nieaktywne, jedynie deka-peptyd (niecykliczny) był aktywny (*Erlanger* i współprac.). *Katchalski* i współprac. otrzymali kopolimery α -aminokwasów związanych w łańcuchu nierozgałęzionym i otwartym. Zawierały one w cząsteczce 20 do 40 reszt aminokwasowych w znanym stosunku ilościowym, ale nieznaney kolejności. Prawdopodobnie były to mieszaniny kopolimerów o wszelkich możliwych sekwencjach. Zbadano działanie 13 rodzajów kopolimerów i 4 polimerów na wzrost wzorcowych szczepów *E. coli* i *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. Rodzaj aminokwasów użytych był najczęściej ten sam co w oryginalnej cząsteczce gramicydyny *S*, niektóre kopolimery

zawierały ponadto alaninę lub sarkozynę. Otrzymane związki miały budowę liniową, bowiem grupa δ -aminowa ornityny była zablokowana za pomocą chlorku benzylooksykarbonowego. Po dokonanej kopolimeryzacji usuwano grupę karbобензоксы- za pomocą bezwodnego bromowodoru. Wśród otrzymanych syntetycznych preparatów stwierdzono kilka o działaniu bardzo zbliżonym do działania oryginalnej cząsteczki gramicydyny *S*. Kopolimer nr 1 (patrz tablica) o 30 resztach w cząsteczce, zawierający te same rodzaje i względne ilości aminokwasów co w gramicydynie *S*, miał działanie bardzo zbliżone do działania naturalnego antybiotyku. Sytuacja niewiele tylko pogorszyła się, gdy zmieniono konfigurację przestrzenną ornityny lub fenyloalaniny; moc otrzymanych preparatów (nr 2 i 3) zmniejszyła się tylko 2—3 razy. Gdy zamiast proliny użyto sarkozyny, moc otrzymanego preparatu była 2 razy mniejsza. Najsilniej działającym preparatem był preparat nr 7, uzyskany przez kopolimeryzację *D,L*-alaniny, *L*-leucyny i *D,L*-ornityny w stosunku 3:1:1. Ciekawy był preparat nr 15 powstały z polimeryzacji 18 reszt *D,L*-ornityny. Działanie jego na gronkowca złocistego i pałeczkę okrężnicy było tylko kilka razy słabsze od działania gramicydyny *S*.

Aktywność biologiczna kopolimerów podobnych do gramicydyny *S*.
(według Katchalskiego i współpracowników)

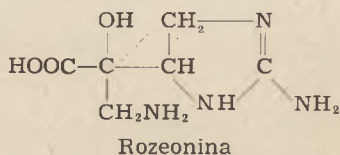
Nr preparatu	Stosunki molarne i konfiguracja aminokwasów						średnia ilość reszt w cząsteczce	Najmniejsze stężenia hamujące wzrost	
	Ala	Leu	Orn	Fen	Pro	Val		<i>E. coli</i> μg w ml	<i>Micr. pyog.</i> μg w ml
1	—	1L	1L	1D	1L	1L	30	5	5
2	—	1L	1L	1L	1L	1L	40	10—15	15
3	—	1L	1DL	1DL	1L	1L	40	10—15	10
7	3DL	1L	1DL	—	—	—	25	2,5	5—10
15	—	—	1DL	—	—	—	18	10	5
Gramicydyna <i>S</i>	—	1L	1L	1D	1L	1L	10	5	1

Natomiast polimery powstałe z *D,L*-alaniny, z *L*-proliny, lub sarkozyny były prawie nieaktywne. Potwierdza to dawniej stwierdzony przez Gauzego fakt, że obecność wolnej grupy δ -aminowej ornityny jest istotna dla aktywności biologicznej. Gdy zamienić inne aminokwasy na *D,L*-alaninę, albo na sarkozynę, lub zupełnie je ominąć, to aktywność jest w znacznym stopniu zachowana, a nawet częściowo wzmożona. Ponieważ wszystkie związki miały budowę otwartą, budowa cykliczna nie jest warunkiem nieodzownym dla aktywności biologicznej (przy od-

powiednim ciężarze cząsteczkowym). Właściwości biologiczne niektórych preparatów podano w tablicy.

Jak z powyższego wynika, aktywność biologiczna gramicydyny S nie jest faktem odosobnionym wśród związków o podobnej budowie.

Rozeotrycyna. Hirata, Goto i Hosoya opisali nowy antybiotyk uzyskany z hodowli *Streptomyces roseochromogenes*, nazwali go rozeotrycyną. Rozróżniono trzy rodzaje rozeotrycyny A, B i C. Rozeotrycyna jest rodzajem peptydu, w skład którego wchodzi dwa kwasy β -aminowe, β -lizyna i rozeonina, ponadto jakaś reszta redukująca. Rozeonina jest pochodną 2-imidazoliny, w której poza grupą aminową w pozycji 2 znajduje się w pozycji 4 lub 5 kwas α -hydroksy- β -aminopropionowy związany z pierścieniem za pomocą swego węgla α tak, że trzy jego grupy funkcjonalne, tj. karboksylowa, hydroksylowa i aminowa są wolne.



Drugi kwas β -aminowy to β -lizyna, czyli β,ϵ -dwuaminokapronowy kwas. Części składowe są powiązane ze sobą wiązaniami podobnymi do peptydowych. Przy tym w cząsteczce nie stwierdza się wolnej grupy karboksylowej. W rozeotrycynie A z trzech wolnych grup aminowych dwie należą do β -lizyny, trzecia jest grupą β -aminową rozeoniny. Druga cząsteczka β -lizyny, a także druga cząsteczka rozeoniny nie mają swoich grup aminowych wolnych. Ta reszta β -lizyny, która ma obydwie grupy aminowe wolne, jest bezpośrednio związana z tą resztą rozeoniny, której grupa β -aminowa jest wolna. Ciężar cząsteczkowy rozeotrycyny A wynosi około 900.

Mykotrycyna. Schaffner, Rangaswami i Waksman opisali antybiotyk mykotrycynę izolowaną przez nich ze szczepu promieniowca bardzo podobnego do *Streptomyces lavendulae*. Mykotrycyna jest rodzajem polipeptydu, przypomina streptotrycynę. Jest to związek zasadowy. Otrzymano kilka rodzajów soli, krystaliczny heliantynian i bezpostaciowe preparaty chlorowodoru i siarczanu. Z brzeczki fermentacyjnej otrzymano mykotrycynę na drodze adsorpcji na węglu aktywowanym. Mykotrycyna (chlorowodorek) jest związkiem bezbarwnym, dobrze rozpuszczalnym w wodzie. Roztwory wodne są trwałe na działanie podwyższonej temperatury.

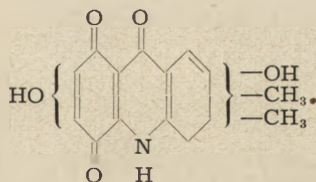
Energiczna hydroliza kwaśna prowadzi do powstania produktów dających reakcję ninhydrynową, wśród nich znajduje się prawdopodobnie

β -lizyna (stwierdzona w streptomycynie, streptolinie, wiomycynie i rozeotrycynie) i seryjna. W hydrolizacie znaleziono także silnie zasadowy aminokwas, który jest być może identyczny z substancją *B* izolowaną przez Cartera, Clarka i współpracowników w hydrolizatach streptotrycyny. Budowa substancji *B* miałaby być zbliżona do budowy gwanidyny i wykazywać strukturę aminoimidazolinową. Być może że zasadowy aminokwas jest izomeryczny, względnie identyczny z geaminą (Brockmann, Musso), lub z rozeoniną (Nakanishi, Ito, Hirata).

Działanie tego antybiotyku jest podobne do działania streptotrycyny, działa on jednak silniej na grzyby. Koncentracje wynoszące 0,5—0,2 μ g mykotrycyny w ml wystarczają do zahamowania wzrostu *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*, a 5—10 μ g w ml do zahamowania *Candida tropicalis* i *Saccharomyces cerevisiae*.

Polimiksyne. Wśród antybiotyków należących do grupy polimiksyn udało się ostatnio za pomocą przeciwprądowej ekstrakcji (Husman, Craig) dalsze rozdzielenie składnika polimiksyne *B* na frakcje *B*₁ i *B*₂, które różnią się między sobą tym, że polimiksyna *B*₁ zawiera optycznie czynny kwas izopelargonowy (6-metylo-oktanowy), a polimiksyna *B*₂ podobny kwas, ale będący niższym homologiem o jeden atom węgla. W polipeptynie kwas ten jest zapewne kwasem hydroksoheptanowym, który może w pewnych warunkach łatwo oddawać cząsteczkę wody i tworzyć odpowiedni kwas nienasycony (Craig).

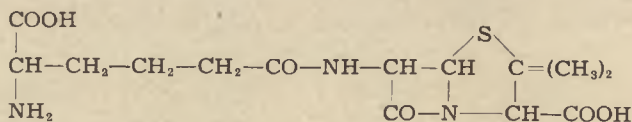
Aktynomycyny. Budowa aktynomycyn była w dalszym ciągu przedmiotem badań. Rozróżniono nowe rodzaje aktynomycyn oznaczone literami *I*₀, *I*₁, *I*₂, i *I*₃ (Brockmann, Gröne). Część chromoforowa aktynomycyn jest zapewne dwuhydroksydwumetylochinonową pochodną akrydyny (Brockmann, Muxfeldt), o częściowej strukturze podanej we wzorze.



Drogą bardzo łagodnej hydrolizy (10% HCl, temperatura pokojowa) aktynomycyny ulegają dezaminacji, przy czym odszczepia się amoniak i powstają produkty ceglasto-czerwone nazwane desaminoaktynomycynami (Brockmann, Franck). Wolne aminokwasy nie uwalniają się podczas tej hydrolizy, pozostają więc one prawdopodobnie w stanie niezmienionym w cząsteczce, w której brak wolnych grup aminowej, karboksylowej i metyloaminowej. Desaminoaktynomycyna *C*₃ powstała

z aktynomycyny C_3 tworzy monoocetan o temp. top. 235° i eter jednometylowy o temp. topnienia 240° , podczas gdy aktynomycyna C_3 pochodnych tych nie daje. Aktywność desaminoaktynomycyny C_3 jest znacznie mniejsza niż produktu wyjściowego. Pierwsza działa w rozcieńczeniu 1:75.000, podczas gdy aktynomycyna C_3 działa już w rozcieńczeniu 1:10.000.000. Aktynomycynę C_3 z roztworu eterowego o barwie żółtej można wytrząsnąć do 10%-go roztworu wodnego HCl przy czym następuje zmiana barwy na czerwoną (halochromia). Desaminoaktynomycyna nie wykazuje halochromii.

Penicyliny. W dziedzinie związków należących do grupy penicylin nastąpił dalszy postęp. Już kilka lat temu stwierdzono, że cefalosporyny można rozdzielić na 2 rodzaje oznaczone literami *N* i *P*. Pierwszy z nich, cefalosporyna *N*, jest rodzajem penicyliny z charakterystycznym ugrupowaniem tiazolidynowym sprzężonym z pierścieniem czteroczłonowym powstałym przez wiązanie laktamowe w pozycji β . W bocznym łańcuchu cefalosporyny *N* znajduje się reszta kwasu *D*- α -amino-adipinowego, który jest związany w cząsteczce za pomocą swej ω grupy karboksylowej. Cefalosporyna *N* ma więc wolną grupę aminową reszty kwasu aminoadipinowego, ponadto dwie wolne grupy karboksylowe. Taka budowa nadaje cząsteczce cefalosporyny *N* wybitnie zaznaczone właściwości hydrofilne; oczyszczenie jej metodą przeciwprądowego rozmieszczania, według *Craig*a, udało się dzięki zastosowaniu kolidyny jako nośnika (*Abraham*, *Newton*, *Hale*), umożliwiającego ekstrakcję w układzie złożonym z wody i fenolu w oddziaływaniu obojętnym. Oddziaływanie bowiem inne niż obojętne powoduje szybki rozkład antybiotyku. *Newton* i *Abraham* zaproponowali nazwę penicyliny *N* dla cefalosporyny *N*.



Cefalosporyna *N* (Penicylina *N*)

Newton i *Abraham* uzyskali w postaci krystalicznej soli sodowej nowy rodzaj cefalosporyny oznaczony przez nich literą *C*. Cefalosporynę *C* izolowano z pewnego gatunku *Cephalosporium* pochodzącego z Sardynii. Cefalosporyna *C* pod wielu względami przypomina cefalosporynę *N* (penicylinę *N*). Obydwie dają identyczny kwas *D*- α -amino-adipinowy, mają po dwie wolne grupy karboksylowe i jedną wolną grupę aminową, przy hydrolizie odszczepiają CO_2 , w widmie w podczerwieni mają identyczne pasma absorpcyjne przy $5,61 \mu$, które stwierdza się w widmie penicylin i uważa się jako charakterystyczne dla grupy $\text{C}=\text{O}$

układu β -laktamowotiazolidynowego. Inne cechy różnią cefalosporynę C od penicylin: nie ulega ona przegrupowaniu w kierunku powstania kwasu penilowego; w przeciwstawieniu do cefalosporyny N cefalosporyna C jest trwała w oddziaływaniu kwaśnym ($\text{pH}=2$); w składzie atomowym cefalosporyny C, $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_8\text{N}_3\text{S}$, znajdują się dwa atomy węgla i dwa atomy tlenu więcej niż w składzie atomowym cefalosporyny N, $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}$ (penicyliny N); cefalosporyna C po hydrolizie kwaśnej nie daje penicylaminy, jeżeli jednak hydrolizę poprzedzić hydrogenolizą wykonaną za pomocą niklu Raneya, to w hydrolizacie można stwierdzić walinę, różniącą się od penicylaminy tylko brakiem grupy tiolowej. Cefalosporyna C wykazuje w nadfiolecie absorpcję przy $260\text{ }\mu\text{m}$, czego nie spotyka się u odmiany N. Cefalosporyna C nie jest wrażliwa na działanie penicylinazy, ale ma działanie antagonizujące działanie tego enzymu. Gdy zostaje dodana do hodowli *Bacillus cereus*, czy *Bacillus subtilis*, powoduje powstawanie penicylinazy, przy czym stymulujące działanie jest czterokrotnie silniejsze niż odpowiednie działanie penicyliny benzylowej. Ponadto istnieją wskazówki, że cefalosporyna C współzawodniczy z penicyliną w wiązaniu się z przypuszczalnym centrum indukującym powstawanie penicylinazy w komórce bakteryjnej (A b r a h a m). Newton i Abraham przypuszczają, że cefalosporyna C zawiera α -hydroksypenicylaminę.

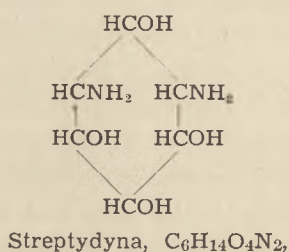
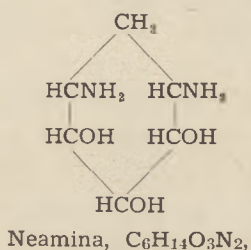
Działanie biologiczne cefalosporyny C jest bakteriobójcze, podobnie do działania penicylin. Działanie cefalosporyny C na paciorkowce i gronkowce jest znacznie mniej intensywne niż działanie cefalosporyny N, toksyczność jest również znacznie mniejsza; dawka 5.000 mg na kg wagi podana myszy dożylnie nie wywołuje żadnych objawów toksycznych. Udało się myszy zakażone 100.000 dawek śmiertelnych paciorkowca hemolizującego całkowicie ochronić przed zakażeniem za pomocą odpowiednich dawek cefalosporyny C podanej podskórnie (F l o r e y).

Wątpliwości co do stosunku synematyn do penicylin (A b r a h a m, Newton, Crawford i współprac.) zostały ostatnio rozstrzygnięte definitywnie na korzyść zapatrywania, że cefalosporyna N (penicylina N) i synematyna B są związkami identycznymi (A b r a h a m). Benavides i współpracownicy uzyskali niedawno dobre wyniki lecznicze z synematyną B w przypadkach duru brzuszego.

Inny, nie wykazujący podobieństw do penicylin rodzaj cefalosporyn, oznaczony literą P, charakteryzujący się dużym podobieństwem do kwasu helwolowego (B u r t o n, A b r a h a m), był przedmiotem dalszych badań szkoły oksfordzkiej. Cefalosporyna P_1 , $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_8$ i kwas helwolowy, $\text{C}_{32}\text{H}_{42-44}\text{O}_8$ mają podobną budowę. Obydwa związki charakteryzują się obecnością grup acetylowych, można je pozbawić tych grup; otrzymano

wtedy identyczne połączenie czteropierscieniowe mające szkielet o 28 atomach węgla.

Neomycyny. Schaffner podał nowy sposób rozdzielania poszczególnych składników kompleksu neomycynowego. Przy zastosowaniu chromatografii bibułowej używając 1m buforu z siarczanem sodowym o pH 2,4 rozdzielił on neomycyny, wraz z towarzyszącymi antybiotykami, stosując do rozwijania chromatogramu układ złożony z 2 części absolutnego metanolu i 1 części 3⁰/₀-go roztworu chlorku sodowego. Kolejność wędrowania poszczególnych antybiotyków była następująca: katenulina, neomycyna A (neamina), framycetyna, neomycyna B i neomycyna C. Zdaniem autora, neomycyny charakteryzują się obecnością ugrupowania neaminy, czyli 1,3-dwuamino-4,5,6-trójhidroksycykloheksanu; jest to ugrupowanie równie charakterystyczne dla neomycyn, jak ugrupowanie streptydyny, czyli 1,3-dwuamino-2,4,5,6-czterohidroksycykloheksanu dla streptomycyn.



Antybiotyki o charakterze związków nienasyconych. Wśród antybiotyków znajduje się grupa związków o wybitnie zaznaczonych nienasyconych właściwościach. Są to antybiotyki najczęściej o działaniu przeciwgrzybowym. Należy tu gryfolina z trzema wiązaniami etylenowymi, dalej grupa związków o 4 sprzężonych wiązaniach etylenowych (antymykoina, fungicydyna czyli nystatyna, rimoicydyna, chromina i prawdopodobnie fumagilina), o 5 wiązaniach etylenowych (euroicydyna), o 6 takichże wiązaniach (flawacydyna i mediocydyna), lub o 7 sprzężonych wiązaniach etylenowych (kandydyna, kandycydyna, trichomycyna i askozyna). Do związków zawierających wiązania acetylenowe należą mykomycyna (2 wiązania acetylenowe i 4 etylenowe), agrocybina (3 wiązania acetylenowe) i diatretyna (2 wiązania acetylenowe i 1 etylenowe). Mniej poznanymi związkami są antymykoina, chromina, fungichromina, fungichromatyna, kwadryfidyna (kilka wiązań acetylenowych, grupa aldehydowa) i nemotyna (3 lub 4 wiązania etylenowe). Z tej grupy fungicydyna, czyli nystatyna (nazwa zastrzeżona firmy Squibb: Mycostatin) została poddana szczegółowym badaniom przez Dutchera, Waltersa i Wintersteinera.

Fungicydyna jest antybiotykiem, który izolowano z brzeczki fermentacyjnej, gdzie znajduje się zarówno w grzybni jak w płynie. Izolowanie fungicydyny polega na ekstrakcji metanolem i wytrącaniu wodnym roztworem chlorku sodowego. Skład atomowy i ciężar cząsteczkowy (948) odpowiadają wzorowi $C_{46}H_{77}O_{19}N$. Fungicydyna ma charakterystyczne widmo w nadfiolecie, z maksimum przy 290, 304 i 319 μm . Katalityczne uwodornianie prowadzi do absorpcji $6H_2$. W cząsteczce znajduje się jedna grupa aminowa pierwszorzędowa. Widmo w podczerwieni wskazuje na obecność ugrupowania estrowego lub laktonowego (5,9 μ) i jednej końcowej grupy metylowej (7,3 μ). Możliwa jest obecność reszty cukrowej. Stwierdzono kilka wolnych grup hydroksylowych. Fungicydyna jest związkiem amfoterowym, tworzy sole z alkaliami i kwasami. Autorzy przypuszczają, że położenie podwójnych wiązań w cząsteczce jest takie jak podano w częściowym wzorze: $CH_3OCO-(CH_2)_7-(CH=CH)_4-$.

Badania Milbergera i Blanka wykazały, że fungicydyna jest korzystna w doświadczalnych zakażeniach za pomocą *Candida albicans*. W dwie godziny po zakażeniu śmiertelną dawką *Candida albicans* myszy otrzymywały dożylnie przez 5 dni dwa razy dziennie, a przez dalsze 5 dni raz dziennie fungicydynę (mycostatin) po 3 mg każdego dnia. Z 10 myszy leczonych padła jedna, z 10 nieleczonych wszystkie. Przy podawaniu doustnie po 4 mg na mysz działanie lecznicze było nieco słabsze, bo z 10 myszy leczonych 3 padły. Autorzy zwracają uwagę, że z organów wewnętrznych zwierząt badanych, które przeżyły doświadczenie, można było jeszcze wyhodować *Candida albicans*.

Fungicydyna została ostatnio zastosowana przez Wighmore i Henderson do opanowania zakażeń drożdżowych przy hodowlach wirusa zarazy pyska i racie na hodowli języka bydłęcego. Wzrost 13 szczepów drożdży z rodzaju *Endomycopsis*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Candida*, *Cloeckera*, *Trichosporon* i *Rodotorula* był hamowany w minimalnych koncentracjach 20 μg w ml., a jeden dopiero w koncentracji 80 μg w ml. To ostatnie stężenie nie powodowało zmniejszenia rozwoju wirusa. Następowoło to dopiero przy 320 μg w ml.

Z innych nowo odkrytych antybiotyków należących do tej grupy należy wymienić przeciugrzybowy antybiotyk, filipinę Whitefield i współprac.) izolowany z hodowlami *Streptomyces filipensis*, a także (Ahmad i Islam), działającą na gronkowce i grzyby.

PIŚMIENNICTWO

1. Abraham E. P., Observations on some antibacterial polypeptides. Proceedings of the third international congress of biochemistry, Brussels 1955, Academic Press, New York 1956, 421.

2. Abraham E. P., Newton G. G. F., Experiments on the degradation of cephalosporin C. *Biochem. J.*, 1956, **62**, 658.
3. Abraham E. P., Newton G. G. F., Crawford K., Burton H. S., Hale C. W., Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature*, 1953, **171**, 343.
4. Abraham E. P., Newton G. G. F., Hale C. W., Purification and some properties of cephalosporin N, a new penicillin. *Biochem. J.*, 1954, **58**, 94.
5. Ahmad K., Islam M. F., Ramnacin: a new antibiotic from a *Streptomyces* sp. *Nature*, 1955, **176**, 646.
6. Benavides L., Birger H. O., Varela G., Holt S. H., Treatment of typhoid with synnematin B. *J. Am. Med. Ass.*, 1955, **157**, 989.
7. Brockmann H., Franck B., Abbau der Actinomycine zu Desaminoactinomycinen. *Naturwiss.*, 1954, **41**, 451.
8. Brockmann H., Gröne H., Reine Actinomycine. *Naturwiss.* 1954, **41**, 65.
9. Brockmann H., Musso H., Geomycin, ein neues, gegen gramnegative Bakterien wirksames Antibiotikum. *Naturwiss.* 1954, **41**, 451.
10. Brockmann H., Muxfeldt H., Zur Konstitution des Despeptido-actinomycins. *Naturwiss.*, 1954, **41**, 500.
11. Burton H. S., Abraham E. P., Cardwell H. M. E., Cephalosporin P and helvolic acid. *Biochem. J.*, 1956, **621**, 171.
12. Calvin M.: Glutathione. Academic Press. 1955.
13. Carter H. E., Clark R. K., Kohn P., Rothrock J. W., Taylor W. R., West C. A., Whitfield G. B., Jackson W. G., Streptothricin. I. Preparation, properties and hydrolysis products. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, **76**, 566.
14. Craig L. C., Antibiotic polypeptides. Proceedings of the third international congress of biochemistry, Brussels 1955, Academic Press, New York, 1956, 416.
15. Craig L. C., Hausmann W., Weisiger J. R., The molecular weight of Bacitracin A. *J. Biol. Chem.*, 1953, **200**, 765.
16. Dutcher J. D., Walters D. R., Wintersteiner O., Structural studies on nystatin, an antifungal antibiotic. 3-ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles. Résumés des Communications. 1955, 1.
17. Erlanger B. F., Goode L., Gramicidin S: relationship of cyclic structure to antibiotic activity. *Nature*, 1954, **174**, 840.
18. Florey H. W.: Antibiotic products of a versatile fungus. *Ann. Intern. Med.*, 1955, **43**, 480.
19. Hausmann W., Craig L. C., Polypeptin: purification, molecular weight determination, and amino acid composition. *J. Biol. Chem.*, 1952, **198**, 405.
20. Hausmann W., Craig C. L., Polymyxin B₁: fractionation, molecular weight determination, amino acid and fatty acid composition. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, **76**, 4892.
21. Hausmann W., Weisiger J. R., Craig L. C., Bactiracin A. Further studies on the composition. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 721.
22. Hausmann W., Weisiger J. R., Craig L. C., Partial hydrolysis studies with bacitracin A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 723.
23. Hirata Y., Goto T., Hosoya S., Structure of roseothricin. 3-ème Congrès International de Biochimie. Résumés des Communications. 1955, 95.
24. Katchalski E., Berger A., Bihowsky-Slomnicki L., Kurtz J., Antibiotically active amino-acid copolymers related to gramicidin S. *Nature*, 1955, **176**, 118. i 3-ème Congrès International de Biochimie. Résumés des Communications. 1955, 88.

25. Korzybski T., Biogeneza antybiotyków. *Postępy Biochemii*, 1955, **1**, 253.
26. Korzybski T., Kuryłowicz W., *Antybiotyki. Pochodzenie, rodzaje i właściwości*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, stron 655. Warszawa 1955.
27. Lockhart I. M., Abraham E. P. The amino acid sequence in Bacitracin A. *Biochem. J.*, 1954, **58**, 633.
28. Lockhart I. M., Abraham E. P., Observations on the structure of Bacitracin A. *Biochem. J.*, 1954, **58**, XLVII.
29. Lockhart I. M., Abraham E. P., Experiments on the lysine and aspartic acid residues in Bacitracin A. *Biochem. J.*, 1956, **62**, 645.
30. Lockhart I. M., Abraham E. P., Newton G. G. F., The N-terminal and sulphur-containing residues of Bacitracin A. *Biochem. J.* 1955, **61**, 534.
31. Nakanishi K., Ito T., Hirata Y., Structure of a new amino acid obtained from roseothricin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 2845.
32. Milberger H., Blank E., Versuche zur Nachprüfung der Wirkung von Mycostatin auf die experimentelle Candida-albicans-Infektionen der weissen Maus. *Naturwiss.*, 1954, **41**, 503.
33. Newton G. G. F., Abraham E. P., Some properties of the bacitracin polypeptides. *Biochem. J.*, 1953, **53**, 597 i 604.
34. Newton G. G. F., Abraham E. P. Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem. J.*, 1954, **58**, 103.
35. Newton G. G. F., Abraham E. P., Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulfur and D-alpha-aminoadipic acid. *Nature*, 1955, **175**, 548.
36. Newton G. G. F., Abraham E. P., Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D-alpha-aminoadipic acid. *Biochem. J.*, 1956, **62**, 651.
37. Otani S., Saito Y. Studies on gramicidin J. 3-ème Congrès International de Biochimie. Bruxelles. Résumés des Communications. 1955, 88.
38. Porath J., Structure of Bacitracin A. *Nature*, 1953, **172**, 871.
39. Schaffner C. P., Identification and differentiation of the neomycins. 3-ème Congrès International de Biochimie. Résumés des Communications. 1955, 98.
40. Schaffner C. P., Rangaswami G., Waksman S. A., Mycothricin, a new basic antibiotic of the streptothricin group. 3-ème Congrès International de Biochimie. Résumés des Communications. 1955, 95.
41. Weisiger J. R., Hausmann W., Craig L. C., On the partial hydrolysis of DNP-bacitracin A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955 **77**, 731.
42. Whitefield G. B., Brock T. D., Ammann A., Gottlieb D., Carter H. E., Filipin, an antifungal antibiotic: isolation and properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 4799.
43. Wighmore J. O., Henderson W. M., Control of yeast contamination by „Mycostatin“ in cultures of the virus of foot and mouth disease. *Nature*, 1955, **176**, 516.

ADDENDUM

Budowa aktynomycyn C₁, C₂, C_{2a} i C₃ została ostatnio całkowicie wyjaśniona przez Brockmanna i współprac. (*Angew. Chem.*, 1956, **68**, 70). Wspólną dla nich część chromoforową (=aktynocyna) zidentyfikowano jako pochodną fenoksazyny, a nie akrydyny, jak sądzono dawniej. W części peptydowej cząsteczek stwierdzono dwa pentapeptydy, tworzące układy cykliczne powstałe przez wiązanie estrowe między grupą karboksylową reszty N-metylo-L-waliny i grupą hydroksylową L-treoniny.

ANDRZEJ MORAWIECKI

Egzymologia i biochemia mięśni

(Przegląd obrad sekcji IV i IX)

Sekcja IV wyróżniała się spośród innych szczególnie dużą ilością zgłoszonych komunikatów — przeszło 70. Obrady toczyły się równocześnie w trzech audytoriach, w których zgrupowane były komunikaty o mniej więcej zbliżonej tematyce. Główne problemy współczesnej enzymologii zostały poruszone w referatach programowych. Wygłaszali je: 1) L. F. Leloir (Argentyna): „Koenzymy urydynowe”, 2) F. Dickens (Anglia): „Tlenowa przemiana heksozomonofosforanu u drożdży i w tkankach zwierzęcych”, oraz 3) S. Spiegelman (USA): „Współczesne poglądy na indukowaną syntezę enzymów”. Projektowany referat prof. Straub'a na temat syntezy amylazy trzustkowej nie został wygłoszony z powodu nieobecności prelegenta.

Ograniczam się tutaj do podania jedynie głównych tez poszczególnych referatów.

Koenzymy urydynowe

Prof. Leloir zebrał w swym referacie dane, osiągnięte w ciągu ostatnich lat, o roli koenzymów urydynowych.

Do niedawna wydawało się, że nukleotydy adenilowe: AMP, ADP a zwłaszcza ATP*) odgrywają szczególną rolę w przemianach wszystkich organizmów żywych. Pozostałe nukleotydy — jak sądzono — biorą udział jedynie w budowie kwasów nukleinowych. Badania ostatnich lat wykazały jednak, że w ustrojach obok wolnych nukleotydów adenilo-

*) ATP — adenozyntroójfosforan

UDPG — urydynodwufosfoglukoz

ADP — adenozyndwufosforan

UDP-gal — urydynodwufosfogalaktoza

AMP — adenozyntromonofosforan

P — ortofosforan

UMP — urydyno-5'-monofosforan

PP — pirofosforan

UDP — urydyno-5'-dwufosforan

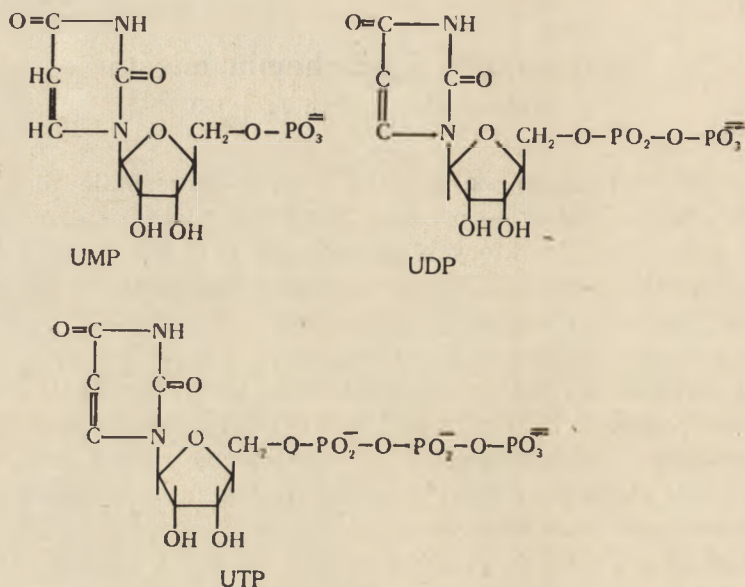
ITP — inozyntroójfosforan

UTP — urydyno-5'-troójfosforan

GTP — guaminotroójfosforan

wych spotykamy analogicznie zbudowane wolne nukleotydy inozynowe, gwanilowe, cytydylowe i urydylowe. Wydaje się zupełnie prawdopodobnym, że wszystkie one posiadają w ustroju określone funkcje jako koenzymy. Nukleotydy urydynowe zostały pod tym względem najlepiej zbadane.

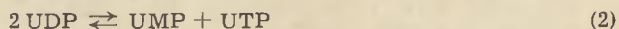
Analogicznie do AMP, ADT i ATP znane są nukleotydy urydynowe: UMP, UDP i UTP.



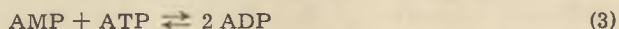
Rys. 1

UMP powstaje w ustroju z kwasu orotowego i rybozo-5-P przy udziale ATP.

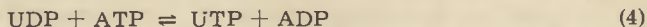
UDP i UTP powstają w drodze następujących transfosforylacji:



Reakcje te są katalizowane przez miokinazę i w istocie są one zupełnie analogiczne do „normalnej” reakcji miokinazowej:

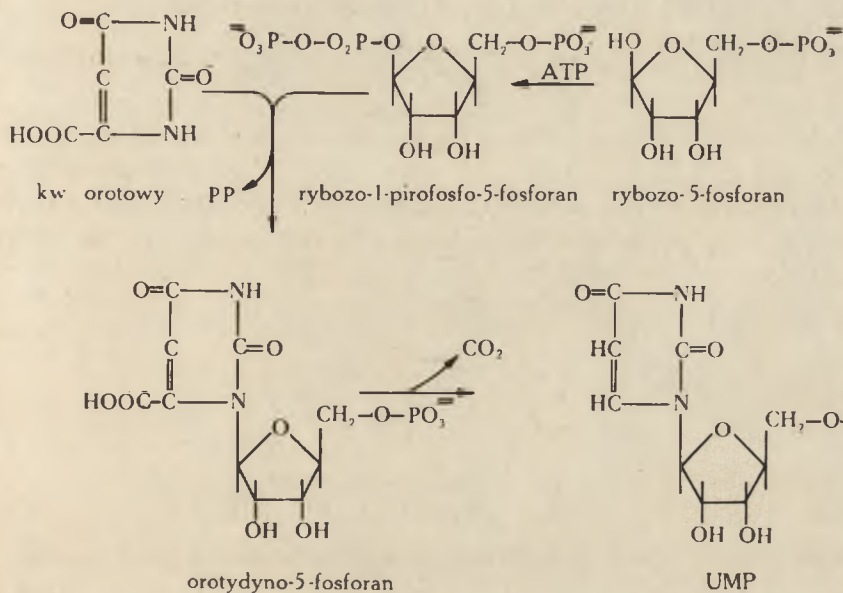
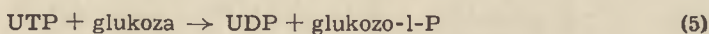


Oprócz tego znaleziono specyficzny enzym katalizujący powstawanie UTP z UDP i ATP:



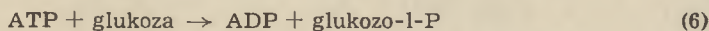
Reakcja ta pozwala na pośredni udział UTP we wszystkich tych reakcjach, w których bierze udział ATP, ponieważ na tej drodze może na-

stępować regeneracja ATP kosztem UTP. Tak np. reakcja zaobserwowana przez Kornberga



Rys. 2

jest prawdopodobnie wypadkową reakcji heksokinazowej



i odwróconej reakcji (4).

W analogiczny sposób przebiega fosforylacja kreatyny przez UTP, wobec śladów ATP. Natomiast, jak stwierdzili Ling i Lardy, reakcja:

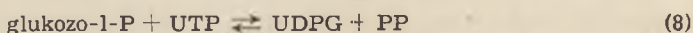


przebiega wprost pod wpływem deuterohexokinazy. Enzym ten może wykorzystywać zarówno ATP, jak też UTP i ITP jako czynniki fosforylujące.

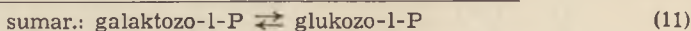
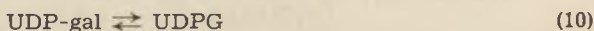
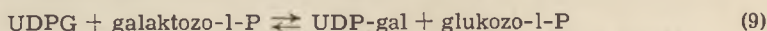
Stwierdzono również istnienie enzymów specyficznie defosforylujących UTP.

Dalszymi koenzymami urydynowymi są: urydynodwufosfoglukozę i urydynodwufosfogalaktozę.

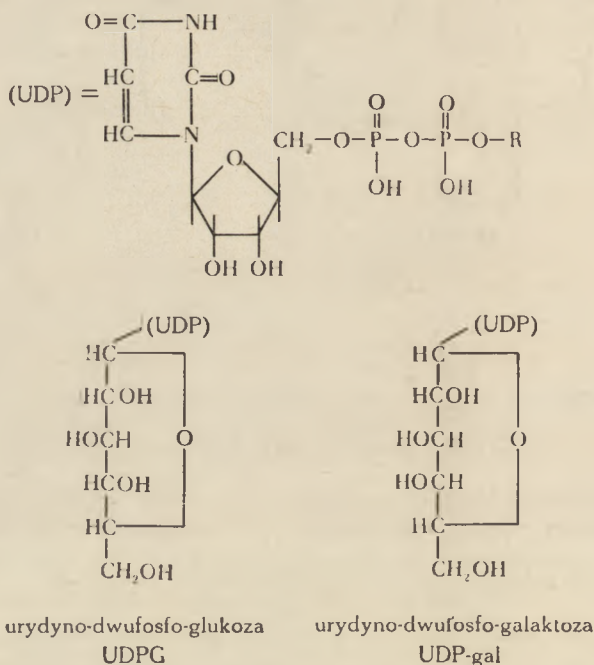
Mechanizm ich powstawania jest prawdopodobnie jednakowy. Obrazuje go synteza UDPG zbadana przez Trucco, a następnie przez Kalkara



Najwcześniej poznana została rola UDPG jako koenzymu galaktowaldehydu, przekształcającej galaktozo-1-P w glukoza-1-P i odwrotnie:

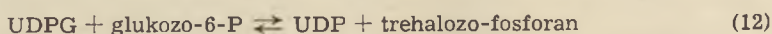


Reakcja ta pozwala z jednej strony na włączenie galaktozy do normalnych przemian glikolitycznych, z drugiej zaś strony na syntezę przez ustrój galaktozy, niezbędnej dla produkcji laktozy. Istotnie, stwierdzono UDPG w gruczole mlecznym ssaków w ilościach większych, niż w innych tkankach.

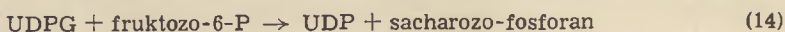
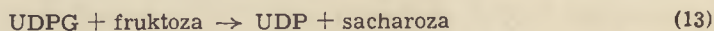


Rys. 3

Stwierdzono dalej, że UDPG bierze udział w syntezie trehalozy i sacharozy. Z drożdży wydzielono enzym prowadzący reakcje:



W kielkach pszenicy stwierdzono obecność 2 enzymów prowadzących reakcje:



Jak stwierdzili Dutton i Storey w roku 1954 nukleotyd urydynowy niezbędny jest również przy syntezie glukuronidów. Czynnym związkiem okazał się tutaj kwas UDP-glukuronowy.

Wydzielanie UDP-acetyloglukozaminy i UDP-acetylogalaktozaminy z drożdży i tkanek zwierzęcych wskazało na rolę koenzymów urydynowych w przemianie heksozamin.

Stwierdzono również występowanie w ustroju innych związków, w których UDP związany jest z aminokwasami i peptydami.

Wydaje się, że w najbliższym czasie można będzie wyświetlić rolę koenzymów urydynowych w syntezie wielocukrowców takich jak kwas hialuronowy i chondroitynosiarkowy, oraz zbadać bliżej mechanizm przemian aminocukrów.

Można również przypuszczać, że wkrótce poznamy bliżej rolę wolnych nukleotydów cytydylowych i gwanilowych.

Tlenowa przemiana heksozomonofosforanu u drożdży i w tkankach zwierzęcych

(Referat F. Dickens'a)

Droga glikolitycznego rozkładu heksoz, prowadząca do kwasu mlekowego w tkankach zwierzęcych, a do alkoholu, glicerolu i innych produktów u mikroorganizmów i w tkankach roślinnych, została już w głównych zarysach poznana dość dawno. Przemiana ta wymaga obecności DPN; hamują ją fluorki i jodooctany (wpływ na enolazę wzgl. dehydrogenazę 3-fosfogliceraldehydu).

Natomiast bezpośrednia tlenowa przemiana heksozo-6-fosforanu została zbadana dokładniej dopiero dzięki badaniom ostatnich lat. Poznanie tej drogi pozwoliło nam lepiej wnikać w przemianę pentoz, oraz rzadziej występujących tetroz i heptoz. Enzymy tej przemiany są — jak się okazało — szeroko rozpowszechnione zarówno w mikroorganizmach, jak też w tkankach zwierząt i wyższych roślin.

Przemiana ta związana jest z obecnością TPN i jest niewrażliwa na fluorek i jodoctan, w odróżnieniu od glikolizy. Zasadniczy jej zarys, oraz powiązanie z przemianą glikolityczną przedstawia rys. 4.

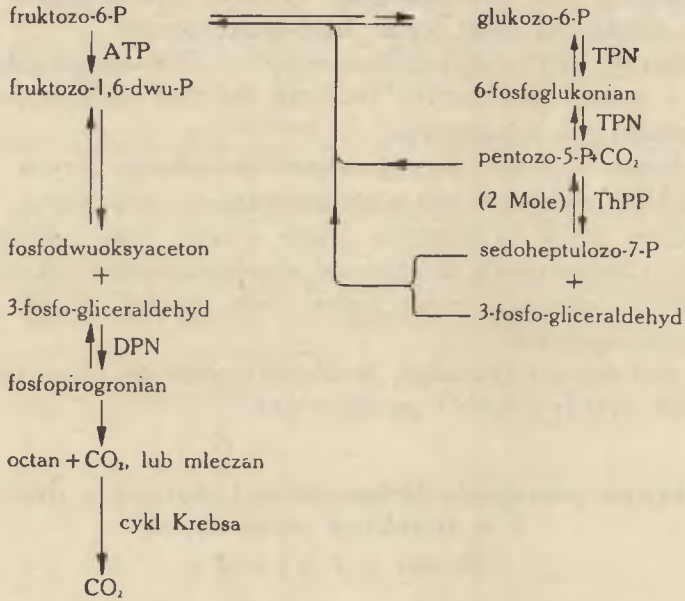
Jak wykazały dalsze badania, pomiędzy zaznaczonymi na tym schemacie etapami występują reakcje pośrednie. Ciąg reakcji pomiędzy glukozo-6-fosforanem, a pentozo-5-fosforanem według współczesnych poglądów przedstawia się następująco (patrz rys. 5):

Następnie działającym enzymem jest izomeraza fosfopentoz. Prowadzi ona przemianę (patrz rys. 6):

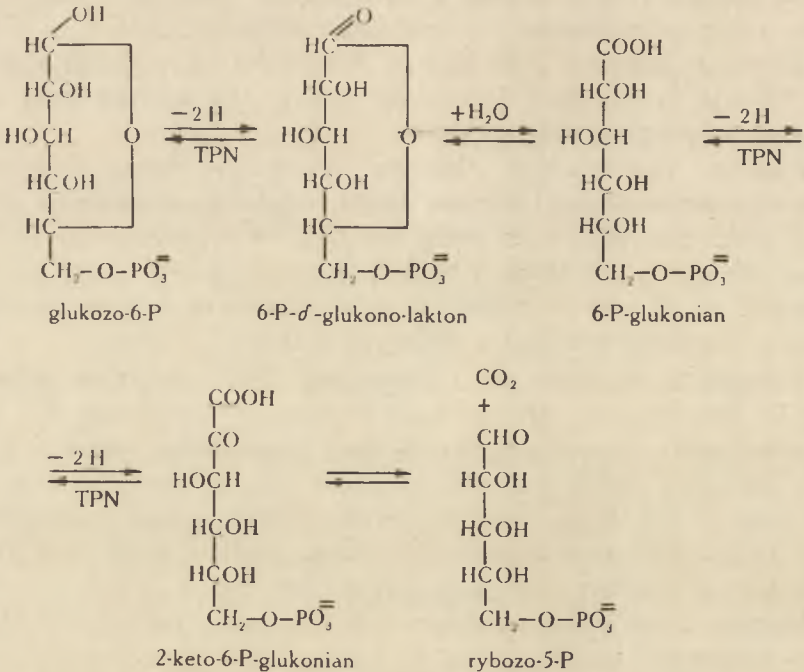
W następnych etapach pod wpływem fermentów: transketolazy

Przemiana glikolityczna

Przemiana tlenowa



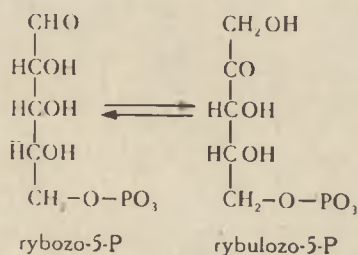
Rys. 4.



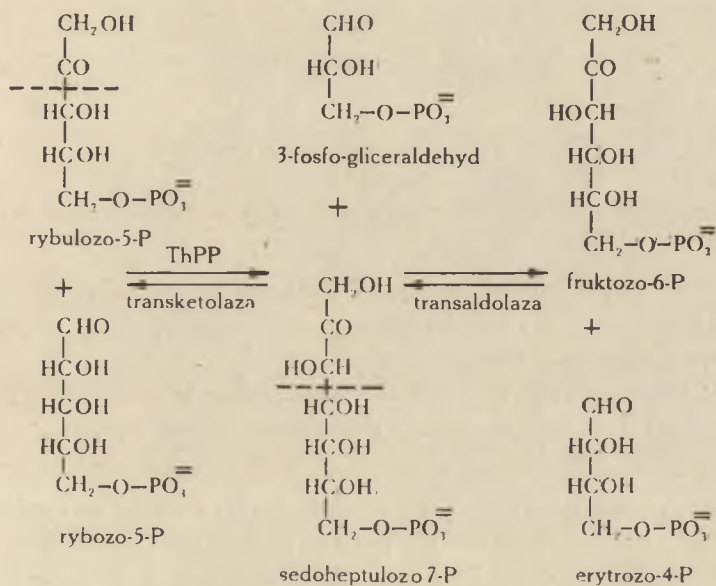
Rys. 5.

(wymagającej obecności pirofosforanu tiaminy) dwuwęglowy fragment cząsteczki rybulozo-5-fosforanu jest przenoszony na cząsteczkę rybozo-5-fosforanu. Powstają przy tym: sedohep-fruktozo-6-fosforan i erytrozo-4-fosforan. Pomiędzy tymi produktami następuje po-nowna wymiana — tym razem 3-węgło-wego fragmentu — przy czym powstaje fruktozo-6-fosforan i erytrozo-4-fosforan. Działający tu enzym nazwany został tran-saldolazą. Etapy te przedstawia rys. 7.

Utworzony erytrozo-4-fosforan może reagować z jeszcze jedną cząstką rybulozo-5-fosforanu (reakcja transke-tolazowa) dając fruktozo-6-fosforan i 3-fosfogliceraldehyd.

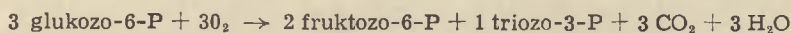


Rys. 6

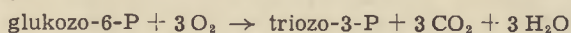


Rys. 7.

Sumarycznie dotychczasowa przemiana glukozy-6-fosforanu przed-stawia się następująco:

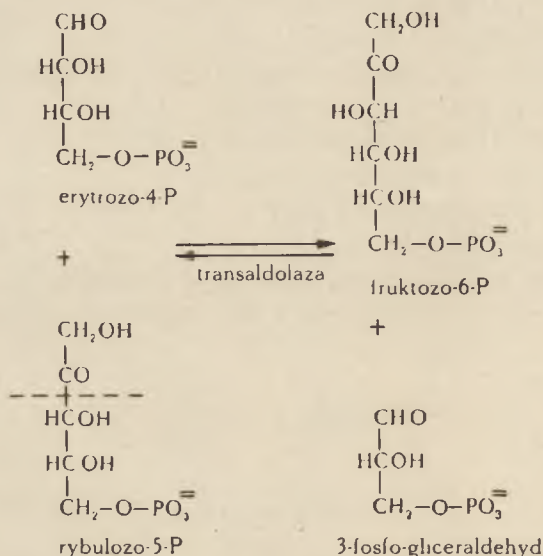


Działanie izomerazy fosfoheksoz zamyka cykl, wobec czego sumaryczna reakcja pozostaje:



Przedstawiony tutaj ciąg reakcji został potwierdzony badaniami izo-topowymi z piętnowanymi cukrami.

Przy porównywaniu intensywności tlenowej przemiany glukozy-1-fosforanu w różnych tkankach, stwierdzono stosunkowo duże jej nasilenie w gruczole mlecznym ssaków w okresie laktacji.



Rys. 8.

W ogóle w organizmach żeńskich enzymy tej przemiany wykazują większą aktywność. Fakt ten nasuwa przypuszczenie o hormonalnej regulacji utleniania fosfoheksoz.

W zakończeniu autor wskazał na powiązanie przedstawionych przez siebie przemian z reakcjami fotosyntezy u wyższych roślin.

Współczesne poglądy na indukowaną syntezę enzymów

(Referat S. Spiegelman'a)

Od przeszło 60-ciu lat znane są zjawiska tzw. adaptacji enzymatycznej mikroorganizmów. Polegają one na tym, że organizmy nie mogące normalnie przetwarzać pewnych substratów z powodu braku odpowiedniego aparatu enzymatycznego, uzyskują tę zdolność pod wpływem dłuższego kontaktu z odpowiednimi substratami. Substraty takie nazywamy substancjami indukującymi, lub induktorami.

Prace ostatnich lat wyjaśniły wiele kwestii dotyczących tego ciekawego problemu. Zostało wykazane, że:

1) zmiana aktywności enzymatycznej nie jest spowodowana wyselekcjonowaniem odpowiedniego mutantu, lecz polega na indukowanej modyfikacji aparatu enzymatycznego, przy niezmienionym genotypie;

2) zmiana aktywności enzymatycznej polega raczej na powstawaniu nowego apoenzymu niż nowego koenzymu.

Z nasuwających się problemów autor omówił dokładniej w swoim referacie następujące kwestie:

a) z czego tworzy się aktywny enzym; co jest właściwym prekursorem enzymu?

b) jaki mechanizm enzymatyczny przekształca prekursora w aktywny enzym?

c) jaką rolę odgrywa substancja indukująca?

W związku z pierwszym pytaniem rozważano trzy możliwości:

a) enzym może powstać wprost z istniejącego uprzednio wielkocząsteczkowego prekursora, rodzaju proenzymu, co można przedstawić schematycznie:

wielkocząsteczkowy prekursor $\rightarrow$ aktywny enzym

b) aktywny enzym może powstawać z wielkocząsteczkowego prekursora, do którego dołącza się pewna ilość wolnych aminokwasów:

wielkocząst. prekursor + aminokwasy $\rightarrow$ aktywny enzym

c) aktywny enzym może być syntetyzowany wprost z aminokwasów:

wolne aminokwasy $\rightarrow$ aktywny enzym

Ponieważ stwierdzono, że do powstania indukowanego enzymu niezbędna jest obecność wolnych aminokwasów egzo- bądź endogennego pochodzenia, pierwsza z powyższych hipotez została odrzucona.

Badania izotopowe wykazały dalej, że co najmniej 99% cząsteczki enzymu jest syntetyzowane wprost z aminokwasów. Przemawia to więc wyraźnie za trzecią z przedstawionych hipotez.

Te dane odpowiadają również częściowo na drugie z postawionych pytań. Powstanie nowego enzymu wiąże się z ogólnym zagadnieniem syntezy białek (omówionym dokładniej w referacie H. Borsook'a — Sekcja II).

Układ syntetyzujący białka składa się według współczesnych poglądów z enzymu lub zespołu enzymów oraz z matrycy, na której zostają odpowiednio rozmieszczone i połączone aminokwasy. Rolę matrycy spełniają cząstki kwasu rybonukleinowego. Jednakże w wypadku indukowanej syntezy enzymów w układach takich muszą być oprócz tego obecne cząstki induktora. Dopiero wówczas układ taki znajduje się w stanie aktywnym i produkuje odpowiedni enzym. Na tym polega rola induktorów wywołujących powstawanie nowych fermentów.

Zdaniem autora referatu współczesne badania pozwoliły dość dobrze wnikać w zagadnienie indukowanej syntezy enzymów; dalsze prace

powinny wyjaśnić dokładniej chemiczną strukturę układów syntetyzujących enzymy. Obecny stan wiedzy pozwala już na takie postawienie problemu.

Komunikaty. Jak wspomniałem poprzednio, ilość komunikatów ogłoszonych na Sekcji IV była bardzo duża. Wspomnę tutaj tylko o kilku, które wywołały największe zainteresowanie.

H. Branderberger (Szwajcaria) donosił o swoich pracach nad wiązaniem enzymów z nierozpuszczalnymi nośnikami. Otrzymuje się w ten sposób substancje analogiczne do wymienniczy jonowych, prowadzące reakcje enzymatyczne. Podobnie można wiązać niektóre antygeny i selektywnie wychwytywać odpowiednie przeciwciała.

F. Winder i J. M. Denny (Irlandia) zbadali bliżej metafosfokinazę — enzym przenoszący fosfor z metafosforanów na ADP tworząc ATP.

M. Grunberg-Manago i S. Ochoa (USA) otrzymali enzym syntetyzujący polinukleotydy z ADP, IDP i innych analogicznych związków z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu.

A. Davidson (Francja) stwierdził, że hydrazyd kwasu izonikotynowego hamuje wszystkie enzymy wymagające witaminu B₆ jako koenzymu. Powstaje przy tym prawdopodobnie izonikotylohydrazon pirydydoksalu.

K. Decker i F. Lynen (Niemcy Zach.) wydzielili z wątroby owczej dwa nowe enzymy: 1) rozkładający acetylo-koenzym A na koenzym A i acetoctan i 2) rozkładający S-acetylglutation.

Sekcja IX

Biochemia mięśnia i centralnego systemu nerwowego

Z dziedziny biochemii mięśnia, na Sekcji tej zostały ogłoszone dwa uzupełniające się wzajemnie referaty: **H. H. Weber** (NRF) „Kurczliwy system mięśni i komórek”, oraz **S. V. Perry** (Anglia) „Przemiana nukleotydów a wewnętrzna struktura mięśnia szkieletowego”. Referaty te wykazały właściwie jak bardzo niekompletne są nasze dotychczasowe wiadomości o wewnętrznej budowie i mechanizmie skurczu mięśnia.

W pierwszym z referatów **H. Weber** omówił wyniki jakie otrzymano badając tzw. kurczliwe modele. Są to odpowiednio sporządzone włókna aktomiozynu, lub włókna mięśni (ewent. komórki z innych tkanek) ekstrahowane przez dłuższy czas odpowiednimi rozpuszczalnikami, jak np. mieszaniną wody i gliceryny.

Modele takie kurczą się pod wpływem ATP, rozkładając go równocześnie do ADP i nieorganicznego fosforanu. W ten sposób otrzymujemy znacznie uproszczone systemy, pozwalające na badanie zjawisk skurczu.

Autor, który od wielu lat prowadził badania na takich modelach, porównywał ich skurcz ze skurczem normalnego mięśnia i doszedł do wniosku, że istota skurczu jest w obydwóch wypadkach taka sama. Występujące różnice są jedynie natury ilościowej.

Z zagadnień poruszonych dalej przez autora wydaje się być najciekawszą kwestia, czy ATP jest bezpośrednim dawcą energii potrzebnej dla skurczu. Sprawa ta — jak się wydawało od dawna przesądzona na korzyść ATP — staje się znów aktualną. Poczyniono bowiem obserwacje (Fleckenstein, Krebs i współpr., oraz Mommaerst), z których wynika, że w czasie pojedynczych słabych skurczów mięśnia nie zmienia się poziom ATP i ADP, natomiast przyrasta nieorganiczny fosforan kosztem niezindetyfikowanego dotychczas związku fosforowego. W każdym razie związkiem tym nie jest fosfokreatyna.

Autor przedyskutował następnie problem, czy któryś z następ. nukleotydów trójfosforowych: ITP, GTP, UTP i acetylo-ATP mógłby być bezpośrednim dawcą energii potrzebnej dla skurczu.

Szereg danych, jak wymagane stężenie jonów Mg^{++} niezbędne dla reakcji z tymi nukleotydami, ich powinowactwo do systemu kurczliwego itp., przemawia przeciwko takiej hipotezie. Kwestia ta pozostaje więc w dalszym ciągu otwarta.

S. V. Perry zajął się przede wszystkim omówieniem roli poszczególnych białek mięśnia. Dotychczas jeszcze nie jest dla nas jasną rola aktynu w skurczu mięśnia. Sądono do niedawna, że właśnie zmiany w cząsteczkach aktynu są odpowiedzialne za skurcz. Jednakże okazało się, że również włókienka czystego miozynu, wolnego od aktynu mogą się kurczyć pod wpływem ATP w $pH = 9$ (Hayashi, 1953). Co więcej, działając pewnymi barwnikami na miozyn można spowodować, że będzie się on kurczył w obecności ATP także w $pH = 7$. Być może, że rola aktynu ogranicza się do takiej modyfikacji cząstek miozynu, aby mogły się one kurczyć w warunkach fizjologicznych.

Jeszcze mniej znane są własności i rola innych białek mięśnia, jak: tropomiozyn, kontraktyna, białko Y i inne.

Znaczną część referatu poświęcił autor omówieniu ATP-azy mięśniowej. Wydaje się, że ATP-azy włókienek, sarkoplazmy i ziarnistości mięśnia posiadają nieco różne własności.

Nowsze analizy wykazały, że nawet w wypoczętym mięśniu pokaźna ilość nukleotydu adenilowego jest w formie ADP.

Jest możliwe, że część ADP jest niedostępna dla normalnych układów

fosforylujących. Jest to prawdopodobnie ADP silnie związany ze strukturą.

Ostatnie badania zwracają coraz większą uwagę na występujące w mięśniu inne trójfosfo-nukleotydy: UTP, GTP i ITP. Autor w zakończeniu przychylił się również do zdania, że nasze wyobrażenie o specyficznej, wyłącznej roli ATP w mięśniu muszą zostać skontrolowane.

Biochemia mózgu. A. W. Pałladin w swoim referacie na temat biochemii mózgu zwrócił uwagę głównie na dwa zagadnienia:

- 1) porównanie aktywności metabolicznej różnych części mózgu, i
- 2) zależność metabolizmu mózgu od jego funkcji.

Opracowanie tych zagadnień nastęrczało i wciąż jeszcze nastęrcza wiele trudności eksperymentalnych ze względu na wielką wrażliwość tkanki nerwowej. Z tych względów nasze wiadomości o biochemii mózgu są ciągle dość fragmentaryczne.

Duża część prac cytowanych przez autora pochodziła z kierowanego przez niego Instytutu Biochemii Ukraińskiej SRR w Kijowie.

Przy badaniu aktywności metabolicznej poszczególnych składników mózgu stosowano przeważnie technikę izotopową. Aby uniknąć zmian zachodzących w mózgu po śmierci zwierzęcia doświadczalnego, zamraża się zazwyczaj mózg ciekłym powietrzem, po czym dopiero przygotowuje się tkanki do analizy.

Otrzymane wyniki wskazują, że najżywszą przemianą białkową odznacza się mózdzek. Wcielanie piętnowanych aminokwasów w białka następuje tutaj najszybciej, wykazuje on też największą zawartość kwasów nukleinowych, związanych — jak wiadomo — z przemianą białkową. Następnymi pod tym względem tkankami są substancja szara półkul mózgowych, oraz substancja biała. Natomiast aktywność enzymów: rybonukleazy i desoksyrybonukleazy jest najwyższa w substancji szarej. Podobnie zachowuje się fosfataza fosfoproteidów, jakkolwiek różnice jej aktywności nie są w poszczególnych tkankach tak wyraźne.

Badania nad przemianą cukrową zmierzały dotychczas głównie do wykazania obecności enzymów glikolitycznych w mózgu.

Istotnie stwierdzono dość wysoką aktywność heksokinazy, fosfoglukomutazy, aldolazy, fosforylasy i ATP-azy w korze półkul mózgowych i w mózdzku.

Badania nad przemianą cukrową rzucają światło na drugi z postawionych problemów: zależność pomiędzy metabolizmem i funkcją mózgu.

Błędnym okazał się wyrażany niekiedy pogląd, że poziom glikogenu w mózgu jest stały. Badania autora wykazały, że na skutek intensywnej pracy mózgu (np. wywołanie silnych drgawek) poziom glikogenu w mózgu może zmniejszyć się o około 25%.

W tym samym czasie wzrasta aktywność amylazy mózgowej, zmniejsza się zaś wyraźnie poziom ATP.

Podniecenie wywołane np. perwityną wiąże się ze wzmożeniem intensywności glikolizy, zawartość ATP w pierwszej godzinie po podaniu środka pobudzającego zmniejsza się, a następnie wzrasta powyżej wartości wyjściowej.

W czasie snu zawartość ATP i nasilenie glikolizy w mózgu królika maleje.

Ciekawe są zmiany zachodzące w metabolizmie mózgu w czasie hibernacji. Dotychczas zostało zbadane bliżej zachowanie się związków fosforowych. Obserwujemy bardzo silne zahamowanie wcielania piętnowego fosforu, zwłaszcza do kwasów nukleinowych i fosfoproteidów. Związki fosforowe podane do krwiobiegu krążą w nim i nie są wychwytywane przez tkanki mózgu.

K o m u n i k a t y. Na Sekcji tej ogłoszono przeszło 40 komunikatów, przy czym około 60% dotyczyło zagadnień biochemii mięśni. Większa ich część dotyczyła enzymologii mięśnia. Z prac o charakterze analitycznym ciekawym było doniesienie C. J. Therlfall'a (Anglia) o nowej metodzie rozdzielania i oznaczania związków fosforowych mięśnia, opartej głównie na metodach chromatografii.

Kilku autorów donosiło o wydzieleniu szeregu białek (aktyn, miozyn, miogen, niekt. enzymy) z mięśni ryb, płazów i bezkręgowców.

Doniesienia z zakresu biochemii mózgu dotyczyły głównie przemian tkanki nerwowej, oraz badań analitycznych.

WŁODZIMIERZ NIEMIERKO

Zoologia chemiczna

(Przegląd obrad Sekcji XII i posiedzenia poświęconego metafosforanom)

Sekcja XII — zatytułowana „Zoologia chemiczna” obejmowała komunikaty o bardzo różnorodnej treści i naogół nie łączące się we wspólne problemy.

W ramach tej sekcji były wygłoszone dwa obszernie referaty. Pierwszy o zależności pomiędzy aktywnym transportem jonów a przenikaniem rozpuszczalnika („solvent drag”), drugi — o chemicznej kontroli ruchu jonów podczas czynności nerwu.

Referat z dziedziny aktywnego przenoszenia jonów został opracowany przez Ussinga, duńskiego badacza z Zoofiziologiske Laboratorium z Kopenhagi, autora szeregu prac z dziedziny aktywnego transportu jonów, oraz Andersena. Po krótkim sprecyzowaniu niektórych pojęć, jak np. aktywny transport, siła przeciskania się rozpuszczalnika („solvent drag”), omówiono szereg cech żywej błony, dzięki którym może zachodzić aktywne przenoszenie jonów oraz podano matematyczne ujęcie „siły przeciskania się rozpuszczalnika”.

Głównym problemem referatu jest zagadnienie siły przeciskania się wody poprzez żywą błonę. Autorzy podają pomysłowo opracowaną metodę, którą nazywają „techniką prądu krótkiego spięcia” pozwalającą na badanie mechanizmu aktywnego transportu. Jako obiekt dla badań kinetyki przepuszczalności błon autorzy wybrali skórę płazów. Stosując radioaktywne izotopy udało im się stwierdzić, że jony Cl i K dyfundują przez skórę z jednakową szybkością w obydwóch kierunkach, natomiast szybkość przepływu jonów Na (Na^{22} i Na^{24}) w różnych kierunkach wykazuje ogromne różnice. Aktywne przenoszenie jonów sodu autorzy stwierdzili również i na przykładzie szeregu innych błon, jak np. jelito i pęcherz moczowy ropuchy, śluzówka jelita świnki morskiej itd.

Dla zbadania siły przeciskania się wody przez błonę autorzy stosowali wodę ciężką. Szereg doświadczeń nad wpływem działania hormonu antydiuretycznego na szybkość przepływu wody i tiomocznika, znaczonego C^{14} i S^{35} , i innych substancji, pozwala autorom sądzić, że zgodnie

z teorią porowatości błon szybkość przenoszenia się cząsteczek poruszających się zgodnie z kierunkiem przenikania wody zwiększa się, natomiast zmniejsza się, jeśli cząsteczki poruszają się „pod prąd”.

Na zakończenie referatu autorzy wysuwają pogląd, że badania ich mogą służyć jako dodatkowe potwierdzenie teorii przenośników. Ponadto o ile dawniej sądzono, że aby jony nieorganiczne mogły przenikać przez błony, to muszą one z przenośnikami tworzyć substancje rozpuszczalne w lipidach, to obecnie wydaje się słuszniejszą hipotezę, że „procesy chemiczne prowadzące do aktywnego transportu zachodzą w porach błony wypełnionych wodą”.

Drugi obszerny referat I. B. Wilsona z Uniwersytetu Columbia poświęcony był kontroli chemicznej ruchu jonów w czasie czynności nerwu. Po krótkim przeglądzie prac Nachmanson'a i współpracowników nad rolą acetylcholine w przewodnictwie nerwowym, autor omówił zagadnienia wymiany jonów sodowych i potasowych w czasie czynności nerwu. Wilson przedstawił ponadto wyniki własnych badań oraz innych autorów nad esterazą acetylcholine. Pozwoliły mu one na skonstruowanie schematu, obrazującego powstanie kompleksu enzymu (esterazy acetylcholine) z substratem. Autor stara się dać biochemiczną interpretację działania niektórych związków farmakologicznych jak eseryna, prostigmina i inne na cały układ acetylcholine, obejmujący receptor acetylcholine, acetylcholine, esterazę acetylcholine, acetylazę choline i białko. Ponadto omawia niektóre zagadnienia związane z udziałem systemu acetylcholine w zjawiskach bioelektrycznych.

Nowoczesne ujęcie problemu z punktu widzenia czynności enzymów jest niewątpliwie wartościową stroną referatu, ciekawego dla specjalistów.

Poza wymienionymi referatami przeglądowymi w ramach sekcji XII ogłoszono 33 komunikaty. Podzielono je na cztery posiedzenia.

Na pierwszym, zatytułowanym Zoologia chemiczna przedstawiono 7 komunikatów o dość różnorodnej treści.

D. L. Fox omawiał przemiany astaksantyny, czerwonego barwika z grupy karotenoidów, u flamingów. L. R. Fisher i współprac. przedstawili wyniki pracy nad rozmieszczeniem, budową i źródłami witaminy A u *Euphasiacea*. Stwierdzono, że jednym karotenoidem występującym u 14 badanych gatunków była astaksantyna lub jej ester.

Z dziedziny biochemii porównawczej były przedstawione dwa komunikaty. Jeden W. Schellera, który wskazuje na różnice w strukturze methemoglobiny u różnych gatunków zwierząt (kręgowców i stawonogów). Drugi — J. Sendroy'a i in. i J. D. O'Neala o różnicach w stałej powinowactwa krwi do tlenu węgla i tlenu u kilku przedstawicieli ssaków.

W zakresie biochemii rozwoju przedstawiono dwa komunikaty: jeden — o przemianach witaminu B w czasie rozwoju jeżowca, drugi — o procesach enzymatycznych w rozwoju embrionalnym i larwalnym płazów (E. Urbani).

Dwa posiedzenia były poświęcone zagadnieniom aktywnego transportu i przepuszczalności. Tematycznie były one częściowo związane z referatem Ussinga i Andersena. Z tej dziedziny była zgłoszona największa liczba komunikatów omawianej sekcji, bo aż 16. Referowane były prace z Centralnego Instytutu Badania nad Odżywianiem, (z Holandii). Prowadzone są tam badania, mające na celu wyjaśnienie mechanizmu przepuszczalności błon, zarówno żywych jak i sztucznych z celulozy, których właściwości można zmieniać w dość znacznym zasięgu zależnie od opracowywanego problemu. Badania nad przepuszczalnością błon z zastosowaniem izotopów promieniotwórczych przedstawione były przez badaczy francuskich.

Przedstawione były również komunikaty z badań nad aktywnym transportem magnezu w komórkach drożdży, aminokwasów w komórkach nowotworowych, sodu i potasu przez błonę niektórych narządów.

Badania Ponza i Llucha wskazują na to, że wchłanianie glukozy w przewodzie pokarmowym jest procesem aktywnego przenoszenia tego związku, wymagającym dopływu energii. Wprowadzenie inhibitorów szeregu enzymów do roztworu glukozy hamuje jej wchłanianie w przewodzie pokarmowym.

Najbardziej zwartym tematycznie było posiedzenie ostatnie, poświęcone biochemii owadów. Zgłoszonych było 8 komunikatów, w tym dwa z Polski z Zakładu Biochemii Instytutu im. M. Nenckiego (jeden W. Niemierki, P. Włodawer i A. Przełęckiej o roli fosfatydów w procesach trawienia i chłonięcia lipidów, drugi L. Wojtacza o enzymach oddechowych).

H. S. Mason i E. Petersen przedstawili wyniki badań, dotyczące się współdziałania chinonów z białkami przy sklerotyzacji kutikuli u *Artropoda*. Wykryty tu został czynny układ: białko-fenolaza — dwufenol.

J. Leclercq z Zakładu Chemii Fizjologicznej z Liège, autor szeregu prac nad odżywianiem *Tenebrio molitor*, wyhodował dwie rasy tego chrząszcza, które różnią się pod względem szybkości wzrostu i wykazują różne zapotrzebowanie pokarmowe. W środowisku zawierającym karnitynę śmiertelność obydwuch ras różni się wybitnie.

P. Faulkner, autor pracy o czynności glukozo-1-fosfatazy w hemolimfie jedwabnika, przedstawił komunikat pt. „Redukcja enzymatyczna nukleotydu trójfosforopirydynowego w hemolimfie owadów”. Autor

przeprowadzał inkubację hemolimfy jedwabnika z TPN i stwierdzał jego redukcję, ponadto badał szereg innych substratów oraz wpływ aktywatorów. Jako ostateczny wniosek z przeprowadzonych doświadczeń Faulkner wysuwa pogląd, że w hemolimfie jedwabnika obecny jest układ enzymatyczny, który utlenia i dekarboksyluje kwas jabłkowy.

Praca K. van Asperena dotyczy się zagadnienia regulacji i wartości składników mineralnych u *Periplaneta americana*. Autor stwierdził znaczną tolerancję tego owada na podstawie stężonych roztworów soli Na, K, Ca i Mg w postaci zastrzyków, oraz dużą wydolność regulacyjną. Wydaje się, że regulacja zachodzi raczej dzięki przenoszeniu jonów niż wody.

Winteringham i współpracownicy przedstawili komunikat o przemianie związków fosforowych rozpuszczalnych u muchy ze specjalnym uwzględnieniem działania insektycydów. Bromek metylu wywołuje rozpad ATP z jednoczesnym uwalnianiem się fosforanów nieorganicznych, lecz bez powstawania ADP, względnie AMP. Wydaje się więc, że u tego owada adenozyna może odgrywać rolę akceptora grup fosforanowych. Badając wpływ różnych insektycydów nie stwierdzono wyraźniejszego działania DDT na poziom ATP w mięśniach tułowia, natomiast spadek zawartości ATP w głowie. Wydaje się, że wyniki te potwierdzają hipotezę innych autorów, że miejscem działania DDT na owada jest głowa.

Jednym z najciekawszych komunikatów był komunikat P. Karlsona. Referował on dalsze swe badania nad chemicznymi i fizjologicznymi właściwościami hormonu gruczołu protorakalnego wywołującego metamorfozę u owadów. Karlson wspólnie z Butenandtem w r. 1954 wyizolowali z poczwarek jedwabnika hormon w postaci krystalicznej. Z 500 kg. poczwarek otrzymano kilkadziesiąt mg substancji o bardzo dużej aktywności. Ten pierwszy hormon owadzi, otrzymany w postaci krystalicznej, nazwano „ecdyson” (Ecdysis — linienie). W dalszych badaniach wyekstrahowano z poczwarek jedwabnika i oczyszczono jeszcze jedną substancję czynną, o takim samym działaniu hormonalnym, lecz o innych właściwościach chemicznych niż „ecdyson”.

Jako jedno z posiedzeń pozasekcyjnych i pozaprogramowych odbyło się w czasie trwania kongresu zebranie poświęcone zagadnieniu metafosforanów.

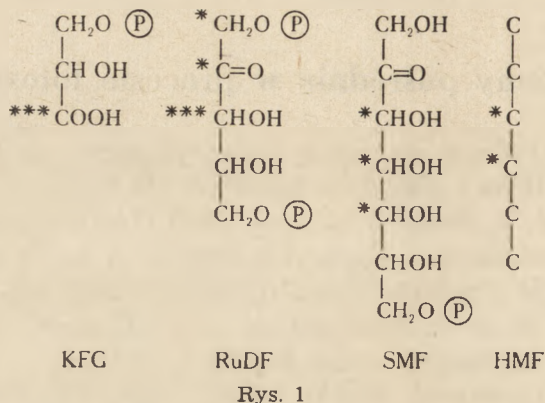
W zebraniu, któremu przewodniczył Wiame (Belgia) wzięli m. in. udział Ebel (Francja), Bielozierskij (ZSRR), Hoffmann-Ostenhoff (Austria), Heller i Niemierko (Polska) oraz kilku innych badaczy pracujących w dziedzinie poli i metafosforanów. W toku zebrania zagajonego przez Wiame'a poruszono szereg zagadnień doty-

czących metabolizmu i cytochemii tych substancji oraz zagadnieniom metodycznym. Szczególnie te ostatnie sprawy stały się przedmiotemżywionej dyskusji, w czasie której próbowano wyświetlić przyczyny dość znacznych rozbieżności wyników uzyskanych z jednej strony przez Bielozińskiego, z drugiej strony przez Ebela i Hofmann-Ostenhoffa.

Dyskusja wykazała, że zagadnienie biochemii polifosforanów staje się coraz bardziej interesującym nie tylko w przypadku mikroorganizmów, lecz, dzięki pracom badaczy polskich, również w przypadku organizmów zwierzęcych, przede wszystkim owadów.

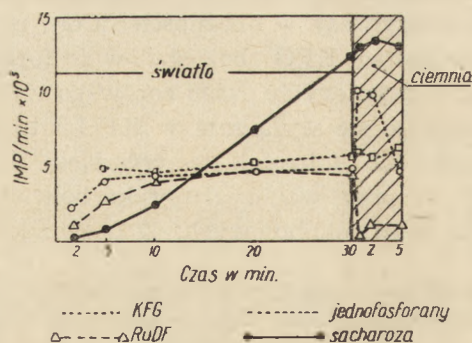
jasno, że fotosyntetyzująca komórka musi zawierać jakiś akceptor dwutlenku węgla, który w procesie fotosyntezy stale się regeneruje z KFG lub też z produktów jego przemiany.

Jak wiadomo w produktach fotosyntezy trwającej około 60 sekund, a przeprowadzonej w obecności $^{14}\text{CO}_2$, znajduje się obok KFG, znaczne ilości rybulozodwufosforanu (RuDF), rybozjednofosforanu (RMF), fosforany heksoz i sedoheptulozy zawierające węgiel izotopowy. (rys. 1).



Rys. 1

W niezmiernie prosty sposób Calvin zdołał wykazać, że jeden z tych estrów fosforanowych a mianowicie RuDF jest akceptorem dwutlenku węgla. Otóż normalnie przebiegającą reakcję fotosyntezy w stanie nasycenia z $^{14}\text{CO}_2$, trwającą około 30 minut, przzerwano nagle przez wyłączenie światła i badano zmiany zawartości węgla izotopowego w produktach fotosyntezy. Okazało się, że ilość RuDF zawierająca radioaktywny węgiel opada gwałtownie i jednocześnie w tym samym stosunku wzrasta gwałtownie ilość KFG. (rys. 2).



Rys. 2

Z doświadczenia tego wynika, że nie tylko RuDF jest bezpośrednim prekursorem KFG i akceptorem dwutlenku węgla, lecz także naodwrot,

KFG jest jakgdyby prekursorem aczkolwiek pośrednim rybulozodwufosforanu (po redukcji KFG do fosforanów trioz i ich dalszych przemianach).

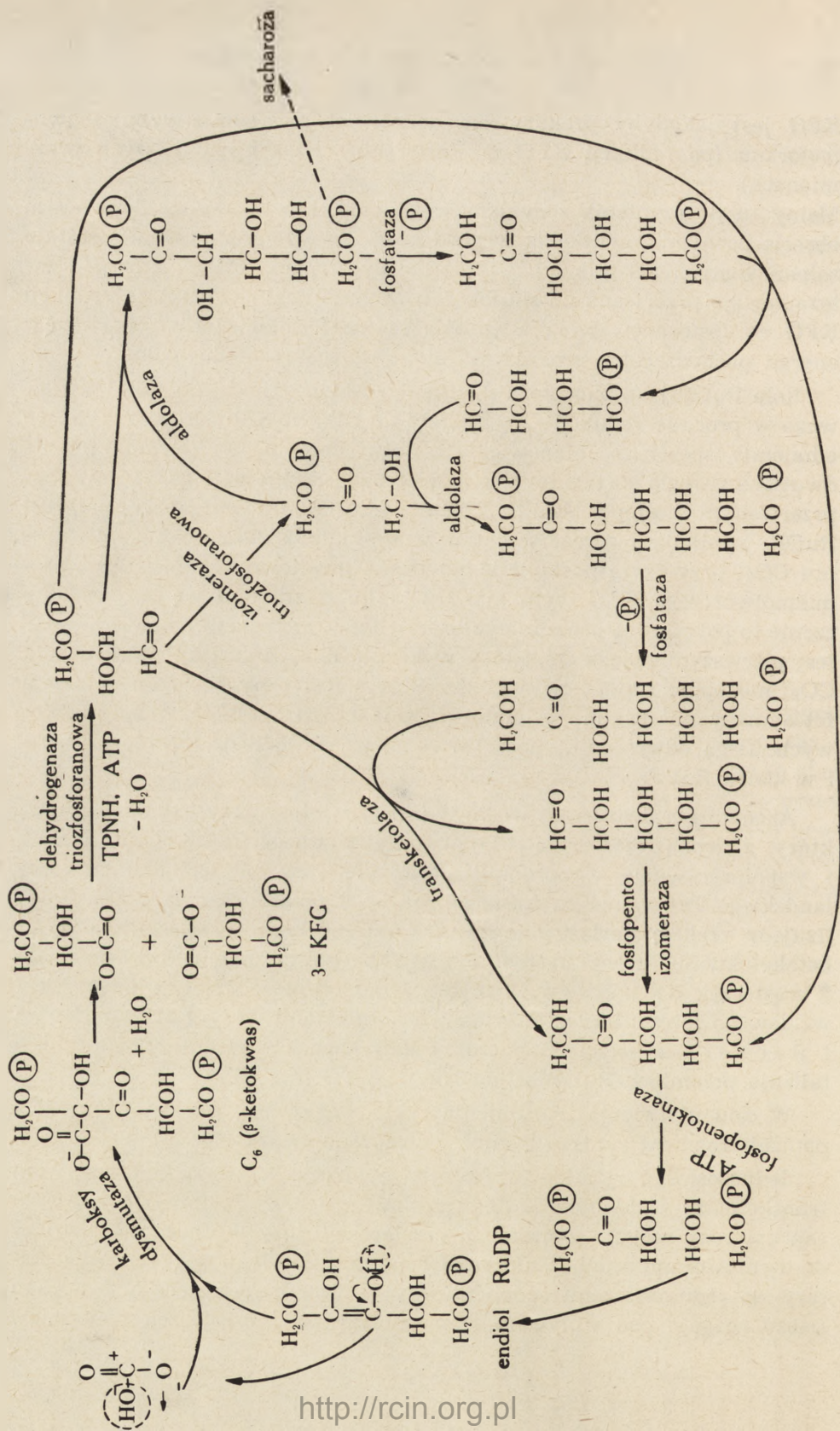
Mamy tu do czynienia z cyklem węglowym, który przy każdorazowym obrocie pochłania dwutlenek węgla i który po wyłączeniu światła zostaje zahamowany. KFG gromadzi się aż do wyczerpania RuDF, którego synteza zostaje przerywana na skutek zatrzymania cyklu w punkcie redukcji KFG do fosforanów trioz. Redukcja ta może dokonać się tylko dzięki energii pochodzącej z produktów fotolitycznego rozkładu wody.

Rola RuDF jako akceptora dwutlenku węgla i znaczenie cyklu węglowego w procesie redukcji CO₂ zostały dodatkowo potwierdzone w nieco odmienny sposób, a mianowicie w doświadczeniu, w którym stężenie dwutlenku węgla zostało gwałtownie obniżone z 1% do 0.003% przy nieprzerwanym dostępie światła. Niedobór CO₂ ujawnił duży przyrost RuDF, wynikający z rezerw cyklu z okresu fotosyntezy o dużym stężeniu CO₂, przy czym nastąpił jednocześnie gwałtowny spadek ilości promieniotwórczego KFG wynikający z braku dwutlenku węgla. Doświadczenie to potwierdza ponadto cykliczny charakter reakcji, ponieważ RuDF jest pierwszym związkiem, który wykazuje duże przyrosty po obniżeniu CO₂; następnie rosną kolejno ilości RMF i fosforany trioz. Po ustaleniu fotosyntezy na niskim poziomie stężenia CO₂, kolejność zmian ilościowych ulega odwróceniu; początkowo opada ilość trioz, następnie RMF i w końcu RuDF.

Akceptorem dwutlenku węgla w procesie fotosyntezy jest więc RuDF, który z jedną cząsteczką CO₂ tworzy 2 cząsteczki KFG. Calvin i współpracownicy wyodrębnili poraz pierwszy ze szpinaku nowozelandzkiego *Tetragonia expansa*, enzym zwany karboksydysmutazą, katalizujący reakcję karboksylacji RuDF do produktu przejściowego typu betaketokwasu, który następnie ulega hydrolitycznemu rozkładowi do 2 cząsteczek KFG. Na rys. 3 przedstawiony jest schemat pełnego cyklu węglowego fotosyntezy z enzymami i substratami według Horeckera i Rackera z uwzględnieniem reakcji karboksydysmutazy, która katalizuje przemianę RuDF całkowicie do KFG (rys. 3).

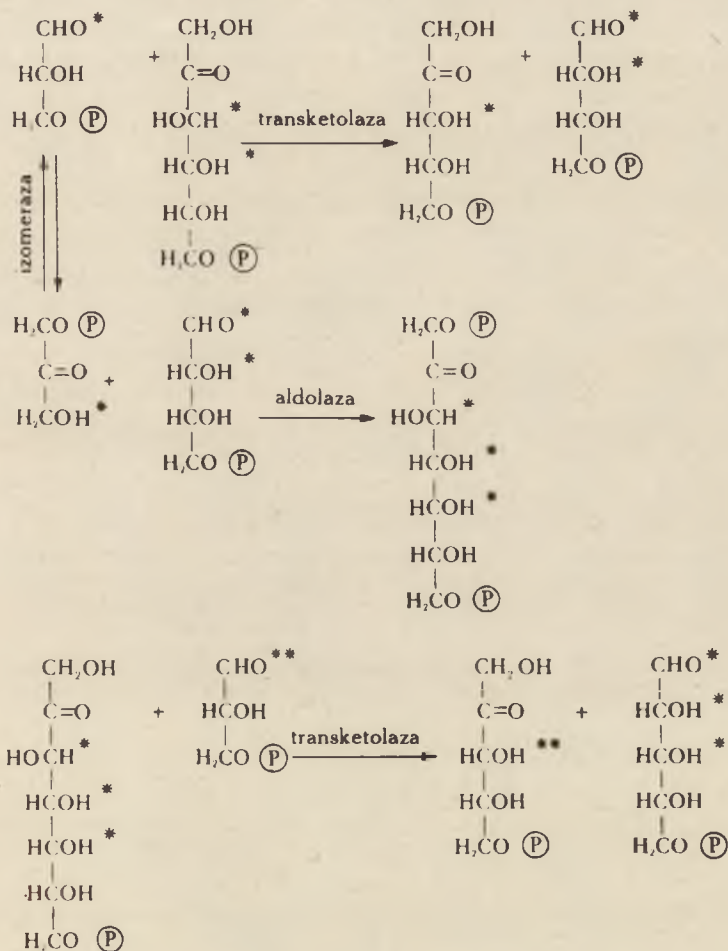
W celu ułatwienia zrozumienia cyklu węglowego, przedstawiony jest poniżej fragment syntezy pentoz z fosforanu triozy (rys. 4).

Jednofosforan rybulozy i fosforan erytrozy powstają pod wpływem transketolazy z aldehydu fosfoglicerolowego i 6, — fosfofruktozy. Fosforan erytrozy reaguje z następną cząsteczką triozy w obecności aldolazy do dwufosforanu sodoheptulozy. SDF po defosforylacji w obecności fosfatazy do jednofosforanu sodoheptulozy z następną cząsteczką fosforanu triozy reaguje pod wpływem transketolazy do 2 cząsteczek fosforanów



pentoz. Fosforan heksozy powstaje z 2 cząsteczek triozy na zasadzie reakcji aldolazowej przebiegającej w kierunku przeciwnym kolejności w procesie glikolizy.

Jak wynika ze schematu na rys. 3 obrót cyklu pentozowego uzależniony jest od zewnętrznych źródeł energii. Redukcja KFG do fosforanów triozy wymaga jednej cząsteczki ATP i jednej cząsteczki TPNH, poza tym jeszcze jedna cząsteczka ATP jest niezbędna do fosforylacji rybulozozjedno-



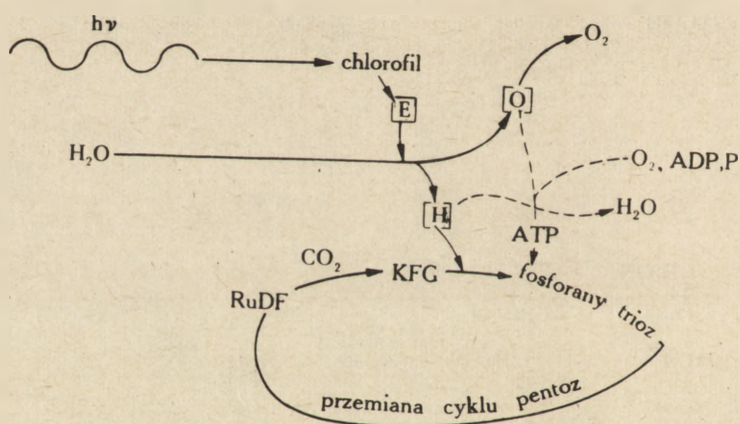
Rys. 4

fosforanu do RuDF. Tak więc redukcja 1 cząsteczki CO_2 wymaga 2 cząsteczek zredukowanego TPN i 3 cząsteczek ATP. W pełnym obrocie cyklu 3 cząsteczki CO_2 karboksylują 3 cząsteczki RuDF, z których w obecności karboksydydmutazy powstaje 6 cząsteczek KFG. Po redukcji, z 5 czą-

steczek fosforanów trioz powstają 3 cząsteczki pentoz umożliwiające następny obrót cyklu, a pozostała cząsteczka triozy opuszcza cykl i następnie jako fruktozo-1,6-dwufosforan według schematu Leloir'a z uridino-dwufosfoglikozą tworzy sacharozę, a więc rezerwy węglowodanów powstających w wyniku procesu fotosyntezy.

Z rys. 3 wynika również, że rola reakcji fotochemicznej w fotosyntezie wydaje się polegać wyłącznie na syntezie ATP i zredukowanego TPN. Istotnie Racker w 1955 roku uruchomił pełny cykl pentozowy *in vitro* w obecności oczyszczonych enzymów zupełnie niezależnie od świetlnej reakcji fotolizy wody. W ten sposób cykl redukcji dwutlenku węgla może w pewnych odpowiednich warunkach przebiegać niezależnie od fotochemicznej produkcji elektronów, ATP i wydzielania tlenu cząsteczkowego.

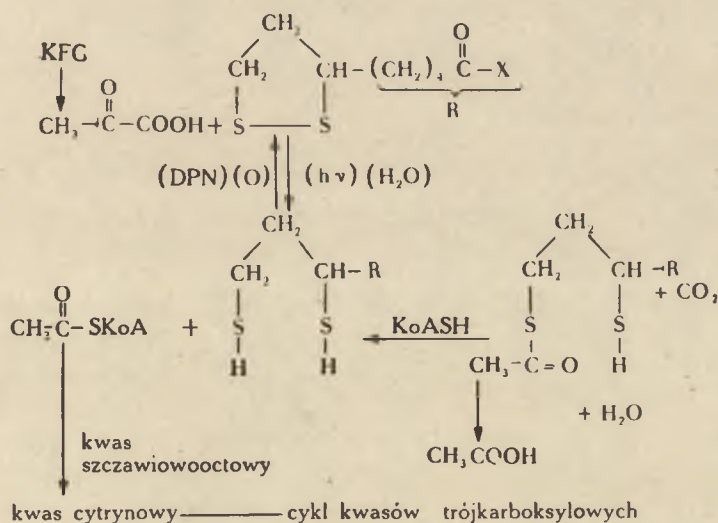
W reakcji fotosyntezy absorbowana przez chlorofil energia świetlna katalizuje fotolizę wody, w wyniku której powstaje nieokreślony jeszcze czynnik redukujący (H) i czynnik utleniający (O). Część (H) redukuje KFG do fosforanów trioz a druga część czynnika redukującego wraz z czynnikiem utleniającym (O) użyta jest do syntezy ATP (rys. 5).



Rys. 5

W wyniku procesu fotosyntezy otrzymuje się poprzez syntezę KFG węglowodany, które jako główny substrat oddychania tkankowego muszą ostatecznie znaleźć swoją drogę do cyklu kwasów trójkarboksylowych. Calvin i współpracownicy wykazali, że w pewnych warunkach istnieje między fotosyntezą i cyklem kwasów trójkarboksylowych jeszcze inny, bardziej bezpośredni związek. Badając promieniotwórczość substancji innych aniżeli cyklu pentozowego, badacze ci stwierdzili, że występujące w procesie fotosyntezy śladowe ilości kwasu cytrynowego i glutamino-

wego, po wyłączeniu światła wzrastają wielokrotnie. To niezmiernie ciekawe zjawisko tłumaczy się syntezą octanu KoA powstającego w ciemności z KFG. Przez defosforylację KFG powstaje kwas pirogronowy, który w obecności oksydazy kwasu pirogronowego ulega dekarboksylacji, i z koenzymem oksydazy, kwasem 6,8-tiooktanowym tworzy octan kwasu tiooktanowego. Z KoASH powstaje następnie octan KoA obok zredukowanej formy kwasu tiooktanowego, która w obecności akceptorów wodoru np DPN zostaje z powrotem utleniona do formy dwusiarczkowej. Powstały octan KoA w wiadomy sposób w obecności enzymu kondensującego reaguje z kwasem szczawiowoocetowym do kwasu cytrynowego i innych substratów cyklu kwasów trójkarboksylowych. Tak przebiega cykl tiooktanowy w ciemności, na świetle natomiast reakcja ta jest w zupełności albo prawie w zupełności zahamowana, ponieważ produkty fotolizy wody redukują dwusiarczek kwasu tiooktanowego zanim on zdoła reagować z kwasem pirogronowym. Pod wpływem światła równowaga między zredukowaną i utlenioną formą kwasu tiooktanowego ulega przesunięciu w kierunku dwutiolowej, światło działa przeto jakgdyby zawór jednokierunkowy, uniemożliwiający syntezę acetylu KoA i tym samym ucieczkę KFG bezpośrednio do produktów cyklu kwasów trójkarboksylowych (rys. 6).

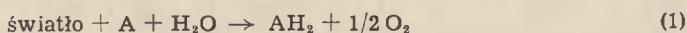


Rys. 6

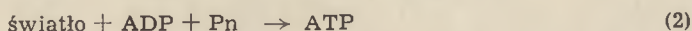
Calvin przypisuje kwasowi tiooktanowemu zasadnicze znaczenie w świetlnej reakcji fotosyntezy, a mianowicie w postaci dwusiarczku kwas ten ma być akceptorem czynnych elektronów powstałych w wyniku fotolizy wody. Wydajność kwantowa reakcji rzeczywiście wzrasta

czynnych elektronów, wówczas inhibicja np. arseninami powinna w zupełności uniemożliwić oksydo-redukcyjne reakcje kwasu tiooktanowego. Wreszcie trudno dziś jeszcze zgodzić się na ograniczenie reakcji fotochemicznej wyłącznie do roli źródła syntezy ATP i zredukowanego TPN. Z drugiej strony opracowanie cyklu węglowego fotosyntezy, wykrycie prekursora KFG w postaci rybulozodwufosforanu i wyjaśnienie reakcji wiązania dwutlenku węgla w obecności karboksydysmutazy stanowią osiągnięcia o tak dużej wadze, że ich znaczenie w przyszłości nie może być dzisiaj w pełni docenione.

Calvin i współpracownicy badali reakcje fotosyntezy w zielonych glonach i roślinach wyższych, przy czym ich materiałem doświadczalnym były nieuszkodzone komórki i tkanki. W odróżnieniu od Calvina, Arnon i jego współpracownicy badali w ostatnich latach fotosyntezę pozakomórkową w nienaruszonych izolowanych chloroplastach i w chloroplastach o uszkodzonej strukturze. Z badań tych wynika, że izolowane chloroplasty mogą nie tylko wydzielać tlen cząsteczkowy w obecności akceptorów elektronów wg reakcji Hilla (1):



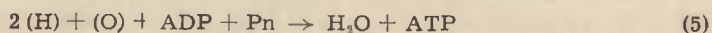
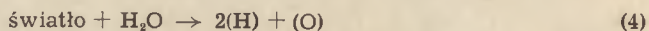
lecz ponadto, że chloroplasty pod wpływem energii świetlnej posiadają zdolność syntezy ATP (2) i redukcji dwutlenku węgla do poziomu węglowodanów przy jednoczesnym wydzielaniu tlenu cząsteczkowego (3)



Syntezę ATP na świetle albo t. zw. fotosyntetyczną fosforylację mogą również katalizować chloroplasty o uszkodzonej strukturze np. na drodze wymywania chloroplastów wodą pod warunkiem, że system reakcji zostanie skompletowany dodatkiem nukleotydów flawinowych (FMN), menadionem i kwasem askorbinowym.

Fosforylacja fotosyntetyczna jest niezależna od procesu wiązania CO_2 i w odróżnieniu od fosforylacji oksydatywnej jest również niezależna od reakcji oddychania. Jak już wspomniano uszkodzone chloroplasty w obecności kofaktorów jak FMN, witaminy K i C katalizują fosforylację na świetle, ale nie mogą wiązać i redukować dwutlenku węgla. Ponadto w izolowanych, nieuszkodzonych chloroplastach, inhibitory, które hamują enzymatyczne reakcje redukcji dwutlenku węgla nie wpływają ujemnie na fosforylację fotosyntetyczną.

Arnon uważa, że fosforylacja fotosyntetyczna jest procesem bez-tlenowym, w którym produkty fotolizy wiążą się z powrotem do cząsteczki wody:



Na poparcie tej tezy Arnon przytacza następujące dowody: 1. fosforylacja fotosyntetyczna nie pochłania i nie wydziela tlenu w aparacie Warburga. 2. w uszkodzonych chloroplastach dodatek TPN lub DPN nie wywołuje dodatkowej syntezy ATP. 3. uszkodzone chloroplasty, które bez dodatku enzymów z zewnątrz posiadają zdolność fotosyntetycznej fosforylacji, mimo dodania zredukowanego nukleotydu dwufosfopirydynowego nie pobierają tlenu i nie katalizują reakcji oksydatywnej fosforylacji. 4. materiał cytoplazmy po usunięciu nieuszkodzonych chloroplastów katalizuje oksydacyjną fosforylację w ciemności, natomiast na świetle w atmosferze azotu nie katalizuje reakcji fosforylacji fotosyntetycznej.

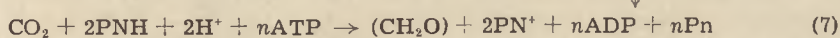
Jak z tego wynika rośliny zielone dysponują dwoma oddzielnymi sposobami syntezy ATP: jeden przy pomocy systemu enzymatycznego zawartego w mitochondriach katalizuje fosforylację oksydacyjną, drugi przy pomocy chloroplastów wytwarza wiązania bogate w energię, korzystając z energii świetlnej reakcji fotosyntezy. Energia świetlna absorbowana w reakcji fotochemicznej gromadzi się w utleniających (O) i redukujących produktach fotolizy wody (4), i ulega zmagazynowaniu w postaci wiązań pirofosforanowych ATP, gdy produkty fotolitycznego rozkładu wody wydzielają energię, łącząc się z powrotem do cząsteczki wody (5).

Jak już wspomniano wyżej, izolowane, nieuszkodzone chloroplasty wiążą na świetle CO_2 i wydzielają O_2 . Rozpuszczalne produkty pochodzące z redukcji promieniotwórczego dwutlenku węgla przez chloroplasty są identyczne ze związkami wykrytymi w reakcji fotosyntezy komórkowej. Obejmują one fosforany fruktozy, glikozy, rybozy, rybulozy, dwuhydroksyacetonu, kwasu glicerolowego, ponadto kwas glikolowy, jabłkowy, asparaginowy, glicynę, alaninę, wolny dwuhydroksyaceton i glikozę.

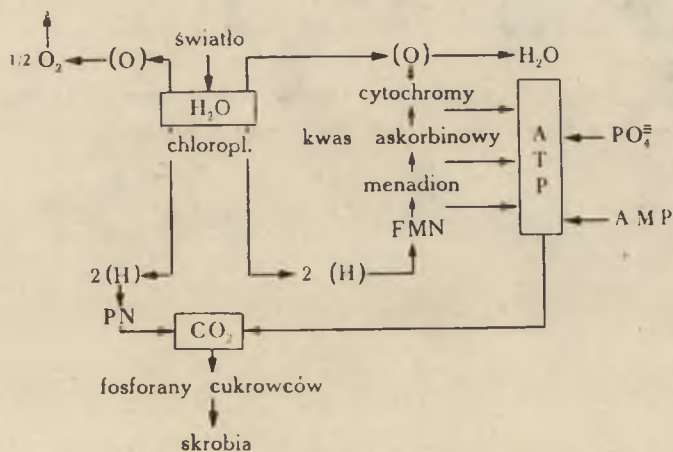
Zdolność wiązania CO_2 przez chloroplasty wymywane wodą znika prawie zupełnie i dodatek ATP, DPN i TPN pozostają bez wpływu. Natomiast dodatek ekstraktów wodnych z przemywania chloroplastów przywraca uszkodzonym chloroplastom zdolność wiązania CO_2 , która po dodaniu ATP, DPN i TPN, a szczególnie mieszaniny ATP i TPN wzrasta kilkakrotnie. Uszkodzone chloroplasty z dodatkiem wodnych ekstraktów z przemywania, ale podgrzewanych do temperatury wrzenia nie wiążą CO_2 , na skutek termicznej denaturacji rozpuszczonych białek enzymatycznych. Wodne ekstrakty pochodzące z przemywania chloroplastów zawierają substraty i enzymy niezbędne do katalizy reakcji redukcji CO_2 .

Dotychczas w ekstraktach tych stwierdzono obecność następujących enzymów cyklu pentozowego: dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerolowego, karboksydysmutazy, kinazy fosfoglicerolowej, fosfopentokinazy, fosfoglikomutazy, menadion, reduktazy, aldolazy i fosforylasy.

Reakcje fotochemicznej syntezy ATP i fotochemicznej redukcji CO_2 przez enzymy nieuszkodzonych chloroplastów wiążą się przede wszystkim z fotolizą wody. Czynniki redukujący (H) fotolitycznego rozkładu wody przypuszczalnie redukuje nukleotyd pirydynowy, który w postaci zredukowanej jest przenośnikiem elektronów reakcji wiązania CO_2 :



Nieuszkodzone chloroplasty posiadają 3 komplety enzymów niezbędnych dla poznanych reakcji fotosyntezy o kolejno wzrastającej kompleksowości: a mianowicie fotolizy wody, fosforylacji fotosyntetycznej i re-



Rys. 8

dukcji CO_2 . Uszkodzone chloroplasty zawierają tylko 2 komplety enzymów fotolizy wody i fosforylacji fotosyntetycznej, ponieważ enzymy cyklu pentozowego są rozpuszczalne i podczas przemywania chloroplastów przechodzą do roztworów wodnych.

Powyższe reakcje można przy pomocy odpowiednich inhibitorów odseparować i wykazać ich zależność od specyficznych systemów enzymatycznych. Zahamowanie reakcji fotosyntezy o wyższej kompleksowości nie wpływa na reakcje mniej kompleksowe i naodwrot hamowania podstawowej reakcji, a mianowicie fotolizy wody hamuje wszystkie inne reakcje fotosyntezy. Amid jodoctanu i arseniny hamują redukcję CO_2 ,

przy czym inhibitory te pozostają bez wpływu na fosforylację fotosyntetyczną i na fotolizę wody. Błękit metylenowy hamuje redukcję CO_2 i fosforylację fotosyntetyczną a nie wpływa na fotolizę wody. Natomiast o-fenantrolina hamuje fotolizę wody i tym samym fosforylację fotosyntetyczną i redukcję CO_2 .

Jak z tego wynika fosforylacja i redukcja CO_2 w izolowanych chloroplastach oparte u swych podstaw o fotolityczny rozkład wody, przebiegają niezależnie po 2 oddzielnych torach. Z jednej strony produkty fotolizy łącząc się z powrotem do cząsteczki wody, wydzielają energię magazynowaną w postaci pirofosforanowych wiązań ATP, a z drugiej redukując nukleotydy pirydynowe katalizują redukcję CO_2 do węglowodanów (rys. 8).

Porównanie prac Calvina z badaniami Arnona nastrocza duże trudności, ponieważ w badaniach z chloroplastami reakcje fotosyntezy przebiegają zupełnie niezależnie od procesów oddychania i od innych reakcji związanych z pobieraniem tlenu. W fotosyntezie komórkowej natomiast reakcje redukcji i utleniania a więc fotosynteza i oddychanie są z sobą ściśle związane. Tym niemniej prace Arnona i współpracowników udowodniły, że fotosynteza w strukturach podkomórkowych jest możliwa, co posiada duże znaczenie teoretyczne, ponieważ wiąże złożone reakcje *in vivo* z badaniami systemów modelowych.

BOLESŁAW SKARŻYŃSKI

Postępy badań w zakresie odżywiania, patologii i immunochemii oraz chemii klinicznej

(Przegląd obrad sekcji XIII, XIV i XVI)

Przypuszczam, że spośród wszystkich 16 sekcji Kongresu Biochemicznego w Brukseli, sekcje poświęcone chemii klinicznej i patologii chemicznej skupiały stosunkowo najmniej biochemików czystej wody, ale skupiały równocześnie największą ilość uczestników reprezentujących marginesowych użytkowników biochemii, którzy zarówno na posiedzeniach, jak jeszcze bardziej w kularach, mieli możliwość wymieniać swe poglądy dotyczące przede wszystkim technicznych spraw związanych z badaniami chemicznymi przy łóżu chorego i w eksperymencie patologicznym na zwierzętach. Wyjątkowo duży odsetek doniesień dotyczył szczegółów metodycznych, niejednokrotnie nawet mało ważnych lub też wiązał się z kazuistyką kliniczną. Niewiele może było doniesień, które reprezentowałyby otwarcie jakiegoś nowego odcinka badań i które posuwałyby tok badań wyraźnie naprzód. Ale za to charakter i treść tych doniesień pozwalały zorientować się dobrze w aktualnych najważniejszych i najczęściej opracowywanych zagadnieniach w tych nieco marginesowych działach biochemii.

Oczywiście, podobnie jak i w obradach innych sekcji, tak i w sekcji patologii chemicznej oraz chemii klinicznej osią obrad były referaty poglądowe, stanowiące punkt wyjścia dla ciekawych i żywych dyskusji. Dwa takie referaty skupiły dokoła siebie zainteresowanych w zakresie patologii chemicznej i chemii klinicznej. Jednym był referat prof. biochemii Uniwersytetu w Edynburgu, G. F. Marriana „O oznaczaniu sterydów w krwi i w moczu”. Tytuł drugiego programowego odczytu wygłoszonego przez H. Harrisa z Biochemistry Departement London Hospital Medical College, brzmiał: „Aminoacyduria u człowieka”.

Prof. Marrian jest zasłużonym badaczem na polu chemii sterydów, odkrywcą estriolu i pregnandiolu w moczu, a od lat kilkunastu wraz ze swym sztabem współpracowników zajmuje się opracowaniem

metod wykrywania, różnicowania i ilościowego oznaczania w moczu hormonów sterydowych i ich metabolitów. Nic dziwnego, że odczyt jego wzbudził bardzo żywe zainteresowanie, a dyskusja, wskutek braku czasu, musiała pozostać niedokończoną. Dla większości słuchaczy pracujących przeważnie w laboratoriach klinicznych, tezy prof. Marriana były do pewnego stopnia strumieniem zimnej wody. Wnioski, do jakich referent doszedł, dałyby się wyrazić następująco: do dzisiejszego dnia nie posiadamy żadnych naprawdę swoistych metod, któreby pozwoliły dokładnie określić w moczu pojedyncze hormony sterydowe z konieczną dokładnością. Nawet poszczególne grupy sterydów dają się w najlepszym wypadku oznaczać z błędem plus minus 10--30%. Dlatego też prof. Marrian wyrażał się z pewnymi zastrzeżeniami co do tego, czy istotnie można wyciągać daleko idące wnioski z wyników uzyskanych na podstawie analizy sterydów w moczu. W każdym razie z naciskiem podkreślił konieczność stosowania metod trudniejszych co prawda, nie nadających się do masowego rutynowego stosowania, ale bardziej precyzyjnych i podnosił wątpliwości co do większości metod używanych zwykle na klinikach. Zwrócił uwagę na poważne straty jakie powoduje powszechnie stosowana kwaśna hydroliza moczu w celu rozkładu połączeń sterydów z kwasem glikuronowym i z kwasem siarkowym, polecając gorąco zastąpienie tego sposobu postępowania użyciem oczyszczanych preparatów β -glikuronidazy i sulfatazy. Mówił krótko o opracowanych w Edynburgu przez jego zespół nowych, jakkolwiek bardzo żmudnych, metodach ilościowego oznaczania estrogenów i pregnandioli, które podobno mają być w najbliższym czasie opublikowane. Jego nastawienie do problemu najlepiej ilustrowały użyte przez niego słowa, wypowiedziane przez znanego chemika-endokrynologa, dr. G. Pincusa. „Ilekoć myślę o wielu próbach opracowania prostych, a łatwych metod oznaczania w moczu estrogenów i 17-ketosterydów, tyle razy zastanawiam się nad tym, czy czas i energia zużyta na te bezowocne i przynoszące rozczarowanie próby nie byłyby lepiej wykorzystane dla badań o wiele bardziej żmudnych, ale prowadzących do sposobów postępowania opartych na zdrowych przesłankach”. Zaznaczyć należy, że większość biorących udział w dyskusji, przyznających się zresztą otwarście do masowego stosowania inkryminowanych przez Marriana metod, godziła się z referentem w jego zasadniczych wnioskach.

Badania sterydów w moczu są istotnie modnym zagadnieniem, co znalazło wyraz w licznych doniesieniach dotyczących odpowiednich metod i ich zastosowania. Oczywiście nie będę wymieniał wszystkich tych doniesień, zwrócę uwagę tylko na doniesienie F. Jayle, O. Crepy i F. Meslina z Paryża, którzy przedstawili metodę żmudną, ale robią-

cą wrażenie dosyć precyzyjnej, oznaczania estrogenów i pochodnych progesteronu, w której tak niebezpieczna hydroliza kwasem solnym jest zastąpiona hydrolizą estrów sterydów za pomocą soku żołądkowego ślimaka. P. L. Munson i współpracownicy z Harvard Medical School badali wydalanie androgenów, oznaczanych w moczu subtelną metodą biologiczną, u starców, kastratów i u osobników z usuniętymi nadnerczami stwierdzając, że nawet u mężczyzn w podeszłym wieku pozbawionych kory nadnercza jądra produkują jeszcze pokaźne ilości androgenów. R. D. Bulbrook wraz z towarzyszami z Londynu usiłował ustalić zależność między wydalaniem estrogenów w moczu w różnych okresach cyklu menstruacyjnego, a zmianami cytologicznymi w rozmazach z pochwy, nie znajdując zupełnie takiej zależności. Zdaniem tych badaczy tylko oznaczanie estrogenów w moczu może dać obraz poszczególnych faz cyklu menstruacyjnego. J. W. H. Lugg i J. M. Bowness z Singapore oznaczali wydalanie różnych frakcji ketosterydów w moczu osobników należących do 6 różnych ras, do czego populacja Malajów stworzyła dogodną sposobność. Znaleźli rzekomo pewne statystyczne korelacje, które mają być znamionną cechą rasową, ale osiągnięte przez nich wyniki były w dyskusji ostro krytykowane.

Referat H. Harrisa o aminoacyduri u człowieka był gruntownym i wyczerpującym omówieniem dotychczasowego piśmiennictwa, dotyczącego tego problemu. W przeciwieństwie do prof. Mariana, referent pominął prawie zupełnie stronę metodyczną, zwracając tylko uwagę na duże trudności z jakimi połączona jest analiza składu aminokwasowego moczu, podkreślając, że właśnie dopiero zastosowanie wymienników jonowych i dwukierunkowej chromatografii bibułowej, a przede wszystkim chromatograficznej analizy według Steina i Moore'a, otworzyło w ogóle możliwość ścisłego badania tego problemu. A problem ten jest zaiste szczególnie ciekawy, o czym świadczyło niemal każde zdanie wypowiedziane przez referenta. Już sam skład ilościowy aminokwasów w moczu zdrowego człowieka, różny dla różnych osobników, ale charakterystyczny niemal dla każdego człowieka z osobna, jest wyrazem stanu biochemicznego uwarunkowanego wybitnie czynnikami genetycznymi. Niezależność składu aminokwasowego moczu od składu aminokwasowego krwi, niezależność od ilości i jakości pobieranych białek — to zagadnienia, których gruntowne przebadanie wymagać będzie jeszcze długotrwałych wysiłków.

Praktycznie ważne aspekty otwiera badanie składu aminokwasowego moczu w warunkach patologicznych, zwiększanie się ogólnej ilości wydalanych aminokwasów, lub też wzmożenie wydalania jednego lub kilku tylko aminokwasów, a więc to co w praktyce nazywamy aminoacydurią.

Referent wyróżnia dwa typy aminoacydurii. Jeden, zwany przez niego „overflow aminoaciduria”, a więc aminoacyduria spowodowana nadmiarem aminokwasów w krwi krążącej, wynikającym z zaburzeń metabolizmu. Drugi typ — to aminoacyduria nerkowa, będąca następstwem upośledzenia resorpcji zwrotnej pewnych aminokwasów w kanalikach nerkowych, występująca przy normalnym poziomie danego aminokwasu w krwi. Do typu „overflow” aminoacydurii zaliczył referent feniloketonurię oraz wydalanie aminokwasów przy schorzeniach wątroby. Do typu aminoacydurii nerkowej zalicza: cystynurię, zespół Fanconiego, galaktozę oraz aminoacydurię w toku gnilca, krzywicy i zatrucia ołowiem. Obszerne wywody referenta na temat patologicznych aminoacydurii mogły uświadomić uczestnikom zebrania w całej pełni bardzo skąpy zakres wiadomości, jaki dotychczas posiadamy w tej dziedzinie.

Problem aminoacydurii, któremu poświęcony był dyskusyjny referat, nie znalazł jednak odpowiedniego wyrazu w doniesieniach oryginalnych. Z piśmiennictwa wiadomo, że zajmuje się tym szereg pracowni w Europie i w Stanach Zjednoczonych, ale najprawdopodobniej badania idą, po przełamaniu trudności metodycznych, w kierunku gromadzenia jak największej ilości materiału pozwalającego na wyciąganie dalej idących wniosków. Odczytano tylko jedno doniesienie dotyczące tego problemu — T. H. J. Huismana i J. H. P. Jonxisa z kliniki pediatrycznej w Groningen, traktujące o wzmożonym wydalaniu pewnych aminokwasów (treonina, seryna, glicyna, lizyna i histydyna, a szczególnie tyrozyna) w stanach niedoboru kwasu askorbinowego, lub witaminu D. Autorowie są raczej skłonni przyjąć, że znane już dawniej wzmożone wydalanie tyrozyny i jej pochodnych w moczu dzieci z objawami gnilca jest spowodowane nie tyle zaburzeniem metabolizmu tyrozyny, ile zaburzeniem zwrotnego wchłaniania tego aminokwasu i podobnych związków w kanalikach nerkowych.

Zbliżonym do poprzedniego, ale odrębnym zagadnieniem, jest sprawa wydalania z moczem różnych bezazotowych kwasów organicznych. W toku Kongresu odczytano 4 doniesienia grupy pracowników szpitala Salpetrière w Paryżu (J. i R. Nordmann, O. Gauchery i in.), która opracowała chromatograficzną metodę rozdziału tych kwasów, sposób ich jakościowego identyfikowania na bibule, a wreszcie szczególną metodę potencjometrycznego miareczkowania wypłuczyn poszczególnych plam chromatograficznych. Autorowie francuscy wykazują w ten sposób w moczu kwasy reprezentujące wszystkie ogniwa cyklu trójkarboksylowego, a poza tym kwas mlekowy, szczawiowy, feniloacetylglutaminę i szereg innych. U ludzi, którym wlewano dożylnie roztwór kwasu bursztynowego stwierdzano następnie w moczu znaczne wzmożenie ilości

kwasów, biorących udział w cyklu *Krebsa* bez równoczesnego wzrostu ilości innych kwasów organicznych.

Elektroforeza bibułowa w swej klasycznej formie oraz w różnych nowszych modyfikacjach stała się dziś metodą pospolitą w laboratoriach, znajdującą szczególnie częste zastosowanie w rozwiązywaniu problemów klinicznych. Część nielicznych zresztą w toku Kongresu demonstracji metod i doświadczeń wiązała się właśnie z elektroforezą bibułową, przy czym zaznaczyć trzeba, że podkreślano jako osiągnięcia zabiegi metodyczne dosyć nawet już pospolite, np. elektroforeza bibułowa ciągle była demonstrowana jako nowość, chociaż my w Krakowie posługujemy się nią od przeszło roku. Kilka doniesień oryginalnych, opartych na zastosowaniu elektroforezy bibułowej dotyczyło oznaczania lipoproteidów surowicy w różnych stanach patologicznych. Wszystkie one były ciekawymi przyczynkami, wszystkie jednak wskazywały również na to, że trzeba zebrać bardzo wiele materiału klinicznego, przebadanego w odpowiedni sposób, zanim będzie możliwe wyciąganie jednoznacznych praktycznych wniosków z badań przy pomocy elektroforezy bibułowej. Niemniej zainteresowanie tym sposobem podejścia do problemu biochemii miażdżycy jest wielkie i zdaje się wskazywać na to, że badania te idą po słusznej drodze.

Szereg doniesień wiązało się z problemem biochemii nowotworów. W porównaniu z obfitością prac z tej dziedziny, jaką napotykamy w piśmiennictwie, udział doniesień z chemii onkologicznej w obradach Kongresu był raczej skromny i — co więcej — częściowo wyrażał się w powtarzaniu znanych już doświadczeń, kończących się potwierdzeniem poprzednio uzyskanych wyników. Ale wśród tych doświadczeń zasługuje na uwagę kilka, ze względu na wagę zagadnienia, lub też z uwagi na rozmiary wkładu doświadczalnego. Wymienię np. badania nad metabolizmem komórek przeszczepialnego, tzw. „Acites-Tumor” Ehrlicha u myszy. Jest to szczególnie dogodny obiekt dla badań biochemicznych, bo pozwala posługiwać się zawiesiną czystych, jednorodnych komórek nowotworowych, wolnych od substancji międzykomórkowej. F. Seelich i W. Weigert z Wiednia stwierdzili ciekawe zjawisko, polegające na tym, że glikoza dodana do płynu odżywczego komórek Ascites-Tumor, zamiast wzmacniać — hamuje oddychanie tych komórek, powoduje więc coś w rodzaju odwrotnego efektu Pasteura-Meyerhofa. Częściowe wytłumaczenie tego zjawiska przyniosło doniesienie z pracowni prof. Šorma w Pradze. Według czeskich badaczy substratem oddychania komórek Ascites-Tumoru jest nie glikoza lub glikogen, lecz kwasy tłuszczowe.

Ciekawym było również doniesienie D. L. Woodhouse'a z Bir-

mingham. Rozbudowując znaną już od kilku lat koncepcję Millerów, według której substancje rakotwórcze okazują swoiste powinowactwo do pewnych określonych białek komórki i swoście wiążą się z tym białkiem eliminując je z normalnych procesów metabolicznych, Woodhouse badał łączenie się różnych rakotwórczych i nierakotwórczych węglowodorów aromatycznych z białkiem skóry i wpływ różnych czynników na wytwarzanie się tych połączeń.

E. Balis i D. Van Praag z Nowego Jorku badali włączanie znakowanych izotopowym węglem puryn i pirymidyn w obręb kwasów nukleinowych w przeszczepialnych tumorach. Stwierdzili oni, że równocześnie z przeszczepianiem przeprowadzane częściowe wycięcie wątroby u szczurów nosicieli tumoru wywiera poważny wpływ na tę zdolność wykorzystywania gotowych układów pierścieniowych do budowy kwasów nukleinowych. Autorzy spodziewają się wyciągnąć z wyników tych doświadczeń praktyczne korzyści przy leczeniu nowotworów anty-metabolitami puryn i pirymidyn.

M. Rapport i L. Graf z Nowego Jorku wystąpili z doniesieniem o serologicznych metodach wykazywania antygenów swoistych dla poszczególnych tkanek. Metoda opracowana przez referentów nie wydaje się być prostą, przynajmniej dla mnie, nefachowca. W każdym razie posługując się tym własnym sposobem, referenci wykazali swoisty antygen w tkance mięsaka limfatycznego, różny od antygenów 6 innych normalnych tkanek.

Dwa doniesienia dotyczyły występowania nukleinaż z surowicy krwi ludzkiej. P. Metais i P. Mandel z Paryża oznaczali rybonukleinażę, stosując dosyć żmudną metodę chemiczną, polegającą ostatecznie na oznaczaniu widma puryn i pirymidyn w świetle pozafioletkowym. Doszli do wniosku, że przeciętna zawartość tego enzymu w krwi osobników zdrowych wynosi około 60 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, przy czym nie stwierdzili żadnej różnicy w porównaniu z tą wartością w surowicy osobników dotkniętych różnymi schorzeniami. K. Schreier i A. Raspe z Heidelbergu oznaczali zmiany w zawartości desoksyrybonukleinaż w surowicy krwi, dochodząc do wniosku, że wahania w zawartości tych enzymów pozwalają ocenić tempo rozkładu jąder komórkowych. O tych dwóch doniesieniach wspominam szczególnie z tego powodu, że analogiczne badania — jakkolwiek oparte na użyciu bardziej prymitywnych metod — przeprowadzane są również u nas w Polsce.

Mówiłem już o tym, że szereg doniesień odczytanych na sekcjach patologii chemicznej i chemii klinicznej dotyczyło zagadnień metodycznych. W związku z tym zwrócę uwagę na to, że J. H. Wilkinson i N. F. Madagan z Londynu podali metodę chromatograficznego wy-

krywania trój-jodotyroniny i tyroksyny w surowicy krwi. W odróżnieniu od znanych metod, które wykrywały oba te jodowane aminokwasy, posługując się radioaktywnym jodem badacze angielscy zastosowali dla wykrywania plam jodowanych fenoli na bibule, katalityczny wpływ tych związków na odbarwianie siarczanu ceru kwasem arsenawym. Metoda niewątpliwie nie jest prosta, ale możliwość wyeliminowania pracy z promieniotwórczym jodem w tego typu badaniach, może mieć pewne znaczenie.

Specjalnie zagadnieniom metodycznym był poświęcony duży referat dyskusyjny P. Grabara z Paryża pt. „Badania mieszaniny białek przy pomocy analizy elektroforetycznej i immunoelektroforetycznej w środowisku o charakterze żelu”. Referent przedstawiał dosyć szczegółowo opracowane przez siebie metody, które w zasadzie polegają na tym, że mieszanina białek poddana jest elektroforezie w środowisku stabilizowanym przez agar lub gelożę. Po ukończeniu elektroforezy doprowadza się do dyfuzji surowicy odpornościowej przez warstwę żelu, w którym zostały uprzednio rozmieszczone elektroforetycznie w odpowiednich miejscach poszczególne białka. Z chwilą, gdy surowica odpornościowa przebiegnie tę samą drogę jaką przebiegła mieszanina białek podczas elektroforezy, w miejscach w których rozmieszczone są odpowiednie frakcje białkowe poswtają widoczne okiem strąty skutkiem reakcji antygenu z przeciwciałem. Według Grabara ten sposób postępowania pozwala różnicować frakcje białek surowicy nie dające się wykazać przy pomocy klasycznej metody elektroforezy swobodnej lub bibułowej.

Poza tym w sekcji patologii chemicznej ogłoszono kilka doniesień z zakresu immunochemii, na temat których mógłbym wypowiedzieć się tylko na podstawie ich drukowanych streszczeń, i to z najdalej idącymi zastrzeżeniami, ponieważ nie znam się na tych sprawach. Zdaje mi się, że najciekawszym z tego zakresu było doniesienie R. R. Portera i J. Humphreya z Medical Research Council w Londynie. Autorzy opracowali, opublikowaną zresztą niedawno, metodę frakcjonowego rozdzielania γ -globulinu na kolumnie wypełnionej celitem. Badając w ten sposób γ -globulin surowicy odpornościowej królika, skierowanej przeciw albuminowi jaja kurzego, wirusowi grypy i przeciw pneumokokom stwierdzili, że swoiste przeciwciała występuje w dwóch różnych frakcjach γ -globulinu, i to początkowo tylko w jednej, a dopiero po dłuższym czasie uodpornienia w drugiej frakcji. Poza tym wspomnę o doniesieniu W. J. Kuhnsa i F. J. Dixona z Pittsburga, którzy badali kinetykę reakcji z toksyną i antytoksyną błoniczą człowieka, posługując się toksyną znakowaną promieniotwórczym jodem. Wreszcie M. F. Jayle i G. Boussier z Paryża komunikowali o swych wyczerpujących badaniach nad haptoglobina, wykazując jej mukoproteidowy charakter.

Z dużym zainteresowaniem spotkał się referat poglądowy pioniera stosowania izotopów w badaniach biochemicznych, laureata Nobla, G. Hevesy'ego, o efektach biologicznych energii promienistej. Niestety referat wielkiego uczonego sprawił słuchaczom rozczerowanie. Nie wnosił on żadnych nowych, mało znanych faktów, ani nowych uogólnień porzysztając na dosyć przejrzyszym i prostym sformułowaniu zasadniczych, znanych od dawna hipotez. Zresztą sprawy biologicznego działania energii promienistej dotyczyło kilka oryginalnych doniesień, z których najbardziej interesującym był krótki referat R. Kocha i U. Hagen a z Fryburga w Badenii. Autorzy zajmowali się znanym już ochronnym działaniem cysteaminy przeciw skutkom naświetlania ustroju promieniami Roentgena. Fakt, że charakterystycznym zaburzeniem popromiennym jest zahamowanie procesów acetylacji w wątrobie nasuwał przypuszczenie, że istotą tych zaburzeń jest zniszczenie koenzymu A, którego regenerację umożliwia wprowadzenie cysteaminy. Wyczerpujące badania autorów wykazały, że jednak mechanizm działania cysteaminy musi być odmienny i że prawdopodobnie zahamowanie acetylacji w wątrobie nie jest swoistym następstwem działania energii promienistej, lecz towarzyszy również innym stanom patologicznym.

W sekcji poświęconej nauce o odżywianiu dominowały dwa zagadnienia: mechanizm pobudzania wzrostu niektórych zwierząt przez antybiotyki oraz problem witaminu B₁₂. Pierwszemu zagadnieniu poświęcone były dwa referaty dyskusyjne. Jeden z nich był wygłoszony przez znanego witaminologa, E. L. R. Stokstada, kierownika laboratorium naukowego znanego koncernu amerykańskiego Lederle, drugi przez naszego rodaka, dyrektora Instytutu naukowego mleczarstwa w Reading pod Londynem, prof. S. K. Kona.

Referat Stokstada był właściwie sumiennym zebraniem dotychczasowego piśmiennictwa, bez wkładu osobistych poglądów referenta. W najlepszym wypadku można dojść do wniosku po zapoznaniu się z tym referatem — że nie ulegający wątpliwości znaczny przyrost wagi u świń i u drobiu karmionego z dodatkiem różnych antybiotyków oraz obserwowany przez niektórych autorów mniej wyraźny przyrost wagi cieląt i szczurów w tych samych warunkach, należy wytłumaczyć różnorodnym mechanizmem. Zdaniem Stokstada w rachubę wchodzi zahamowanie wzrostu drobnoustrojów przewodu pokarmowego, produkujących substancje szkodliwe oraz wzmożenie wzrostu drobnoustrojów produkujących różne witaminy z grupy witaminów B. W rzeczywistości jednak treść referatu Stokstada wskazywała na rozliczne sprzeczności w wynikach doświadczeń różnych autorów i świadczyła o tym, jak bardzo rozległym polem dla przeróżnych hipotez jest problem wpływu antybiotyków na wzrost.

O wiele bardziej zdecydowany charakter i wyraźnie indywidualne oblicze cechowały referat dyskusyjny prof. Kona. Referent wychodził z założenia, że niemal z reguły młody drób i prosięta hodowane na fermach znajdują się w stanie pewnego rodzaju nie dających się klinicznie ująć zaburzeń, spowodowanych najróżnorodniejszymi utajonymi infekcjami. Do tego wniosku dochodził prof. Kon na podstawie licznych doświadczeń, polegających na przenoszeniu grup zwierząt z jednych klatek do drugich, na zamianie pomieszczeń i budynków hodowlanych, na przenoszeniu zwierząt z jednej fermy do drugiej. Antybiotyki usuwając owe infekcje powodujące subkliniczne zaburzenia wzmagają ogólny stan zdrowia zwierzęcia, ułatwiają pobieranie większej ilości pokarmów, lepsze wykorzystywanie witaminów, — słowem, stwarzają warunki umożliwiające maksymalny wzrost zwierzęcia. Niemniej i to właśnie było szczególnie interesujące — prof. Kon nie wyklucza możliwości bezpośredniego wpływu niektórych antybiotyków, a nawet ich produktów rozpadu, na metabolizm tkanek zwierzęcych. O takich możliwościach świadczą przytaczane przez referenta wyniki doświadczeń różnych autorów, według których wzmoczony wzrost kur i świń można uzyskać przez dodawanie do karmy penicyliny w różny sposób inaktywowanej, a nawet przez podawanie jednego ze składników penicyliny — penicylaminy. Wreszcie referent przytoczył również nieopublikowane jeszcze, niezmiernie ciekawe badania grupy fizjologów amerykańskich z Uniwersytetu Notre Dame w Stanie Indiana, z Reyniersem i Luckeyem na czele. Jak wiadomo grupa tych badaczy specjalizuje się od lat w hodowaniu zwierząt w warunkach idealnie aseptycznych. Okazało się, że drób hodowany w tych warunkach, nie posiadający w przewodzie pokarmowym żadnej flory bakteryjnej, reaguje wyraźnym wzmoczeniem wzrostu na podawanie drobnych dawek antybiotyków. Przemawiałoby to w każdym razie zdecydowanie przeciwko poglądom przeważającym w omawianym poprzednio referacie Stockstada, upatrującym istotę wpływu antybiotyków na wzrost zwierząt w zmianie charakteru flory bakteryjnej.

Zaznaczyć również należy, że wspomniany już Reynier z Uniwersytetu Notre Dame, miał obszerny referat o technice hodowania szczurów w warunkach aseptycznych, bardzo bogato ilustrowany przezroczami. Referat ten oczywiście nie nadaje się do streszczenia.

Referaty dyskusyjne Stockstada i Kona wysunęły problem wpływu antybiotyków na wzrost zwierzęcy na czołowe miejsce wśród tematów, którymi zajmowała się sekcja nauki o odżywianiu, co jednak nie znalazło oddźwięku w doniesieniach oryginalnych. Jedno tylko takie doniesienie było przedstawione przez L. Y. Quinna z Iowa State College w Stanach Zjednoczonych. Autor prowadził doświadczenia z pro-

sietami, do których karmy dodawano aureomycynę, badał charakter zmian flory drobnoustrojowej w toku eksperymentów, stwierdzając wybitny spadek udziału enterokoków w populacji przewodu pokarmowego, a znaczny przyrost pleśni. Okazało się, że hodowle rozwijających się w tych warunkach pleśni produkują jakąś substancję, która wydzielana w stanie oczyszczonym wzmacnia przyrost wagi prosiąt. Eksperymenty Quinn'a przemawiają więc raczej za słusnością hipotez upatrujących przyczynę wzmocnienia wzrostu po podawaniu antybiotyków w zmianie charakteru flory jelitowej.

W doniesieniach oryginalnych podczas obrad sekcji nauki o odżywianiu ilościowo i jakościowo wysuwały się na pierwszy plan wyniki badań dotyczących witaminu B₁₂. Z szeregu pracowni donoszono o uzyskaniu czynnika wewnątrzpochodnego Castle'a w stanie daleko posuniętej czystości albo nawet — jak niektórzy twierdzili — w stanie zupełnie oczyszczonym. Do całkowitej czystości zdaje się słusznie pretendować preparat czynnika wewnątrzpochodnego, uzyskany przez J. C. Andresena i A. P. Skouby z Kopenhagi. Otrzymane przez tych badaczy białko wiąże cyjanokobalaminę w ilościach 18 µg na 1 mg białkowego azotu. Połączenie tego białka z witaminem B₁₂ zachowuje się w warunkach doświadczalnych jako zupełnie jednorodny związek o masie cząsteczkowej około 80 000. Preparat Andresena był badany w Reading przez Holdswortha, który stwierdził, że białko to jest mukoproteidem zawierającym 28% cukrowców reprezentowanych przez jakąś heksozaminę, mannozę, galaktozę i fukozę. Analogiczne wyniki w toku swych badań, zmierzających do oczyszczenia wewnątrzpochodnego czynnika Castle'a otrzymał H. C. Heinrich z Hamburga. Jego preparat zawierający 15 µg cyjanokobalaminy na 1 mg azotu białkowego badany był klinicznie, przy czym zdecydowane efekty uzyskiwano dawkami preparatu zawierającymi zaledwie 2 µg witaminu. Preparat otrzymany przez Wijmenga ze znanej wytwórni holenderskiej Organon Oss zdaje się być mniej czystym niż poprzednio omówione produkty. Wreszcie A. L. Latner z New-Castle opisał otrzymany w jego pracowni produkt, odpowiadający czynnikowi wewnątrzpochodnemu, zachowujący się w toku chromatografii i przy elektroforezie jak związek jednolity, będący również mukoproteidem, ale mający znacznie mniejszą masę cząsteczkową niż preparaty Heinricha i Andresena.

Instytut Kona w Reading wystąpił również jeszcze z kilkoma innymi doniesieniami, dotyczącymi witaminu B₁₂. Badano w doświadczeniach na kurczętach efekt fizjologiczny różnych odmian witaminu B₁₂ uzyskanych z odchodów zwierzęcych względnie w hodowlach drobnoustrojów z dodatkiem pewnych metabolitów, które po wbudowaniu

w cząsteczkę witaminu zmieniały w pewnym stopniu jego strukturę. Te pochodne witaminu B₁₂, których terminologia wciąż jeszcze jest nieustalona, nie okazują żadnej aktywności biologicznej w organizmie kurczęcia, albo okazują aktywność znikomą w porównaniu z cyjanokobalaminą. Gromadzą się w wątrobie zwierzęcia, ale w cyjanokobalaminę nie zamieniają się. Niektóre z nich ujmowane dzisiaj w grupę tzw. pseudowitaminów B₁₂ działają wprost jako antymetabolity cyjanokobalaminy utrudniając jej wchłanianie z przewodu pokarmowego i gromadzenie się w wątrobie. Kon i K. M. Henry mówili również o pięknych doświadczeniach, przeprowadzanych na szczurach, mających na celu wyjaśnienie roli metabolicznej witaminu B₁₂. Trudno w kilku zdaniach przedstawić istotę tych doświadczeń polegających głównie na karmieniu szczurów kazeiną z różnymi dodatkami, jak np. homocysteina, cholina, metionina itd. W każdym razie na podstawie tych sumiennych przeprowadzanych a pomysłowych doświadczeń autorzy dochodzą do wniosku, że witamin B₁₂ nie bierze żadnego udziału w procesie transmetylacji, natomiast jest niezbędny dla wytwarzania grup metylowych z seryny lub glicyny. Do tego samego wniosku doszli również badacze amerykańscy B. C. Johnson i S. P. Mistry na podstawie doświadczeń przeprowadzanych z prosiakami i kurczętami, u których przez karmienie dietą ubogą w cholinę wywoływano stłuszczenie wątroby.

Pozostałe oryginalne doniesienia w sekcji nauki o żywieniu dotyczyły różnych zagadnień i — moim zdaniem — nie wnosiły niczego szczególnie frapującego. Odczytano kilka doniesień dotyczących stosunkowo zaniedbywanej dotychczas fizjologii witaminu E. Między innymi P. L. Day i J. D. Dinning z Uniwersytetu w Arkansas opisywali objawy awitaminozy E u *Macacus rhesus*, pokrywające się na ogół z dobrze znanymi objawami tej awitaminozy u pospolitych zwierząt doświadczalnych. T. Morre z Cambridge opisywał doświadczenia, w których udawało się usuwać objawy porażeń mięśniowych u szczurów pozbawionych witaminu E przez podawanie błękitu metylenowego. Inne zaburzenia charakterystyczne dla awitaminozy E nie ustępowały po błękitie metylenowym. Pokrywałoby się to z poglądem upatrującym w tokoferol czynnik antyoksydacyjny dla pewnych składników mięśni.

Wreszcie zootechników zainteresować mogły doniesienia H. Hilla i W. Prinza z Hannoveru, którzy przedstawili wyniki rozległych, systematycznych doświadczeń, przeprowadzanych na bardzo bogatym materiale, zmierzających do wykazania różnic w składzie białkowym organizmu świń karmionych wyłącznie białkiem roślinnym i karmionych z dodatkiem mąki rybnej. U świń odżywianych wyłącznie białkiem roślinnym zaznacza się wybitny spadek zawartości suchej substancji

azotowej w mięśniach i w wątrobie, a szczególnie duży spadek zawartości takich aminokwasów, jak tryptofan, izoleucyna i metionina.

Zdaję sobie sprawę z tego, że przedstawiona przeze mnie treść obrad trzech sekcji Kongresu biochemików może zaledwie w znikomym stopniu zobrazować ich istotną wartość. Sądzę, że jednak już to co przedstawiłem wystarczająco ilustruje różnorodność poruszanej problematyki, przybierającą czasami charakter chaosu. Zdaje mi się, że nie popełnię błędu, jeżeli powiem, iż obrady tych trzech sekcji, o których mówiłem, nie mogły się poszczycić takimi, niemal sensacyjnymi momentami, jakimi były referaty o fotosyntezie, o syntezie białek, o cyklicznych peptydach itd. wygłoszone w innych sekcjach. Żadne z doniesień oryginalnych nie wniosło niczego specjalnie nowego i żaden z pośród referatów dyskusyjnych nie mógł być źródłem przeżyć dla słuchaczy. Materiał jednak był wystarczająco bogatym źródłem najprzeróżniejszych dyskusji, przebiegających głównie nie na salach obrad, ale w kularach. Zdaje się, że te właśnie dyskusje były najciekawsze, najwięcej dające trwałych wartości uczestnikom, ale tych dyskusji oczywiście nie da się zreferować.

PIOTR P. SŁONIMSKI

Adaptacja procesów oddechowych: rozwój układu hemoproteidowego, indukowanego przez tlen^{*)}

Układ hemoproteidowy jest układem, który spełnia rolę narzędzia w końcowych procesach utleniania w komórce; wartość jego jest niewątpliwa. Ponieważ nie można stworzyć tego narzędzia, zadowolmy się próbą wyjaśnienia, w jaki sposób komórka je tworzy.

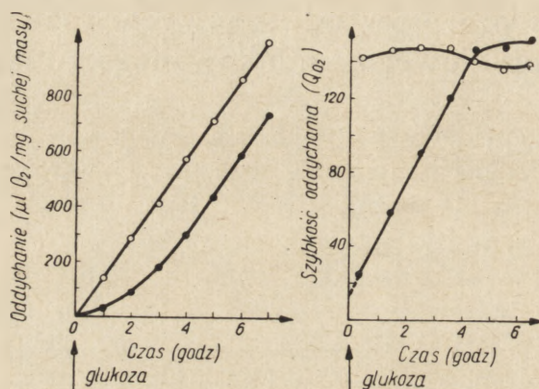
Oddychanie prawie wszystkich komórek, które żyją w atmosferze powietrza jest katalizowane przez enzymy, należące do układu Warburga-Keilina (1-3). Prawdopodobnie nigdy nie dowiemy się, jak wśród świata żyjących rozwinął się układ, który pozwala na zużytkowanie O_2 jako akceptora elektronów. Może w przyszłości dowiemy się, jak komórka tworzy hemoproteidy, wchodzące w skład układów oddechowych. Tematem mego referatu będzie tworzenie układu oddechowego, indukowanego przez O_2 u drożdży.

Drożdże, w odpowiednim środowisku, rosną prawie równie dobrze w warunkach tlenowych, jak i w warunkach beztlenowych (4, 25, 26). Hodowane w obecności O_2 , drożdże posiadają układ enzymów oddechowych niewiele różniący się np. od takiego samego układu w mięśni sercowym. Te same drożdże, hodowane przez jeden dzień w nieobecności O_2 , nie posiadają enzymów oddechowych i w konsekwencji nie oddychają. O_2 indukuje tworzenie się układu hemoproteidowego, który może się formować nawet wtedy, gdy nie zachodzi podział komórkowy. W trakcie tego referatu będę nazywał „adaptacją procesów oddechowych” całość rozwoju, indukowanego przez O_2 , którego głównym wynikiem jest zwiększenie szybkości zużycia tlenu. Będę używał określenia „indukowana biosynteza” (5), mówiąc o poszczególnych hemoproteidach. Ograniczę analizę tego zjawiska do przypadku drożdży, gdyż zjawisko na tym materiale zostało najlepiej poznane (6—26). Możliwe, że to same zjawisko zachodzi także i w innych ustrojach, które mogą żyć w obecności lub w nieobecności powietrza (27—30).

*) Autoryzowany przekład odczytu wygłoszonego na Kongresie w Brukseli.
Tłumaczyła Alina Linde (Red.).

Opis zjawiska

Fakt, że adaptacja procesów oddechowych może odbywać się wtedy, gdy nie ma źródła azotu poza komórką, dającego się asymilować tzn. wtedy, gdy nie ma wzrostu, — fakt ten ogromnie ułatwił badanie tego zjawiska. Drożdże, hodowane przeważnie w nieobecności O_2 (drożdże beztlenowe) zawieszają się po prostu w buforze, zawierającym źródło energii i węgla (np. glukozę) i przewietrza się (rys. 1).



Rys. 1. Adaptacja procesów oddechowych. Drożdże, hodowane w warunkach tlenowych (białe kółka) lub beztlenowych (czarne kółka), wymywa się, zawieszają w buforze i przewietrza. Na początku przewietrzania, tzn. 20 min. przed rozpoczęciem pomiarów manometrycznych dodaje się glukozę w stężeniu 0.007M.

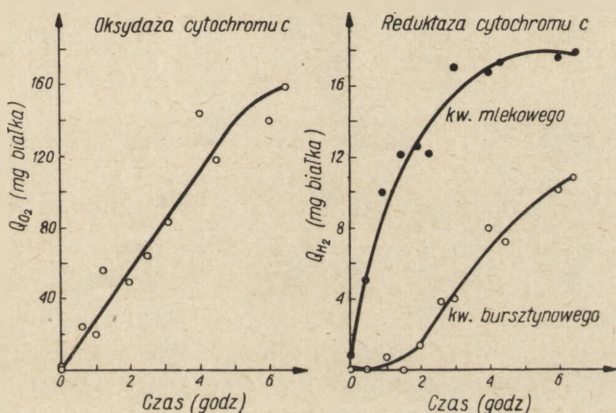
Szybkość oddychania wzrasta w danym czasie, gdy tymczasem w przypadku drożdży hodowanych w warunkach tlenowych — pozostaje stała. Tak jak miarą oddychania jest jego szybkość (dO_2), dt, jednostki $Q_{O_2} = \mu l O_2 / mg$ suchej masy/godz), tak miarą adaptacji procesów oddechowych jest szybkość tej adaptacji (d^2O_2/dt^2 , jednostki $A_{O_2} = \mu l O_2 / mg$ suchej masy/godz²). A zatem A_{O_2} jest miarą przyspieszenia Q_{O_2} . Wartości Q_{O_2} drożdży adaptowanych i nieadaptowanych wynoszą odpowiednio 7 ± 3 i 150 ± 10 , a wartości A_{O_2} mogą zmieniać się zależnie od warunków doświadczalnych od 0 do 30.

Enzymy, indukowane przez tlen

Do badań należy drożdże rozetrzeć a następnie badać czynności enzymatyczne ekstraktów ogólnie przyjętymi metodami (tab. 1). Tabela 1 nie pozwala nam na porównanie wartości enzymów tej samej hodowli drożdży, lecz tylko czynności enzymatycznych dwóch różnych hodowli drożdży. Stosunek czynności enzymatycznych dla większości enzymów odpowiada stosunkowi stężenia białek enzymatycznych w nieuszkodzo-

nych komórkach, zarówno adaptowanych, jak i nieadaptowanych. Argumenty, które przemawiają za taką interpretacją były omówione gdzieś indziej (18, 25). Niektóre z czynności enzymatycznych, podanych w tab. 1 przedstawiają układy złożone z conajmniej dwóch różnych białek (31—33), co powoduje wzrost ilości enzymów, wchodzących w skład układu adaptacji procesów oddechowych. Trudno jest zorientować się, z przyczyn oczywistych, czy niewielkie wartości czynności enzymatycznych nieadaptowanych drożdży odpowiadają rzeczywiście tym czynnościom, czy też należy je przypisać nieswoistym procesom oksydo-redukcyjnym. Szczególnie duży wysiłek poświęcono badaniu oksydazy cytochromu *c*. Zawartość tego enzymu w komórce odpowiada wartości mniejszej niż 1/200 jego stężenia w przypadku drożdży zadaptowanych.

Mimo to, że tlen powoduje tworzenia się całego układu poly-enzymatycznego, poszczególne biosyntezy nie są jednocześnie (rys. 2).



Rys. 2. Wzrost poziomu trzech enzymów hemoproteidowych w ciągu adaptacji procesów oddychowych. Adaptacja w obecności glukozy 0.007M.

Biosynteza oksydazy cytochromu *c* oraz prawdopodobnie cytochromu *c* zachodzi jednocześnie z całkowitą adaptacją procesów oddechowych. Te dwa enzymy są zatem czynnikami ograniczającymi wzrost Q_{O_2} całej komórki, co zgodne jest z pomiarami ich liczby obrotów *in situ* (34,3). Natomiast wydaje się, że przeciwnie reduktaza bursztynowo-cytochromowa (*c*) nie bierze aktywnego udziału w oddychaniu, gdyż wzrost jej czynności różni się 0, w przedziale, w którym Q_{O_2} wzrasta od 5 do 50 (rys. 2).

Jasnym jest także, że układ kwasów trójkarboksylowych u drożdży nie jest wyłącznie częścią przemiany tlenowej (tabl. 1). Wyniki dostarczone przez badanie adaptacji procesów oddechowych potwierdzają dane, otrzymane metodami zupełnie niezależnymi (3,35).

Tablica 1

Enzymy, utworzone w czasie adaptacji procesów oddechowych

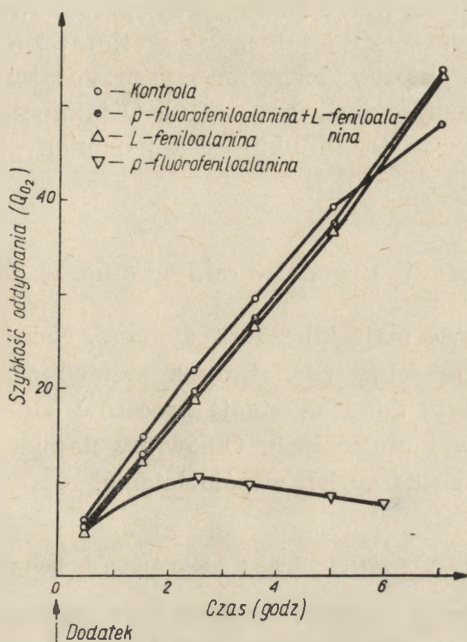
E n z y m	Aktywność drożdży		Wzrost aktywności
	niezadapto- wanych	adapto- wanych	
Oksydaza cytochromu c ($\mu\text{l. O}_2/\text{godz.}$)	<1	180	> 200 x
Peroksydaza cytochromu c (jedn.cf.23)	<0,03	1,6	> 50 x
Katalaza (cf.22)	<0,3	10	> 30 x
Cytochrom c ($\text{mol} \times 10^{-10}$)	około 0,1	1,8	około 20 x
Reduktaza mlekowo-cyt. c ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	„ 0,5	25	„ 50 x
„ α -glicerofosforano-cyt. c ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	<0,2	12	> 50 x
„ DPNH-cyt. c ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	około 1,6	64	około 40 x
„ bursztyno-cyt. c ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	„ 0,3	13	„ 40 x
Akonitaza ($\mu\text{l. cis-akoninian.}/\text{godz.}$)	5	96	20 x
Fumaraza ($\mu\text{l. fumaran}/\text{godz.}$)	120	800	7 x
Dehydrogenaza jabłkowa (DPN) ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	20	110	6 x
Dehydrogenaza izocytrynowa (DPN) ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	7	20	3 x
Dehydrogenaza alkoholowa (DPN) ($\mu\text{l. H}_2/\text{godz.}$)	83	35	0,4 x

Rozwojowi czynności enzymatycznych podczas adaptacji odpowiada ją zmiany spektroskopowe, które można zauważyć bezpośrednio na żywej komórce. Widzimy, jak zjawiają się cytochromy *a*, *a*₃, *b* i *c*, nieobecne w drożdżach, hodowanych w warunkach tlenowych. Hemochromogeny rodzime, typu *b*₁ i *a*₁ obecne w drożdżach, hodowanych w warunkach beztlenowych znikają w miarę, tworzenia normalnego układu. Ani rola tych beztlenowych hemochromogenów, ani ich udział w biosyntezie cytochromów normalnych nie jest jasny. Prawdopodobnie są one prekursorami grup heminowych, lecz nie wiadomo, czy wchodzą w skład utworzonych apoenzymów. Adaptacji procesów oddechowych towarzyszy stosunkowo mało zmian w całkowitej zawartości hemin, a dodatek feroprotoporfiryny nie wpływa na szybkość tej adaptacji. Należy więc wyraźnie rozróżniać zmiany w budowie enzymów oddechowych, wywołanych przez spadek hemin (36—39). Nie należy z tego jednak wnioskować, że heminy nie grają żadnej roli w mechanizmie indukowania zapomocą O₂ lub w biosyntezie apoenzymów heminowych.

Biosynteza hemoproteidów indukowana przez O₂ dotyczy przede wszystkim części białkowych enzymu. Związki analogiczne aminokwasów, jak np. p-fluoro-fenylalanina (40) hamują adaptację procesów oddechowych (rys. 3) oraz hamują tworzenie katalazy (22).

Później okaże się, w jaki sposób adaptacja procesów oddychania zależna jest od obecności puli aminokwasów wewnątrzkomórkowych. Z danych, że biosyntezie enzymów oddechowych nie towarzyszy odpo-

wiedni wzrost ogólnej ilości białek komórkowych należałoby wnioskować, że albo suma wszystkich utworzonych enzymów jest o około 20%



Rys. 3. Hamowanie adaptacji procesów oddechowych, wywołane przez związek analogiczny aminokwasu (p-fluoro-feny-loalanina 0,009M). Zniesienie hamowania przez homolog (l-fenyloalanina 0,009M). Adaptacja w obecności glukozy 0,17M.

mniejsza od ilości białek, co jest bardzo mało prawdopodobne, albo, że jednocześnie mają miejsce rozpady uzupełniające niedobór.

Swoistość indukcji tlenem

Wśród licznych akceptorów elektronów i wodoru, mogących utlenić część układu oddechowego, żaden nie jest w stanie zastąpić tlenu w jego możliwościach indukowania adaptacji procesów oddechowych. Oczywiście można sądzić, że biosynteza katalazy i peroksydazy cytochromu c nie jest indukowana przez tlen cząsteczkowy, lecz przez nadttlenki, które tworzą się w obecności tego enzymu. Można by było rozstrzygnąć ten problem, używając jako induktorów nadttlenków w warunkach beztlenowych. Pierwsze próby poczynione w tym kierunku nie dały wyników, pozwalających na jakieś wnioski.

Możliwe, że rozwój całego układu hemoproteidowego da się wytłumaczyć szeregiem indukcji — tlen indukowałby biosyntezę oksydazy cytochromu c, oksydaza cytochromu c biosyntezę cytochromu c, który z kolei indukowałby tworzenie reduktazy cytochromu c itd., zgodnie

z koncepcją kolejnych adaptacji (41, 42). Łańcuch indukcji szedłby tą samą drogą, co przenoszenie elektronów i wodoru podczas oddychania, lecz w odwrotnym kierunku. Wtedy, gdy proponowałem tę interpretację, nie można było przy jej pomocy wytłumaczyć roli indukcyjnej tlenu w procesie biosyntezy cytochromu c w przypadku odmiany drożdży, pozbawionych oksydazy cytochromu c (18). Ostatnio tę hipotezę podjęto na nowo, wykazując, że O_2 indukuje u tej odmiany peroksydazę cytochromu c (23).

Scalenie adaptacji procesów oddychania w metabolizmie

Enzymy oddechowe mają kluczową czynność. Należy więc oczekiwać, że ich rozwój będzie ściśle powiązany z metabolizmem komórki. Jak i wszystkie biosyntezy, tak i adaptacja procesów oddechowych wymaga energii i materiałów budulcowych. Omówimy najpierw osobno te dwa czynniki, a później zbadamy ich współdziałanie.

Związek między działaniem a biosyntezą hemoproteidów

Problem ten można najpierw postawić w następujący sposób: czy czynność katalityczna enzymów oddechowych jest niezbędna przy ich formowaniu? Jeśli odpowiedź jest przecząca, należy inaczej problem postawić: czy czynność katalityczna enzymów oddechowych wpływa na ich tworzenie? W pierwszym pytaniu należy rozróżnić dwie przeciwstawne hipotezy, jedną, która mówi, że rozwój układu hemoproteidowego jest spowodowany samym procesem oddychania, i drugą, która zakłada, że rozwój ten jest spowodowany przez O_2 . Zadając drugie pytanie chcielibyśmy się dowiedzieć, jak oddychanie wpływa na biosyntezę enzymów, za oddychanie odpowiedzialnych.

Czynność katalityczna nieuszkodzonych drożdży i ekstraktów bezkomórkowych jest hamowana do połowy azydkiem sodu w stężeniu $1,1 \times 10^{-6}$ M. Aby natomiast zahamować indukowane tworzenie katalazy, należy dodać 500—1000 razy więcej azydku. Katalaza, której czynność enzymatyczna została zredukowana do 99% lub więcej jest syntetyzowana tak, jak enzym, który nie został zahamowany (24).

Podobny wynik daje hamowanie adaptacji procesów oddechowych oraz biosyntezy oksydazy cytochromu c przy pomocy KCN. Cjanek hamuje działanie enzymów oddechowych drożdży (hamowanie w 50% przy stężeniu 5×10^{-6} M (43). Trzeba dodać co najmniej 100 razy więcej inhibitora, by obniżyć do połowy adaptację procesów oddychania. Oksydaza cytochromu c, której aktywność jest zmniejszona o 95% jest normalnie

syntetyzowana. Prawdopodobnie hamujące działanie KCN na adaptację procesów oddechowych jest pośrednio wynikiem zmian w ogólnym metabolizmie.

Wyniki, dotyczące hamowania czynności katalitycznej hemoproteidów, wskazują na możliwość, że ta czynność nie jest koniecznym warunkiem ich biosyntezy. W przypadku indukowanych hydrolaz dochodzi się do tego samego wniosku, używając innego typu doświadczeń uzupełniających (44—46). Jest bardzo ważny wniosek, gdyż w jego świetle okazuje się, że hipoteza o tworzeniu enzymów przez indukcję, oparta poprostu na ich czynności katalitycznej jest mało prawdopodobna (47). Trzeba jednak pamiętać o dwóch następujących względach: a) szybkość, z którą enzym działa na substrat jest conajmniej 1000 razy większa, niż szybkość z którą komórka ten enzym tworzy. Inaczej mówiąc, gdy komórka utworzyła jednostkę enzymu, którego czynność została zredukowana do 99%, ta jednostka powiększyła 10 razy odpowiednią czynność katalityczną. Jest zatem rzeczą bardzo trudną, jeśli nie niemożliwą, podać doświadczalny dowód na tworzenie enzymu nieczynnego. b) czynność katalityczna enzymu indukowanego ma pierwszorzędne znaczenie w naturalnej selekcji układu tworzącego ten enzym. Jeżeli czynność katalityczna nie jest potrzebna w ontogenezie enzymu, to była ona konieczna w jego filogenezie.

Dodajmy w końcu, że adaptacja procesów oddechowych może być zmieniana bez naruszenia czynności enzymów oddechowych. Jest to oczywiste, gdyż pierwszy proces jest dużo bardziej złożony, niż drugi.

W następnych rozdziałach okaże się jak czynność enzymatyczna hemoproteidów oddechowych wpływa na ich rozwój.

Energetyka adaptacji

W zasadzie energia, potrzebna do biosyntezy hemoproteidów może być dostarczona albo przez metabolizm procesów oddechowych albo przez metabolizm procesów fermentacyjnych. Przypuśćmy, że materiały budulcowe znajdują się w nadmiarze, i że szybkość adaptacji procesów oddechowych jest proporcjonalna do udziału energii dającej się użyć do biosyntezy:

$$A_{O_2} = \frac{1}{K'_1} \cdot \frac{d \text{ energii}}{dt}$$

$$\frac{d \text{ energii}}{dt} = K_2 Q_{O_2} + K_3 Q_{CO_2}^{\text{powietrze}} \text{ fermentacja} \quad (1)$$

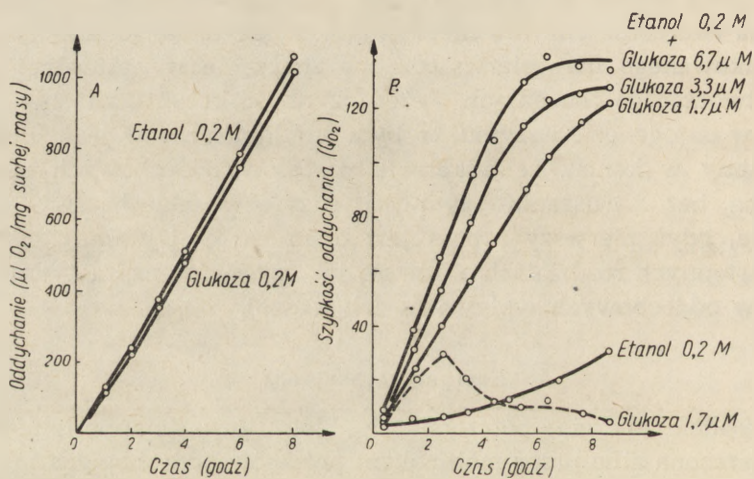
$$A_{O_2} = \frac{K_2}{K'_1} Q_{O_2} + \frac{K_3}{K'_1} Q_{CO_2}^{\text{powietrze}} \text{ fermentacja}$$

Czy można sprawdzić słuszność tego równania i określić wartość stałych K'_1 , K_2 , i K_3 ?

Jeżeli źródłem energii będzie jedna substancja, która jest metabolizowana wyłącznie na drodze procesów oddechowych, wówczas z równania (1) wynikałoby, że rozwój adaptacji procesów oddechowych w ciągu pewnego czasu odpowiada krzywej wykładniczej. Doświadczenia przeprowadzone z dodatkiem octanu i etanolu wykazują, że tak jest rzeczywiście. Należy zwrócić uwagę na to, że komórki w warunkach tlenowych oddychają z dodatkiem octanu lub etanolu z taką samą szybkością, jak z dodatkiem glukozy (rys. 4A).

Natomiast komórki, hodowane w warunkach beztlenowych z dodatkiem samego etanolu adaptują się wolno. Dodanie małej ilości glukozy bardzo szybko zużywanej, a wobec tego niewystarczającej na to, by sama zapewniła oddychanie pozwala na adaptację i oddychanie z dodatkiem etanolu (rys. 4B).

Ten efekt bodźcowy tłumaczy się wkładem energii podczas zużycia glukozy. Szybkość oddychania, zwiększona dzięki tej energii staje się wy-



Rys. 4. A — Oddychanie drożdży, hodowanych przeważnie w warunkach tlenowych z dodatkiem etanolu i glukozy. B — Adaptacja procesów oddechowych w przypadku samego etanolu i w przypadku etanolu z dodatkiem niewielkiej ilości glukozy.

starczającą na to, by zapewnić adaptację której przebieg wyraża się linią prostą w stosunku do czasu. Doświadczenia, wykonane z substratami, które nie ulegają fermentacji, zgadzają się z równaniem (1) i potwierdzają pogląd o zależności między czynnością metaboliczną enzymu i jego biosyntezą (48). Ta zgodność jest tylko jakościowa i nie daje liczbowych wartości stałych K'_1 , K_2 , K_3 .

Układ o „podwójnej adaptacji” pozwala na dowód ilościowy. Ponieważ jego zasada da się w różnych przypadkach zastosować, a wykonanie

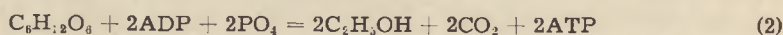
doświadczalne jest bardzo proste, wydaje mi się, że należy to szczegółowiej omówić. Weźmy drożdże, hodowane w warunkach beztlenowych na glukozie i wystawmy je na powietrze, używając maltozy (lub galaktozy) jako jedynego źródła energii. Ich Q_{O_2} i $Q_{CO_2}^{\text{powietrze}}$ fermentacji są na początku nieduże (< 10). Drożdże nie są adaptowane podwójnie, ponieważ nie posiadają ani enzymów oddechowych, ani enzymów potrzebnych do fermentacji cukru („galaktozymazy” lub „maltozymazy”). Są to enzymy, powstające przez indukcję i ich biosynteza wymaga energii, którą może dostarczyć oddychanie albo fermentacja (49). W przypadku, gdy energia jest czynnikiem ograniczającym, rozwój podwójnej adaptacji może być porównany do wspinaczki na linie dwóch alpinistów: biosynteza hemoproteidów pociąga za sobą biosyntezę hydrolaz i odwrotnie. Dodajmy, że doświadczenia kontrolne wykazały, że komórki w warunkach beztlenowych lub tlenowych zawierające maltozymazę syntetyzują cytochromy i oddychają przy użyciu maltozy tak, jak przy użyciu glukozy. Początkowy dodatek glukozy, która może fermentować od razu przyspiesza adaptację (rys. 5), jak również w przypadku etanolu (rys. 4B). Zmieniając ilości dodanej glukozy zmieniają się w momencie „stanu krytycznego” (patrz dalej) trzy czynniki A_{O_2} , Q_{O_2} , i $Q_{CO_2}^{\text{powietrze}}$ ferm. Te trzy czynniki są powiązane między sobą równaniem (1), które można wyrazić w następującej formie:

$$\frac{A_{O_2}}{Q_{O_2}} = \frac{K_2}{K_1} + \frac{K_3}{K_1} \frac{Q_{CO_2}^{\text{powietrze}} \text{ ferm.}}{Q_{O_2}} \quad (1a)$$

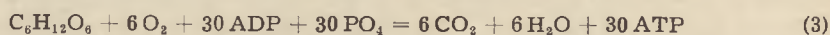
Jak widać, jest to równanie prostej, w którym stosunek A_{O_2}/Q_{O_2} jest funkcją liniową stosunku $Q_{CO_2}^{\text{powietrze}} \text{ ferm.}/Q_{O_2}$. Aby oznaczyć stosunek K_2/K_3 wystarczy podzielić wartość liczbową rzędnej w punkcie przecięcia się prostej z tą osią przez kąt nachylenia prostej. Analiza statystyczna 17 adaptacji pobudzonych przez glukozę na maltozie, galaktozie i etanolu wskazuje na to, że wyniki doświadczalne tworzą prostą, której współczynnik regresji jest bardzo znamieny ($P \ll 0.001$); że optymalna wartość stosunku K_2/K_3 jest 5, a jej granice wynoszą 4.1 i 6.1 ($P = 0.05$). Wydaje się, że można wobec tego wnioskować, że równanie zostało sprawdzone doświadczalnie tzn., że szybkość adaptacji procesów oddechowych jest proporcjonalna do energii, dostarczonej i że oddychanie i fermentacja są procesami wymiennymi, z tym jednak, że jedna objętość zużytego tlenu daje 5 razy więcej energii, niż jedna objętość CO_2 , uwolnionego w czasie fermentacji.

Wynik ten pozwala na sformułowanie pewnych ważnych wniosków. Stała K_3 może być obliczona z ogólnego równania fermentacji alkoholowej

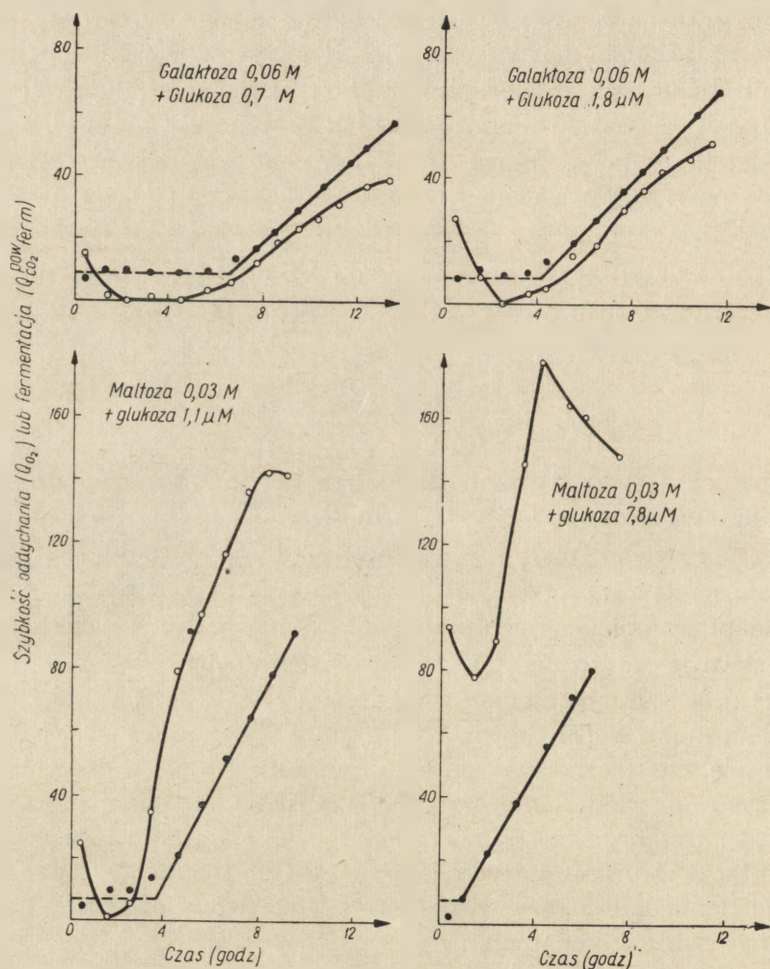
wej. Jeśli przyjmimy, że energia zużyta na syntezę hemoproteidów pochodzi z wiązań fosforowych bogatych energetycznie, i że mamy:



otrzymamy, że $K_3 = 0.0446$ (moli $\sim$ P/litry CO_2), $K_2 = 0,0446 \times 5 = 0.224$ moli $\sim$ P/litry CO_2). Ogólny bilans całkowitego utlenienia glukozy przez drożdże przedstawia się jak następuje:



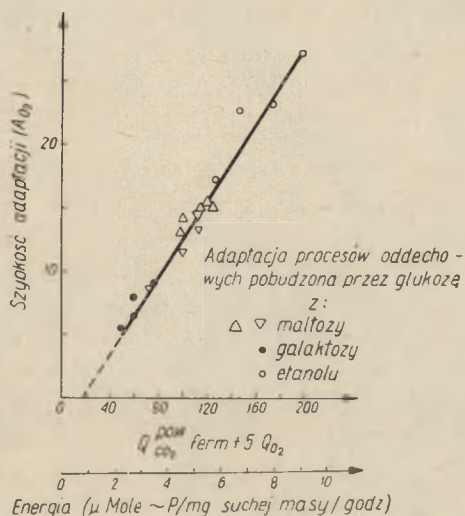
Wydaje się, że utlenienie glukozy jest energetycznie 15 razy bardziej wydajne, niż fermentacja, a ogólny stosunek $\sim$ P/O w przypadku fosforylacji z utlenieniem wynosi około 2.5. O ile wiem, to po raz pierwszy



Rys. 5. Podwójna adaptacja, pobudzona przez glukozę. Szybkość oddychania — czarne kółka; szybkość fermentacji — kółka białe.

można było ustalić zależność między szybkością dwóch metabolitów: w warunkach tlenowych i beztlenowych, w komórce nieuszkodzonej oraz ilościowo wykazać ich równowartość i wyprowadzić stąd następstwa energetyczne. Zgodność danych otrzymanych w ten sposób *in vivo*, z założeniami termodynamicznymi oraz z bezpośrednimi pomiarami procesów fosforylacji z utlenieniem w wyciągach bezkomórkowych jest wysoce zadawalająca. — ΔF reakcji (2) i (3) są 56 Kcal i 700 Kcal (stosunek około 13), a stosunek doświadczalny $\sim P/O$ w przypadku utlenienia pyrogronianu *in vitro* wynosi między 2 i 3 (50).

Znając K'_1 można porównać adaptację procesów oddechowych ze wzrostem. Jedno pokolenie drożdży rośnie w ciągu fazy logarytmicznej w średnim czasie około 2.2 godziny w warunkach beztlenowych oraz 1,6 godz. w warunkach tlenowych. Intensywność procesów metabolicznych w tych warunkach zapewnia stan od 20—230 $\mu M \sim P/mg$ suchej masy/godzinę. Inaczej mówiąc tworzeniu 1mg suchej masy protoplazmy w ciągu 2 godzin odpowiada udział energetyczny rzędu 60 $\mu M \sim P$. Lub też, adaptacja procesów oddechowych, która zachodzi bez wzrostu, wymaga dla swojej maksymalnej szybkości udział rzędu 20 $\mu M \sim P$ w ciągu 2 godzin. Stanowi ona zatem proces bardzo nieekonomiczny z punktu widzenia wydatkowania energii komórki. Należy zanotować jednak, że K'_1 nie jest stałą energetyczną syntezy hemoproteidów oddechowych w ścisłym znaczeniu (K_1), lecz jest wartością przybliżoną, dużo większą. Procesy metaboliczne związane z tą syntezą odbywają się ciągle i zużywają energię. Krzywa regresji, która pomogła nam oznaczyć K'_1 (rys. 6) wskazuje tylko na to, że intensywność tych procesów jest proporcjonalna do szybkości adaptacji procesów oddechowych. Dodajmy jeszcze, że wartość 0,3 jest wartością trochę za wysoką, jeśli chodzi o stałą K'_1 , gdyż doświadczenia zostały wykonane na komórkach, które nie zostały całkowicie „naładowane” materiałami budulcowymi potrzebnymi do adaptacji.

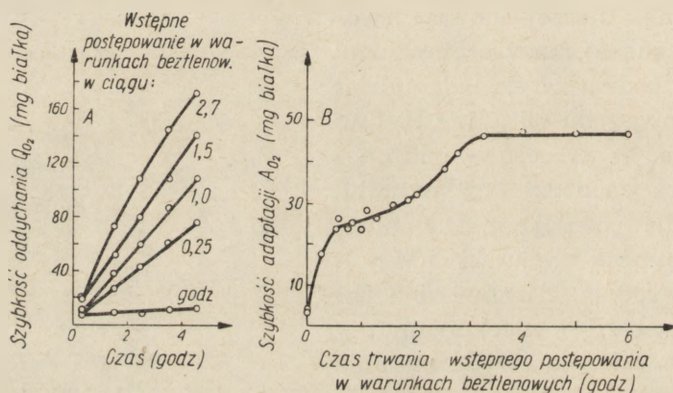


Rys. 6. Zależność między szybkością adaptacji procesów oddechowych a poziomem energetycznym metabolizmu. Wartości Q_{O_2} , Q_{CO_2} powietrze fermentacji i A są zmierzone; poziom energetyczny jest obliczony, zakładając, że $K_3 = 0,0446 \mu mol$ P/mg suchej masy/godz.

Materiały budulcowe potrzebne do adaptacji

Opisane dotychczas doświadczenia zostały wykonane na komórkach, które potrafią tworzyć enzymy oddechowe w nieobecności zewnątrzpochoдного źródła azotu, dającego się asymilować. Te „dające się zaadaptować” komórki pochodziły z stacjonarnej fazy hodowli w warunkach beztlenowych. Zdolność adaptacji procesów oddechowych zmienia się bardzo w czasie wzrostu bez tlenu. Jest ona praktycznie równa zero wśród komórek pobranych w fazie logarytmicznej wzrostu ze środowiska, zawierającego NH_4^+ jako źródło azotu. Wiadomo, że drożdże zawierają znaczny śródkomórkowy zapas wolnych aminokwasów (51). Wiadomo również, że wolne aminokwasy grają poważną rolę w biosyntezie białek (40, 52, 53). Można więc sądzić, że brak zdolności adaptacyjnej w procesach oddechowych komórek w warunkach beztlenowych, pochodzących z fazy logarytmicznej, można przypisać nieobecności tego zapasu.

Doświadczenie, przedstawione na rys. 7 wykazuje, że tak jest w istocie. Drożdże, pochodzące z fazy logarytmicznej wzrostu w wa-



Rys. 7. Wpływ wstępnego działania w warunkach beztlenowych hydrolizatu kazeiny na zdolność adaptacji procesów oddechowych. Adaptacja w stężeniu glukozy 0.015M.

runkach beztlenowych inkubuje się również w warunkach beztlenowych w obecności hydrolizatu kazeiny. Pobiera się próbki, które po umyciu, są przewietrzane w buforze z dodatkiem glukozy.

Początkowe postępowanie w nieobecności tlenu nie zmienia początkowej zawartości enzymów oddechowych, która pozostaje równa zero. Przeciwnie, szybkość adaptacji rośnie (rys. 7A). Przebieg zdolności adaptacji procesów oddechowych w czasie początkowego postępowania jest nie jednakowy (rys. 7B). Rozróżnia się tutaj fazę początkową szybką, po której następuje faza bardziej powolna. Pierwsza zachodzi wtedy, gdy nie ma podziału komórkowego, podczas gdy w czasie drugiej fazy komór-

ki zaczynają się dzielić. Można, oczywiście sądzić, że faza pierwsza odpowiada uzupełnieniu wolnych aminokwasów, a w drugiej fazie jako materiał budulcowy służą związki bardziej złożone. Należy zanotować, że amoniak jest tu bez wpływu, natomiast mieszanina 15 aminokwasów zastępuje dość dobrze hydrolizat kazeiny. Jest jasne, że taki układ pozwala na szczegółowe badanie aminokwasów potrzebnych do adaptacji ogólnych procesów oddechowych i do biosyntezy poszczególnych hemoproteidów.

Efekt przeciwny efektowi Pasteura

Poniższe wyniki są dobrym przykładem wzajemnego działania między metabolizmem procesów fermentacyjnych i oddechowych. Współzawodnictwo tyczy się rozwoju układu hemoproteidowego i metabolizmu materiałów budulcowych dla tego układu.

Od czasu prac Meyerhofa (6) w ciągu dwudziestu lat efekt Pasteura stanowił jeden z głównych problemów biochemii. Nie będę tutaj omawiał jego mechanizmu, ani nawet jego definicji. Wystarczy powiedzieć, że niezależnie od znaczenia, jakie im się przypisuje, polega on na zahamowaniu fermentacji przez oddychanie (54—56). Ta zależność zawsze była rozpatrywana jako zależność jednokierunkowa. Wśród setek prac, które omawiają efekt Pasteura, znam tylko dwie (57, 58), w których mowa jest o odwrotnej zależności. Zobaczymy, że fermentacja nie hamuje lub hamuje w małym stopniu oddychanie. Przeciwnie hamuje ona adaptację procesów oddechowych.

Widzieliśmy, jak fermentacja w warunkach tlenowych przyspiesza szybkość adaptacji procesów oddechowych, dostarczając im energii. Z równania (1) można obliczyć, że aby zapewnić drożdżom, które mają początkowo $Q_{O_2} = 10$, maksymalną szybkość adaptacji ($A_{O_2} = 30$), trzeba, aby $Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}}$ było początkowo równe 150

$$30 = \frac{0.224 \times 10}{0.3} + \frac{0.0446 \times 150}{0.3}$$

Inaczej mówiąc wartość $Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}} = 150$ jest wartością niezbędną, wystarczającą na to, by pozwolić na rozpoczęcie adaptacji procesów oddechowych z maksymalną szybkością.

Przypuśćmy, że fermentacja o większej intensywności będzie miała działanie hamujące, i że szybkość adaptacji procesów oddechowych będzie odwrotnie proporcjonalna do nadmiaru fermentacji. Wtedy dla $Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}}$ większej od 150 będzie można napisać następującą zależność:

$$A_{O_2} = 30 \frac{150}{Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}}}$$

Szybkość fermentacji jest funkcją stężenia glukozy. Dla drożdży można osiągnąć stan pół-nasycenia przy stężeniu glukozy od $8 - 11 \times 10^{-3}$ M, a wartości Q_{CO} , odpowiadają zależności *Henri-Michaelis-Menten* (59, 18). Zmieniając stężenie glukozy między 10^{-3} M i 0.2M wywołuje się zmianę szybkości fermentacji (której największa wartość wynosi 380) nie wpływając na zmianę szybkości oddychania. Rzeczywiście stała szybkości oddychania przy stanie pół-nasycenia glukozą jest niższa niż 5×10^{-4} M (60). Na rys. 8 przedstawiona jest szybkość adaptacji procesów oddechowych jako funkcja stężenia glukozy. Zgodnie z zależnością energetyczną (1) należy oczekiwać, że poniżej stężenia 6×10^{-3} M:

$$\frac{380 \times 0.006}{0.006 + 0.01} = 150$$

wartości A_0 , będą maleć, w miarę zmniejszania się stężenia glukozy. Tak jest rzeczywiście. Powyżej stężenia 6×10^{-3} M należy oczekiwać zgodnie z zależnością (4), że wartości A_0 , maleją, gdy stężenie glukozy wzrasta. Krzywa teoretyczna odpowiada w sposób zadawalający wynikom doświadczalnym. Czynnikiem określającym jest stężenie glukozy na początku adaptacji, a nie stosunek stężenia glukozy do ilości komórek. Nietylko równanie (4) jest w ten sposób sprawdzone, ale jednocześnie otrzymuje się potwierdzenie doświadczalne bez względu na zależność (1), z której równanie (4) zostało otrzymane.

Hamowanie, w przypadku nadmiaru produktów fermentacji, tyczy przede wszystkim szybkości adaptacji procesów oddechowych. Q_0 , osiąga w siódmej godzinie wartości 70 ± 10 zamiast 150 ± 10 . Krzywa adaptacji w tym czasie zamiast być linią prostą, jak w przypadku glukozy o stężeniu 0.007M (rys. 1) przypomina przy stężeniu glukozy 0.2M hyperbolę prostokątną, gdzie szybkość adaptacji szybko spada. Ekstrapolacja do nieskończoności tej hyperboli daje wartość Q_0 , bliską 150. Biosynteza poszczególnych hemoproteidów jest niejednakowo hamowana. Nadmierna fermentacja opóźnia przede wszystkim tworzenie reduktazy bursztynowo-cytochromowej (c), w sposób umiarkowany wpływa na tworzenie się reduktazy mlekowo-cytochromowej (c) oraz cytochromu c, a biosynteza oksydazy cytochromu c jest stosunkowo mało wrażliwa.

Niezależnie od szczegółów mechanizmu biosyntezy, głównym skutkiem hamowania w czasie fermentacji jest zatrzymanie efektu *Pasteura*. Wyda to się truizmem, ale efekt *Pasteura*, który polega na zmniejszeniu szybkości fermentacji przez metabolizm procesów oddechowych, jest możliwy tylko w obecności tych ostatnich, a więc w obecności hemoproteidów (18). Zwalniając biosyntezę enzymów oddechowych, metabolizm beztlenowy koliduje z ustaleniem się metabolizmu oddechowego,

który hamuje fermentację. I to jest efektem, przeciwnym efektowi Pasteura.

Najbardziej zdumiewającym faktem jest mała zdolność przystosowania się metabolizmu drożdży. Ogólny system, regulujący składa się z trzech współzależnych układów:

— układ Pasteura-Meyerhofa,

$$(Q_{CO_2}^{N_2} = Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}}) : Q_{O_2} = 2 \text{ do } 3.$$

-fosforylacje, które pozwalają na adaptację procesów oddechowych

$$A_{O_2} = 0.75 Q_{O_2} + 0.15 Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}}$$

-fermentacja hamująca adaptację procesów oddechowych

$$A_{O_2} = 4500 Q_{CO_2}^{\text{powietrze ferm.}}$$

i z trzech stałych: $Q_{CO_2}^{N_2} \text{ max.} = 380$, $Q_{CO_2} \text{ max.} = 150$ i $A_{O_2} \text{ max.} = 30$.

Krytyczny stan fermentacji, który dostarcza fosforylacji potrzebnych i wystarczających do maksymalnej adaptacji procesów oddechowych i który odgranicza tym samym dwie ostatnie zależności jest rzędu $150 \times 0.0446 = 7 \mu\text{M} \sim \text{P/mg. suchej masy/godzinę}$. Współzawodnictwo, o którym mówi pierwsza zależność tyczy prawdopodobnie fosforylacji (61—63). To samo mogłoby się tyczyć efektu, przeciwnego efektowi Pasteura, w przypadku, gdzie nadmierna fermentacja powoduje spadek nieorganicznego fosforu lub akceptorów fosforanów jak ADP. Pewnym jest natomiast wzajemny wpływ między hamowaniem, spowodowanym nadmierną fermentacją i ilością aminokwasów. W rzeczywistości komórki, „naładowane” całkowicie hydrolizatem kazeiny są o wiele mniej czułe na hamowanie, niż komórki, naładowane tylko częściowo (tabl. 2).

Możliwe, że hamowanie adaptacji procesów oddechowych może służyć, jako wytłumaczenie kilku obserwacji z których niektóre są już dość znane. Tłumaczy ono zmniejszenie się zużycia O_2 przez dodatek glukozy do drożdży piwnych (które się adaptują) i brak tego zmniejszenia w przypadku drożdży piekarniczych, już zadaptowanych (57). Wiadomo również, że drożdże, w miarę wzrostu w warunkach tlenowych w obecności dużych stężeń glukozy, rozkładają ją prawie całkowicie do alkoholu (64, 65), ich oddychanie jest słabe (64, 66), a zawartość cytochromów zmniejszona. Oddychanie (2, 6, 66) i zawartość cytochromów (66, 67), zwiększają się pod koniec wzrostu. A więc w przypadku drożdży w stadium rozmnażania równie ważne jak działanie jest tworzenie enzymów oddechowych. Widzieliśmy, że tworzenie to jest hamowane przez duże stężenie glukozy, co pozwala, jak mi się wydaje, na zorientowanie się w tych obserwacjach.

Biosynteza dużej ilości enzymów u różnych mikroorganizmów jest hamowana przez glukozę (69). To hamowanie tworzy podstawę zjawiska, nazwanego przez Monod „*diauxie*” (68). Jest mało prawdopodobne, że ten sam mechanizm działa we wszystkich przypadkach. Należy pamiętać jednak o przypadku adaptacji procesów oddechowych u drożdży, a także o przykładzie hamowania, wywołanego przez metabolizm zbyt intensywny w stosunku do zapotrzebowań energetycznych biosyntez.

Okresy adaptacji procesów oddechowych

Szybkość adaptacji procesów oddechowych jest wartością stałą prawie przez cały czas jej trwania (rys. 1). Można byłoby uważać tę krzywą za wyraz takiego procesu, który w każdym momencie swego trwania jest podobny do siebie. Można jednak wydzielić różne okresy w czasie powstawania hemoproteidów oddechowych.

Okres krytyczny

Gdy adaptacja procesów oddechowych jest ograniczona przez poziom energetyczny, czy to będzie w przypadku hodowli drożdży z dodatkiem alkoholu (rys. 4B), czy też w przypadku podwójnej adaptacji (rys. 5), wzrost Q_O staje się wzrostem liniowym począwszy od pewnego momentu. Moment ten może natychmiast nastąpić po rozpoczęciu przewietrzania (rys. 4B, rys. 5, maltoza), lub też może być oddalony od niego o kilka godzin (rys. 5, galaktoza), lub też wkład energii zwiększa się w miarę postępu adaptacji. Należałoby zatem oczekiwać, że szybkość adaptacji będzie wzrastała od chwili pobudzenia, a nie pozostanie wartością stałą. Cały proces przebiega jednak tak, jakby zwiększenie ilości energii, uwolnionej później w momencie odszczepienia było niedostateczne.

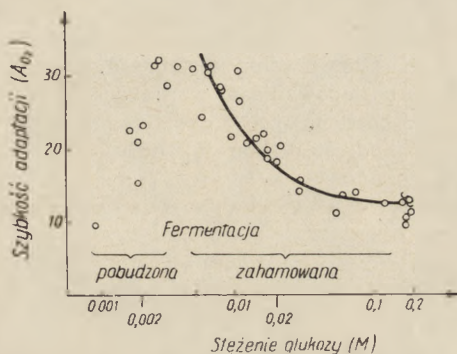
Gdy adaptacja procesów oddechowych jest ograniczona przez wyjściową ilość materiału budulcowego, zwiększenie Q_O jest również stałe (rys. 7A). Nie mamy dowodu zmniejszania się ilości aminokwasów w przypadku biosyntezy hemoproteidów. Wiemy jednak, że ilość zmniejsza się w miarę indukcji maltozymazy (40). Możliwe więc sądzić, że szybkość adaptacji zmniejsza się w miarę tworzenia enzymów oddechowych. Otóż tak nie jest.

Początkowa za bardzo intensywna fermentacja hamuje adaptację procesów oddechowych. Hamowanie jest nieodwracalne, gdyż późniejsze zmniejszenie $Q_{CO_2}^{powietrze}$ ferm. nie zwiększa szybkości tworzenia hemoproteidów. To zmniejszenie można wykonać dwoma sposobami z tym

samym wynikiem: albo zmniejszając np. w godzinę po rozpoczęciu adaptacji stężenie glukozy, albo też zmniejszenie to zachodzi spontanicznie jako skutek wystąpienia w czasie adaptacji efektu Pasteura-Meyerhofa. Należy zaznaczyć, że ten efekt ujawnia się znacznym opóźnieniem w stosunku do wzrostu Q_{O_2} .

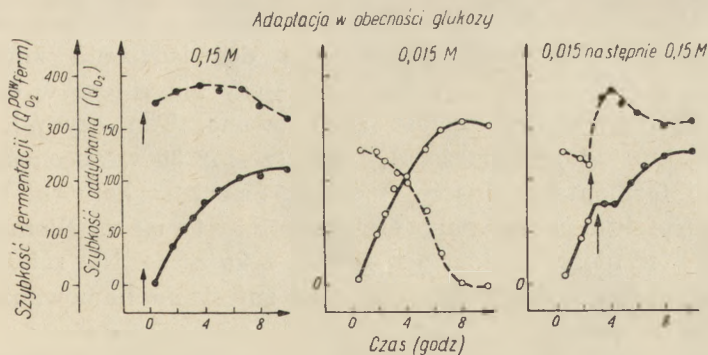
Mamy więc, jak się zdaje, prawo wnioskować, że na początku powstania hemoproteidów istnieje „okres krytyczny”. Trwa on mniej niż 1 godz., a więc mniej od $1/5$ trwania adaptacji procesów oddechowych. W ciągu tego krytycznego okresu szybkość, z którą enzymy oddechowe utworzą się później jest określona współdziałaniem między wkładem energii a dostępnym budulcem. Kuszającą myślą jest uważać ten okres za okres indukcji przez O_2 biosyntezy hemoproteidów, analogicznie do utajonej fazy innych indukowanych biosyntez enzymów (70).

Mimo to, że adaptacja procesów oddechowych zachodzi w pewnej mierze nieodwracalnie, począwszy od okresu krytycznego, ta nieodwracalność nie jest całkowita. Brak induktora (O_2) oraz związki analogiczne aminokwasów hamują adaptację. Hamuje ją również dodatek glukozy, który powoduje nadmierną fermentację (rys. 9)



Rys. 8. Szybkość adaptacji procesów oddechowych jako funkcja początkowego stężenia glukozy. Krzywa teoretyczna jest obliczona w/g równania (4a)

$$A_{O_2} = 30 \frac{150 ([G] + 0.01)}{380 [G]}$$



Rys. 9. Efekt, przeciwny efektowi Pasteura, wywołany na początku i w połowie adaptacji procesów oddechowych. Strzałki wskazują na moment dodania glukozy w stężeniu 0,15M. Linia ciągła — oddychanie; linia przerywana — fermentacja.

Po nagłym zatrzymaniu się na okres około godziny adaptacja zaczyna się na nowo. Ważną rzeczą, którą należy zanotować, jest fakt, że niezależnie od wystąpienia między 0 a 4 godziną efektu przeciwnego efektowi Pasteura, poziom adaptacji po 10 godz. jest zawsze taki sam. Jak zobaczymy podobne zjawisko zachodzi w przypadku benzimidazolu.

Tablica 2
Intensywność efektu przeciwnego efektowi Pasteura
jako funkcja ponownego naładowania aminokwasami

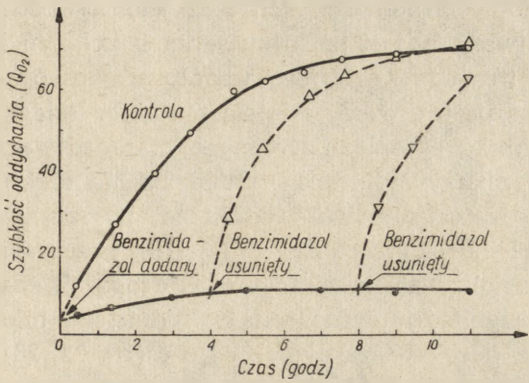
Czas trwania wstępnego postępowania w warunkach beztlenowych z dodatkiem hydrolizatu kazeiny (min)	Adaptacja procesów oddechowych		
	$Q_{CO_2}^{powietrze}$ ferm	A_{O_2}	Hamowanie (%)
45	161	30.3	—
	276	16.4	46
	368	10.3	66
210	180	34.5	—
	265	29.2	15
	381	22.7	34

Benzimidazol hamuje adaptację procesów oddechowych. Inhibitor, zaabsorbowany przez komórkę, może być usunięty prawie natychmiast przez zwykłą zmianę pH poza komórką. W wyniku tego tylko cząsteczka naładowana przenika do drożdży (71,72). Sposób działania benzimidazolu nie jest znany. Jego działanie na asymilację glukozydów jest podobne do działania 2,4-dwunitrofenolu i NaN_3 (72). Wyniki, według których działałby on jako antymetabolit puryn (73) należy najprawdopodobniej przypisać artefaktom (74). Gdy usuwa się benzimidazol, adaptacja rozpoczyna się na nowo (rys. 10).

Tymczasem adaptacja, tak odnowiona, zachodzi z początkową szybkością szybszą niż szybkość początkowa doświadczenia kontrolnego. Nagromadził się zatem czynnik przyspieszający biosyntezę w czasie gdy tworzenie hemoproteidów zostało zahamowane. Ten czynnik posiada właściwości, które dają wartości A_{O_2} większe niż 30 w obecności bardzo intensywnej fermentacji. Inaczej mówiąc, znieczuła komórki chwilowo na działanie efektu przeciwnego efektowi Pasteura. Niemniej wartość Q_{O_2} ostatecznie osiągnięta jest zawsze taka sama. Nie zależy ona od poprzedniego przebiegu adaptacji, ani od zniesienia hamowania wywołanego benzimidazolem.

Obecnie trudno jest zinterpretować całość tych wyników. Możliwe, że mamy do czynienia tutaj z istotnym zagadnieniem tworzenia hemoproteidów, z zagadnieniem układu tworzącego enzymy oddechowe. Zmiany takie jakie widać na rys. 9 i 10 są chyba tylko zmianami i odtworze-

niem „układu organizującego” biosyntezy hemoproteidów (48,70), którego średni okres trwania odpowiadałby czasowi trwania okresu krytycznego i czasowi trwania hamowania poprzez współzawodnictwo z fermentacją.



Rys. 10. Chwilowe przyspieszenie szybkości adaptacji po usunięciu hamowania, wywołanego przez benzimidazol. Adaptacja przy stężeniu glukozy 0.17M. W obecności benzimidazolu — kółka czarne; w nieobecności benzimidazolu — kółka białe.

Wiadomo jaka jest prawdopodobnie rola nukleotydów w syntezie białek (74). Ciekawą rzeczą będzie stwierdzenie, że pochodne puryn lub pirymidyn (2,6 dwuaminopuryna, azopuryny, 6-metylo uracyl, 5-bromo-uracyl, dwuazouracyl, 2-tiouracyl) nie mają żadnego wpływu na nor-

Tablica 3
Hamowanie adaptacji procesów oddechowych wywołane przez 2,6-dwuaminopurynę

Drożdże	Adaptacja	QO ₂		Hamowanie adaptacji(%)
		po 0 godz.	po 7 godz.	
A	kontrola	< 5	77.5	—
	+ DAP 3.5 mM	„	80.1	0
B	kontrola	„	36.5	—
	+ DAP 3.5 mM	„	19.8	46 — 53
	+ DAP 3.5 mM	„		
C	+ adenina 3.3 mM	„	35.6	2 — 3
	kontrola	„	15.8	—
	+ DAP 3.5 mM	„	5.5	65 — 95
	+ DAP 1.4 mM	„	11.5	27 — 40

malną adaptację procesów oddechowych. Przeciwnie, posiadają wydatne działanie wtedy, gdy rozwój hemoproteidów został zakłócony podczas okresu krytycznego (tabl. 3). Nukleotydy grają zatem prawdopodobnie rolę w organizacji biosyntezy hemoproteidów.

Okres dziedziczny

Adaptacja procesów oddechowych jako całość nie jest zjawiskiem dziedzicznym. Gdy drożdże rosną w nieobecności O_2 biosynteza hemoproteidów oddechowych nie zachodzi, lecz zdolność do wykonania tej syntezy jest zachowana nawet po kilku setkach pokoleń komórek.

Badania Ephrussiego i jego współpracowników (75) wykazały, że akrydyny powodują u drożdży swoistą mutację. Polega ona na utracie lub odmianie czynnika cytoplazmatycznego „samoodtwarzalnego”, odpowiedzialnego za przekazywanie drogą dziedziczenia niektórych hemoproteidów (oksydaza cytochromowa, reduktaza bursztynowo-cytochromowa (c), reduktaza DPNH-cytochromowa (c) (18). Przeciwnie, czynnik ten nie jest odpowiedzialny za przekazywanie drogą dziedziczenia innych enzymów oddechowych jak cytochrom c, reduktaza mlekowo-cytochromowa (c), katalaza, peroksydaza cytochromu c (18, 22, 23). Jedynie akrydyny, które indukują mutacje (76) powstrzymują adaptację procesów oddechowych, blokując wybiórczo biosyntezę oksydazy cytochromu c, (19). Nie naruszają one czynności tego enzymu. Hamowanie adaptacji poprzedza indukowanie mutacji. Można całkowicie znieść biosyntezę oksydazy cytochromu c, a nie zjawia się mutanty. Kilka godzin później, większość komórek podlega mutacji i traci na zawsze zdolność tworzenia tego hemoproteidu. Istnieje więc okres lub reakcja wspólna dla rozwoju niedziedzicznego i dla przekazywania drogą dziedziczenia enzymów oddechowych.

Badanie adaptacji procesów oddechowych u drożdży pozwoliło na podjęcie pewnej ilości zagadnień dotyczących utleniania komórkowych, energetyki metabolizmu w warunkach tlenowych i beztlenowych, regulacji międzykomórkowej, biosyntezy białek i dziedziczności komórkowej. Tworzenie hemoproteidów indukowanych przez O_2 wydaje się procesem równie złożonym, jak powstawanie wirusa lub wzrost komórki. Niemniej, niektóre zależności można podać w dość prostej formie.

PIŚMIENNICTWO

1. Keilin D., Proc. Roy. Soc. (London) B., 1925, 98, 312.
2. Warburg O., Biochem. Z., 1926, 177, 471.
3. Chance B., w The mechanism of enzyme action, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954.
4. Andreasen A. A. i Stier T. J. B., J. Cellular. Comp. Physiol., 1953 41, 23.
5. Cohn M. Monod J., Pollock M. R., Spiegelman S. i Stanier R. Y., Nature, 1953, 172, 1096.
6. Meyerhof O., Biochem. Z., 1925, 162, 43.

7. Warburg O., *Biochem. Z.*, 1927, **189**, 350.
8. Fink H., Berwald E., *Biochem. Z.*, 1933, **258**, 141.
9. Elion E., *Bull. soc. chim. biol.*, 1936, **18**, 165.
10. Euler H., Hellström H. i Gunther G., *Hoppe-Seyler's. Z. physiol. Chem.*, 1939, **258**, 47.
11. Beraud P., *Ann. Fermentations*, 1939-40, **5**, 108.
12. Borei H. i Sjöden, *Arkiv. Kemi Mineral. Geol.*, 1943, **16**, 1.
13. Chin C. H., *Nature*, 1950, **165**, 926.
14. Ephrussi B. i Słonimski P. P., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1950, **6**, 256.
15. Słonimski P. P., *Compt. rend.*, 1950, **231**, 375.
16. Słonimski P. P. i Hirsch H. M., *Compt. rend.* 1952, **235**, 914.
17. Hirsch H. M., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1952, **9**, 674.
18. Słonimski P. P., *Formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson, Paris, 1953.
19. Słonimski P. P., w *Adaptation in microorganisms*, Cambridge University Press, 1953.
20. Chin C. H., *Federation Proc.*, 1953, **12**, 311.
21. Słonimski P. P., *Compt. rend.*, 1954, **238**, 1361.
22. Chantrenne H. i Courtois C., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1954, **14**, 397.
23. Chantrenne H., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1954, **14**, 157, *Biochim. et Biophys. Acta*, w druku.
24. Chantrenne H., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1955, **16**, 410.
25. Słonimski P. P., *Biochim. et Biophys. Acta*, w druku.
26. Harris M., *J. Cellular Comp. Physiol.*, w druku.
27. Schaeffer P., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1952, **9**, 261.
28. Moss F., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 1952, **30**, 531.
29. Engelsberg E., Gibor A. i Levy J. B., *J. Bacteriol.*, 1954, **68**, 146-178.
30. Smith L., *Bacteriol. Revs.*, 1954, **18**, 106.
31. Keilin D. i Hartree E. F., *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, 1940, **129**, 277.
32. Slater E. C., *Biochem. J.*, 1950, **46**, 484.
33. Stotz E. i in., *J. Biol. Chem.*, 1954, **210**, 851, 861, 869.
34. Haas E., *Naturwiss.*, 1934, **22**, 207.
35. Krebs H. A., Gurin S. i Eggleston L. V., *Biochem. J.*, 1952, **51**, 614.
36. Lwoff A. i Lwoff M., *Ann. inst. Pasteur*, 1937, **59**, 130.
37. Ycas M. i Starr T. J., *J. Bacteriol.*, 1953, **65**, 83.
38. Beljanski M., *Compt. rend.*, 1955, **240**, 374.
39. Jensen J. i Thofern E., *Z. Naturforsch.*, 1954, **9b**, 596.
40. Spiegelman S. i Halvorson, H. G., w *Adaptation in microorganisms*, Cambridge University Press, 1953.
41. Stanier R. V., *J. Bacteriol.*, 1947, **54**, 339.
42. Suda M., Mayashi O. i Oda Y., *Med. J. Osaka. Univ.*, 1950, **2**, 21.
43. Negelein E., *Biochem. Z.*, 1925, **165**, 203.
44. Monod J., Cohen-Bazire G. i Cohn M., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1951, **7**, 585.
45. Pollock M. R. i Perret C. J., *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 1951, **32**, 387.
46. Spiegelman S. i Halverson H. O., *J. Bacteriol.*, 1954, **68**, 265.
47. Hinshelwood C., *The chemical kinetics of the bacterial cell*, Oxford, 1946

48. Monod J. i Cohn M., *Advances in Enzymol.*, 1952, **13**, 67.
49. Spiegelman S., w *The enzymes*, t. I., Academic Press, New-York, 1950, str. 267.
50. Fruton J. S. i Simmonds S., *General Biochemistry*, Wiley and sons, New-York.
51. Roine P., *Praca doktorska*, Helsinki, 1947.
52. Hogness D. S., Cohn M. i Monod J., *Biochim. et biophys. Acta*, 1955, **16**, 99.
53. Rotman B. i Spiegelman S., *J. Bacteriol.*, 1954, **68**, 419.
54. Burk D., *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.* 1939, **7**, 420.
55. Engelhardt W. A. i Sakow N. E., *Biochimja*, 1943, **8**, 35.
56. Dickens F., w *The enzymes*, t. II, Academic Press, New-York, 1951, 624.
57. Belitzer W. S., *Biochem. Z.* 1936, **283**, 339.
58. Crabtree H. C., *Biochem. J.* 1929, **23**, 536.
59. Hopkins R. H. i Roberts R. H., *Biochem. J.*, 1935, **29**, 919.
60. Aldous J. G., Fisher K. G. i Stern J. R., *J. Cellular Comp. Physiol.* 1950, **35**, 303.
61. Lynen F., *Ann.*, 1941, **546**, 120.
62. Johnson M. T., *Science*, 1941, **94**, 200.
63. Meyerhof O. i Fiala S., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1950, **6**, 1.
64. Swanson W. R. i Clifton C. E., *J. Bacteriol.*, 1948, **56**, 115.
65. Lemoigne M., Aubert J. P. i Millet J., *Ann. inst. Pasteur*, 1954, **87**, 427.
66. Ephrussi B., niepublikowane dane.
67. Chaix P. i Roncoli G., *Biochim. et Biophys. Acta*, 1950, **6**, 268.
68. Monod J., *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*, Hermann, Paris, 1942.
69. Gale E. F., *The chemical activities of bacteria*, London, 1951.
70. Pollock M. R., w *Adaptation in microorganisms*, Cambridge University Press, 1953.
71. Słonimski P. P., *Ann., inst. Pasteur*, 1954, **87**, 404.
72. Słonimski P. P., *Exptl. Cell Res.*, w druku.
73. Woolley D. W., *J. Biol. Chem.*, 1944, **152**, 225.
74. Gale E. F. i Folkes J. P., *Nature*, 1955, **175**, 592.
75. Ephrussi B., *Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms*, Oxford, 1953.
76. Marcovich H., *Ann. inst. Pasteur*, 1953, **85**, 199.

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI

Wyjaśnienie budowy witaminu B₁₂

Od chwili kiedy wykazano, że z zewnątrzpochodnym czynnikiem krwiotwórczym jest jakiś związek chemiczny zawarty w wątrobie (1), rozpoczęto rozległe badania mające na celu wyosobnienie tej substancji w czystym stanie. Najpoważniejszą trudnością na jaką napotykały wszelkie wysiłki w tej dziedzinie był brak wygodnej i prostej próby biologicznej pozwalającej wykrywać i oznaczać ilościowo zawartość czynnika krwiotwórczego w poszczególnych preparatach. Z reguły posługiwano się oceną efektu leczniczego badanych preparatów w przypadkach klinicznej niedokrwistości, a więc stosowano postępowanie nienadające się do badań szybkich i masowych. Mimo tych trudności już w r. 1945 Emery i Hurran (2) otrzymali z wątroby preparat doprowadzający do efektów leczniczych w dawce ok. 5,5 mg, a w rok później Emery i Parker (3) otrzymali produkt sześciokrotnie czystszy. Dziś wiemy, że preparaty te zawierały zaledwie ok. 1% biologicznie czynnej substancji.

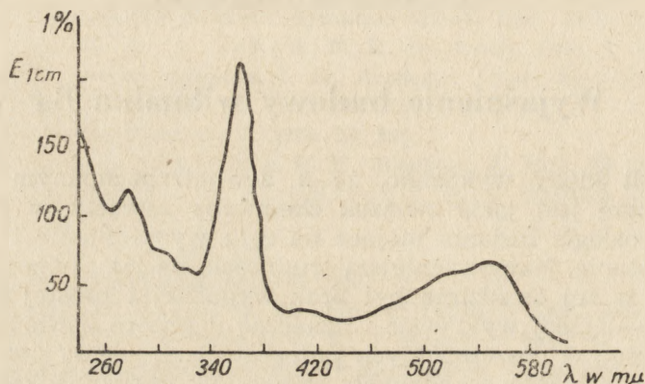
Na nowe tory pchnęły badania nad z zewnątrzpochodnym czynnikiem krwiotwórczym obserwacje dokonane w r. 1947 przez Shorb (4). Okazało się, że dwa szczepy drobnoustrojów fermentacji kwasu mlekowego: *Lactobacillus lactis* Dorner i *Lactobacillus leichmanii* wymagają czynnika krwiotwórczego zawartego w wyciągach wątrobowych do normalnego wzrostu. Fakt ten pozwolił na opracowanie dogodnych i szybkich testów mikrobiologicznych, które do dziś dnia są stosowane na szeroką skalę dla wykrywania i ilościowego oznaczania czynnika krwiotwórczego. Z czasem okazało się, że wymienione powyżej drobnoustroje, jak również w tym samym celu używany mutant *E. coli* (5), reagują na obecność

*) Redakcja „Postępów“ wprowadza stałą rubrykę pod powyższym tytułem. Na łamach tej rubryki omawiać będziemy krótko najwybitniejsze nowe osiągnięcia biochemii światowej oraz będziemy powiadamiać naszych czytelników o sprawach organizacyjnych biochemii polskiej i światowej.

Jako pierwszy temat wybraliśmy fakt wyjaśnienia budowy witaminu B₁₂ przedstawiony w pięknym artykule A. W. Johnsona i A. Todda w czasopiśmie „Endeavour“ nr 57, str. 29, 1956. Na prośbę redakcji dr Wł. Ostrowski referuje poniżej ten artykuł z własnymi uzupełnieniami. Dr Ostrowski pracuje od kilku lat pod kierunkiem prof. Skarżyńskiego nad kompleksem białkowym witaminu B₁₂. (Przyp. Red.)

czynnika krwiotwórczego nie zupełnie swoiście. Toteż w latach ostatnich coraz rozleglejsze zastosowanie w próbach mikrobiologicznych służących do oznaczania czynnika krwiotwórczego, znajdują glony *Euglena gracilis* (6) i *Ochromonas melhamensis* (7), dla których czynnik krwiotwórczy jako substancja wzrostowa nie daje się zastąpić jakimkolwiek innym czynnikiem.

Czynnik przeciwanemiczny znany dziś jako witamin B_{12} , został wyosobniony w krystalicznej postaci w r. 1948 równocześnie i niezależnie

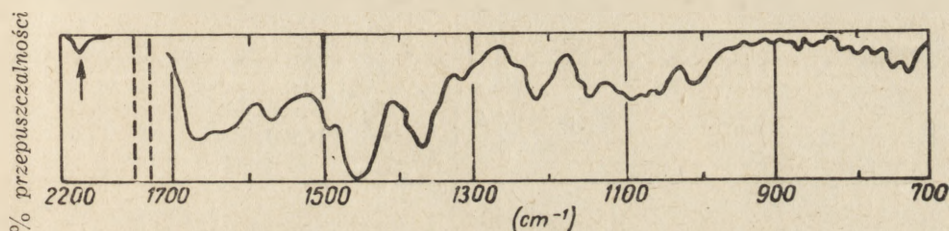


Rys. 1. Widmo absorpcyjne witaminu B_{12} w roztworze wodnym (13).

przez dwie grupy badaczy: Folkersa i współprac. (8) z laboratorium Mercka w USA i Lester Smitha i współprac. (9, 10) z Glaxo Laboratories w Anglii. Trudności przy izolowaniu witaminu B_{12} z wyciągów wątrobowych były przyczyną poszukiwania nowych źródeł naturalnych tego czynnika. Badania wykazały, że biosynteza B_{12} ma miejsce tylko u mikroorganizmów żyjących w glebie, w wodzie i przewodzie pokarmowym. Szczególnie dogodnym źródłem okazały się drobnoustroje używane do produkcji antybiotyków, a zwłaszcza liczne szczepy *Streptomyces* (11). Dziś najpospolitszą metodą produkcji B_{12} na skalę przemysłową jest wykorzystanie ługów pofermentacyjnych pozostających jako produkt odpadowy po wydzieleniu antybiotyków. Ostatnio jako cenne źródło B_{12} wykorzystuje się również odpowiednio przerobione odpływy ściekowe w których żyją liczne mikroorganizmy syntetyzujące oraz koncentrujące witamin (12). Wydzielenie B_{12} z tych różnych źródeł polega na ekstrakcji przy pomocy różnych rozpuszczalników jak alkohol benzylowy, fenol, butanol, a następnie adsorpcji na żelu krzemionkowym lub tlenku glinu. Dla dalszego zagęszczenia wykorzystuje się chromatografię oraz krystalizację z wodnego acetonu lub gorącej wody.

Ciemno-czerwone uwodnione kryształy witaminu B_{12} przy analizie elementarnej dają sumaryczny wzór: $C_{63}H_{90}O_{14}N_{14}PCo$. W wodnych roztworach związek ten jest optycznie czynny o skręcalności właściwej $[\alpha]_{6438}^{20} = 110^{\circ} \pm 10^{\circ}$. Kryształy podgrzewane przy 210° czernieją, od $300 - 320$ rozplývają się. Witamin B_{12} jest bardziej trwały w roztworach o pH kwaśnym i najbardziej trwały jest przy pH $4.5 - 5.0$ nie

tracąc aktywności przy ogrzaniu w 100°. Badania magnetometryczne wykazały, że B₁₂ jest diamagnetyczny i kobalt znajduje się na trzecim stopniu utlenienia. Jest interesującym, że poza grupą witaminu B₁₂ nie znaleziono dotychczas w przyrodzie związków organicznych zawierających kobalt. Widmo absorpcyjne wodnego roztworu witaminu w świetle pozafioletkowym posiada charakterystyczne maksima przy 287, 361 i 550 mμ z odpowiadającymi im współczynnikami ekstynkcji: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115, 204$ i 63 (por. rys. 1). Widmo absorpcyjne nie zmienia się w bardzo szerokich granicach pH. Również w podczerwieni witamin B₁₂ posiada charakterystyczne widmo, które przedstawia rys. 2. Na drodze analizy chemicznej wykazano, że B₁₂ posiada grupę CN związaną koordynacyjnie z kobaltem, przy czym grupa ta może być zastąpiona innymi ugrupowaniami bez większych trudności. Otrzymuje się w ten sposób szereg pochodnych B₁₂



Rys. 2. Widmo witaminu B₁₂ w świetle podczerwonym (14).

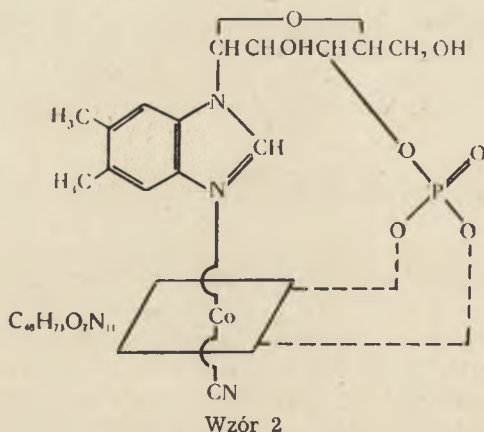
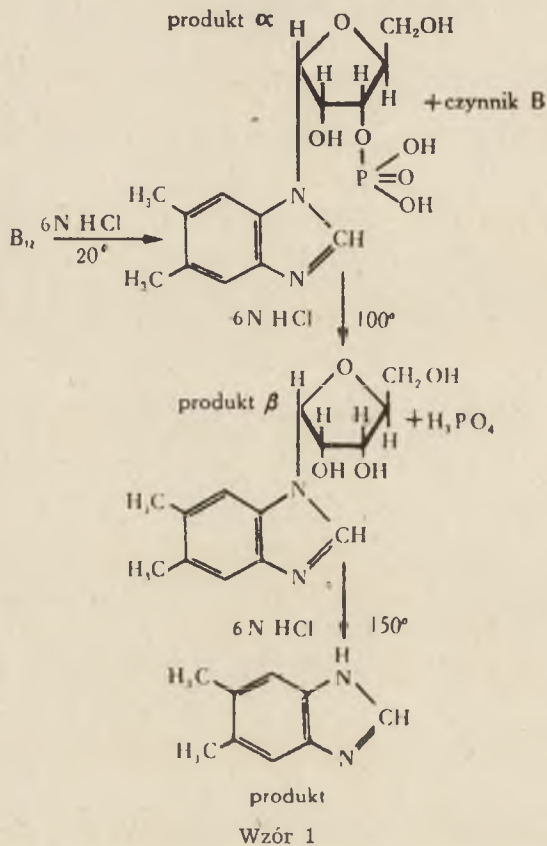
czyli tzw. kobalamin; właściwy witamin w tej nomenklaturze nazywa się cyjanokobalaminą (patrz dalej).

Dalsze badania nad strukturą cząsteczki witaminu B₁₂ polegały na stopniowej hydrolizie przy pomocy kwasów i zasad oraz identyfikacji produktów hydrolizy. Przez ogrzewanie witaminu w 150° ze stężonym HCl otrzymano 6 cząsteczek NH₃ z cząsteczki witaminu, kwas fosforowy, czerwony produkt zawierający Co oraz jeszcze dwa produkty, których obecność można było wykazać chromatograficznie. Jednym z tych produktów barwiącym się ninhydryną okazał się D_g-1-amino-2-propanol. Drugi produkt zidentyfikowano w świetle pozafioletkowym jako 5:6-dwumetylobenzimidazol. Przez zastosowanie łagodnych warunków hydrolizy otrzymano z B₁₂ dwie pochodne, nazwane związkami α i β, którymi były N-podstawne 5:6-dwumetylobenzimidazolu. Związek α zidentyfikowano jako N-α-D-rybofuranozydo-3-fosforan 5:6-dwumetylobenzimidazolu, natomiast związek β różni się tylko brakiem kwasu fosforowego od związku α. Przebieg i produkty hydrolizy przedstawia wzór 1.

Należy zaznaczyć, że witamin B₁₂ należy do α-N-glikozydów a nie do β jak pozostałe rybozydy występujące w przyrodzie, np. kwasy nukleinowe.

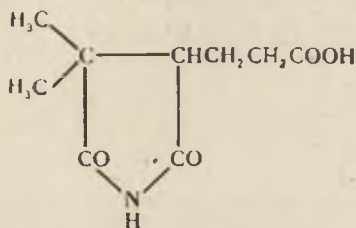
Na podstawie analizy widma absorpcyjnego dwucyjanowego kompleksu witaminu ustalono, że drugi atom azotu pierścienia benzimidazolu jest związany koordynacyjnie z resztą cząsteczki witaminu poprzez kobalt. Zebranie powyższych danych uzyskanych w wyniku prac grupy Follkera (15), Todda (16) i Armitage (17) pozwoliło na ustalenie częściowej struktury witaminu B₁₂ którą przedstawia wzór 2.

Stosując żmudne zabiegi chemiczne stwierdzono, że amoniak wydzielający się w czasie kwaśnej hydrolizy witaminu, pochodzi z pierwszorzędowych grup amidowych. Żywicowaty produkt powstający w czasie hydrolizy B₁₂ okazał się mieszaniną substancji o charakterze kwaśnym,



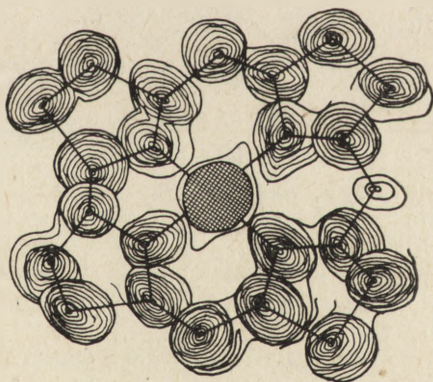
które posiadały jedną do siedmiu grup karboksylowych. Armitage i współprac. (17) przez zastosowanie elektroforezy bibułowej rozdzielili te produkty stwierdzając, że wszystkie te związki były pochodnymi karboksylowymi tzw. czynnika B, otrzymywanego z B₁₂ po odszczepieniu nukleotydu. Jeden z tych kwasów, mianowicie tzw. kwas sześciokarboksylowy otrzymano w stanie krystalicznym, wydzielając go z mieszaniny innych kwasów przy pomocy chromatografii jonowymiennej (16). Było to olbrzymie osiągnięcie, gdyż krystaliczny produkt mógł być poddany badaniom rentgenograficznym które w głównej mierze dały rozwiązanie struktury cząsteczki B₁₂. Sam czynnik B powstający jako produkt hydrolizy B₁₂, otrzymuje się również z kału przeżuwaczy oraz z płynów fermentacyjnych przy produkcji abtybiotyków.

Równocześnie grupa badaczy amerykańskich (18), przez utlenienie czynnika B chromianem sodu w środowisku kwasu octowego, otrzymała



Wzór 3

produkt, który okazał się imidem kwasu bursztynowego (wzór 3). Nasunęło to myśl, że kwas sześciokarboksylowy może się składać z rdzeni pyrolowych, analogicznie do układu porfiryny. Badania Hodgkin



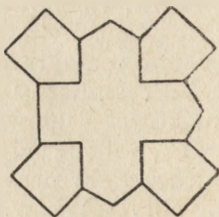
Rys. 3. Zagęszczenie elektronów atomów stanowiących rdzeń kwasu sześciokarboksylowego (por. wzór 4 (20).

i współprac. (19) oparte na analizie przy pomocy promieni X doprowadziły do potwierdzenia tej koncepcji i wyjaśnienia ogólnej struktury kwasu sześciokarboksylowego (por. rys. 3 i wzór 4 i 5).

W środku układu tkwi atom kobaltu. Jakkolwiek nasuwa się tu duże

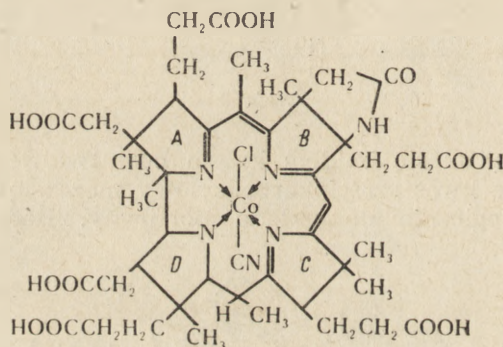
podobieństwo do pierścienia porfiryny, to jednak główną różnicą jest brak wiązania mekinowego między pierścieniami pyrolowymi A i D.

Podczas badań rentgenograficznych nad strukturą kwasu sześciokarboksylowego stwierdzono obecność pięcioczłonowego pierścienia zbu-



Wzór 4

dowanego na pierścieniu B wchodzącym w skład rdzenia kwasu sześciokarboksylowego (por. wzór 5). Przy badaniu w ten sam sposób witaminu, nie stwierdzono cyklicznego ugrupowania co wskazywało, że cyklizacja ma miejsce podczas hydrolizy B₁₂. Przez analizę produktu w świetle podczerwonym ustalono, że pierścień dodatkowy o strukturze laktamu



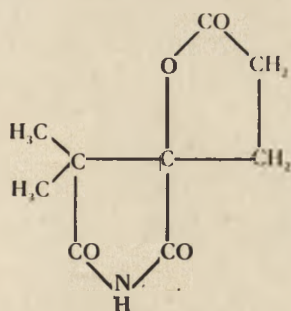
Wzór 5

jest utworzony przez resztę acetamidu związanego z węglem β pierścienia B i przez hydroksylację węgla β' tegoż pierścienia podczas hydrolizy witaminu. Cyklizacja przy pierścieniu B zachodzi tylko podczas hydrolizy B₁₂ w środowisku zasadowym, natomiast podczas hydrolizy kwaśnej otrzymuje się kwas siedmiokarboksylowy. Podobne zjawisko cyklizacji wskutek hydroksylacji węgla β pierścieni pyrolowych obserwuje się również przy chlorofilu.

Cyklizacja podczas hydrolizy B₁₂ zachodzi również przy pierścieniu C na co wskazuje wyosobniony przez Kuehla i współprac. (18) lakton, po hydrolizie witaminu kwasem chromowym (wzór 6).

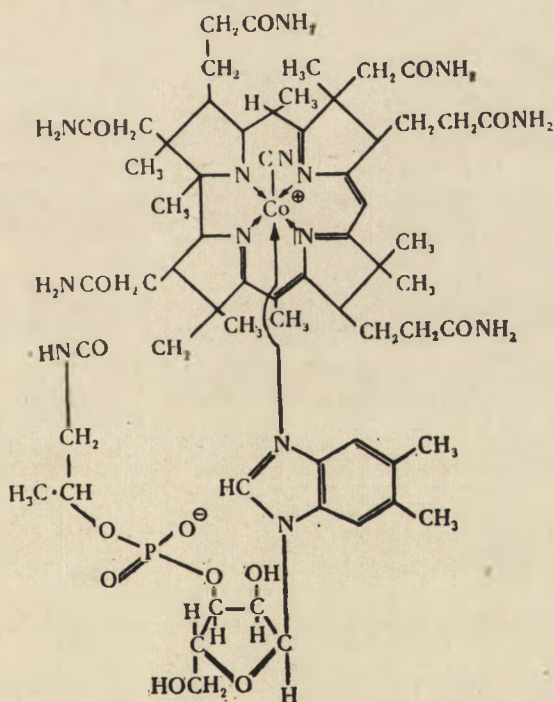
W dalszym ciągu, intensywne badania oparte na analizie krystalograficznej, prowadzone przez Hodgkin i współprac. (20) z Oxfordu. Trueblood i Prosena z uniwersytetu California w Los Angeles oraz badania przy pomocy analizy chemicznej prowadzone przez Todd i współprac. z Cambridge i Lester Smitha z Glaxo Labor. (21) doprowadziły do wyjaśnienia dalszych szczegółów budowy i ustalenia wzoru

cząsteczki B₁₂ (wzór 7). Z sześciu grup kwasowych kwasu sześciokarboksyłowego, cztery należą do reszty kwasu propionowego, dwie natomiast do kwasu octowego. Wszystkie reszty kwasowe przyłączone są do węgli β układów pyrolowych.



Wzór 6

Położenie ośmiu grup metylowych określono przy pomocy analizy promieniami X. Dane te pozwoliły na złożenie struktury całej cząsteczki witaminu. Aminopropanol związany jest amidowo z resztą kwasu pro-



Wzór 7

pionowego pierścienia D, natomiast kwas fosforowy łączy rybozę z resztą aminopropanolu. Ujemny ładunek kwasu fosforowego jest skompensowany dodatnim ładunkiem atomu kobaltu, a zatem cząsteczka B₁₂ posiada charakter jonu obojętnego.

Jak już wspomniano, grupa CN może być w odpowiednich warunkach zastąpiona innym ugrupowaniem, np. grupą hydroksylową, resztą azotynu, jonem chlorkowym itd. otrzymując cały szereg pochodnych kobalaminy. Tablica 1 zawiera niektóre pochodne kobalaminy i ich charakterystykę.

Tablica 1
Pochodne kobalaminy (22)

Nazwa	Podstawiona grupa	Widmo absorpcyjne	
		λ m μ	E ₁ cm ^{1%}
cyjanokobalamina	CN	287	115
		361	204
		550	63
hydroksykobalamina	OH	270—277	137
		352.5	150
		530	56
akwakobalamina	H ₂ O	—	—
chlorokobalamina	Cl	274—275	142
		352—353	174
		525—530	59
nitritokobalamina	ONO	255—275	187
		354	185
		530	75
cyjanatokobalamina	OCN	272—278	139
		353	140
		520—530	54
sulfatokobalamina	HSO ₄	272—275	135
		352	163
		520—530	55

Tablica 2

Najważniejsze analogi i pseudowitamina B₁₂ oraz ich aktywność biologiczna (11)

Nazwa związku	Posiadana zasada	Aktywność u kręgowców	Aktywność mikrobiologiczna			
			<i>L. leichmanii</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. gracilis</i>	Ochr. melham.
Witamin B ₁₂ (cyjanokobalamina)	5:6-dwumetylobenzimidazol	+	+	+	+	+
Analog witaminu B ₁₂ (desdwumetylo B ₁₂)	benzimidazol	+	++	++		+
Czynnik A (pseudo B _{12d})	2-metyloadenina	—	±	+	+	—
Pseudo B ₁₂	adenina	—	++	+	±	—
Pseudo B _{12b}	adenina	—	+		—?	
Czynnik G (deamino pseudo B ₁₂)	hypoksantyna	—	±	+		
Czynnik H (deamino czynnik A)	2-metylohypoksantyna	—	±	+		
Pseudo B _{12f}	2-metyloadenina	—	±			

Wszystkie te pochodne mogą być zamienione z powrotem na cyjanokobalaminę przez podziałanie jonami cyjankowymi przy pH 10—11.

Badania nad występowaniem B₁₂ u różnych mikroorganizmów doprowadziły do wyizolowania szeregu tzw. analogów B₁₂, które od tego ostatniego różnią się budową układu nukleotydowego, a właściwie zasadą nukleotydu. Tak otrzymano czynniki, które zamiast 5:6-dwumetylobenzimidazolu zawierają adeninę, 2-metyloadeninę, hypoksantynę, 2-metylohypoksantynę oraz benzimidazol. Wszystkie te czynniki u zwierząt nie posiadają aktywności biologicznej wzgl. tylko nieznaczną, natomiast są czynnikami wzrostowymi dla licznych drobnoustrojów. Tablica 2 zawiera zebrane najważniejsze analogi i pseudowitaminy B₁₂.

Niezależnie od różnicy w budowie zasady nukleotydu, wszystkie witaminy B₁₂ i pseudowitaminy pozostałą część struktury, czyli czynnik B, posiadają wspólny.

PIŚMIENNICTWO

1. Minot G. R. i Murphy W. P., J. Amer. med. Ass., **87**, 470, 1926.
2. Emery W. B. i Hurran W. J., Brit. med. J., **75**, 1, 1945.
3. Emery W. B. i Parker L. F. Y., Biochem. J. **40**, IV, 1946.
4. Shorb M. S., J. Biol. Chem., **169**, 455, 1947; **176**, 1463, 1948.
5. Mc Laughlan J. M., Clark J. A. i Campbell J. A., Arch. Biochem. Bioph., **46**, 244, 1953.
6. Ross G. I. M., J. Clin. Pathol., **5** 250, 1952.
7. Ford J. E., Brit. J. Nutrition. **7**, 299, 1953.
8. Rickes E. L., Brink N. S., Koniuszy F. R., Wood T. R. i Folkers K., Science, **107**, 396, 1948; **108**, 134, 1948.
9. Lester Smith E., Nature, **161**, 638, 1948; **162**, 144, 1948.
10. Fantès K. H., Page J. E., Parker L. J. E. i Lester Smith E., Proc. Roy. Soc. B., **136**, 592, 1950.
11. Briggs G. M. i Daft F. S., Ann. Rev. Biochem., **24**, 339, 1955.
12. Hoover S. R., Jasewicz L. B. i Porges N., Science, **114**, 213, 1951.
13. Kaczka E. A., Deuhewalter R. G., Holland A. i Folkers K., J. Amer. Chem. Soc. **73**, 355, 1951.
14. Lester Smith E., Fantès K. H., Ball S., Walter J. G., Emery W. B., Anslow W. K. i Walker A. D., Biochem. J., **52**, 389, 1952.
15. Kaczka E. A. i Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., **75**, 6317, 1953.
16. Cannon J. R., Johnson A. W. i Todd A. R., Nature, **174**, 1168, 1954.
17. Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. J. F., Lester Smith E., Stafford W. H. i Todd A. R., J. Chem. Soc., **3849**, 1953.
18. Kuehl F. A., Shunk C. H. i Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., **77**, 251, 1955.
19. Brink C., Hodgkin D. C., Lindsey J., Pickworth J., Robertson J. H. i White J. G., Nature, **174**, 1169, 1954.
20. Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Trueblood K. N., Prosen R. J. i White J. G., Nature, **176**, 325, 1955.
21. Bonnet R., Cannon J. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A. R. i Lester Smith E., Nature, **176**, 328, 1955.
22. Bukin W. N., Areszkina L. J. i Kucewa L. S., Usp. Sowr. Biol., **40**, 269, 1955.

Międzynarodowego Kongresu Biochemii. Prezydent będzie mógł, jeśli usprawiedliwiają to szczególne okoliczności i za zgodą Biura, zwołać nadzwyczajne Zebranie Zgromadzenia Ogólnego. Jeśli zresztą co najmniej $\frac{1}{3}$ członków Rady zażąda tego, Prezydent będzie zobowiązany zwołać nadzwyczajne zebranie Zgromadzenia Ogólnego.

Każda organizacja wchodząca w skład Unii płacić jej będzie roczną składkę. Będą dwa rodzaje członków. Organizacje wchodzące w skład Unii z Niemiec, ze Stanów Zjednoczonych z Francji, ze Zjednoczonego Królestwa i ZSRR płacić będą roczną składkę w wysokości 200 dolarów am. Organizacje te wysyłać będą po 2 delegatów na Zgromadzenie Ogólne. Organizacje innych krajów opłacać będą roczną składkę w wysokości 100 dolarów am. i wysyłać będą 1 delegata na Zgromadzenie Ogólne.

III.

6. Zgromadzenie Ogólne będzie miało moc podejmowania decyzji we wszystkim co dotyczy Unii włącznie z zmianami Statutu. Zgromadzenie Ogólne będzie mogło udzielać pełnomocnictw w poszczególnych sprawach Radzie i Komitetom specjalnym. Zmiana Statutu będzie mogła zostać uchwalona tylko wtedy, jeśli wypowie się za nią $\frac{2}{3}$ ważnych głosów. Krajom, których organizacja należąca do Unii płaci składkę roczną w wysokości 200 dolarów am. przysługują 2 głosy w głosowaniu, a pozostałym krajom po 1 głosie.

IV. Rada

7. Kierowanie Międzynarodową Unią Biochemiczną powierzone zostanie Radzie wybranej w sposób podany w art. 8 § V.

V.

8. Rada składać się będzie najwyżej z 20 członków wybranych spośród członków Zgromadzenia Ogólnego. Członkowie Rady wybrani będą od razu na okres 6 lat. W końcu tego okresu mandaty 5 członków Rady wygasną; kolejność wygasania mandatów ustali, jeśli zajdzie potrzeba, losowanie. Funkcja każdego z członków Rady nie może trwać dłużej niż 12 następujących po sobie lat.

VI.

9. Zebrania Rady odbywać się będą: (a) podczas kongresów międzynarodowych; (b) w innym czasie zależnie od decyzji Rady. Członkowie Rady mogą głosować drogą korespondencyjną. Decyzje będą podejmowane większością głosów i będą ważne, jeśli liczba głosów oddanych wynosi co najmniej $\frac{2}{3}$ liczby członków Rady.

VII.

10. Rada wybierze spośród swoich członków Prezydenta, Skarbnika i Sekretarza Generalnego. Prezydent będzie mógł pełnić swą funkcję najwyżej 6 lat. Sekretarz Generalny i Skarbnik będą mogli być powtórnie wybierani na swe stanowiska w czasie 12 po sobie następujących lat. Po tych 12 latach nie będą oni mogli być wybierani na te same stanowiska w ciągu 3 lat. Sekretarz Generalny utrzymywać będzie kontakt z organizacjami — członkami Unii i z innymi organizacjami, które nie są członkami Unii.

VIII.

11. Siedzibą oficjalną Unii będzie miejsce zamieszkania Sekretarza Generalnego, pod adresem którego kierowana będzie cała korespondencja dotycząca Unii.

12. Dla pokrycia wydatków w okresie między dwoma Międzynarodowymi Kongresami Biochemii Skarbnik i Sekretarz Generalny ustalą wspólnie na rok przed datą każdego Kongresu budżet pokrywający wydatki okresu dzielącego ten Kongres od następnego. Budżet ten zostanie przedłożony Radzie, która wyda wszystkie potrzebne rozporządzenia, aby pokryć wydatki określone w tym budżecie.

IX.

13. We wszystkich swych decyzjach Rada kierować się będzie tradycją wolnej międzynarodowej współpracy naukowej.

X.

14. Dla ułatwienia współpracy z organizacjami międzynarodowymi w innych dziedzinach nauki Międzynarodowa Unia Biochemiczna zwróci się z prośbą o przyjęcie jej w skład Międzynarodowej Rady Unii Naukowych.

Z działalności Międzynarodowej Unii Biochemicznej

Drugie Zgromadzenie Ogólne Unii

Drugie Zgromadzenie Unii odbyło się 1 sierpnia 1955 r. w Brukseli z okazji III Międzynarodowego Kongresu Biochemii. W Zgromadzeniu Ogólnym brali udział następujący delegaci: S. Akabori (Japonia), I. Baló-Banga (Węgry), J. Courtois (Francja), V. A. Engelhardt (ZSRR), A. H. Ennor (Australia), K. Felix (Niemcy), M. Florkin (Belgia), J. Heller (Polska), O. Hoffman-Ostenhof (Austria), K. Linderström-Lang (Dania), K. Lohmann (Niemcy), S. Ochoa (USA), R. H. S. Thompson (Wielka Brytania), D. L. Thompson (Kanada), A. I. Oparin (ZSRR), R. A. Paters (Wielka Brytania), J. Roche (Francja), A. Rossi-Fanelli (Włochy), E. H. Stotz (USA), O. Walaas (Norwegia), H. G. K. Westenbrink (Holandia).

Prócz delegatów krajów należących do Unii w obradach brali udział: C. R. Harrington, honorowy członek Rady, J. Murray Luck przewodniczący Sekcji chemii biologicznej Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej, C. Fromageot sekretarz Sekcji chemii biologicznej Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej, E. Boeri delegat Międzynarodowej Unii Nauk Biologicznych, K. Bernhard oraz B. C. Guha, obaj członkowie dawniejszego Międzynarodowego Komitetu Biochemicznego, który poprzedzał istnienie Unii. Przewodniczył M. Florkin. Sekretarzem Generalnym Unii jest prof. R. H. S. Thompson, którego adres brzmi: Department of Chemical Pathology, Guy's Hospital Medical School, London, S. E. 1. Skarbnikiem Unii jest prof. E. H. Stotz, ze Stanów Zjednoczonych.

Oprócz szeregu spraw organizacyjnych o mniejszym znaczeniu drugie Zgromadzenie Ogólne przyjęło do Międzynarodowej Unii Biochemicznej Polskę, Węgry, Czechosłowację, Kanadę i Hiszpanię. Ustalono również, że IV Międzynarodowy Kongres Biochemii odbędzie się w 1958 r. w Wiedniu. Postanowiono również zorganizować

2 sympozja: w lecie 1957 r. w Moskwie na temat „Początki życia” oraz na jesieni tegoż roku w Japonii na temat „Wybranych zagadnień biochemii enzymów”.

*

Ostatnio Bułgaria przystępuje do Międzynarodowej Unii Biochemicznej. W Bułgarii powstał Narodowy Komitet Biochemiczny w następującym składzie: Dossio Bakałow, przewodniczący, Dimiter Naszkow, sekretarz, Boris Koi-czew, Angel Kalaidiew, Maria Stefanowa — członkowie. W związku z tym Bułgaria zwróciła się o przyjęcie do Unii.

*

W chwili obecnej na terenie Międzynarodowej Unii Biochemicznej rozpatrywane jest przyjęcie do Unii Komitetów Biochemicznych Chin i Portugalii. Członkami tych komitetów są następujący biochemicy: w Chinach prof. Wang- Yin-g-lai, zastępca dyrektora Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Chińskiej, który jest przewodniczącym Komitetu, prof. Wong Yu, zastępca dyrektora Instytutu Chemii Organicznej Akademii Chińskiej, prof. Lin Ku-o-hao, kierownik Zakładu Biochemii Instytutu Nauk Medycznych, prof. Yin Hung-hang, zastępca dyrektora Instytutu Fizjologii Roślin Akademii Chińskiej, i prof. Yang En-fu, kierownik Zakładu Żywienia Centralnego Instytutu Zdrowia.

W skład portugalskiego komitetu wchodzi następujący uczeni: prof. dr Joao de Oliveira e Silva, profesor biochemii na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Coimbr, prof. dr Elisio Filinto Milheiro Fernandes, profesor biochemii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Porto, prof. dr Silverio Ferreira Gomes da Costo, prof. biochemii na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Lizbońskiego, dr Kurt Jacobson, profesor chemii na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Lizbońskiego reprezentujący Instytut Badań Naukowych „Bento da Rocha Cabral”, i prof. dr Guilherme Jorge Janz, Instytutu Medycyny Tropikalnej.

Z chwilą przyjęcia wymienionych wyżej narodowych komitetów biochemicznych Unia nasza liczyć będzie 31 państw — członków.

III Sesja Sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego PAN z prac datowanych w 1955 r.

W dniach 29 i 30 maja 1956 roku odbyła się w Warszawie III Sesja Sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego, która objęła tym razem zarówno placówki dotowane przez Komitet, jak i placówki biochemiczne własne Polskiej Akademii Nauk. Kierunki badań poszczególnych ośrodków przedstawia się jak następuje:

1. Ośrodek kierowany przez prof. dr T. Baranowskiego we Wrocławiu złożył sprawozdanie z następujących prac:

- 1) Rozdzielanie hormonów płata przedniego przysadki.
- 2) Przygotowanie i właściwości biologiczne związków analogicznych do glutationu.
- 3) Z badań biochemicznych nad grupami krwi.

Wszystkie prace referował osobiście prof. Baranowski.

2. Ośrodek kierowany przez prof. dr Janinę Opieńską-Blauth (Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Lublinie) złożył sprawozdanie z następujących czterech prac:

1) Przemiana węglowodanowo-fosforowa u mykobakterii (referował dr M. Szymona).

2) Transaminaza asparaginowo-glutaminowa u *Mycobacterium phlei* (referował mgr E. Gąsior).

3) Paskowo-krążkowa technika chromatograficzna w rozdzielaniu mieszanin aminokwasowych (referował dr T. Borkowski).

4) Nowe wskaźniki przy identyfikacji aminokwasów w chromatogramach jedno i dwukierunkowych (referowały prof. J. Opieńska-Blauth, mgr H. Kowalska i mgr M. Pietrusiewicz).

3. Ośrodek kierowany przez prof. B. Skarżyńskiego (Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie).
Przedstawił badania nad witaminem B₁₂ we krwi. Ponadto prof. Skarżyński omówił szerszy udział polskiej delegacji w obradach Sympozjum w Hamburgu poświęconego witaminowi B₁₂.

4. Ośrodek kierowany przez doc. dr J. Dudę i doc. dr J. Pawełkiewicza (Zakład Mikrobiologii Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu). Z ośrodka tego doc. Pawełkiewicz zreferował dwie prace:

1) Wytwarzanie wolnych porfiryn przez *Propionibacterium shermanii*.

2) Biosynteza witaminu B₁₂ i analogów witaminu B₁₂.

5. Ośrodek kierowany przez prof. dr. W. Mozołowskiego (Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku) przedstawił pracę

1) Dalsze badania nad odwracalną hemolizą (referował dr A. Manitius).

6. Ośrodek kierowany przez doc. dr. J. Meduskiego (Pracownia Przemiany Pośredniej Zakładu Biochemii PZH) przedstawił pięć prac:

1) O metodzie chemicznej oznaczania fosfolipazy C i badania nad kinetyką działania fosfolipazy C na lecytynę jaja kurzego (referowała lek. A. Zakrzewska).

2) Wodorowanie lecytyny i kinetyka działania fosfolipazy C na lecytynę wodorowaną (referował mgr. A. Zbrożyna).

3) Opis niektórych właściwości otrzymanego preparatu fosfolipazy C (referowała mgr. D. Olkowska).

4) Oznaczania lecytyn w niektórych środowiskach biologicznych za pomocą fosfolipazy C (referowała mgr B. Ługowska-Orłowska).

5) Zmiany zawartości lecytyn woreczka żółtkowego zarodka jaja kurzego w czasie rozwoju (referowała mgr. B. Ługowska-Orłowska).

7. Ośrodek kierowany przez prof. dr. A. Dmochowskiego (Zakład Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego) zgłosił trzy prace, które referowali prof. Dmochowski, mgr inż. E. Sempiańska, i lek. L. Kłyszewko:

1) Frakcjonowanie β -nukleoproteidów łusek łuszczyca, oraz wstępne badania nad β -nukleoproteidami skóry ludzkiej.

2) Ilościowe oznaczanie kwasów nukleinowych w łuskach łuszczyca.

3) Oznaczanie krzemu w łuskach łuszczyca.

8. Zakład Biochemii PAN, kierowany przez prof. dr. J. Hellera przedstawił prace poszczególnych pracowników:

1) Pracownia Biochemii Ewolucyjnej prof. I. Mochnackiej:

a) prof. J. Heller i mgr M. Szafrąński: O wykazaniu enzymów cyklu pentozowego glukozy u *Mycobacterium tbc.* R37V.

b) prof. J. Heller i mgr. Szarkowska: Rola tyrozynazy w metabolizmie wilczomlecza z zastosowaniem techniki izotopowej.

c) mgr. Szarkowska: Reduktaza chinonowa u wilczomlecza.

d) mgr. Jeżewska: Przemiana nukleotydoma w cyklu rozwojowym wilczomlecza.

e) prof. J. Heller i dr M. Piechowska: Rola pyrofosforanów u wilczomlecza.

f) prof. I. Mochnacka i mgr. Szafranski: Badanie cyklu pentozowego w mózgu normalnych gołębi i gołębi z awitaminozą B₁.

g) mgr. Szarkowski we współpracy z Pracownią Biochemii Roślin. Wpływ bodźcowania żelaziciankiem na oddychanie kiełków pszenicy.

2) Pracownia Biochemii Roślin prof. I. Reifera.

a) Maria Możejko-Toczko: Biosynteza alkaloidów łubinu niebieskiego.

b) Kazimierz Toczko: Opracowanie metody ilościowego oznaczania pięciu głównych alkaloidów opium.

c) Kazimierz Kleczkowski: Przemiana niektórych składników cyklu ornitynowego u roślin.

d) Danuta Kleczkowska: Hodowla tkanek łubinu in vitro.

e) Maria Solecka: Oddychanie cytochromowe u roślin.

Wszystkie prace na Sesji Sprawozdawczej referował prof. Heller z powodu nieobecności w kraju prof. Reifera.

3) Pracownia Biofizyczna doc. D. Shugara:

a) Kwasy nukleinowe w roślinach.

b) Rybonukleaza: Wpływ środowiska i zagadnienie grup SH.

c) Struktura pochodnych ksantyny i kwasu orotowego.

Wszystkie trzy prace referował doc. Shugar.

d) Kinetyka inaktywacji rybonukleazy (Referowała mgr. E. Gajewska).

e) Fotoliza pochodnych kwasów nukleinowych (Referował mgr. K. Wierzcowski).

4) Pracownia Cytochemiczna doc. A. Szenberga:

a) Regeneracja niektórych układów enzymatycznych w wątrobie szczura po hepatektomii (Referowała mgr. C. Janion).

9. Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, kierowany przez prof. dr. W. Niemierkę. Podczas sesji sprawozdawczej najpierw kierownik Zakładu wprowadził w problematykę Zakładu, a następnie poszczególni pracownicy zreferowali sześć prac:

1) P. Włodawer: Rola fosfolipidów w procesach przyswajania wosku przez *Galleria mellonella*.

2) A. Przełęcka: Cytochemiczne badania występowania fosfolipidów w jelicie *Galleria mellonella*.

3) H. Załuska: Glikogen wolny i związany w rozwoju jedwabnika.

4) L. Wojtczak: Z zagadnień lokalizacji komórkowej niektórych enzymów u *Galleria mellonella*.

5) M. Dydyńska i I. Kąkol: Wolne i związane nukleotydy w mięśniach żaby. (Referowała I. Kąkol)

6) J. Brahms: Wolne grupy SH w czynności mięśni.

KONGRESY I ZJAZDY MIĘDZYNARODOWE

Konferencja o biochemii białek

W dniach od 3 do 5 października 1956 r. w Liblicach pod Pragę w pałacu barokowym, stanowiącym obecnie własność Czechosłowackiej Akademii Nauk, odbyła się z inicjatywy prof. Oriechowicza (ZSRR) konferencja, której tematyka obejmowała:

1. Ogólne właściwości związków białkowych.
2. Mikrostruktura białek.
3. Proteosynteza.

Pierwszy kierunek obrad reprezentował główny wykład prof. Oriechowicza i koreferaty prof. Baranowskiego (Polska), prof. Strauba i prof. Deveny (Węgry) oraz prof. Pasynskiego (ZSRR). Koreferaty przedstawiały współczesny kierunek badań nad białkami poszczególnych krajów.

Drugi kierunek badań otworzył programowy wykład gospodarza konferencji prof. Šorma, sekretarza generalnego Czechosłowackiej Akademii Nauk i kierownika Zakładu Biochemii Akademii. O stanie badań nad mikrostrukturą białek w Związku Radzieckim zamiast chorego prof. Chessina mówił dr Deborin. Stan badań w Czechosłowacji przedstawił współpracownik prof. Šorma dr Keil.

Trzeci kierunek badań otworzył wykład programowy prof. Strauba i koreferaty dr Rychlika (CSR), prof. Rapoporta (NRD).

Dyskusja wniosła wiele nowego i ciekawego materiału do każdego z trzech zakresów obrad. W dyskusji nad proteosyntezą zabierał m. in. głos doc. Meduski, referując prace kierowanego przez siebie ośrodka.

W wyniku obrad na oddzielnym organizacyjnym zebraniu uczestnicy konferencji powzięli następującą rezolucję:

„Uczestnicy konferencji odbytej w Liblicach (Czechosłowacja) od 3 do 5 października 1956 r. z udziałem przedstawicieli Bułgarii, Węgier, NRD, Polski i Związku Radzieckiego oraz Czechosłowacji wysłuchali następujących referatów i przedyskutowali je:

„O stanie badań nad białkami w odnośnych krajach i o zadaniach dalszych prac naukowych w zakresie wyosabniania i krystalizacji białek” (T. Baranowski — Polska);

„O badaniu struktury chemicznej białek” (W. N. Oriechowicz — ZSRR, F. Šorm — CSR, B. Keil — CSR);

„Struktura fizyczna i fizykochemiczne właściwości białek” (A. G. Pasynskij — ZSRR).

„Biosynteza białek” (F. Straub — Węgry, S. Rapoport — NRD, I. Rychlik — CSR).

Stwierdzono przy tym co następuje:

Ostatnio osiągnięto cenne wyniki w badaniach nad określeniem struktury białek szczególnie przez powiązanie studiów mikrostruktury chemicznej ze studiami fizycznej makrostruktury białek przy użyciu najnowszych fizykochemicznych zdobytych metod badawczych oraz dzięki teoretycznemu opracowaniu wyników.

Znaczne postępy uczyniły badania nad proteosyntezą w kierunku poznawania tworzenia enzymów w preparatach uszkodzonych komórek, w kierunku lokalizacji syntezy białek w częściach komórek oraz w kierunku poznawania udziału wolnych aminokwasów i peptydów w tych procesach.

W chwili obecnej następujące kierunki badań posiadają najbogatsze perspektywy:

a. w poznawaniu struktury białek dokładne badanie struktury i właściwości peptydów oraz białek niskocząsteczkowych posiadających swoiste, biologiczne własności;

b. w proteosyntezie użycie równoczesne metody izotopowej, wyosobniania i analizy chemicznej powstałych białek oraz określanie ich biologicznych właściwości. Należy przy tym zwracać uwagę przede wszystkim na wyjaśnianie roli jaką w omawianych procesach grają kwasy nukleinowe.

Dla skutecznego rozwiązania tych zadań konieczne jest — zdaniem uczestników konferencji — ustalenie między państwami biorącymi w konferencji udział ścisłej koordynacji poczynić, wzajemnego informowania i pomocy w badaniach nad białkami.

W tym celu byłoby pożyteczne ustanowienie patronatów wiodących laboratoriów w następujących dziedzinach badań:

a) wyosobnianie i krystalizacja białek (Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu i Instytut Chemii Biologicznej i Medycznej Akademii Nauk Medycznych ZSRR);

b) ogólna charakterystyka białek (Instytut Chemii Biologicznej i Medycznej Akademii Nauk Medycznych ZSRR);

c) chemiczna mikrostruktura białek (Instytut Chemiczny Czechosłowackiej Akademii Nauk);

d) biosynteza białek (Instytutu Chemii Medycznej Uniwersytetu w Budapeszcie).

Zadaniem tych patronatów byłaby pomoc przy opracowywaniu nowych metod, organizacja pomocy technicznej i wymiana pracowników naukowych między laboratoriami zajmującymi się badaniem białek państw biorących udział w konferencji.

Konferencja aprobuje kierunki badań nad białkami zaproponowane przez uczestników konferencji (w załączeniu do niniejszej rezolucji plany badań).

Dla poprawy wzajemnego informowania o osiągnięciach konferencja zaleca wydawanie biuletynu informacyjnego, który powinien zawierać streszczenia prac znajdujących się w druku, krótkie doniesienia o nowych metodach i aparatach, które zostały opracowane w różnych laboratoriach a ponadto informacje o rzadkich odczynnikach i materiałach oraz inne wiadomości.

Konferencja proponuje powierzyć wykonanie tych zadań tj. wzajemnego informowania i koordynacji Komitetowi do Spraw Białek, który ma następujący skład: Baranowski, (Polska), Keil (CSR), Oriechowicz (ZSRR), Rapoport (NRD), Szörenyi (Węgry), Šorm (CSR), Straub (Węgry), Engelhardt (ZSRR).

Do udziału w obradach Komitetu należy zaprosić przedstawicieli organizacji naukowych następujących państw: Albanii, Bułgarii, Chin, Korei, Rumunii, Jugosławii, Mongolii.

Zgromadzenie plenarne Komitetu odbywać się będzie raz do roku, coraz to w innym państwie biorącym udział w konferencji. Konferencja proponuje odbyć najbliższe zgromadzenie Komitetu na jesieni (wrzesień) 1957 r. w Budapeszcie.

Konferencja powierza Komitetowi następujące zadania:

- a) opracować w ciągu 1957 r. na podstawie propozycji państw biorących udział w konferencji plan perspektywiczny problematyki badawczej na najbliższe lata,
- b) przygotować wnioski o rozdziale zamówień przyrządów i materiałów potrzebnych dla badań nad białkami,
- c) przygotować międzynarodowe sympozjum nad białkami w 1959 r.

Konferencja uważa za konieczne ustalenie między towarzystwami biochemicznymi krajów biorących udział w konferencji ściślejszych kontaktów i poleca założenie takich towarzystw w tym państwach, w których towarzystwa te jeszcze nie istnieją.

Konferencja proponuje, by Komitet wybierany był co 3 lata i by w czasie tych wyborów określano siedzibę Komitetu. Siedzibą Komitetu w ciągu pierwszych trzech lat winna być Praga.

Konferencja niniejsza jest pierwszym spotkaniem międzynarodowym pracowników naukowych Związku Radzieckiego i demokracji ludowych w zakresie białek.

Konferencja stwierdza pozytywne wyniki tego spotkania i wyraża Czechosłowackiej Akademii Nauk oraz Akademikowi F. Šormowi swoje podziękowanie za znakomitą organizację.

Rezolucja niniejsza winna być przedłożona do aprobaty Prezydium Akademii Nauk ZSRR, Akademii Nauk Medycznych ZSRR, Węgierskiej Akademii Nauk, Akademii Nauk NRD, Polskiej Akademii Nauk i Czechosłowackiej Akademii Nauk.

Rezolucję przyjęto w Liblicach 5 października 1956 r."

Załącznik

Plany laboratoriów w CSR

1. Studia porównawcze w zakresie mikrostruktury chymotrypsynogenu, tripsyny, myoglobiny, pepsyny, rozmaitych gatunków zwierząt oraz kilku prostszych białek roślinnych. Równocześnie badana będzie możliwość wyosobnienia składników tych białek (o średnim ciężarze cząsteczkowym) oraz badane będą ogólne reakcje białek w stanie rodzimym.

2. Badane będą ogólne problemy proteosyntezy z zamiarem wyjaśnienia jej poszczególnych faz. Tu wykorzystane zostaną nasze doświadczenia w zakresie mikrostruktury białek. Obiektem studiów nad proteosyntezą będą przede wszystkim trzustka, retikulocyty i bakterie. Równocześnie poddany zostanie badaniu mechanizm działania inhibitorów proteosyntezy, a zwłaszcza antybiotyków.

3. W związku z badaniami nad proteosyntezą opracowywana będzie biochemia kwasów nukleinowych i produktów ich rozkładu oraz mechanizm działania kwasów nukleinowych w proteosyntezie.

Plany laboratoriów w ZSRR

1. Wyosobnianie indywidualnych białek, badanie ich właściwości i czynności w ustroju.

2. Badanie składu i struktury białek (skład aminokwasów, grupy końcowe końca C i końca N, następstwo aminokwasów w łańcuchach, grupy czynne w białkach, ciężar cząsteczkowy, postać i wymiary cząsteczek).

3. Mechanizm biosyntezy i przekształcenia białek wewnątrz i na zewnątrz ustroju.

4. Badania nad uszkodzeniem składu chemicznego, właściwości i czynności białek w różnych stanach patologicznych ustroju oraz studia nad środkami zapobiegawczymi przeciw takim uszkodzeniom.

Plany laboratoriów na Węgrzech

1. Krystalizacja rozmaitych białek w różnych warunkach (białka takie jak dehydrogenazy aldehydu fosfoglicerynowego uzyskane z różnych gatunków, dehydrogenaza alkoholowa, albuminy surowicze, hemoglobiny, rozmaite enzymy proteolityczne i rybonukleaza). Czystość badanych białek kontrolowana będzie za pomocą precipitacji ilościowej immunobiologicznie, a prócz tego metodami fizykochemicznymi, tj. sedymentacją i elektroforezą. Porównywana będzie szybkość proteolizy aminokwasów końców N i C oraz peptydów z punktu widzenia swoistości gatunkowej i zależności między czynnością, a strukturą.

Do tych badań użyte zostaną opracowane już metody techniki DNP, PTC, tiohydantoinowej oraz karboksypeptydazowej.

Podjęte zostaną badania nad swoistością dwóch frakcji uzyskanych już z elastazy, a mianowicie elastomukazy i właściwej elastazy krystalicznej.

2. Kontynuowane zostaną badania nad mechanizmem syntezy amylazy: podjęte zostaną usiłowania wyosobnienia hipotetycznego prekursora. Badana będzie rola kwasu nukleinowego w przypadku syntezy amylazy oraz syntezy penicylinazy. Badania te zostaną uzupełnione studiami nad mechanizmem działania dwuaminoakrydyn w syntezie białek i w infekcji fagowej oraz nad mechanizmem aktywacji acylowej aminokwasów.

Opisywane będą właściwości wolnych peptydów gruczołu jedwabnika z uwzględnieniem ewentualnych związków pośrednich w syntezie fibroiny.

Plany laboratoriów w Polsce

1. Badania struktury prolaktyny.
2. Wymogi strukturalne dla działania biologicznego prolaktyny.
3. Badania nad wykryciem swoistych inhibitorów proteaz tkankowych.
4. Wyosobnienie i identyfikacja czynnika eozynofilii z średniego płata przesadki mózgowej.

Plany laboratoriów w NRD

1. W zakresie chemii fizycznej białek przedsięwzięte zostaną systematyczne badania kinetyczne nad wpływem rozmaitych czynników, jonów i innych na zachowanie hemoproteidów.

2. W zakresie proteosyntezy kontynuowane będą badania nad tworzeniem hemoglobiny w retikulocytach. Wybijają się tu na plan pierwszy następujące kierunki badań:

- a) poznanie chwiejnych czynnościowo frakcji zrębu,
- b) badania tzw. fazy „rest-N”, a zwłaszcza jej peptydów.
- c) badania swoistości kwasów rybonukleinowych, rybonukleazy i związków ją hamujących a także przemiany nukleotydowej.
- d) zależności między oddychaniem endogennym a proteosyntezą.

Jerzy Meduski

SPIS TREŚCI

Od Redakcji	403
SPRAWOZDANIA CZŁONKÓW DELEGACJI PAN NA III MIĘDZYNARODOWY KONGRES BIOCHEMIKÓW W BRUKSELI	
Józef Heller — Utlenienia i fosforylacje	405
Tadeusz Korzybski — Budowa i właściwości niektórych anty- biotyków polipeptydowych i grzybobójczych antybiotyków o cha- rakterze związków nienasyconych	435
Andrzej Morawiecki — Enzymologia i biochemia mięśni	449
Włodzimierz Niemierko — Zoologia chemiczna	463
Ignacy Reifer — Przemiany pośrednie w procesie fotosyntezy	469
Bolesław Skarżyński — Postępy badań w zakresie odżywia- nia, patologii i immunochemii oraz chemii klinicznej	481
Piotr P. Słonimski — Adaptacja procesów oddechowych: roz- wój układu hemoproteidowego, indukowanego przez tlen	493
AKTUALNOŚCI BIOCHEMICZNE	
Włodzimierz Ostrowski — Wyjaśnienie budowy witaminu B ₁₂	515
Statut Międzynarodowej Unii Biochemicznej	525
Z działalności Międzynarodowej Unii Biochemicznej	527
III Sesja Sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego PAN	528
KONGRESY I ZJAZDY MIĘDZYNARODOWE	
Konferencja o biochemii białek (J. Meduski)	531

Cena zł 15.—