

72131

Post. biochem.

POLSKA AKADEMIA NAUK
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK

TOM VI



1960

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLÓW

1. AMP — adenozyjnofosforan
2. ADP — adenozyndwufosforan
3. ATP — adenozynotrójfosforan
4. CMP — cytydynojnofosforan
5. CDP — cytydynodwufosforan
6. CTP — cytydynotrójfosforan
7. CoA lub CoASH — koenzym A
8. ac-SCoA — acetylokoenzym A
9. DN (kwas) — kwas dezoksyrybonukleinowy
10. DPN — nukleotyd dwufosfopirydynowy
11. DPNH — postać zredukowana DPN
12. FAD — dwunukleotyd flawinoadenilowy
13. FADH₂ — postać zredukowana FAD
14. FMN — monokleotyd flawinowy
15. GMP — guanozyjnofosforan
16. GDP — guanozyndwufosforan
17. GTP — guanozynotrójfosforan
18. GSH — postać zredukowana glutationu
19. GSSG — postać utleniona glutationu
20. IMP — inozyjnofosforan
21. IDP — inozyndwufosforan
22. ITP — inozynotrójfosforan
23. P — ortofosforan
24. PP — pirofosforan
25. PAPS — adenozyjno-3'-fosforano-5'-fosforanosiarcezan
26. RN (kwas) — kwas rybonukleinowy
27. TPN — nukleotyd trójfosfopirydynowy
28. TPNH — postać zredukowana TPN
29. UMP — urydynojnofosforan
30. UDP — urydynodwufosforan
31. UTP — urydynotrójfosforan
32. UDPG — urydynodwufosforan glikozy
33. UDPGal — urydynodwufosforan galaktozy

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM VI

1960

ZESZYT 4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY
Redaktor — Irena Chmielewska
Sekretarz — Witold Brzeski

RADA REDAKCYJNA
Przewodniczący — Józef Heller

Członkowie: Włodzimierz Mozołowski, Janina Opieńska-Blauth, Bolesław Skarżyński

ADRES REDAKCJI
KATEDRA BIOCHEMII UW
Warszawa 22, Al. Żwirki i Wigury 6/8
tel. 22 22 91, wewn. 46

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1960

Nakład 880 (752 + 128)	Oddano do składania 23.VIII.60
Ark. wyd. 11,5. Ark. druk. 9,75 + wkładka 05	Podpisano do druku 14.XI.60
Papier druk. sat. kl. V, 70 g., 70×100	Druk ukończono w listopadzie 1960
Cena zł 20.—	Zam. 1591/60. C-29

DRUKARNIA IM REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

WANDA LEYKO* i LIDIA BUCZEK**

Budowa przestrzenna hemoglobiny

Structure of Haemoglobin

Recent investigations of Kendrew, concerned with a new polypeptide chain-fold in sperm whale myoglobin, are described. The same structure was found by Perutz in horse haemoglobin and appears probably in all haemoglobins and myoglobins of vertebrates.

Hemoglobina, występująca w krwinkach czerwonych zwierząt kręgowych, jest białkiem o masie cząsteczkowej około 67 000. Cząsteczka jej zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych, połączonych z czterema kompleksami żelazoporfirynowymi. Łańcuchy polipeptydowe posiadają mniej więcej jednakowe wymiary i tworzą dwie identyczne pary, każda o masie cząsteczkowej około 34 000.

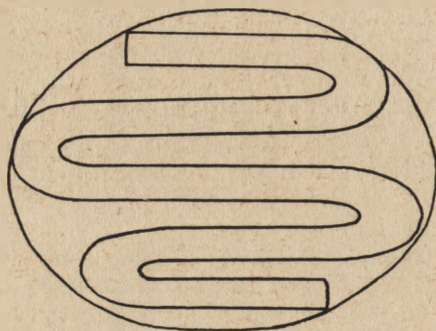
Badania nad budową hemoglobiny dotyczyły w pierwszym rzędzie rozmieszczenia przestrzennego grup prostetycznych w stosunku do cząsteczki globiny. Według poglądu Paulinga z 1939 roku grupy hemu znajdują się wewnątrz cząsteczki, przy czym leżą w jednej płaszczyźnie w czterech narożach kwadratu. Bliskie sąsiedztwo tych grup ułatwia, zdaniem Paulinga, tworzenie się szeregu związków pośrednich między Fe i O₂ w procesie oksygenacji, polegającym na stopniowym łączeniu się tlenu z żelazem.

Perutz i współpracownicy na podstawie badań przeprowadzonych w latach 1949—1957 doszli do odmiennych niż Pauling wniosków. W myśl poglądu tych autorów grupy hemu umieszczone są na powierzchni cząsteczki, mniej więcej prostopadle do łańcuchów polipeptydowych i równolegle do siebie. Cząsteczka hemoglobiny ma postać walca, przy czym według pierwotnej koncepcji miał to być walec o przekroju kołowym, następnie walec elipsoidalny, wreszcie zaś elipsoida, która w stanie wysuszonym ma wymiary $60 \times 40 \times 40$ Å, a po uwodnieniu wymiary — $70 \times 55 \times 55$ Å, zwiększone warstwą wody związanej. Łańcuchy

* Dr, adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi.

** Mgr biologii.

polipeptydowe biegną równolegle do osi długiej elipsy (rysunek 1), przy czym posiadają one strukturę śrubową (*helix*). Łańcuchy te leżą jedne nad drugimi, w czterech warstwach, z których dwie środkowe połączone są nieco luźniej, co ułatwia rozpad cząsteczki hemoglobiny na dwie jednokowe części („podcząsteczki”).



Rysunek 1. Przebieg łańcucha polipeptydowego w hemoglobinie wg Perutza (4).

W 1958 roku W a n g wysunął interesującą hipotezę, tłumaczącą mechanizm łączenia się hemoglobiny z tlenem cząsteczkowym (5). Według tej hipotezy hemoglobina łączy się z tlenem ze względu na niską stałą dielektryczną bezpośredniego sąsiedztwa tych części łańcucha polipeptydowego, do których przyłączone są grupy hemu. W a n g przyjmuje, że w roztworze wodnym grupy te nie są całkowicie odsłonięte, ale przynajmniej częściowo przykryte hydrofobowymi grupami globiny, które grupy hydrofilne zwrócone są do roztworu. Autor ten dochodzi do wniosku, że średnia stała dielektryczna przykrytego hemu jest znacznie niższa niż całkowicie odsłoniętego. To osłonięcie grup hemu, w myśl hipotezy W a n g a, opóźnia proces nieodwracalnego utlenienia, a nie przeszkadza w odwracalnym wiązaniu i odszczepianiu tlenu. Celem potwierdzenia swej hipotezy W a n g sporządził model hemoglobiny, otaczając odpowiednio spreparowany hem warstewką polistyrenu. Związek ten, będący pierwszym udanym modelem Hb, trwałym w obecności wody, okazał się zdolny do procesu odwracalnej oksygenacji.

Wydaje się więc, że położenie grup hemu można przyjąć za wyjaśnione. Leżą one na powierzchni cząsteczki, osłonięte w mniejszym czy większym stopniu grupami hydrofobowymi globiny. Natomiast przedstawione w 1957 roku poglądy Perutza i współpracowników na konfigurację i rozmieszczenie przestrzenne łańcuchów polipeptydowych uległy w ostatnich latach poważnym zmianom.

W wyniku najnowszych badań Perutza i współpracowników powstał w 1960 roku model hemoglobiny, różniący się znacznie od modelu

podanego przez tych autorów przed paroma laty. Perutz, tak jak poprzednio, użył do swych badań oksy- i methemoglobiny końskiej, ponieważ krystalizują one w postaciach szczególnie odpowiednich do badań rentgenograficznych, a przy tym mogą być przechowywane w roztworach soli przez długi okres czasu. Godną uwagi właściwością kryształów methemoglobiny jest ich charakter „gąbkowaty”, wypływający z tego, że warstwy utworzone z cząsteczek białkowych poprzedzielane są jak gdyby warstewkami wody. Ponad 50% objętości kryształów zajmuje ciecz krystalizacyjna. Więcej niż 1/3 tej objętości przypada na tzw. „wodę związaną”, połączoną ściśle z cząsteczkami białka, a więc niedostępną jako rozpuszczalnik dla elektrolitów, natomiast pozostałość jest „wodą wolną”, która stanowi doskonale środowisko dla dyfuzji całego szeregu jonów, bez szkody dla budowy kryształów. Gdy np. wprowadzi się ciężkie atomy w obręb cieczy krystalizacyjnej, to tym samym zwiększy się siła rozproszenia promieni X przez tę ciecz. Zmiany te umożliwiają wyciągnięcie wniosków o rozmieszczeniu środowiska płynnego w elemencie jednostkowym, a następnie o kształcie cząsteczki białkowej.

Na podstawie swych ostatnich badań Perutz stwierdził, że cztery elementy jednostkowe cząsteczki hemoglobiny tworzą układ tetraedru, przy czym każdy z tych elementów jest podobny do podanego w latach 1958—1960 przez Kendrew i współpracowników (3) modelu mioglobiny z wieloryba-olbrotowca. Model ten omówimy bardziej szczegółowo, ponieważ przedstawia on strukturę przestrzenną, którą posiadają przypuszczalnie wszystkie hemoglobiny i mioglobiny kręgowców, mimo znacznych różnic w ich składzie aminokwasowym.

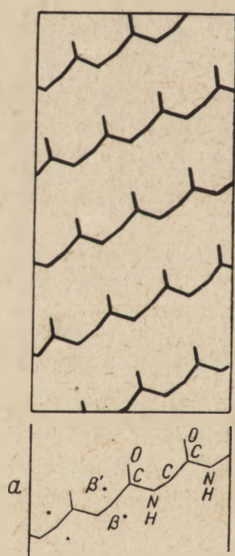
I. Budowa mioglobiny według Kendrew

Mioglobina wieloryba-olbrotowca zbudowana jest z jednego, składającego się z 153 reszt aminokwasowych, łańcucha polipeptydowego, połączonego z kompleksem żelazoporfirynowym, tj. grupą hemu. Jej masa cząsteczkowa wynosi około 18 000, a więc jest to jedno z mniejszych białek. Znany jest jej skład aminokwasowy, natomiast sekwencja aminokwasów nie została dotychczas ustalona.

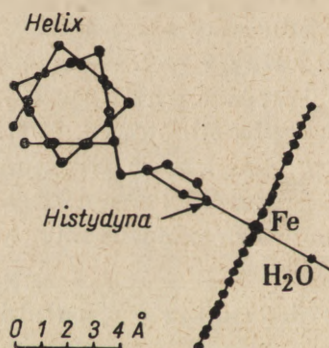
W badaniach nad trójwymiarową strukturą mioglobiny, wyizolowanej z wieloryba-olbrotowca, Kendrew i współpracownicy sporządzili szereg izomorficznych krystalicznych jej pochodnych, zawierających atomy ciężkich metali (rtęci lub złota) w poszczególnych, specyficznych miejscach cząsteczki. Dalsze prace polegały na porównaniu obrazów ugięcia promieni X przez te kryształy i kryształy nie podstawionej mioglobiny. Prace te pozwoliły w pierwszym etapie (1958) na dość dokładne określenie kształtu cząsteczki oraz przebiegu łańcucha polipeptydowego czyli

ogólnych rysów trzeciorzędowej struktury mioglobiny. K e n d r e w i współpracownicy przeprowadzili analizę odbl, wytworzonych przez atomy leżące w odległościach większych niż 6 Å. Kryształy mioglobiny dają około 400 takich odbl. Wyniki tych badań wykazały, że łańcuch polipeptydowy cząsteczki mioglobiny ma postać pręta o dużej gęstości elektronowej i przekroju w przybliżeniu kołowym. Łańcuch ten jest połałdowany, przybierając postać płaskiego dysku o wymiarach $43 \times 35 \times 23$ Å. Wewnątrz dysku mniej lub bardziej proste segmenty łańcucha przebiegają w sposób skomplikowany i nieregularny. Pojedynczą grupę hemu z atomem żelaza, który posiada znacznie większą gęstość elektro-nową, niż każdy inny atom w cząsteczce, zidentyfikowano jako tarczę, mającą połączenie z przynajmniej czterema sąsiadującymi segmentami łańcucha. Mimo to jedna jej strona jest dostępna dla tlenu, a nawet od-czynników o dużej objętości cząsteczkowej jak np. p-jodofenylo-hydro-ksyloamina.

W początkowych pracach K e n d r e w i współpracownicy odkryli więc ogólny charakter trzeciorzędowej struktury cząsteczki, ale nie podali



Rysunek 2. Rzut segmentu łańcucha polipeptydowego na powierzchnię cylindryczną
a) położenie atomów na linii śrubowej. Położenie C_β przy linii śrubowej prawoskrętnej — β , przy lewoskrętnej — β' wg K e n d r e w (3).



Rysunek 3. Schemat układu atomów w przekroju prostopadłym do płaszczyzny hemu

jeszcze drugorzędowej budowy łańcucha polipeptydowego, chociaż wskazywali na możliwość konfiguracji śrubowej. Zagadnienie drugorzędowej struktury mioglobiny autorzy ci rozwiązali w pracy opublikowanej w 1960 roku. Rozpatrzenie odbl rzędu 2 Å, których kryształy mioglobiny

dają około 9 600, wykazało, że wszystkie proste segmenty łańcucha polipeptydowego są pustymi cylindrycznymi rurami. Reszty specyficzne aminokwasów wystają na zewnątrz tego rdzenia cylindrycznego, a sam łańcuch polipeptydowy jest na niego jakby nawinięty, tworząc linię śrubową o skoku śruby około 5,4 Å (rysunek 2).

Stwierdzono, że grupa hemu, która w wyniku poprzedniej analizy została określona jako tarcza, jest nachylona do łańcucha polipeptydowego pod kątem około 21°. Badania chemiczne zarówno mioglobiny, jak i hemoglobiny sugerują, że grupa hemu jest przyłączona do białka wiązaniem między atomem żelaza i atomem azotu reszty histydyny (odległość między atomami Fe i N wynosi około 1,9 Å) i że szósta pozycja koordynacyjna atomu żelaza w metmioglobinie jest zajęta przez cząsteczkę wody. Na rysunku 3 przedstawiono schemat układu atomów w przekroju prostopadłym do płaszczyzny hemu. Grupa hemu leży prostopadle do płaszczyzny rysunku, na lewo od niej — w pozycji również prawie prostopadlej — znajduje się reszta histydyny, a jeszcze bardziej na lewo — linia śrubowa (*helix*), utworzona przez łańcuch polipeptydowy i widoczna w przekroju poprzecznym. Grupa karbonylowa łańcucha polipeptydowego połączona jest wiązaniem wodorowym z drugim atomem azotu histydyny. Po prawej stronie grupy hemu dołączony jest do atomu żelaza atom tlenu, należący do cząsteczki wody (odległość między atomami Fe i O wynosi 2,1 Å).

Bliższe badania trzeciorzędowej budowy mioglobiny, tj. przestrzennego układu łańcucha polipeptydowego, wykazały że tworzy on około ośmiu



Rysunek 4. Trzeciorzędowa struktura mioglobiny wg Kendrew (3).

segmentów, z których każdy zawiera 7—20, a wszystkie razem 100—110 reszt aminokwasowych, podczas gdy w całej cząsteczce znajduje się ich 153. Część łańcucha, posiadająca budowę regularnej prawoskrętnej linii

śrubowej, stanowi 65—72% cząsteczki i ma długość około 228 Å, natomiast cała długość łańcucha wynosi około 300 Å. Trzeciorzędowa struktura mioglobiny wieloryba-olbrotowca i przebieg łańcucha polipeptydowego przedstawione są na rysunku 4. Zakłócenie regularnej konfiguracji śrubowej następuje w obszarach zakrętów łańcucha polipeptydowego. Większość zakrętów zbudowana jest z dwóch lub trzech reszt aminokwasowych, przy czym istnieje jeszcze dodatkowy obszar, zbudowany z 13—18 reszt, w którym układ aminokwasów nie tworzy regularnej linii śrubowej.

Nie udało się przeprowadzić dotychczas systematycznej identyfikacji reszt specyficznych aminokwasów. Wiele z nich wydaje się podlegać znacznej wibracji termicznej, badanie jest ponadto utrudnione ze względu na wzajemne oddziaływanie reszt specyficznych aminokwasów przy sąsiednich zakrętach tej samej linii śrubowej albo sąsiadującego z nią innego łańcucha polipeptydowego. Jedynie w poszczególnych przypadkach łatwa jest identyfikacja, np. w niektórych miejscach linie śrubowe leżą tak blisko siebie, iż mogą się tam pomieścić jedynie reszty glicyny, w innych miejscach reszty specyficzne aminokwasów są z kolei tak długie, że mogą to być tylko reszty argininy lub lizyny.

II. Budowa hemoglobiny według Perutza

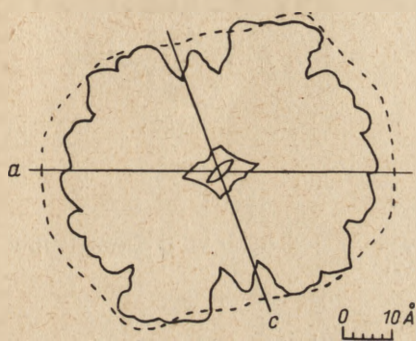
Jak już wspomniano, według ostatnich poglądów Perutza cztery elementy jednostkowe, z których zbudowana jest cząsteczka hemoglobiny, dokładnie przypominają omówiony model mioglobiny Kendrew. W celu wyjaśnienia, jakie jest wzajemne położenie tych łańcuchów w cząsteczce hemoglobiny, Perutz zastosował tę samą metodę, co Kendrew, tj. użył do badań sześciu różnych izomorficznych pochodnych hemoglobiny zawierających atomy ciężkich metali i poddał analizie 1 200 odbić, danych przez kryształy hemoglobiny i jej pochodnych przy zdolności rozdzielczej rzędu 5,5 Å.

Analiza ta wykazała, że cząsteczka hemoglobiny ma postać sferoidy długości 64 Å, szerokości 55 Å i wysokości 50 Å. Dane te różnią się nieznacznie od wartości podanych uprzednio przez Perutza. W środku cząsteczki pozostaje wolna przestrzeń, tworzy się jakby kanał. Zewnętrzny kształt cząsteczki hemoglobiny, oglądanej z góry w kierunku osi b, podany jest na rysunku 5.

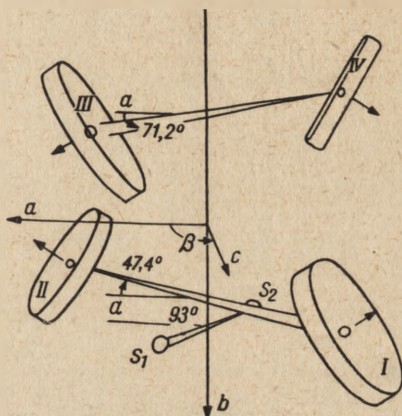
Na zewnętrznej powierzchni cząsteczki można odróżnić cztery wierzchołki, które odpowiadają atomom Fe, otoczonym pierścieniami porfirynowymi. Atomy żelaza leżą w rogach nieregularnego tetraedru, przy czym odległości między symetrycznie położonymi atomami Fe wynoszą

33,4 i 36,0 Å, a najbliższa odległość między niesymetrycznymi atomami Fe wynosi 25,2 Å. Układ grup hemowych podany jest na rysunku 6.

Perutz ustalił również położenie dwóch grup tiolowych. Hemoglobina końska zawiera cztery reszty cysteiny, ale tylko dwie grupy —



Rysunek 5. Zewnętrzny kształt cząsteczki hemoglobiny wg Perutza (4). Widok z góry w kierunku osi b.

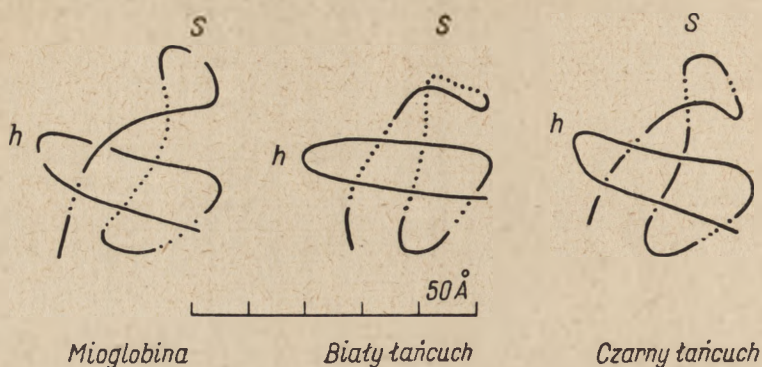


Rysunek 6. Układ grup hemu w hemoglobinie wg Perutza (4).

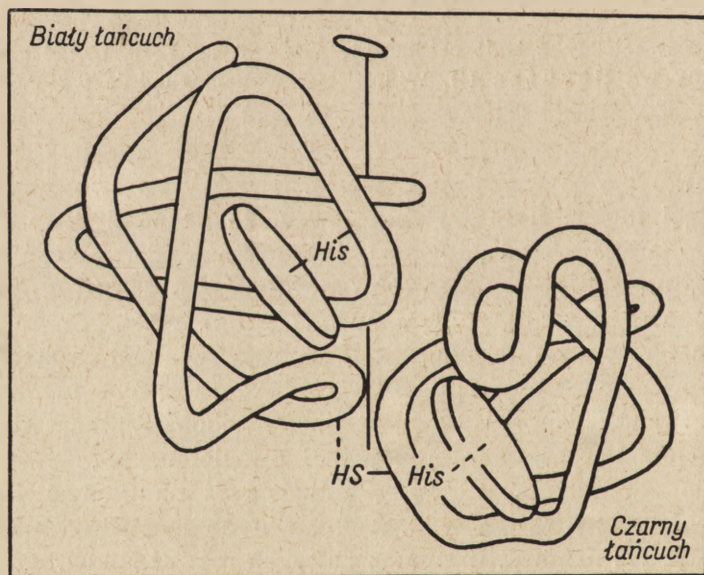
SH rodzimego białka, łączą się z rtęcią. Z położenia związanych dwóch atomów rtęci można było wywnioskować, że każda z grup —SH jest oddalona o około 13 Å od jednego i o około 21 Å od drugiego atomu Fe. Przypuszczalna rola grup tiolowych omówiona jest dalej (str. 403).

Jeżeli chodzi o konfigurację łańcucha polipeptydowego, to Perutz ustalił, że cztery oddzielne jednostki wchodzące w skład cząsteczki hemoglobiny tworzą dwie pary, z których każda zawiera dwa identyczne łańcuchy. Na rysunku 7 pokazany jest bieg łańcucha polipeptydowego dla przedstawiciela każdej pary oraz model mioglobiny (na lewo). W celu łatwiejszego odróżnienia Perutz przedstawił na modelu jedną parę w postaci białych, a drugą w postaci czarnych łańcuchów polipeptydowych i tak je też nazywał w swoich dalszych rozważaniach. Konfiguracja czarnego łańcucha jest bardzo podobna do konfiguracji białego. Różnice są jedynie niewielkie: w czarnym łańcuchu polipeptydowym zakręt w kształcie S przy wierzchołku cząsteczki jest wyraźniejszy, nie zaznaczona na rysunku 7 grupa hemu jest położona niżej, a zakręt h ostrzejszy niż w łańcuchu białym. Czarny łańcuch jest identyczny z łańcuchem polipeptydowym mioglobiny. Każdy łańcuch ma swój dokładny odpowiednik w postaci drugiego, symetrycznego do niego łańcucha, tworząc w ten sposób parę białych lub czarnych łańcuchów polipeptydowych. Perutz

sugeruje, że między podcząsteczką złożoną z pary białych i podcząsteczką złożoną z pary czarnych łańcuchów kontakt jest niewielki, a występujące połączenia bardzo słabe. W cząsteczce hemoglobiny biała para jest jak



Rysunek 7. Przebieg łańcuchów polipeptydowych w mioglobinie i hemoglobinie wg Perutza (4).



Rysunek 8. Konfiguracja łańcuchów polipeptydowych w dwóch jednostkach budowy hemoglobiny wg Perutza (4). Położenie dwóch pozostałych można otrzymać przez obrót dookoła osi. Widok w kierunku prostopadłym do osi a.

gdyby odwrócona i położona nad czarną parą, dając w rezultacie układ prawie, lecz nie całkowicie rombowy. Na rysunku 8 pokazana jest konfiguracja łańcucha polipeptydowego w czarnym i białym łańcuchu cząsteczki hemoglobiny widzianej w kierunku prostopadłym do osi a.

Cząsteczka hemoglobiny wygląda więc jak gdyby zbudowana była z czterech kłębków nici mocno do siebie docisniętych, przy czym dwa górne kłębki (białe) są identyczne i tworzą jedną symetryczną parę, a dwa dolne (czarne) są także identyczne i tworzą drugą parę. W środku cząsteczki pozostaje wolna przestrzeń, tworząca kanał. Siły van der Waalsa sprawiają, że w otworze tym jest niewiele miejsca dla wody lub elektrolitów. Poza tym, w górnej części cząsteczki w miejscu, gdzie spotykają się łańcuchy białe, występuje w cząsteczce hemoglobiny niewielkie wgłębienie. Drugie, znacznie większe, znajduje się w jej części dolnej, w miejscu spotkania się łańcuchów czarnych.

Grupy hemu leżą w oddzielnych „kieszeniach” na powierzchni cząsteczki. Każda „kieszeń” utworzona jest przez fałdę w łańcuchu polipeptydowym, który styka się z hemem przynajmniej w czterech różnych miejscach. Pozostaje to w zgodzie z przytoczoną powyżej hipotezą Wanga, który twierdził, że układy hemu są częściowo przykryte hydrofobowymi grupami globiny.

Wolne grupy —SH, których brak jest w mioglobinie, występują w hemoglobinie w tej części łańcuchów czarnych, w której znajduje się histydyna połączona z hemem. Perutz podaje, że reszty specyficzne histydyny i cysteiny są skierowane przeciwnie, przy czym histydyna zwrócona jest w kierunku hemu (rysunek 8), a cysteina w drugą stronę. Grupa —SH może więc być w kontakcie z leżącym poniżej grup hemowych zagięciem białych łańcuchów. Dwie pozostałe grupy —SH, występujące w cząsteczce hemoglobiny, są przypuszczalnie w białych łańcuchach, ale ponieważ w rodzimym białku nie są one zdolne do reakcji z Hg, ich pozycja jest nieznana. Przypuszcza się, że grupy —SH mogą odgrywać ważną rolę przy przejściu Hb w HbO₂. Należałoby zwrócić uwagę na to, że w modelu Perutza grupy hemu są zbyt daleko od siebie, aby połączenie jednej z nich z tlenem mogło wpłynąć bezpośrednio na powinowactwo do tlenu drugiej grupy. Ponieważ stwierdzono, że istnieje wzajemny wpływ (*hem — hem interaction*) między tymi grupami, działanie na siebie grup hemu musi więc być, zdaniem Perutza, bardzo subtelnej i pośredniej natury.

Zwinięcie łańcucha polipeptydowego, odkryte przez K e n d r e w w mioglobinie wieloryba-olbrotowca, znaleziono także w mioglobinie foki. Stwierdzenie podobnego zwinięcia w hemoglobinie końskiej sugeruje, zdaniem Perutza, że wszystkie hemoglobiny i mioglobiny kręgowców zbudowane są według tego samego wzoru. Perutz przypuszcza, że kiedy łańcuch polipeptydowy zostanie zsyntetyzowany i zaopatrzony w grupę hemu, dokoła której może się owinać, przybiera on tę konfigurację spontanicznie, jako jedyny układ przestrzenny, który spełnia wszystkie warunki stereochemiczne, wynikające z sekwencji aminokwasów. To z kolei upoważnia do przypuszczenia, że podobne sekwencje

w określonych miejscach łańcucha polipeptydowego występują w całej tej grupie białek mimo znacznych różnic w ich składzie aminokwasowym. Podobieństwo to, zdaniem Perutza, nasuwa myśl, że białka te posiadają wspólnego prekursora genetycznego.

Zestawmy raz jeszcze najważniejsze dane, dotyczące wszystkich hemoglobin i mioglobilin kręgowców:

1) skład aminokwasowy tych białek jest bardzo różny, pełna sekwencja aminokwasów nieznana, ale Perutz sugeruje, że występują w nich podobne sekwencje w określonych miejscach łańcucha polipeptydowego;

2) przypuszczalnie we wszystkich tych białkach łańcuch polipeptydowy przybiera w znacznej części cząsteczki postać regularnej prawoskrętnej linii śrubowej (*helix*);

3) zwinięcie łańcuchów polipeptydowych jest, według Perutza, jednakowe we wszystkich białkach tej grupy, przy czym podstawową strukturę jednostkową stanowi układ, znaleziony przez Kendrew w mioglobinie;

4) różne białka zawierają jedną lub kilka jednostek podstawowych, w wyniku czego mają różne masy cząsteczkowe i różne kształty cząsteczek.

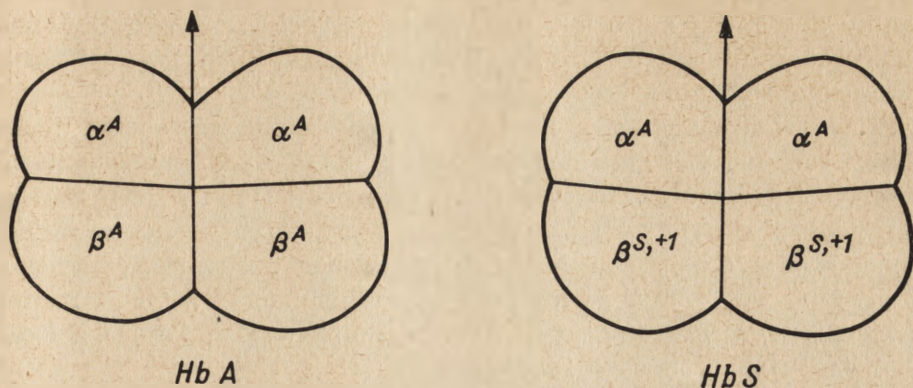
Różnice między hemoglobinami różnych gatunków i różnych osobników związane są więc przede wszystkim ze zmianą w ich składzie aminokwasowym.

III. Odmiany hemoglobiny ludzkiej

Interesującym zagadnieniem jest występowanie szeregu odmian hemoglobiny we krwi ludzkiej. Oprócz hemoglobiny ludzi dorosłych (Hb-A) i hemoglobiny płodowej (Hb-F), odkryto ostatnio cały szereg innych hemoglobin: Hb-S, Hb-C, Hb-E, Hb-D, Hb-J, Hb-G i in., których obecność prowadzi do różnych objawów chorobowych.

Podamy tu pokrótce nomenklaturę hemoglobin, stosowaną w rozważaniach genetycznych. W badaniach tych górne łańcuchy cząsteczki hemoglobiny oznacza się jako α (odpowiadają białym łańcuchom w modelu Perutza), a dolne jako β (odpowiadają czarnym łańcuchom Perutza). W normalnej Hb-A występują więc dwa łańcuchy α^A i dwa łańcuchy β^A (rys. 9), a budowę cząsteczki można przedstawić jako $\alpha_2^A\beta_2^A$ (2).

W Hb-S występują dwa łańcuchy α i dwa łańcuchy β przyczem ładunek każdego łańcucha β^S zmienił się o +1, w wyniku zastąpienia kwasu glutaminowego przez walinę. Budowę cząsteczki przedstawiamy jako $[\alpha_2^A\beta_2^S]^{+2}$



Rysunek 9. Schemat budowy Hb-A i Hb-S wg Itano (2).

Podobne badania przeprowadzone z Hb-C wykazały, że anomalie występują tu także w łańcuchu β , w którym kwas glutaminowy jest zastąpiony przez lizynę. Tak więc ładunek łańcucha β zmienił się o $+2$, a cząsteczkę oznaczamy jako $[\alpha^A\beta_2^C]^+4$.

W Hb-J natomiast występują różnice w łańcuchu α , zmiana wynosi -2 , ale nie wyjaśniono dotychczas, które aminokwasy zostały tu wymienione. Cząsteczkę Hb-J przedstawiamy jako $[\alpha_1^J\beta_2^A]^+$.

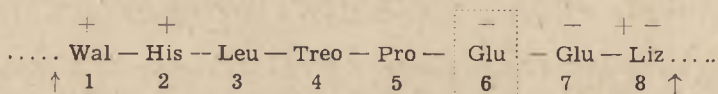
Różne odmiany hemoglobiny ludzkiej przebadano z punktu widzenia chemicznych i genetycznych elementów budowy cząsteczki. Na podstawie badań, przeprowadzonych przez Itano i współpracowników (2) stwierdzono, że rozcieńczone kwasy rozszczepiają cząsteczkę hemoglobiny na „podcząsteczki α_2 i β_2 ”, z których każda zawiera dwa hemy. Wyniki, otrzymane przy zastosowaniu metody elektroforetycznej i piętnowania izotopami radioaktywnymi, wykazały, że połączenie dwóch identycznych łańcuchów jest znacznie mocniejsze niż połączenie podcząsteczek α_2 z β_2 . Itano sugeruje nawet, że synteza łańcuchów następuje od razu w postaci stabilnych identycznych par.

W celu wyjaśnienia różnic w budowie odmian hemoglobiny ludzkiej Hunt i Ingram (1) przeprowadzili badania ich składu aminokwasowego. W połowie cząsteczki hemoglobiny, tzn. w jednym łańcuchu α (białym) i jednym β (czarnym) znajduje się około 300 aminokwasów, między którymi należało szukać różnicy między Hb-A i innymi jej odmianami. Hunt i Ingram badali mieszaninę peptydów, otrzymaną w wyniku trawienia białek różnymi enzymami. W pierwszym rzędzie porównali Hb-A i Hb-S, przy czym zastosowali denaturację cieplną i trawienie trypsyną. Wiadomo, że trypsyna rozrywa tylko wiązania, w których bierze udział lizyna i arginina. Ponieważ w każdej połowie cząsteczki hemoglobiny znajduje się około 26 cząsteczek lizyny i argininy, otrzymana mieszanina zawierała około 28 fragmentów. Porównano następnie mie-

szaniny otrzymane z Hb-A i Hb-S za pomocą elektroforezy bibułowej i chromatografii. Hunt i Ingram stwierdzili różnicę w położeniu tylko jednego peptydu, który określili jako numer 4.

Duży fragment cząsteczki hemoglobiny, nie zawierający aminokwasów zasadowych, nie jest trawiony przez trypsynę. Tę pozostałość poddano następnie trawieniu chymotrypsyną. Otrzymana z Hb-A i Hb-S mieszanina peptydów była taka sama w obu przypadkach, a zatem różnica między obu hemoglobinami leżała jedynie w budowie peptydu numer 4.

Zbadano wobec tego szczegółowo peptydy numer 4 z Hb-A i Hb-S i stwierdzono, że zawierają one po osiem aminokwasów. Peptyd z Hb-A ma następującą sekwencję aminokwasów:



Peptyd z Hb-S różni się od niego jedynie rodzajem szóstego aminokwasu — zamiast kwasu glutaminowego występuje w nim walina. Ponieważ reszta specyficzna kwasu glutaminowego o charakterze kwaśnym została zastąpiona przez obojętną walinę, uległ również zmianie ładunek peptydu. Ta zamiana jednego z 300 aminokwasów wydaje się jak dotychczas jedyną różnicą strukturalną między Hb-A i Hb-S. Zdaniem Hunt a i Ingram a nasuwa to sugestię, że kwas glutaminowy musi zajmować jakąś kluczową pozycję w trójwymiarowej strukturze hemoglobiny. Ponieważ nieznana jest jednak pełna sekwencja aminokwasów, nie można dokładnie określić pozycji tej cząsteczki kwasu glutaminowego w zwiniętym łańcuchu polipeptydowym.

W podobny sposób przebadano inne odmiany hemoglobiny i stwierdzono, że w Hb-C różnica występuje w tym samym peptydzie numer 4, przy czym kwas glutaminowy peptydu z Hb-A jest zastąpiony przez lizynę. W Hb-E kwas glutaminowy jest zastąpiony przez lizynę, ale w innym peptydzie (numer 26). Inne odmiany hemoglobiny jak D, J, G, Hopkins-2, H wykazywały zmiany w budowie różnych peptydów. Stwierdzono, że hemoglobina płodowa (Hb-F) posiada dwa łańcuchy polipeptydowe takie same jak Hb-A, natomiast dwa pozostałe łańcuchy (tzw. γ) różne od spotykanych w pozostałych odmianach hemoglobin, które dotychczas przebadano.

Hunt i Ingram podkreślają, że występowanie różnych anormalnych ludzkich hemoglobin jest jednym z najlepszych przykładów odziedziczonych anomalii w budowie białka, które mogą spowodować poważne zaburzenia. Niektóre z tych anomalii (ale nie wszystkie) są przyczyną anemii hemolitycznych. Autorzy ci wysuwają następującą sugestię, która ich zdaniem tłumaczy zaobserwowane fakty. Przyjmują oni, że istnieją

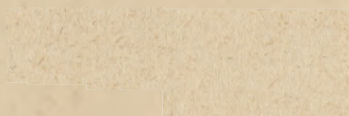
dwa geny hemoglobiny, z których każdy kieruje syntezą jednego łańcucha polipeptydowego, a właściwie pary złożonej z dwóch identycznych łańcuchów. Chemiczna struktura tych genów decyduje o sekwencji aminokwasów w odpowiednim łańcuchu polipeptydowym. Mutacja genu prowadzi do zmiany chemicznej łańcucha, a więc i cząsteczki hemoglobiny. Zmiany chemiczne nie zawsze muszą być związane z efektami fizjologicznymi. Zdaniem H u n t a i I n g r a m a część tych zmian nie jest możliwa do zaobserwowania klinicznego, część może mieć skutki śmiertelne, tak że badamy niewielką stosunkowo liczbę mutacji po dużej selekcji zarówno efektów klinicznych, jak i możliwych do uchwycenia zmian w zachowaniu elektroforetycznym.

Należało by tu podkreślić, że podane powyżej rozważania H u n t a i I n g r a m a mają jedynie charakter przypuszczeń, natomiast badacze ci stwierdzili ważny fakt, a mianowicie, że różnice między odmianami ludzkich hemoglobin spowodowane są bardzo niewielkimi zmianami w ich budowie. W przebadanych przypadkach polegały one jedynie na zamianie jednego aminokwasu w połowie cząsteczki hemoglobiny, zawierającej około 300 reszt aminokwasów.

Badania te potwierdziły do pewnego stopnia przypuszczenie P e r u t z a, że w całej tej grupie białek występują podobne sekwencje aminokwasów i wszystkie hemoglobiny i mioglobiny kręgowców posiadają tę samą strukturę. Należałoby tu nadmienić, że określanie struktur na podstawie badań rentgenograficznych zawiera w sobie zawsze pewne elementy zgadywania. Można wprawdzie określić matematycznie, czy proponowana struktura daje takie same obrazy ugięcia promieni X, jak otrzymane w przypadku rzeczywistego kryształu, ale dla cząsteczek bardziej skomplikowanych zdarza się, że kilka struktur daje podobne obrazy ugięcia i dlatego też często na podstawie nawet tych samych zdjęć, proponowane są różne konfiguracje. Wydaje się jednak, że ostatni model P e r u t z a, otrzymany przy zastosowaniu udoskonalonej techniki, spełnia wszystkie wymagane warunki i, jeśli nawet ulegnie dalszym modyfikacjom, to już jednak w chwili obecnej można przyjąć, że jest on bardzo bliski rzeczywistej budowie przestrzennej hemoglobiny.

LITERATURA

1. Hunt J. A., Ingram V. M., Ciba Foundation Symposium on Biochemistry of Human Genetics, J. & A. Churchill Ltd., London 1959, str. 114.
2. Itano H. A., Singer S. J., Robinson E. ibidem, str. 96.
3. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G., Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. C. *Nature*, **185**, 422 (1960).
4. Perutz M. F., Rossman M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T. *Nature*, **185**, 416 (1960).
5. Wang J. H. J. *Am. Chem. Soc.*, **80**, 3168 (1958) oraz *Chem. Engineer. News*, **15**, 51, (1958).



LEON ŻELEWSKI*

Rola dwufosforanowych koenzymów glikolizy**

The Role of Diphosphocoenzymes in Glycolytic Process

The mechanism of biochemical reactions is described, in which two diphosphoric esters: 2, 3-diphosphoglyceric acid and glucose-1,6-diphosphate play a role of coenzymes and substrates in glycolytic process simultaneously.

Badania ostatnich dziesięciu lat pozwoliły na dość dokładne określenie udziału poszczególnych enzymów i koenzymów w przebiegu reakcji glikolizy, opisanych schematem Embdena—Meyerhofa—Parnasa. Z drobno-cząsteczkowych związków fosforanowych wyróżniają się szczególną rolę kofermentów—substratów dwa z nich, a mianowicie: 2,3-dwufosforan kwasu glicerolowego oraz 1,6-dwufosforan glikozy. Omówienie ich przemian i katalitycznego działania jest przedmiotem tego artykułu.

I. Występowanie, synteza oraz charakterystyka ilościowa 2,3-DPG

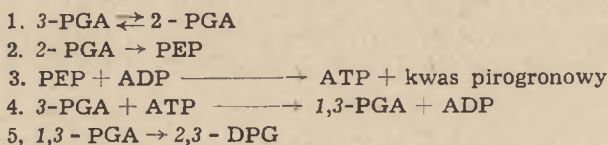
Największe ilości 2,3-DPG występują w erytrocytach wielu ssaków, około połowy wszystkich estrów fosforanowych rozpuszczalnych w kwasach przypada na ten związek (65). Wyjątek stanowią przeżuwacze (bydło, owce), w krwinkach których nie stwierdzono 2,3-DPG (76). Również

* Dr med., adiunkt Zakładu Chemii Biologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

** W niniejszym artykule są stosowane następujące skróty i symbole: 2,3-DPG — 2,3-dwufosforan kwasu glicerolowego; 1,3-PGA — 1,3-dwufosforan kwasu glicerolowego; 3-PGA — 3-fosforan kwasu glicerolowego; 2-PGA — 2-fosforan kwasu glicerolowego; G-1,6-P — 1,6-dwufosforan glikozy; G-1-P — 1-fosforan glikozy; G-6-P — 6-fosforan glikozy; PEP — fosforan kwasu enolopirogronowego; PBA — 2-fosforan kwasu D-erytro-2,3-dwuhydroksymasłowego; DPBA — 2,3-dwufosforan kwasu D-erytro-2,3-dwuhydroksymasłowego; Ma-1-P — 1-fosforan mannozy; Ma-6-P — 6-fosforan mannozy; Ma-1,6-P — 1,6-dwufosforan mannozy; Ga-6-P — 6-fosforan galaktozy; Ga-1,6-P — 1,6-dwufosforan galaktozy; Ga-1-P — 1-fosforan galaktozy; R-1-P — 1-fosforan rybozy; R-5-P — 5-fosforan rybozy; R-1,5-P — 1,5-dwufosforan rybozy; DIP — dwuizopropylodifluorofosforan.

w erytrocytach gadów i ptaków brak jest tego składnika frakcji fosforanowej, a jego ilościowym odpowiednikiem jest kwas fitynowy (64). Obecność 2,3-DPG wykazano w drożdżach (71) i mięśni piersiowym kurcząt (90); natomiast nie znaleziono tego związku w mięśni sercowym, nerce, wątrobie ani mózgu kurczęcia, ani też w tkankach bydła i owiec (91).

Podczas pracy nad izolowaniem estrów fosforanowych z krwinek konia E m b d e n uzyskuje w roku 1924 sól brucynową nowego związku prawdopodobnie 2,3-DPG, nie identyfikuje jej jednak. Później G r e e n w a l d (18) otrzymuje z krwinek nieredukujący rozpuszczalny w kwasach ester fosforanowy, podaje jego skład oraz skręcalność optyczną, wyrażając przypuszczenie, że jest to 2,3-DPG. Dokładną preparatykę izolowania tego związku z krwinek konia jako soli brucynowej podał J o s t (29). W głównych zarysach nie straciła ona na znaczeniu po dzień dzisiejszy. Syntezy organicznej 2,3-DPG dokonano w 1950 roku, wychodząc z kwasu D-glicerolowego; stwierdzono identyczne własności syntetycznego związku z otrzymanym przez G r e e n w a l d a (18) i J o s t a (29) z erytrocytów. W ostatnim czasie G r i s o l i a i J o y c e (19) dokonali enzymatycznej syntezy 2,3-DPG, inkubując 3-PGA z ATP, $MgCl_2$ i wyciągiem z proszku acetonowego mięśnia piersiowego kurczęcia, zawierającym enzymy zdolne do katalizowania następującego ciągu reakcji:



W reakcjach tych dwie cząsteczki 3-PGA tworzą jedną cząsteczkę 2,3-DPG oraz jedną cząsteczkę kwasu pirogronowego.

Dla ilościowego oznaczenia 2,3-DPG z mieszaniny różnych produktów przemiany glikolitycznej wykorzystano początkowo jego brak zdolności do odszczepiania fosforanu nieorganicznego podczas hydrolizy w 1 N H_2SO_4 w temperaturze 100°. Później R a p o p o r t (59) do kolorymetrycznego oznaczania 2,3-DPG w krwinkach zastosował barwną reakcję z naftorezorcynolem. Wykorzystano również reakcje barwne, jakie daje wolny glicerol, kwas fosfoglicerolowy i 2,3-DPG z 1,3-dwuhydrosynaftalenem, 2,7-dwuhydrosynaftalenem oraz z kwasem 4,5-dwuhydroksy-2,7-naftalenodwusulfonowym (4). Szczególne jednak znaczenie miało zastosowanie chromatografii bibułowej (58, 74), oraz żywic jonowymiennych (5, 47) dla oznaczania 2,3-DPG wśród innych metabolitów fosforanowych krwinek. Ostatnie lata pozwoliły na ilościowe oznaczanie tej substancji w oparciu o jej własności katalityczne (91, 40).

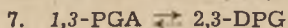
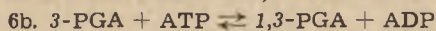
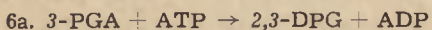
Ilościowa ocena 2,3-DPG w tkankach ograniczała się początkowo do krwinek ssaków, jako materiału biologicznego o najwyższym stężeniu tego związku. Liczne badania w tej dziedzinie dotyczą przede wszystkim zaburzeń gospodarki kwasowo—zasadowej oraz fosforanowo—wapniowej. W odniesieniu do zakłóceń równowagi kwasowo—zasadowej stwierdzono, że zarówno w kwasicy wywołanej chlorkiem amonu, jak i ciężkiej kwasicy cukrzycowej występuje wyraźny wzrost fosforanu nieorganicznego kosztem fosforanów organicznych. W doświadczeniach na zwierzętach stwierdzono, że przy obustronnym podwiązaniu moczowodów, a także przy zatruciu chlorkiem rtęciowym i toksyną błoniczą zachodzi również wzrost stężenia estrów fosforanowych w erytrocytach (24). Późniejsze badania wykazały, że zarówno w doświadczalnej krzywicy wywołanej chlorkiem amonu (60), jak i w kwasicy cukrzycowej obniżenie się frakcji estrowej odbywa się kosztem 2,3-DPG (23). Badania te, a także inne (6, 22, 63) pozwalają na przypisanie 2,3-DPG pewnej roli w utrzymaniu równowagi kwasowo—zasadowej krwi. Zakwaszenie ustroju prowadzi do zmniejszenia się w erytrocytach stężenia 2,3-DPG przy równoczesnym wzroście fosforanu nieorganicznego (62). W zaburzeniach gospodarki wapniowo—fosforowanej dają się stwierdzić istotne przesunięcia we frakcjach fosforanowych erytrocytów (32, 33, 84). Obniżenie fosforanu organicznego w krwinkach występuje szczególnie u dzieci dotkniętych krzywicą (15, 51, 85). W doświadczeniach na szczurach trzymanych na diecie krzywiczej stwierdzono również obniżenie fosforanu organicznego, zwłaszcza 2,3-DPG. Po podaniu witaminu D poziom 2,3-DPG powracał do normy (61). Efekt ten należy tłumaczyć wtórnym działaniem witaminu D na cały ustrój (21).

W tym okresie, który można by nazwać „analitycznym”, główny tok badań skierowano na oznaczanie poziomu 2,3-DPG w krwinkach w zależności od różnych warunków doświadczalnych i klinicznych. Dalsze badania nad 2,3-DPG jako koenzymem fosfogliceromutazy pozwoliły na skromny na razie wgląd w mechanizm tej reakcji enzymatycznej. Doświadczenia z fosforanem radioaktywnym wykazały, że 2,3-DPG wymienia fosforan bardzo szybko w porównaniu z innymi estrami fosforanowymi erytrocytów większości ssaków. Należało zatem przypuszczać, że bierze on udział jako jeden z etapów pośrednich w przemianach estrów fosforanowych.

II. Przemiany 2,3-DPG pod wpływem dwufosfogliceromutazy i dwufosfoglicerofosfatazy

Z erytrocytów królika uzyskano enzym zwany dwufosfogliceromutazą, katalizujący przemianę 1,3-PGA w 2,3-DPG. Pozwoliło to powiązać

powstawanie 2,3-DPG z procesem glikolizy (66). Z teoretycznego punktu widzenia synteza 2,3-DPG mogła przebiegać dwiema drogami:



Stwierdzenie w tkankach dwufosfogliceromutazy przemawia raczej za przebiegiem reakcji zgodnie z równaniem 7. Dwufosfogliceromutazę wyosobnił Rapoport (68) z erytrocytów, a Ito i Grisolia (26) — z mięśnia piersiowego kurczęcia. Enzymy te różnią się od siebie w zakresie optimum pH (tablica 1). Na uwagę zasługuje to, że dwufosfogliceromutaza z mięśnia piersiowego kurczęcia jest hamowana przez tyroksynę i 2,4-dwunitrofenol.

Tablica 1

Niektóre właściwości dwufosfogliceromutazy krwinek i mięśnia

Pochodzenie enzymu	Aktywator	Inhibitor	Optimum pH	Autorzy
Erytrocyty	3-PGA	2,3-DPG	6,9—7,5	Rapoport S., Luebering J. (68)
Mięsień piersiowy kurczęcia	3-PGA	2,3-DPG Tyroksyna 2,4-dwunitrofenol	9	Joyce B.K., Grisolia S. (31)

Według reakcji 6 i 7 ATP jest niezbędny do syntezy 2,3-DPG. Przyjęcie kierunku odwrotnego reakcji 7 napotyka na trudności, związane z małym prawdopodobieństwem odwracalności etapu 7. Możliwość udziału 2,3-DPG w resyntezie ATP w krwinkach badano w zakwaszonej krwi królika. Stwierdzono wzrost fosforanu nieorganicznego oraz spadek 2,3-DPG, podczas gdy stężenie ATP i innych frakcji fosforu hydrolizującego pozostawało nie zmienione (62). Utrzymanie stałości poziomu ATP w nie naruszonych krwinkach można by tłumaczyć istniejącą równowagą pomiędzy rozpadającym się ATP a jego resyntezą z kwasu adenilowego kosztem dalszej przemiany glikolitycznej 2,3-DPG. W hemolizatach nie zaobserwowano przemiany 2,3-DPG (7, 81), natomiast dodanie do hemolizatu kwasu adenilowego powodowało wyraźny spadek ilości 2,3-DPG (44). Dla poznania przebiegu tych reakcji istotne znaczenie posiada enzym swoisty dla rozkładu 2,3-DPG do 3-PGA i fosforanu nieorganicznego. Już Jost (29) w krwinkach, a także Sutherland i współpracownicy (89) w mięśniu szkieletowym królika stwierdzili obecność takiego enzymu.

Wyosobnienie i oczyszczenie dwufosfoglicerofosfatazy z mięśnia szkieletowego szczura i królika przeprowadził Rapoport i Luebering (67). Enzymy o tym działaniu występują również w erytrocytach człowieka i świni (45), w mięśni piersiowym kurczęcia i w drożdżach (30). Wszystkie one katalizują swoiście tę samą reakcję rozpadu 2,3-DPG z wytworzeniem 3-PGA i fosforanu nieorganicznego, ale różnią się właściwościami jak: optimum pH, rodzaj aktywatorów i inhibitorów. Podobieństwa i różnice dwufosfoglicerofosfatazy różnych tkanek zestawiono w tablicy 2.

Tablica 2

Niektóre właściwości dwufosfoglicerofosfatazy różnych tkanek

Pochodzenie enzymu	Aktywator	Inhibitor	Optimum pH	Autorzy
Mięsień szkieletowy szczura i królika	2-PGA Hg ⁺⁺ Ag ⁺	3-PGA Cu ⁺⁺	7	Rapoport S., Luebering J. (67) Rapoport S., Luebering J., Wagner R. H. (70)
Erytrocyty człowieka i świni	NaHSO ₃ Na ₂ S ₂ O ₃	—	—	Manyai S., Varady Z. (45)
Mięsień piersiowy kurczęcia	—	3-PGA 2-PGA	7	Joyce B. K., Grisolia S., (30)
Drożdże	—	3-PGA 2-PGA	5	Joyce B. K., Grisolia S., (30)

Z danych tablicy 2 na specjalną uwagę zasługuje aktywujące działanie jonów srebrowych i rtęciowych na enzym wyosobniony z mięśnia szkieletowego szczura i królika (77, 78) oraz jonów siarczynowych — na enzym wyosobniony z erytrocytów człowieka i świni. Również odmienny wpływ wywiera 2-PGA na dwufosfoglicerofosfatazę różnego pochodzenia, aktywując enzym wyosobniony z mięśnia szkieletowego szczura i królika, natomiast inaktywując enzymy wyosobnione z mięśnia piersiowego i z drożdży. Fakt występowania dwufosfoglicerofosfatazy w licznych i różnych tkankach zdaje się wskazywać na jej powszechne występowanie; zwraca jednak uwagę istnienie wyraźnych różnic gatunkowych i tkankowych. Wniosek taki miałby mocniejsze podstawy doświadczalne, gdyby udało się dany enzym uzyskać w postaci krystalicznej.

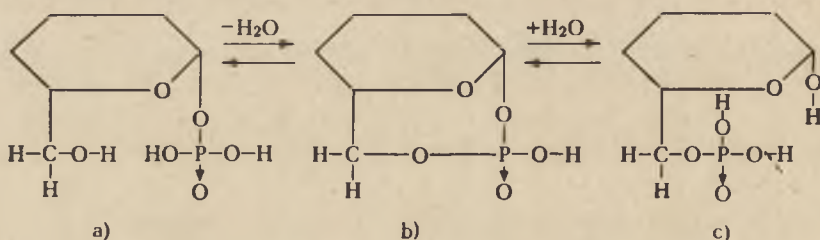
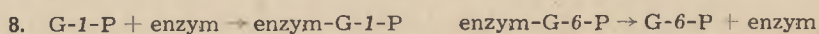
3-PGA wytworzony z 2,3-DPG pod wpływem dwufosfoglicerofosfatazy ulega dalszej przemianie do kwasu fosfoenolopirogronowego, dając w efekcie syntezę jednej cząsteczki ATP z ADP. Chociaż ta droga wydaje się

prawdopodobniejsza, należy jednak wspomnieć, że Pranker d (58) sugeruje możliwość wzajemnej zamiany 2,3-DPG i 1,3-PGA. W wyniku przemian z jednej cząsteczki 2,3-DPG powstałyby wówczas dwie cząsteczki ATP. Koncepcja Pranker d a jest jednak mało prawdopodobna, ponieważ jak wykazały dotychczasowe badania, dwufosfogliceromutaza katalizuje reakcję w kierunku syntezy 2,3-DPG. Pogląd pierwszy, tj. rozpad 2,3-DPG z wytworzeniem 3-PGA i fosforanu nieorganicznego wydaje się bardziej prawdopodobny i znajduje potwierdzenie również w pracach innych autorów (17, 75).

III. 2,3-DPG oraz C-1,6-P jako koenzymy fosfogliceromutazy i fosfoglikomutazy

Współudział 2,3-DPG w reakcjach schematu Embdena—Meyerhofa—Parnasą pozostawał długo nieznany mimo istnienia dowodów na jego występowanie w enzymatycznych przemianach prowadzących do kwasu pirogronowego.

Nowe światło na rolę 2,3-DPG w schemacie glikolizy rzuciły badania nad koenzymem fosfoglikomutazy katalizującej zamianę G-1-P w G-6-P; enzym ten otrzymano z mięśni i oczyszczono uzyskując go w postaci krystalicznej (48). Mechanizm jego działania ujmowano początkowo jako wewnątrzcząsteczkowe przegrupowanie enzym — substrat, ponieważ nie stwierdzano wymiany wolnych fosforanów (46) ani glikozy (80). Schematycznie można by to ująć następującym równaniem:



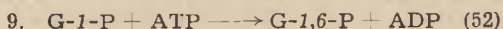
Schemat 1. Wewnątrzcząsteczkowe przegrupowanie 1-fosforanu glikozy w 6-fosforan glikozy.

Produktem pośrednim takiej przemiany G-1-P w G-6-P byłby 1,6-monofosforan glikozy (schemat 1, wzór b). Taki przebieg reakcji wydawał się jednak mało prawdopodobny ze względu na wzajemne położenie przeszerzone grupy fosforanowej w G-1-P i G-6-P (25).

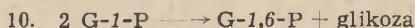
W roku 1948 stwierdzono w wyciągach z *S. fragilis* lub *S. cerevisiae* obecność termostabilnego czynnika, katalizującego przemianę G-1-P

w G-6-P (9). Aktywacja fosfoglikomutazy przez dodatek heksozodwufosforanów (34) nasuwała przypuszczenie, że tym czynnikiem termostabilnym może być G-1,6-P (41). Przypuszczenie to zostało potwierdzone: koenzym fosfoglikomutazy izolowany jako sól srebrowa albo barowa, z wyciągu drożdżowego, wykazał własności identyczne z własnościami G-1,6-P (10).

Enzymatyczna synteza G-1,6-P przez wyciągi z drożdży i mięśni królika zachodzi wobec G-1-P, ATP i katalitycznych ilości Mg^{++} lub Mn^{++} zgodnie z równaniem:

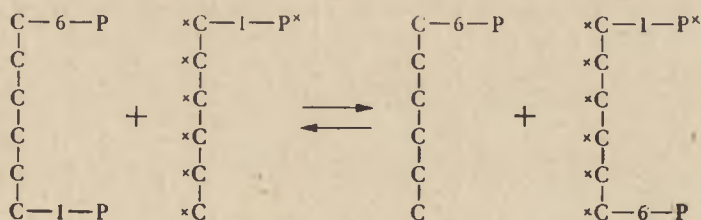


odmienne są warunki syntezy G-1,6-P przez wyciąg z *E. coli*, który syntetyzuje G-1,6-P z dwóch cząsteczek G-1-P zgodnie z równaniem:



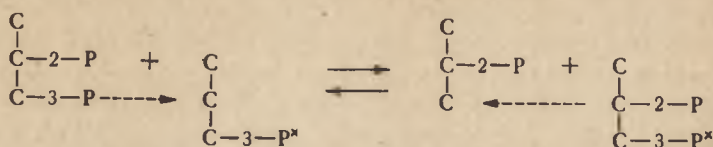
Podobną transfosforylaze, katalizującą syntezę G-1,6-P z dwóch cząsteczek G-1-P zgodnie z równaniem 10, stwierdzono również w wyciągach z mięśnia szkieletowego królika (82). W 1949 roku dokonano syntezy organicznej G-1,6-P stosując jako produkt wyjściowy bromek 2,3,4-trójacetylo-6-dwufenylofosforano-D-glikozy (55).

Aktywacja fosfoglikomutazy przez G-1,6-P wydaje się być niezależna od aktywacji przez czynniki wiążące metal (87). Badania z krystaliczną fosfoglikomutazą przeprowadzone G-1-P znakowanym na węglu i fosforze i nie znakowanym G-1,6-P w wielkich stężeniach, wykazały, udział G-1,6-P zarówno, jako koenzymu, jak i substancji będącej równocześnie produktem i substratem reakcji zgodnie ze schematem podanym przez Sutherlanda i współpracowników (schemat 2) (88).



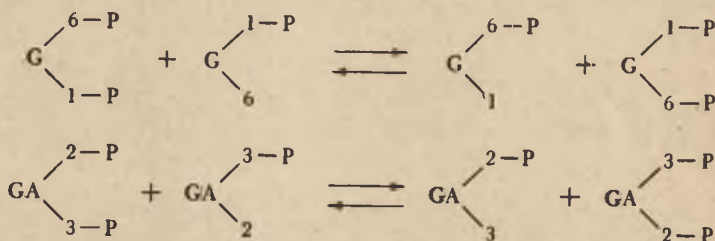
Schemat 2. 1,6-dwufosforan glikozy jako substrat i produkt reakcji.

Jak wykazały badania w pracowni Cori'ego analogicznie przebiega reakcja przemiany 3-PGA w 2-PGA, katalizowana przez fosfogliceromutazę, w której koenzymem jest 2,3-DPG. Po inkubacji 3-PGA zawierającego radioaktywny fosfor z nie znakowanym 2,3-DPG stwierdzono rozmieszczenie piętna izotopowego w 2,3-DPG zgodnie ze schematem 3 (89).



Schemat 3. 2,3-dwufosforan kwasu glicerolowego jako substrat i produkt reakcji.

Podobieństwo w katalizowaniu reakcji przez oba dwufosforanowe koenzymy można ująć schematem 4 (86).



Schemat 4. 1,6-dwufosforan glikozy i 2,3-dwufosforan kwasu glicerolowego jako koenzymy w reakcjach transfosforylacji.

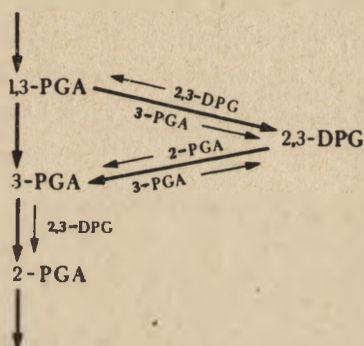
Nowe światło na mechanizm katalizowania reakcji przemiany 2-PGA w 3-PGA rzuciły dalsze badania nad własnościami fosfogliceromutazy. Wyosobniono ten enzym w postaci krystalicznej z drożdży oraz wysoce oczyszczony — z mięśni i z ziaren pszenicy. Podobieństwa i różnice we właściwościach tego enzymu zebrano w tablicy 3.

Tablica 3

Niektóre właściwości fosfogliceromutazy różnych tkanek

Pochodzenie enzymu	Koenzym	Inhibitor	Optimum pH	Masa cząsteczkowa	Autorzy
Mięsień szkieletowy królika	2,3-DPG	Odczynniki blokujące grupę —SH Fluorki	7,0	—	Cowgill R. W., Pizer L., (11,12)
Drożdże	2,3-DPG	Zn ⁺⁺	5,9	112,000	Rodwell V. W., Towne J. C., Grisolia S. (72,73)
Mięsień szkieletowy królika	2,3-DPG	Zn ⁺⁺	5,9	64,000	Edelhoch H., Rodwell V. W., Grisolia S. (14)
Nasiona pszenicy	Nie wymaga 2,3-DPG	—	9,0	—	Ito N., Grisolia S. (26)

Pośród danych tablicy 3 zwraca uwagę brak 2,3-DPG jako kofermentu fosfogliceromutazy wyosobnionej z ziaren pszenicy. Enzym ten nie wymaga dla swej aktywacji 2,3-DPG, a przeciwnie wysokie stężenia tej substancji działają hamująco na aktywność enzymu. Brak 2,3-DPG jako koenzymu w reakcji przemiany 3-PGA w 2-PGA wskazuje na możliwość zasadniczej różnicy w mechanizmie katalizowania tej reakcji w świecie roślinnym (20). Najlepiej ilustruje stosunki zachodzące pomiędzy poszczególnymi pochodnymi kwasu fosfoglicerolowego schemat 5 określony przez Rapoporta (69) jako cykl kwasu glicerolowego.



Schemat 5. Cykl kwasu glicerolowego.

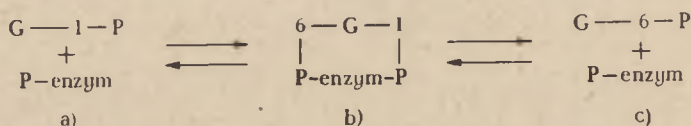
Strzałki zgodne z kierunkiem reakcji wskazują substancje aktywujące, niezgodnie z kierunkiem reakcji — substancje hamujące.

Jak widać ze schematu, 2,3-DPG może być: a) substratem dla dwufosfoglicerofosfatazy, b) inhibitorem kompetycyjnym dwufosfogliceromutazy, c) katalitycznym aktywatorem fosfogliceromutazy mięśniowej i drożdżowej. 3-PGA może służyć jako: a) substrat dla fosfogliceromutazy, b) katalizator dwufosfogliceromutazy, c) inhibitor kompetycyjny dwufosfoglicerofosfatazy. Natomiast 2-PGA znany jest dotąd tylko jako aktywator dwufosfoglicerofosfatazy mięśniowej.

Opisany cykl zachodzi w wielu tkankach, zwłaszcza w erytrocytach, gdzie nagromadzenie 2,3-DPG jest ze wszystkich tkanek największe, należałoby mu zatem przypisać szczególne znaczenie. Mogło by ono polegać na tym, że 2,3-DPG stanowi pewien zasób energii, który przez przemiany w 3-PGA i PEP pozwala odtworzyć jedną cząsteczkę ATP. Fakt, że nagromadzenie 2,3-DPG z 1,3-PGA i następne wytworzenie 3-PGA, przebiega z dużą utratą energii, nasuwa przypuszczenie, że jest to mechanizm, który w razie nadmiernego nagromadzenia ATP pozwala na dwuetapową utratę energii.

IV. Fosfogliceromutaza oraz fosfoglikomutaza jako fosfoenzymy (P-enzymy) biorące udział w transfosforylacjach

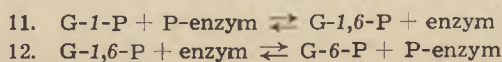
Ostatnie lata badań rzuciły nowe światło na enzymy katalizujące wzajemną zamianę 2-PGA w 3-PGA i G-1-P w G-6-P. Podobne własności koenzymów, biorących udział w katalizowaniu obydwóch reakcji, mogą nasunąć myśl o podobieństwie enzymów. Początek prac związanych z tym zagadnieniem dotyczy badań nad zawartością fosforu w fosfoglikomutazie. Zauważono, że podczas oczyszczania długotrwałą dializą wobec wody lub buforu o pH 5—7 nie można oddializować całkowicie fosforanu z tego enzymu (27). Stwierdzono, że zarówno G-1-P, jak G-6-P łączy się z fosfoglikomutazą jako P-enzymem, tworząc podwójne połączenie fosforanowe enzymu z glikozą (schemat 6, wzór b). Z takiego kompleksu po rozszczepieniu powstałyby zarówno G-1-P, jak i G-6-P według schematu 6:



Schemat 6. Kompleks P-enzymu z 1-fosforanem glikozy jako produkt przejściowy przemiany 1-fosforanu glikozy w 6-fosforan glikozy.

W przemianie tego typu istotnym składnikiem jest fosfoglikomutaza jako P-enzym, tworzący kompleks G-1,6-P—enzym odpowiedzialny za powstawanie G-6-P. W pracach z radioaktywnym fosforanem w G-1-P wykazano zmniejszenie radioaktywności w G-1-P, a pojawienie się jej w fosforanie enzymu (28).

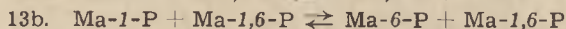
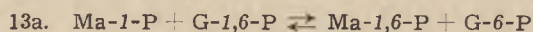
Nieco odmienny mechanizm katalizowania przez fosfoglikomutazę przyjmują Najjar i współpracownicy (49). Badacze ci dali bezpośrednie dowody na przenoszenie fosforanu z krystalicznej fosfoglikomutazy na G-1-P i G-6-P w powiązaniu z G-1,6-P zgodnie z następującymi reakcjami:



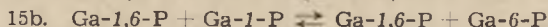
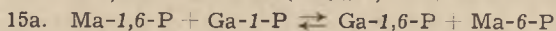
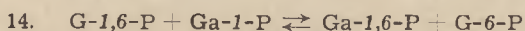
Mechanizm powyższy różni się od poprzedniego tym, że G-1,6-P jest składnikiem gromadzącym się w środowisku jako produkt reakcji heksozofosforanów i fosfoglikomutazy jako P-enzymu, a nie jako przejściowy kompleks enzymu z substratem. Enzym może istnieć zarówno w formie fosforylowanej, jak i nie fosforylowanej, a nie jedynie fosforylowanej, jak to sugerowano w schemacie 6.

Stwierdzono, że na jeden mol enzymu przypada jeden mol fosforanu. Na tej podstawie oznaczono stałe równowagi oraz obliczono zmianę swobodnej energii reakcji 11 i 12 (83, 50).

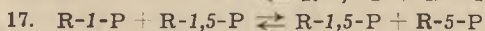
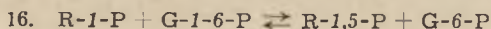
Przenoszenie fosforanu z fosfoglikomutazy jako P-enzymu na G-1-P i G-6-P, chociaż bardzo aktywne, nie jest swoiste. Ma-1-P w obecności fosfoglikomutazy i katalitycznych ilości G-1,6-P przechodzi w Ma-6-P zgodnie z równaniami:



Udział P-enzymu w tej reakcji nie jest dowiedziony doświadczalnie (43, 56). W wyniku działania mięśniowej fosfoglikomutazy stwierdzono również przemianę 1-fosforanu D-glikozaminy w 6-fosforan D-glikozaminy. G-1,6-P w stężeniach katalitycznych wzmacnia tę reakcję, natomiast wielkie jego stężenia wpływają hamująco (8). Podobną przemianę Ga-1-P w Ga-6-P zaobserwowano w obecności mięśniowej fosfoglikomutazy i G-1,6-P lub Ma-1,6-P. Reakcje wobec tych koenzymów przebiegają zgodnie z równaniami:

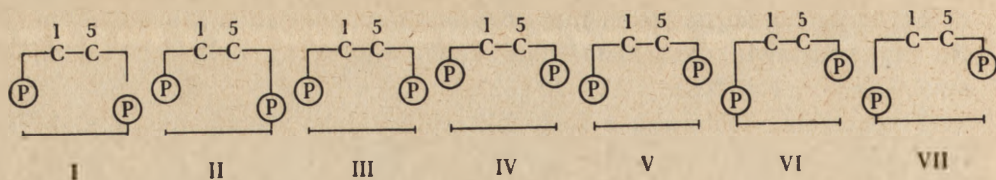


Poza przegrupowaniem fosforanów heksoz stwierdzono analogiczne przeniesienie reszty fosforanowej w fosforanopentozach. Pod wpływem fosfoglikomutazy R-1-P przechodzi w R-5-P (56). Wobec stwierdzenia katalitycznego działania G-1,6-P i R-1,5-P można przyjąć, że reakcja przemiany R-1-P w R-5-P przebiega w dwóch etapach:



Wydaje się, że reakcja 16 przebiega wolniej od reakcji 17. Wyniki badań uzyskane przez Najjar i współpracowników nad mechanizmem katalizowania reakcji przemiany G-1-P w G-6-P przeniesiono na reakcję przemiany R-1-P w R-5-P. Mechanizm katalizy można schematycznie przedstawić w siedmiu następujących etapach (schemat 7) (38). Podobnie jak R-1-P reagują z fosfoglikomutazą i G-1,6-P także inne pentozy, np. 1-fosforan dezoksyrybozy. Możliwość katalitycznego przenoszenia fosforanu w wielu cukrach w obecności fosfoglikomutazy i G-1,6-P wskazuje na niespecyficzność enzymu katalizującego tę reakcję (37).

Aktywna fosfoglikomutaza zawiera na cząsteczkę enzymu jedną cząsteczkę fosforanu związaną jako 0-fosforanoseryna (1). Miejsce połączenia fosforanu z seryną w fosfoglikomutazie stanowi centrum aktywne enzymu, ponieważ traktowanie dwuizopropylodifluorofosforanem, który blokuje grupę hydroksylową, unieczynnia ten enzym (35). Aminokwasy dookoła cen-

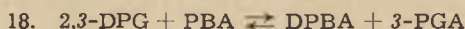


Schemat 7. Etapy przemiany 1-fosforanu rybozy w 5-fosforan rybozy.

- I. 1-fosforan rybozy i P-enzym tworzą połączenie typu soli.
- II. Grupa fosforanowa P-enzymu reaguje z 1-fosforanem rybozy tworząc kompleks.
- III. Wiązanie fosforanu z białkiem pęka.
- IV. Oddysocjowuje 1,5-dwufosforan rybozy.
- V. Tworzy się ponownie połączenie typu soli przy atomie węgla C 1, na którym znajduje się reszta fosforanowa 1,5-dwufosforanu rybozy.
- VI. Atom węgla C 1 1,5-dwufosforanu rybozy reaguje z enzymem.
- VII. Wiązanie fosforanowe pęka i tworzy się P-enzym i 5-fosforan rybozy.

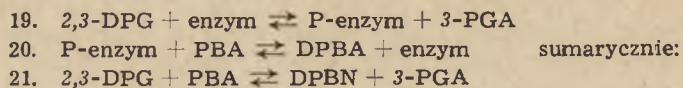
trum aktywnego w fosfoglikomutazie cechuje następująca sekwencja: Asp., Ser., Gly., Glu., Ala., Val. (39). Okazuje się, że sekwencja Gly., Asp., Ser. (DIP), Gly jest charakterystyczna, dla szeregu esteraz, a także innych enzymów hydrolitycznych, jak trypsyna (13), chymotrypsyna (79) i trombina (16).

Gdy prace nad fosfoglikomutazą jako P-enzymem były już daleko zaawansowane, prace nad fosfogliceromutazą jako P-enzymem były w stadium początkowym. Dotychczasowe badania wykazały, że aktywność fosfogliceromutazy wyosobnionej z mięśni i drożdży, w przeciwieństwie do fosfogliceromutazy z nasion, ulega obniżeniu wobec braku 2,3-DPG. Wskazuje to na istnienie dwóch postaci enzymu, z których jedna wymagałaby do swego działania 2,3-DPG, podczas gdy druga działałaby bez koenzymu. W następstwie takiego rozumowania można przyjąć, że fosfogliceromutaza istnieje w dwóch postaciach: jednej fosforylowanej nie wymagającej do swego działania 2,3-DPG i drugiej nie fosforylowanej wymagającej do swego działania 2,3-DPG, który jest zdolny zaktywować enzym, przeprowadzając go w postać fosforylowaną. Dla wykazania swoistości 2,3-DPG jako donatora grupy fosforanowej użyto fosforanowych pochodnych kwasu D-erytro-2,3-dwuhydroksymasłowego (3). Stwierdzono zdolność przrzucania fosforanu z 2,3-DPG na PBA, który jest również substratem dla fosfogliceromutazy. W wyniku tej reakcji powstają jako produkty DPBA oraz 3-PGA. Wyniki tych doświadczeń dają się przedstawić reakcją:



Syntetyczny DPBA może zastąpić 2,3-DPG w aktywacji fosfogliceromutazy. Wydaje się, że synteza DPBA z PBA przy użyciu 2,3-DPG nie polega na bezpośrednim przrzucaniu fosforanu z 2,3-DPG, lecz jest

procesem dwuetapowym z udziałem fosfogliceromutazy jako P-enzymu. Wyniki te dają się przedstawić następującym równaniem:



Powyższe doświadczenia modelowe potwierdziły podobieństwo mechanizmu działania fosfogliceromutazy jako P-enzymu do mechanizmu działania fosfoglikomutazy jako P-enzymu (53). Zbadano warunki strukturalne, jakie muszą być spełnione, aby dany związek chemiczny stał się akceptorem lub donatorem fosforanowym. Stwierdzono, że drugi i trzeci węgiel musi posiadać grupy hydroksylowe o konfiguracji D-erytro. Jedna z tych grup musi być zestryfikowana fosforanem, jeżeli związek ma być akceptorem fosforanowym, zaś obie grupy muszą być ufosforylowane, gdy dany związek ma być donatorem fosforanowym (54).

Wyniki badań, przedstawione w tym artykule, dotyczące zagadnień związanych z 2,3-DPG i G-1,6-P, mają szereg podobieństw zasługujących na szczególną uwagę, a mianowicie: oba związki są koenzymami. Wchodzą one w skład produktów katalizowanej reakcji, będąc równocześnie substratem. W każdym przypadku proces enzymatyczny polega na przeniesieniu grupy fosforanowej. Podczas reakcji koenzym jest zamieniany w produkt, a substrat w koenzym. W obu reakcjach katalizowanie związane jest z P-enzymem. Przedstawione wyniki badań wskazują, że pojęć koenzymu i substratu nie zawsze można ściśle od siebie oddzielić. W wielu przypadkach daje się to łatwo wykazać, a w innych, jak omówione w tym artykule, obydwa te pojęcia wzajemnie się pokrywają.

LITERATURA

1. Anderson L., Jolles G. R., *Arch Biochem. Biophys.*, **70**, 121 (1957).
2. Baer E., *J. Biol. Chem.*, **185**, 763 (1950).
3. Ballou C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 984 (1957).
4. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.*, **234**, 469 (1959).
5. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.*, **234**, 449, 459, 466 (1959).
6. Behrent H., *Am. J. Dis. Child.*, **64**, 55 (1942).
7. Braunstein A. E., *Biochem. Z.*, **272**, 21 (1934).
8. Brown D. H., *J. Biol. Chem.*, **204**, 877 (1953).
9. Caputto R., Leloir L. F., Trucco R. E., Cardini C. E., Paladini A. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **18**, 201 (1948).
10. Cardini C. E., Paladini A. C., Capputo R., Leloir L. F., Trucco R. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **22**, 87 (1949).
11. Cowgill R. W., Pizer L. I., *Fed. Proc.*, **14**, 198 (1955).
12. Cowgill R. W., Pizer L. I., *J. Biol. Chem.*, **223**, 885 (1956).
13. Dixon G. H., Kauffman D. L., Neurath H., *J. Biol. Chem.*, **233**, 1373 (1958).

14. Edelhoch H., Rodwell V. W., Grisolia S., *Biol. Chem.*, **228**, 891 (1957).
15. Freudenberg E., *Ztschr Kinderh.*, **57**, 427 (1936).
16. Gladner J. A., Laki K. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1263 (1958).
17. Gourley D. R. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 1 (1952).
18. Greenwald I., *J. Biol. Chem.*, **63**, 339 (1925).
19. Grisolia S., Joyce B. K., *J. Biol. Chem.*, **233**, 18 (1958).
20. Grisolia S., Joyce B. K., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1335 (1959).
21. Guest G. M., Rapoport S., *J. Biol. Chem.*, **124**, 599 (1938).
22. Guest G. M., Rapoport S., *Am. J. Dis. Child.*, **58**, 1072 (1939).
23. Guest G. M., Rapoport S., *Am. J. Dis. Child.*, **60**, 450 (1940).
24. Guest G. M., Rapoport S., *J. Lab. Clin. Med.*, **26**, 190 (1940).
25. Harrison W. H., Boyer P. D., Falcone A. B., *J. Biol. Chem.*, **215**, 303 (1955).
26. Ito N., Grisolia S., *J. Biol. Chem.*, **234**, 242 (1959).
27. Jagannathan V., Luck J. M., *J. Biol. Chem.*, **179**, 561 (1949).
28. Jagannathan V., Luck J. M., *J. Biol. Chem.*, **179**, 569 (1949).
29. Jost H., *Z. physiol. Chem.*, **165**, 171 (1927).
30. Joyce B. K., Grisolia S., *J. Biol. Chem.*, **233**, 350 (1958).
31. Joyce B. K., Grisolia S., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1330 (1959).
32. Kay H. D., *J. Biol. Chem.*, **99**, 85 (1932).
33. Kay H. D., Skill D. H., *Biochem. J.*, **28**, 1222 (1934).
34. Kendal L. P., Stickland L. H., *Biochem. J.*, **32**, 572 (1938).
35. Kennedy E. P., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.*, **228**, 419 (1957).
36. Klenow H., Larsen B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 488 (1952).
37. Klenow H., Emberland R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 276 (1955).
38. Klenow H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 288 (1955).
39. Koshland D. E., Erwin M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2657 (1957).
40. Krimsky I., *J. Biol. Chem.*, **234**, 228 (1959).
41. Leloir L. F., Trucco R. E., Cardini C. E., Paladini A. C., Caputto R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **19**, 339 (1948).
42. Leloir L. F., Trucco R. E., Cardini C. E., Paladini A. C., Caputto R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **24**, 65 (1949).
43. Leloir L. F., *Phosphorus Metabolism*, t. 1., Johns Hopkins Press, Baltimore, 1951, str. 75.
44. Lennerstrand R., *Enzymologia*, **9**, 248 (1941).
45. Manyai S., Varady Z., *Bioch. Bioph. Acta*, **20**, 594 (1956).
46. Meyerhof O., Ohlmeyer P., Gentner W., Maier—Leibnitz H., *Biochem. Z.*, **298**, 396 (1938).
47. Mills G. C., Summers L. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 7 (1959).
48. Najjar V. A., *J. Biol. Chem.*, **175**, 281 (1948).
49. Najjar V. A., Pullman M. E., *Science*, **119**, 631 (1954).
50. Najjar V. A., McCoy E. E., *Fed. Proc.*, **17**, 1141 (1958).
51. Nissen H., *Zeitschr. Kinderh.*, **57**, 289 (1936).
52. Paladini A. C., Caputto R., Leloir L. F., Trucco R. E., Cardini C. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **23**, 55 (1949).
53. Pizer L. I., Ballou C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3612 (1957).
54. Pizer L. I., Ballou C. E., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1138 (1959).
55. Posternak T., *J. Biol. Chem.*, **180**, 1269 (1949).
56. Posternak T., Rosselet J. P., *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1614 (1953).
57. Posternak T., Rosselet J. P., *Helv. Chim. Acta*, **37**, 246 (1954).

58. Pranker T. A. J., Altman K. I., *Biochem. J.*, **58**, 622 (1954).
59. Rapoport S., *Biochem. Z.*, **289**, 406 (1937).
60. Rapoport S., *Biochem. Z.*, **289**, 411, 416 (1937).
61. Rapoport S., Guest G. M., *J. Biol. Chem.*, **128**, 749 (1938).
62. Rapoport S., Guest G. M., *J. Biol. Chem.*, **129**, 781 (1939).
63. Rapoport S., Guest G. M., *J. Biol. Chem.*, **131**, 675 (1939).
64. Rapoport S., *J. Biol. Chem.*, **135**, 403 (1940).
65. Rapoport S., Guest G. M., *J. Biol. Chem.*, **138**, 269 (1941).
66. Rapoport S., Luebering J., *J. Biol. Chem.*, **183**, 507 (1950).
67. Rapoport S., Luebering J., *J. Biol. Chem.*, **189**, 683 (1951).
68. Rapoport S., Luebering J., *J. Biol. Chem.*, **196**, 583 (1952).
69. Rapoport S., Nieradt C., *Biochem. Z.*, **326**, 231 (1955).
70. Rapoport S., Luebering J., Wagner R. H., *Z. physiol. Chem.*, **302**, 105 (1955).
71. Rapoport S., Nieradt C., Oberman A., *Naturwiss.*, **42**, 73 (1955).
72. Rodwell V. W., Towne J. C., Grisolia S., *Bioch. Bioph. Acta*, **20**, 394 (1956).
73. Rodwell V. W., Towne J. C., Grisolia S., *J. Biol. Chem.*, **228**, 875 (1957).
74. Rohdewald M., Weber M., *Z. physiol. Chem.*, **306**, 90 (1956).
75. Rohdewald M., Weber M., *Z. physiol. Chem.*, **311**, 239 (1958).
76. Rohdewald M., Weber M., *Z. physiol. Chem.*, **317**, 217 (1959).
77. Sauer G., Rapoport S., *Biochem. Z.*, **331**, 522 (1959).
78. Sauer G., Rapoport S., *Biochem. Z.*, **331**, 534 (1959).
79. Schaffer N. K., Simet L., Harshman S., Engle R. R., Drisko R. W., *J. Biol. Chem.*, **225**, 197 (1957).
80. Schlamowitz M., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.*, **171**, 293 (1947).
81. Schuchardt W., Vercellone A., *Biochem. Z.*, **272**, 437 (1934).
82. Sidbury J. B., Rosenberg L. L., Najjar V. A., *J. Biol. Chem.*, **222**, 89 (1956).
83. Sidbury J. B., Najjar V. A., *J. Biol. Chem.*, **227**, 517 (1957).
84. Skill D. I., Kay H. D., *Biochem. J.*, **28**, 1228 (1934).
85. Stearns G., Warweg E., *Am. J. Dis. Child.*, **49**, 79 (1935).
86. Sutherland E. W., Posternak T., Cori C. F., *J. Biol. Chem.*, **179**, 501 (1949).
87. Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.*, **180**, 1279 (1949).
88. Sutherland E. W., Cohn M., Posternak T., Cori C. F., *J. Biol. Chem.*, **180**, 1285 (1949).
89. Sutherland E. W., Posternak T., Cori C. F., *J. Biol. Chem.*, **181**, 153 (1949).
90. Towne J. C., Rodwell V. W., Grisolia S., *Fed. Proc.*, **15**, 372 (1956).

KAZIMIERZ TOCZKO*

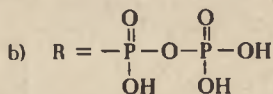
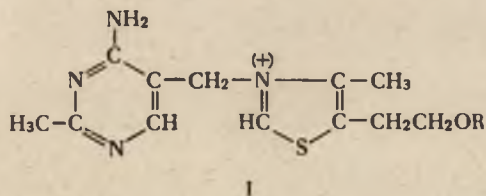
Mechanizm działania tiaminy

The Mechanisms of Thiamine—catalysed Reactions

The hypothesis concerning the mechanisms of thiamine-catalyzed reactions were discussed mainly on the base of the model systems investigations.

Podjęte w 1912 roku przez Kazimierza Funka próby wyosobnienia witaminy B₁ zakończone zostały w 1926 roku wydzieleniem przez Jansena i Donatha tego związku w postaci krystalicznej. W latach 1934—1936 ustalono ostatecznie strukturę tiaminy i opracowano metodę jej syntezy (32).

Tiamina zbudowana jest z 2-metylo-4-aminopirymidyny połączonej mostkiem metylenowym z 4-metylo-5-(β -hydroksyetylo)-tiazolem (Ia).



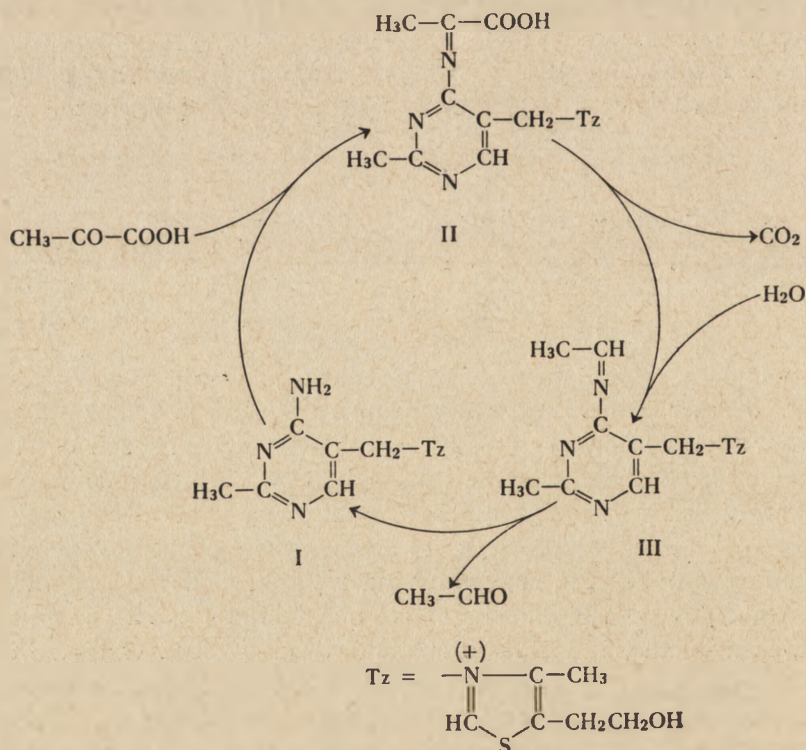
Równoległe z badaniami zmierzającymi do ustalenia budowy tiaminy prowadzono prace nad wykryciem jej funkcji biologicznych. W 1935 roku P e t e r s i współpracownicy (24, 25) po raz pierwszy wykazali katalityczne działanie tego związku w reakcji utleniania kwasu pirogronowego przez tkanki zwierzęce. Następnie ustalono, że aktywną w układach biologicznych jest nie sama tiamina, lecz jej fosforanowa pochodna — pirofosforan tiaminy (Ib) — TPP, nazywany inaczej kokarboksylazą, wydzielony i zidentyfikowany w 1937 roku przez L o h m a n n a i S c h u s t e r a (15).

Obecnie wiadomo, że pirofosforan tiaminy jako koenzym bierze udział w dość różnorodnych przemianach (8, 10, 26). Są to: 1) dekarboksylacja α -ketokwasów i proces odwrotny — włączanie dwutlenku węgla w reakcji α -karboksylacji, 2) synteza acyloin, 3) powstawanie i wykorzystywa-

* Mgr, st. asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

nie aktywnego aldehydu glikolowego w reakcjach katalizowanych przez transketolazę. Najwcześniej poznaną z tych reakcji jest powstawanie aldehydu octowego w wyniku dekarboksylacji pirogronianu w czasie fermentacji alkoholowej. Wszystkie wymienione reakcje posiadają pewną wspólną cechę: przyjmuje się, że produktem pośrednim jest w nich karbanion acylu $R-CO^-$, lub stabilizowany związek podobny, nazywany „aktywnym aldehydem”.

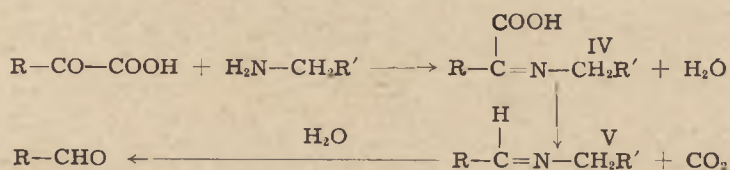
Podstawowa rola pirofosforanu tiaminy w metabolizmie była powodem, że stosunkowo wcześniej rozpoczęto badania nad wyjaśnieniem mechanizmu reakcji zachodzących przy jego udziale. Napotkano tu jednak na duże trudności. Do niedawna brak było możliwości śledzenia tych przemian w uproszczonych układach modelowych, a wyniki otrzymane przy użyciu wieloenzymatycznych układów ze względu na ich złożoność były trudne do interpretacji. Układ modelowy, w którym działanie tiaminy może być badane w reakcjach nieenzymatycznych, opracowano dopiero w latach pięćdziesiątych. Ogólnie przyjmuje się, że w przemianach katalizowanych przez TPP-enzymy następuje łączenie się substratu z koenzymem i jest możliwe, że sam koenzym, bez udziału białka może



Schemat 1. Mechanizm reakcji dekarboksylacji kwasu pirogronowego według Langenbecka (13, 14).

w określonych warunkach katalizować tego typu reakcje. Dałoby to podstawę do interpretacji mechanizmu działania pirofosforanu tiaminy w przemianach enzymatycznych. Pierwsze prace na ten temat z wymienionych wyżej przyczyn ograniczały się do mniej lub bardziej udokumentowanych sugestii i teoretycznych rozważań.

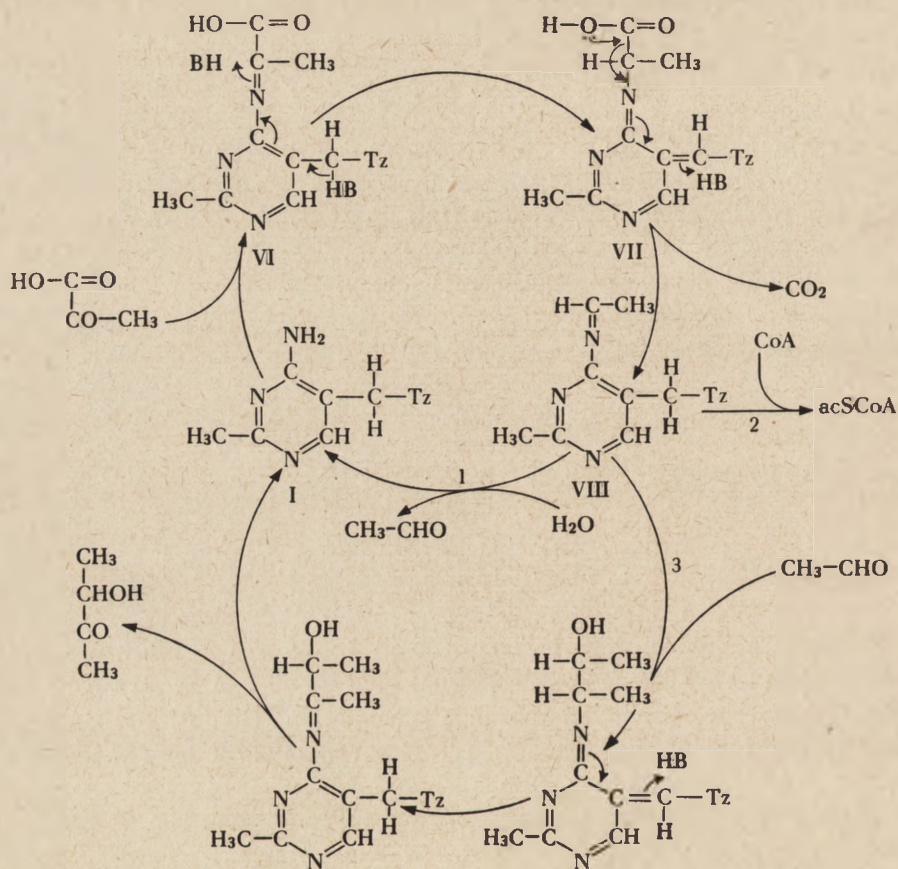
W 1933 roku Langenbeck (13, 14) zaproponował mechanizm dla reakcji dekarboksylacji kwasu pirogronowego. Przyjmuje on, że pierwszym etapem jest kondensacja ketokwasu z grupą aminową pierścienia pirymidynowego tiaminy. Wytworzona zasada Schiffa (II) odszczepia dwutlenek węgla, a powstała zasada (III) ulega hydrolizie, w wyniku czego powstaje aldehyd octowy i regeneruje się tiamina (schemat 1). Sugestię swą oparł na spostrzeżeniu, że wiele pierwszorzędowych amin katalizuje dekarboksylację α -ketokwasów do odpowiednich aldehydów z wytworzeniem tego typu zasad (IV i V) zgodnie z równaniem:



Mechanizm ten w późniejszych latach został zmodyfikowany przez Weil—Malherbe (31), a ostatnio Wiesner i Valenta (33) ogłosili oparty na podobnych zasadach mechanizm reakcji katalizowanych przez enzymy współdziałające z pirofosforanem tiaminy (schemat 2). Zgodnie z tym schematem grupa karbonylowa kwasu pirogronowego łączy się z grupą aminową tiaminy. W wytworzonej zasadzie Schiffa (VI) następuje przegrupowanie protonów, w którym bierze również udział grupa mostku metylenowego koenzymu. W wyniku tych przegrupowań powstaje związek pośredni o budowie ortochinoidowej (VII). Z niego po odszczepieniu cząsteczki dwutlenku węgla wytwarza się zasada (VIII), która dalej może ulegać jednej z trzech następujących przemian: 1) hydrolizować do aldehydu octowego i zregenerowanego koenzymu, 2) przekazywać resztę acetylową na koenzym A lub 3) reagować z cząsteczką aldehydu octowego tworząc acetoinę.

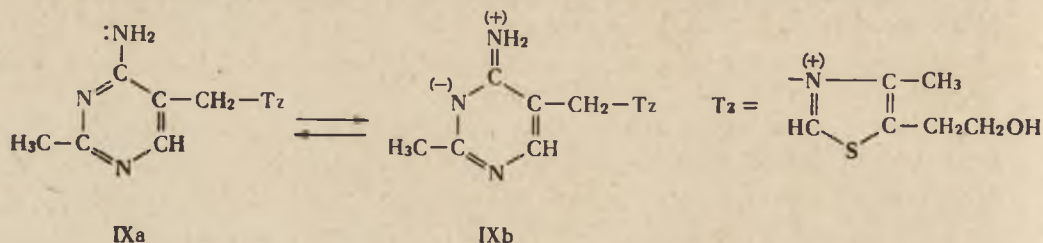
Tak sformułowany mechanizm wydaje się jednak mało prawdopodobny. W 1939 roku Stern i Melnick (27) wykazali, że tiamina w układzie Langenbecka, aktywnym przy użyciu szeregu amin syntetycznych, nie katalizuje reakcji dekarboksylacji ketokwasów. W rozważaniu przyczyn jej nieaktywności w tych warunkach autorzy zwracają uwagę na fakt, że grupa aminowa witaminy B₁ wykazuje znacznie mniejszą

reaktywność w porównaniu z analogicznymi grupami syntetycznych amin stosowanych przez Langenbecka. Niereaktywność tę tłumaczą rezonans w układzie aminopirymidynowym z możliwością przemieszczenia



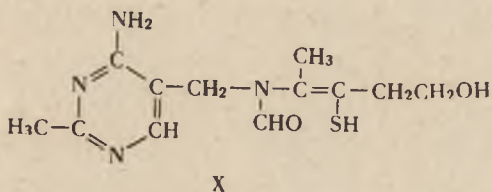
Schemat 2. Mechanizm działania tiaminy wg Wiesnera i Valenta (33).

ładunku i wytworzenia formy dipolowej (IXb). Przypisywanie głównej roli części pirymidynowej tiaminy nie jest również zgodne z doświadczalnie stwierdzonymi faktami, że pierścień tiazolowy witaminy jest niezbędny dla zachowania katalitycznych własności tego koenzymu. Ponadto w doś-



wiadczeniach izotopowych wykazano, że mostkowa grupa metylenowa nie bierze udziału w reakcji, nie stwierdzono bowiem wymiany deuteru wprowadzonego w to położenie (2, 4, 7, 9).

Na odmiennych zasadach opartą koncepcję działania tiaminy wysunął w 1947 roku Karrer (11). Przyjmuje on, że zasadniczą rolę w reakcji odgrywa układ tiazolowy, przy czym aktywną formą jest układ z otwartym pierścieniem tiazolowym, zawierający wolną grupę tiolową (X).



Poparciem słuszności tej hipotezy było stwierdzenie, że w doświadczeniach przeprowadzonych z tkankami zwierzęcymi forma (X) jak i produkt jej utlenienia — odpowiedni dwusiarczek — wykazywały w reakcji utlenienia kwasu pirogronowego aktywność równą tiaminie (12). Ponadto Mitsukawa i Kawasaki (19) wykazali, że syntetyczna O,S-dwu-acetylotiamina przekazuje grupę acetylową na związki zawierające wolną grupę tiolową jak cysteina lub glutation. Również nieoczyszczone preparaty S-acetylopirofosforanu tiaminy, otrzymane przez acetylowanie w środowisku alkalicznym kokarboksylazy, reagują z cysteiną i glutationem tworząc S-acetylocysteinę i S-acetyloglutation. Dane te zostały potwierdzone przy użyciu krystalicznych preparatów S-acetylo- jedno- i dwufosforanu tiaminy. S-acetylowe pochodne tiaminy mogą również zastąpić tiaminę przy niedoborze tej witaminy w żywieniu ptaków. Wydawało się zatem bardzo prawdopodobne, że w niektórych biologicznych reakcjach syntezy acetylo-CoA koenzymem może być S-acetylopirofosforan tiaminy.

Wiadomo, że otwarcie pierścienia tiazolowego z wytworzeniem wolnej grupy tiolowej zachodzi tylko w środowisku alkalicznym. Wyniki polarograficznych badań Watanabe i Asaki (30) wykazały, że w nieznacznej ilości forma ta występuje już w pH 7—9. Według Watanabe 0,001% pirofosforanu tiaminy w pH 7 występuje w postaci tiolowej. Maier i Metzler (17) na podstawie badań struktury witaminy B₁ w środowisku alkalicznym przyjmują również możliwość występowania formy tiolowej w warunkach biologicznych. Znaleziona przez nich wartość pK dla tej reakcji jest wprawdzie wysoka (9, 2), nie jest jednak wykluczone, że wstępna reakcja z substratem może wartość tę znacznie obniżyć.

Zgodnie z przedstawionymi danymi kwas pirogronowy (lub inny ket kwas) reagowałby z grupą tiolową otwartej formy (X) pirofosforanu

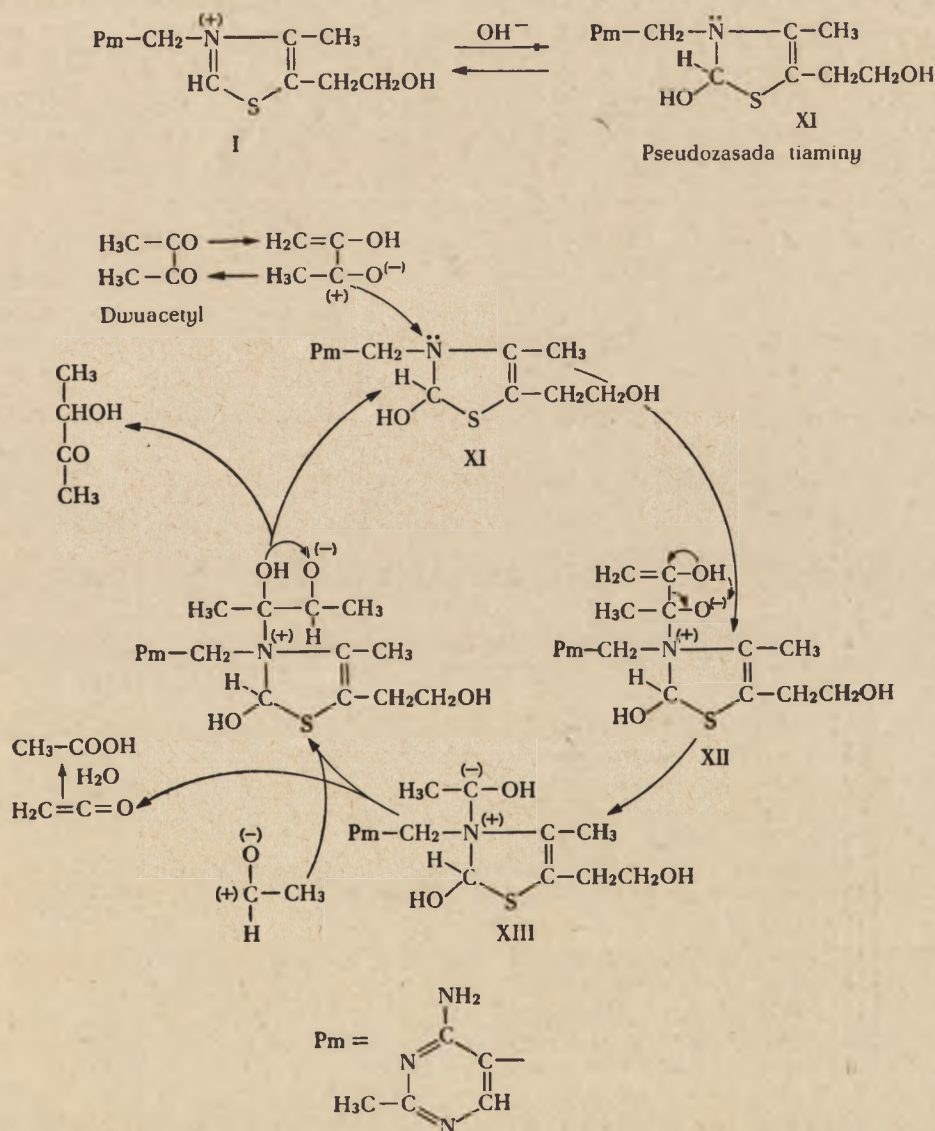
tiaminy. Wytworzony produkt ulegałby odwodorowaniu przez DPN^+ -dehydrogenazę z równoczesnym odszczepieniem dwutlenku węgla. Powstały S-acetylopirofosforan tiaminy przekazywałby grupę acetylową na koenzym A lub ulegał hydrolizie z wytworzeniem aldehydu octowego, przy czym następowałaby regeneracja koenzymu.

Hipoteza ta, jakkolwiek bardzo sugestywna, budziła szereg zastrzeżeń — zwłaszcza możliwość istnienia formy otwartej pierścienia tiazolowego tiaminy w warunkach biologicznych wymagała potwierdzenia doświadczalnego.

Jak już wspomniano do niedawna trudności w szczegółowym śledzeniu mechanizmu działania tiaminy polegały głównie na braku uproszczonego układu, w którym reakcje te mogłyby być badane. W 1951 roku Mizuhara ze współpracownikami (21), analizując przebieg katalizowanej przez sole tiazoliowe reakcji syntezy benzoiny z aldehydu benzoowego, zaobserwowanej po raz pierwszy w 1943 roku przez Ugai i współpracowników (29), zwrócił uwagę na to, że mechanizm jej może być tego samego typu, co i mechanizm reakcji przebiegających w układach biologicznych przy udziale pirofosforanu tiaminy. Reakcja Ugai zachodzi bowiem przez związek pośredni typu $\text{R}-\text{CO}^-$, który reagując z niezmienioną drugą cząsteczką aldehydu benzoowego tworzy benzoinę. Po zmodyfikowaniu warunków Mizuhara stwierdził, że w środowisku wodnym, w temperaturze pokojowej i pH 8,4 zarówno tiamina, jak i jej pirofosforan zdolne są do katalizowania reakcji dekarboksylacji kwasu pirogronowego do aldehydu octowego, syntezy acetoiny i octanu z dwuacetylu i aldehydu octowego, jak również syntezy acetoiny z kwasu pirogronowego i aldehydu octowego (21, 22). Opracowany przez Mizuharę układ stał się układem modelowym dla badania mechanizmu działania tiaminy. Odtwarza on w dużym stopniu warunki enzymatycznych reakcji przebiegających w układach biologicznych z udziałem pirofosforanu tiaminy. Przemiany katalizowane przez dodaną tiaminę zachodzą w temperaturze pokojowej w środowisku wodnym i są tego samego typu, co zachodzące w organizmie przy udziale enzymów. Wprawdzie optimum pH 8,4 reakcji nieenzymatycznych jest wyższe aniżeli w układach biologicznych, jednak zdaniem Breslowa (4) zarzut ten nie jest istotny, bowiem nie jest pewne, czy rzeczywiste pH działania tiaminy na powierzchni białka enzymu nie jest nieco wyższe aniżeli mierzone w roztworze.

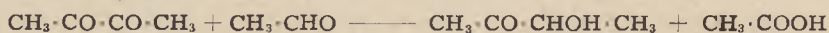
W badaniu mechanizmu reakcji w układzie modelowym Mizuhary zbadano przede wszystkim, czy związki z wolną grupą tiolową i tiocetany wykazują aktywność katalityczną w stosunku do syntezy acetoiny. W przeprowadzonych doświadczeniach cysteina, kwas tioglikolowy, tiolenol, produkt połączenia tioglikolanu z kwasem pirogronowym oraz

O,S-dwuacetyltiamina okazały się nieaktywne (28). Syntezę acyloin oraz wymienione wyżej reakcje tego typu katalizowały natomiast poza tiaminą różne pochodne tiazoliowe. Optimum pH 8,4 odpowiada w przybliżeniu wartości pK dla powstawania pseudozasad związków tiazoliowych. Dane te skłoniły Mizuharę i współpracowników do zaproponowania mechanizmu reakcji, w którym zakłada się udział pseudozasad.



Schemat 3. Mechanizm syntezy acetoiny z dwuacetyl w Mizuhary i Handlera (22).

Przyjmują oni, że spolaryzowana cząsteczka pirogronianu lub dwuacetylu łączy się z wolną parą elektronów przy atomie azotu pierścienia tiazolowego pseudozasady z wytworzeniem połączenia (XII), z którego następnie ulega odszczepieniu dwutlenek węgla lub keten, a powstały związek (XIII) może bądź to hydrolizować do aldehydu octowego, bądź też kondensować z cząsteczką aldehydu octowego do acetoiny. Przebieg proponowanych reakcji dla przemiany dwuacetylu przedstawiony jest na schemacie 3. Potwierdzeniem takiego przebiegu reakcji są zdaniem Mizuhary i Handlera (22) wyniki uzyskane przy zastosowaniu substratów znakowanych izotopami. Wykazali oni, że po podaniu do układu dwuacetylu i aldehydu octowego znaczonego za pomocą ^{14}C powstaje acetoina ze znaczącym atomem węgla. Zatem katalizowana przez tiaminę reakcja:



nie jest typu oksydoredukcyjnego, lecz przebiega przez rozbitcie cząsteczki dwuacetylu na dwa fragmenty, z których jeden w postaci „aktywnego aldehydu” reaguje z aldehydem octowym dając acetoinę, drugi zaś wydziela się w postaci kwasu octowego. Synteza ta nie zachodzi w środowisku kwaśnym ani obojętnym, lecz w pH dostatecznie wysokim, umożliwiającym powstanie pseudozasady katalizatora.

Tablica 1

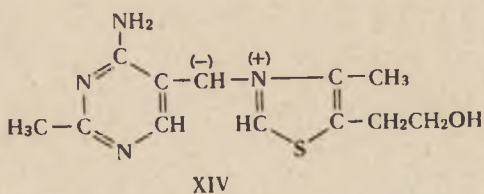
Katalityczne własności pochodnych tiazoliowych w syntezie benzoiny

L. p.	Badana pochodna tiazoliowa	Wynik
1	Chlorowodorek, chlorek tiaminy	+
2	Bromek 3-benzylotiazoliowy	+
3	Bromek 3-etylotiazoliowy	+
4	Jodek 3-etylotiazoliowy	+
5	Bromek 3-benzyl-4-metylotiazoliowy	+
6	Jodek 3-etylo-4-metylotiazoliowy	+
7	Bromek 3-etylo-4-metylotiazoliowy	+
8	Bromek 3,4-dwumetylotiazoliowy	+
9	Bromek 3-(β -hydroksy- β -fenyloetylo)-4-metylotiazoliowy	+
10	Bromek 3-benzyl-2,4-dwumetylotiazoliowy	—
11	Bromek 3-benzyl-4-fenylo-2-metylotiazoliowy	+
12	Jodek 3-izopropyl-4-metylotiazoliowy	—
13	Jodek 2,3-dwumetylotiazoliowy	—
14	Jodek 1,3, 4-trójmetylotiazoliowy	+
15	Jodek 1,3-dwumetylotiazoliowy	+
16	Jodek 1,2,3-trójmetylobenzylimidazolowy	—

Mechanizm proponowany przez Mizuharę i współpracowników spotkał się z ostrą krytyką i uznano go za mało prawdopodobny. Zagadnienie wymagało zatem dalszych badań. Przede wszystkim zwrócono

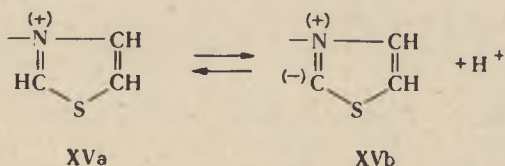
uwagę na to, jakie pochodne tiazoliowe posiadają aktywność katalityczną w układzie modelowym Mizuhary. Poza dotychczas poznanymi przebadano dodatkowo wiele innych pochodnych tiazoliowych. Niektóre wyniki tych badań podane są w tabelicy 1.

Na podstawie tych badań B r e s l o w (1) wysunął hipotezę, że aktywną w reakcji formą katalizatora byłaby tiamina ze zjonizowaną mostkową grupą metylenową (XIV). Jednakże w wyniku badań Westheimera

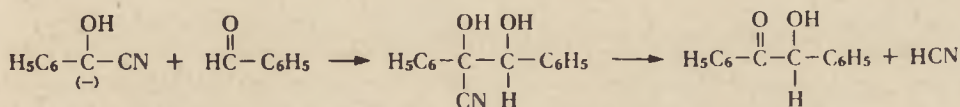
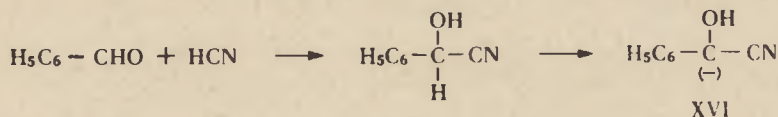


XIV

(9) oraz późniejszych prac Breslowa (2, 3, 4) hipotezę tę należało odrzucić. Wykazano, że jonizacja taka nie zachodzi, ponieważ nie stwierdzono wymiany deuteru przy mostkowym atomie węgla metylenowego. Wymiana taka następuje natomiast, i to bardzo szybko, w temperaturze pokojowej i już w obojętnym środowisku wodnym przy atomie węgla 2 pierścienia tiazoliowego (3). Powstawanie jonu tiazoliowego przez od-szczepienie protonu w tym położeniu potwierdzone zostało zarówno badaniami spektroskopowymi w podczerwieni, jak i przez badania magnetycznego rezonansu jądrowego (2, 3). Badania te wskazują, że po rozpuszczeniu soli tiazoliowej w wodzie szybko ustala się równowaga między następującymi dwiema formami (XVa i XVb):

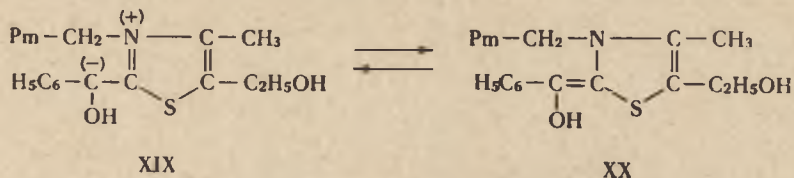


Wyniki te nasunęły przypuszczenie ewentualnego udziału C 2 anionu tiazoliowego w reakcjach katalizowanych przez tiaminę. Analizując te



Schemat 4. Mechanizm syntezy benzoiny wg Lapworth'a (16).

wszystkie wyniki dotychczas uzyskane w badaniach na układach modelowych. Szczególnie przekonywające są tu dane Downesa i Sykesa (6), którzy wykazali, że podstawienie w pozycji 2 pierścienia tiazoliowego grupy metylowej na miejsce wodoru powoduje całkowitą utratę włas-



ności katalitycznych pochodnej tiazoliowej aktywnej uprzednio w reakcji. Stąd też wydaje się, że dla układów nieenzymatycznych mechanizm zaproponowany przez Breslowa odpowiada rzeczywistemu przebiegowi reakcji.

Dotychczasowe wyniki badań mechanizmu reakcji zachodzących przy udziale TPP-enzymów w układach biologicznych są zbyt pośrednie i niewystarczające na wyciągnięcie dostatecznie pewnych wniosków w tym względzie. Zreferowane przez O b e r m a n (23) prace nad mechanizmem biosyntezy acetoiny nie wykluczają możliwości przebiegu tych reakcji zgodnie ze schematem Breslowa. Również wyniki ostatnio ogłoszonej pracy De Tara i Westheimera (5) przemawiałyby na korzyść tej hipotezy.

Pani Prof. Dr I. Chmielewskiej składam serdeczne podziękowanie za cenne wskazówki i uwagi udzielane przy opracowaniu niniejszego artykułu.

LITERATURA

1. Breslow R., *Chem. a Ind. B. I. F. Rev. R.*, 28 (1956).
2. Breslow R., *Chem. a Ind.*, 893 (1957).
3. Breslow R., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1762 (1957).
4. Breslow R., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3719 (1958).
5. De Tar D. F., Westheimer F. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 175 (1958).
6. Downes J., Sykes P., *Chem. a Ind.*, 1095 (1957).
7. Fry K., Ingraham L. L., Westheimer F. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5225 (1957).
8. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1008 (1953).
9. Ingraham L. L., Westheimer F. H., *Chem. a Ind.*, 846 (1956).
10. Jansen B. C. P., *Vitamins a Hormones*, 7, 84 (1949).
11. Karrer P., *Bull. soc. chim. France*, 149 (1947).
12. Karrer P., Visconti M., *Helv. Chim. Acta*, 29, 711 (1946).
13. Langenbeck W., *Erg. Enzymforsch.*, 2, 314 (1933).

14. Langenbeck W., *Die Organischen Katalysatoren*, Julius Springer, Berlin, 1935.
15. Lohmann K., Schuster P., *Biochem. Z.*, **249**, 188 (1937).
16. Lapworth A., *J. Chem. Soc.*, **83**, 995 (1903).
17. Maier J. D., Metzler D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4386 (1957).
18. Manzo E. I., Metzler D. E., *Feder. Proc.*, **16**, 391 (1957).
19. Mitsukawa T., Kawasaki H., *J. Pharm. Soc. Japan*, **73**, 705 (1953).
20. Mitsukawa T., Kawasaki H., *J. Vitaminol.*, **1**, 260 (1955).
21. Mizuhara S., Tamura R., Arata H., *Proc. Japan Akad.*, **27**, 302 (1951).
22. Mizuhara S., Handler P., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 571 (1954).
23. Oberman H., *Postępy Biochemii*, **6**, 181 (1960).
24. Peters R. A., *Lancet*, 1161 (1936).
25. Peters R. A., Rydin H., Thompson R. H. C., *Biochem J.*, **29**, 53 (1935).
26. Racker E., De La Haba G., Leder I. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1010 (1953).
27. Stern K., Melnick J., *J. Biol. Chem.*, **131**, 597 (1939).
28. Takeuchi Y., Okuda K., Hayakawa S., Mizuhara S., *J. Biochem. (Japan)*, **42**, 93 (1955).
29. Ugai T., Tanaka S., Dokawa S., *J. Pharm. Soc. Japan*, **63**, 269 (1943).
30. Watanabe A., Asaki Y., *Vitamins*, **7**, 1092 (1954).
31. Weil — Malherbe H., *Nature*, **145**, 106 (1940).
32. Williams R. R., *Erg. Vitamin- u. Hormonforsch.*, **1**, 213 (1938).
33. Wiesner K., Valenta Z., *Experientia*, **12**, 190 (1956).

JANUSZ SUPNIEWSKI*

Biosynteza i biooksydacja cholesterolu w tkankach zwierzęcych

Biosynthesis and Biooxidation of Cholesterol in Animal Tissues

The extensive review is made on the results of investigations of the cholesterol biosynthesis in animal tissues and its biooxidation as well. The formation of bile acids and steroid hormones is discussed. The balance of the cholesterol metabolism in human body is given.

Wszystkie komórki zwierzęce i roślinne zawierają związki steroidowe, które są ich istotnymi niezbędnymi składnikami. W tkankach zwierząt występuje cholesterol wolny i w postaci estrów z wyższymi kwasami tłuszczowymi obok niewielkich ilości produktów jego redukcji, na przykład dwuhydrocholesterolu, lub odwodorowania, na przykład 7-dehydrocholesterolu, albo utlenienia. W tkankach roślinnych znajdują się fitosterole zbliżone budową do cholesterolu.

Tkanki zwierzęce zawierają różny procent cholesterolu; dużo cholesterolu znajduje się w ośrodkowym układzie nerwowym i nerwach obwodowych, wchodząc w skład ich mieliny, w nadnerczach i skórze, mniej nieco w gonadach, w narządach gruczołowych jak wątroba i nerki, w płucach i mięśniach.

Poziom cholesterolu w osoczu krwi, będący pewnym miernikiem bilansu jego przemiany w ustroju, jest wypadkową intensywności procesów syntezy tego związku w tkankach i wchłaniania z pokarmów oraz procesów wydalania z ustroju, głównie z kałem, w mniejszym stopniu z moczem, i utleniania w narządach ciała. Cholesterol osocza znajduje się w stanie równowagi z cholesterolem wątroby, najważniejszego narządu jego syntezy w ustroju. Synteza cholesterolu w wątrobie, a być może też w innych tkankach, jest uwarunkowana jego poziomem w osoczu krwi.

Nadmierne podawanie cholesterolu w pokarmach powoduje wzrost jego poziomu w osoczu (hipercholesterynemia), hamuje syntezę tego związku w wątrobie, lecz nie w jelitach i skórze (39, 49, 81).

* Prof. dr, Kierownik Zakładu Farmakologii PAN w Krakowie.

Podobnie jak inne organiczne składniki ustrojowe, cholesterol ulega ciągłej odnowie — stale tworzy się i rozpada. Okres połowicznego rozpadu cholesterolu w wątrobie zwierząt wynosi 4-6 dni, we krwi — 8 dni, w całym ciele — 31-32 dni (89). Przemiana cholesterolu jest więc powolniejsza od przemian węglowodanów i białek.

Cholesterol powstaje w tkankach zwierzęcych z prostych produktów przemiany materii — utleniania węglowodanów, białek i tłuszczów (35). Zwierzęta roślinożerne syntezują cały cholesterol ustrojowy w swych tkankach (cholesterol endogeniczny), zaś zwierzęta mięsożerne i wszystkożerne (a więc i ludzie) otrzymują część cholesterolu z pokarmów zwierzęcych (cholesterol egzogeniczny). Sterole z pokarmów roślinnych w śladach tylko wchłaniają się z jelit i nie są przerabiane w tkankach zwierzęcych na cholesterol.

U młodych szybko rosnących zwierząt synteza cholesterolu odbywa się we wszystkich tkankach ustrojowych, nawet w ośrodkowym układzie nerwowym (82); najintensywniej jednak jest on wytwarzany w wątrobie (121), fibroblastach tkanek łącznych (83), ścianach większych naczyń krwionośnych (115, 133), nadnerczach (120), gonadach, skórze, ścianach przewodu pokarmowego, szpiku i narządach bogatych w komórki siateczkowe. U zwierząt dojrzałych synteza ta prawie nie odbywa się w mózgu i rdzeniu, a najintensywniej przebiega w wątrobie, przy czym komórki siateczkowe Kupffera odgrywają tu największą rolę (66, 112, 130).

Synteza cholesterolu odbywa się głównie w mikrosomach (27, 44), które skupiają 80% jego ilości zawartej w komórce (28), natomiast nie zachodzi w mitochondriach ani w morfotycznych składnikach jądra komórkowego. Synteza ta wymaga obecności ATP, DPN lub TPN, jonów manganu i magnezu, biotyny (40, 60), kwasu pantotenowego (22, 62, 63) lub CoA (21) oraz kobalamin (137). Synteza odbywa się w warunkach aerobowych.

Utlenianie cholesterolu w ustroju zwierzęcym prowadzi do prostszych, bogatszych w tlen związków steroidowych, przy czym tylko alifatyczny łańcuch boczny dołączony do układu steranowego może ulec przemianie do dwutlenku węgla i wody. Trudne utlenianie się cholesterolu jest powodem, że często odkłada się on w tkankach zmienionych patologicznie, źle unaczynionych i odżywianych: w płytkach i guzkach ateromatycznych ścian naczyń krwionośnych, w gruzliczych masach serowatych, starych zawałach, rogówce i soczewce oka, w błonie bębenkowej.

Prace nad biosyntezą i biooksydacją cholesterolu były dawniej utrudnione z powodu braku odpowiednich metod badawczych, a rozwinęły się z chwilą zastosowania przypuszczalnych prekursorów tej syntezy znakowanych izotopami węgla i wodoru. Najpierw stosowano w tym celu ^{13}C i deuter, potem izotopy promieniotwórcze ^{14}C i tryt — łatwe do ozna-

czenia licznikami Geigera lub urządzeniami scyntylacyjnymi. Najłatwiej badania nad biosyntezą steroli można było prowadzić na drożdżach i pleśniach, hodowanych w pożywkach zawierających znakowane prekursorzy. Po wyosobnieniu z tych drobnoustrojów fitosteroli można było przez ostrożne ich utlenianie wykazać, które z ich atomów węgla i wodoru pochodzą ze znakowanych prekursorów.

Podobną techniką badano syntezę cholesterolu *in vitro* w skrawkach lub miazgach tkanek narządów, najczęściej wątroby. Badania te rozszerzono na wyosobnione narządy: wątroby, nadnercza, tętnice, przemywane płynami odżywczymi zawierającymi znakowane prekursorzy. Analiza radiometryczna wytworzonego w narządach cholesterolu oraz jego pochodnych dawała odpowiedź, z jakich pośrednich produktów mogą one powstawać.

Synteza cholesterolu przebiega też *in vitro* z homogenatami tkankowymi nie zawierającymi nieuszkodzonych komórek. Jest on syntetyzowany przez wyosobnione mikrosomy, aktywowane dodatkiem enzymów zawartych w wodnych wyciągach z protoplazmy komórkowej. Synteza cholesterolu nie przebiega w wyosobnionych mitochondriach.

Żywienie zwierząt znakowanymi prekursorami pozwala na wykrycie cholesterolu zawierającego izotopy węgla i wodoru pochodzące z podanych prekursorów.

I. Biosynteza cholesterolu

Fitosterole drożdży i pleśni mogą powstawać z kwasu octowego, jak wykazali *Sonderhoff* i *Thomas* (119), hodując drożdże w pożywce zawierającej znakowany deuterem kwas octowy CD_3COOH . W drożdżach tworzy się wtedy ergosterol zawierający ten izotop. *Ottke* ze współpracownikami (87) znaleźli, że mutant *Neurospora crassa*, nie przyswajający cukrów ani trójwęglowych produktów ich utleniania, rośnie w pożywce zawierającej $^{14}\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ i tworzy ergosterol zawierający ^{14}C i ^{13}C .

Również w tkankach zwierzęcych kwas octowy jest najprostszym substratem biosyntezy cholesterolu (23, 24, 37, 38, 58, 59). *Rittenberg* i *Schönheimer* (98) wykryli, że deuter jest inkorporowany w cholesterolu ciała szczurów żywionych znakowanym kwasem octowym CD_3COOH . Cholesterol w tych warunkach powstaje też z kwasów: masłowego, β -hydroksymasłowego, acetylooctowego, izowalerianowego i alany (14, 18, 19), a więc ze związków, które łatwo utleniają się do kwasu octowego w tkankach zwierzęcych. Deuter wykryto w cholesterolu ciała szczurów żywionych znakowanym alkoholem etylowym $\text{CD}_3\text{CH}_2\text{OH}$, lecz

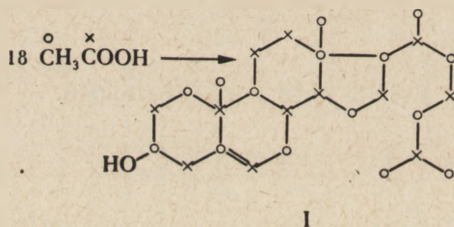
nie $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$ (18, 41), bo po utlenieniu ostatniego w tkankach powstaje kwas octowy CH_3COOH nie zawierający deuteru.

Bloch ze współpracownikami (20, 72) śledził biosyntezę cholesterolu *in vitro* w skrawkach i miazgach z wątroby szczurów, dodając do płynów odżywczych prekursorów biosyntezy, a więc $\text{CD}_3^{13}\text{COOH}$ (16, 17). Cholesterol wątroby zawierał wtedy ^{13}C i D.

In vitro w komórkach wątrobowych znakowany cholesterol powstaje ze znakowanego kwasu pirogronowego CD_3COCOOH , natomiast nie wykryto deuteru w cholesterolu szczurów karmionych znakowanym kwasem pirogronowym (3, 12, 17), bowiem kwas ten podany doustnie szybko utlenia się do dwutlenku węgla w ścianie jelit i krwi żyły wrotnej, nie dostaje się więc do wątroby, gdzie odbywa się biosynteza cholesterolu.

In vitro cholesterol tworzy się w komórkach wątrobowych szczura z kwasów: bursztynowego, izowalerianowego, acetylooctowego, acetonu (20) aldehydu octowego, ze związków łatwo utlenianych przez tkanki do kwasu octowego (23).

Bloch, a następnie Cornforth metodą stopniowego utleniania cholesterolu powstałego w tkankach zwierzęcych ze znakowanego kwasu octowego ustalili, które atomy węgla cholesterolu (I) pochodzą z grupy metylowej i karboksylowej kwasu octowego.



Kwas octowy w tkankach zwierzęcych najłatwiej powstaje przez utlenianie heksoz. Jako produkt utleniania powstaje najpierw kwas pirogronowy, który dalej utlenia się i dekarboksyluje do kwasu octowego pod wpływem układu lipotiamidowego. Powstały kwas octowy wiąże się estrowo z grupą tiolową koenzymu acetylacyjnego, tworząc czynny kwas octowy obdarzony silnymi właściwościami reagowania z różnymi związkami chemicznymi.

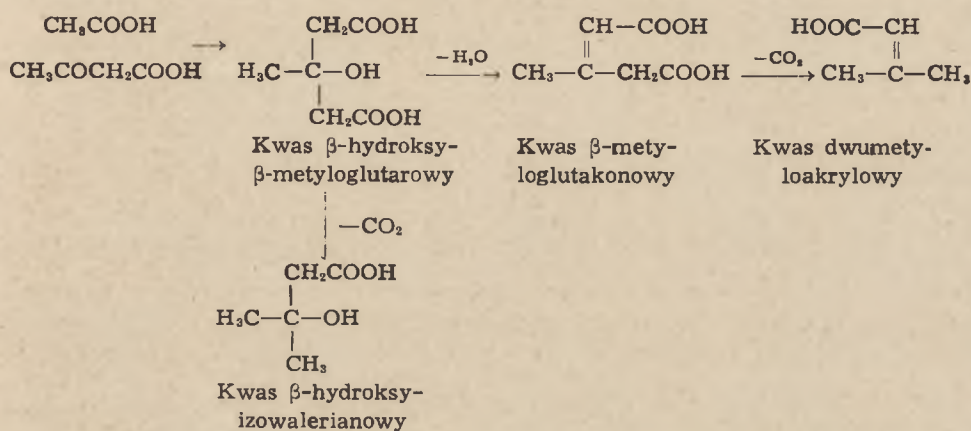
Kwas octowy powstaje też z wyższych kwasów tłuszczowych z tłuszczów drogą beta-oksydacji, tworzy się też przez utlenienie ketokwasów powstałych przez dezaminację i utlenianie aminokwasów z białek. Cholesterol może więc tworzyć się w ustroju zwierzęcym z węglowodanów, tłuszczów i białek.

Przez kondensację dwóch cząsteczek czynnego kwasu octowego tworzy się kwas acetylooctowy; dołączanie następnych cząsteczek tego kwasu

prowadzi do syntezy nie rozgałęzionych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych.

Kwas acetylooctowy znakowany w grupie karboksylowej węglem promieniotwórczym $\text{CH}_3\text{COCH}_2^{14}\text{COOH}$ jest przerabiany w skrawkach wątrobowych w promieniotwórczy cholesterol (9), obok niego powstają niewielkie ilości kwasów: β -hydroksy- β -metyloglutarowego, β -metyloglutaronowego, β -hydroksyzowalerianowego i dwumetyloakrylowego (46, 93).

Kwasy te na pewno powstają z kondensacji cząsteczek kwasu acetylooctowego i kwasu octowego. Produkt kondensacji, kwas β -hydroksy- β -metyloglutarowy, przez dekarboksylację zamienia się w kwas β -hydroksyzowalerianowy, zaś przez odwodnienie — w kwas β -metyloglutakonowy, a z tego przez dekarboksylację powstaje kwas dwumetyloakrylowy (schemat 1).



Schemat 1. Produkty przemiany kwasu β -hydroksy- β -metyloglutarowego.

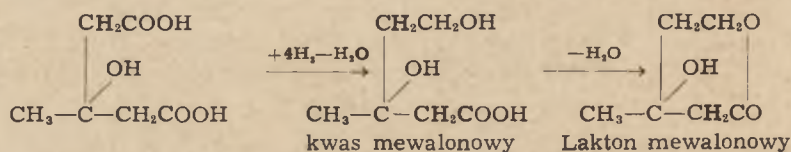
Jednak kwasy dwumetyloakrylowy i β -hydroksyzowalerianowy znakowane węglem promieniotwórczym są tylko w niewielkim stopniu inkorporowane do cząsteczek cholesterolu syntezowanego w ustroju szczura, jak również do cholesterolu tworzonego *in vitro* w skrawkach wątroby, nie zdają się więc być prawidłowymi pośrednimi produktami biosyntezy cholesterolu w tkankach zwierzęcych (46). Jedynie kwas β -hydroksy- β -metyloglutarowy jest inkorporowany w dużym stopniu, do cząsteczek cholesterolu, jest więc pośrednim produktem tej biosyntezy (15, 94).

Skęggs (117) wykryła w wyciągach roślinnych obecność czynnika wzrostowego dla *Lactobacillus odontoliticus*. Ciało nazwane kwasem mewanonowym wyosobnił Folkers ze współpracownikami (135, 136) i ustalił jego budowę chemiczną potwierdzoną syntezą (113). Tylko lewoskrętna odmiana kwasu mewanonowego jest czynna biologicznie. Tawormina

i Gibbs (122, 123), a następnie Wright (137) wykazali, że znakowany węglem promieniotwórczym lewoskrętny kwas mewalonowy lub jego lakton inkubowane ze skrawkami wątroby są prawie ilościowo inkorporowane do cząsteczek cholesterolu.

Stwierdzono, że kwas mewalonowy hamuje w wątrobie syntezę cholesterolu z kwasu octowego. Wątroba naświetlana promieniami X tworzy cholesterol z kwasu mewalonowego, lecz nie z octanów. Również obfite karmienie zwierząt cholesterollem hamuje syntezę tego związku z kwasu octowego, lecz nie z mewalonianów. Fakty te przemawiają za tym, że kwas mewalonowy jest normalnym pośrednim produktem biosyntezy cholesterolu z kwasu octowego w tkankach zwierzęcych. Biosynteza ta odbywa się też w wyosobnionych mikrosomach komórek wątrobowych w obecności wyciągów wątrobowych zawierających enzymy niezbędne w tej syntezie.

Kwas mewalonowy powstaje z kwasu β -hydroksy- β -metyloglutarowego przez redukcję jednej grupy karboksylowej do alkoholowej (schemat 2).



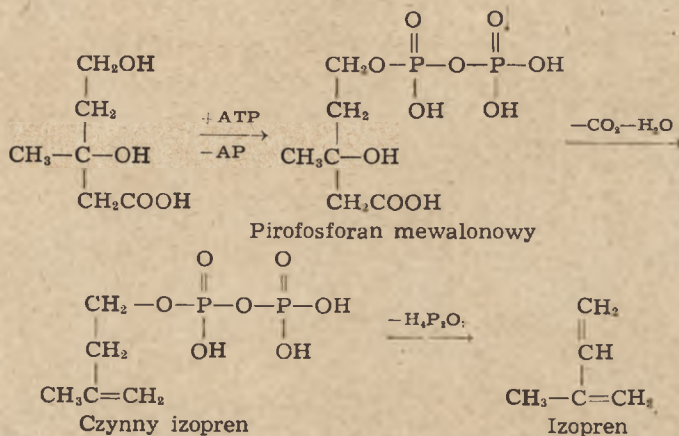
Schemat 2. Powstawanie kwasu mewalonowego i jego laktonu z kwasu β -hydroksy- β -metyloglutarowego.

Węglowodór alifatyczny, skwalen, został wykryty w nie zmydlającej się frakcji tłuszczów z wątroby rekinów. Rekin roślinożerny *Selache maxima* zawiera go w wątrobie w dużych ilościach. Związek ten wykryto też w wątrobach ssaków, w łojkach tworzonych przez gruczoły łojowe skóry, znaleziono go też w roślinach, drożdżach, w oleju z nasion kozieradki (*Trigonella foenum graecum*).

Zwierzęta żywione skwalem znakowanym węglem promieniotwórczym zawierają w wątrobie promieniotwórczy cholesterol. W warunkach beztlenowych obserwowano powstawanie skwalenu w miazgach wątrobowych ze znakowanego kwasu octowego, ponieważ skwalen powstaje z kwasu octowego, a następnie w warunkach aerobowych jest dalej przetwarzany na cholesterol, jest więc pośrednim produktem biosyntezy tego związku. W podobnych warunkach skwalen powstaje z kwasu mewalonowego (36, 48).

Biosynteza ta odbywa się w tkankach tylko w obecności ATP poprzez estry fosforanowe tego związku (1, 124, 126, 127, 128). Tchen (88, 124) wykazał, że w tych warunkach z kwasu mewalonowego powstaje 5-monofosforan mewalonowy, a następnie — pirofosforan. Ten ostatni od-

szczepia cząsteczkę kwasu węglowego i przechodzi w tak zwany czynny izopren (schemat 3). Przez odszczepienie cząsteczki kwasu pirofosforowego z czynnego izoprenu może powstawać izopren; proces ten najprawdopodobniej przebiega w niektórych roślinach (kaczkodajnych), nie spotykamy go w tkankach zwierzęcych.



Schemat 3. Powstawanie czynnego izoprenu z kwasu mewalonowego.

Skwaleń jest bezpierzścieniowym związkiem terpenowym zbudowanym ze spolimeryzowanych cząsteczek izoprenu, musi więc w tkankach zwierzęcych powstawać ze związków chemicznych zbliżonych do izoprenu. Wyjaśnienie tego procesu biochemicznego nie jest łatwe i nastrocza ciągle wiele wątpliwości.

Czynny izopren, pirofosforan 3-metylo-3-butenylowy, powstaje z kwasu mewalonowego pod wpływem wyciągów z drożdży zatrutych amidem jodoctowym; jest on szybko zamieniany w skwaleń przez wyciągi nie zatrute, a w cholesterol — przez miazgi wątrobowe (144).

Enzymy wyciągów drożdżowych nie zawierających TPNH wytwarzają z kwasu mewalonowego pirofosforan farnezyli, z którego powstaje skwaleń, gdy do wyciągów dodamy tej kodehydrogenazy. Skwaleń tworzy się więc z sześciu cząsteczek czynnego izoprenu (pirofosforanu izoprenyli) poprzez pirofosforan geranyli i pirofosforan farnezyli (96, 144), (schemat 4).

Miazgi wątrobowe tworzą z kwasu mewalonowego niewielkie ilości kwasu farnezenowego (42), który zdaje się być ubocznym produktem biosyntezy. Ze znakowanego kwasu farnezenowego powstaje w nich znaczony skwaleń, najprawdopodobniej kwas ten jest redukowany w tkankach do farnezołu przerabianego następnie w cholesterol.

Już w 1926 roku Heilbron, Kamm i Owens (57) przypuszczali, że skwalen jest prekursorem biosyntezy cholesterolu i innych związków steroidowych w tkankach zwierzęcych i roślinnych. Węglowodór ten tworzy wiele stereoizomerów, z których najprawdopodobniej jeden tylko ma znaczenie biologiczne, inne izomery nie są przetwarzane w sterole (68), bowiem tkanki nie są w stanie przeprowadzić konwersji innych stereoizomerów w izomer biologiczny.

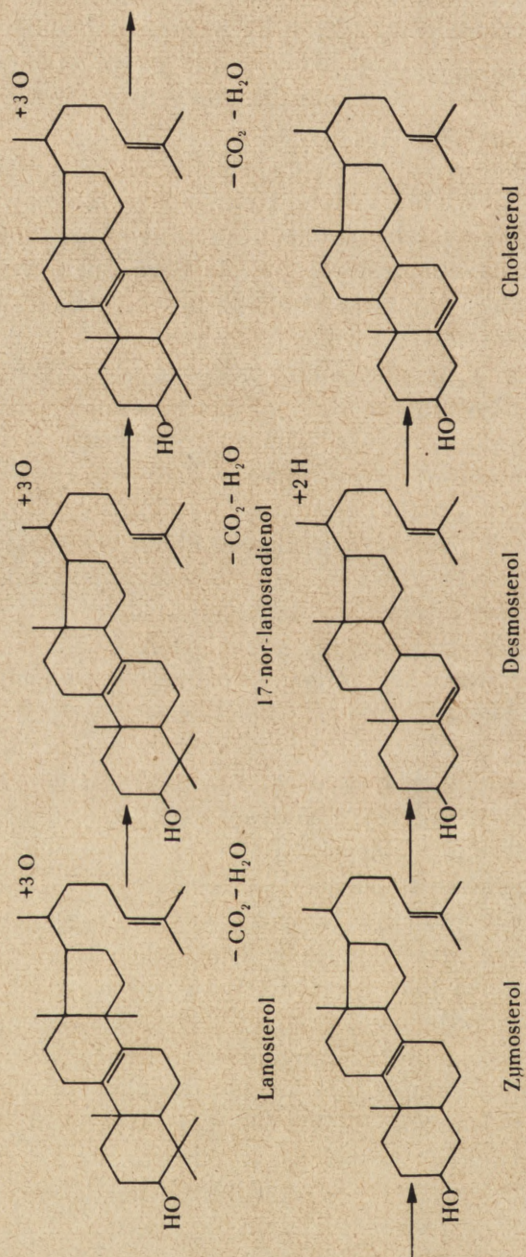
Cholesterol szybko i łatwo tworzy się w tkankach zwierzęcych ze skwalenu (31, 32). Żywienie zwierząt skwalenem znakowanym ^{14}C powoduje zjawianie się w ich tkankach promieniotwórczego cholesterolu (61). Promieniotwórczy cholesterol powstaje ze znakowanego skwalenu w skrawkach wątroby i jajników kur (92). Skwalen hamuje w tych tkankach syntezę cholesterolu z kwasu octowego.

Zamiana skwalenu w cholesterol odbywa się tylko w warunkach tlenowych, jest to bowiem oksydacyjna cyklizacja związku alifatycznego do wielopierścieniowego sterolu. Już w 1934 roku Robinson (99) przypuszczał, że cholesterol tworzy się w istotach żywych przez cyklizację skwalenu. Modon (80) tłumaczył tę cyklizację uprzednią izomerizacją skwalenu do hipotetycznego izoskwalenu. Woodward i Bloch (134) wysunęli hipotezę roboczą, że pierwszym produktem cyklizacji skwalenu jest związek sterydowy lanosterol, wykryty po raz pierwszy w tłuszczu z wełny i produkowany przez gruczoły łojowe skóry ssaków, jak również syntezowany w tkankach roślinnych (huba brzoza). Mechanizm cyklizacji skwalenu do lanosterolu został wyjaśniony przez Ruzickę (105).

Zachodzi ona samorzutnie, zapoczątkowana działaniem czynnego tlenu na skwalen. Podczas cyklizacji następuje przesunięcie grupy metylowej z położenia przy atomie węgla C 9 do położenia przy C 13 lanosterolu. Cyklizacja jest przykładem „concerted reaction”. W tkankach zwierzęcych obok lanosterolu powstaje też pokrewny mu agnosterol (schemat 5).

Miazgi wątrobowe przetwarzają w warunkach tlenowych znakowany lanosterol w cholesterol (33). Steroid ten tworzy się też ze znakowanego kwasu octowego w wątrobie i jelitach (110). Homogenaty wątrobowe pozbawione mikrosomów też zamieniają skwalen w lanosterol, podczas gdy w obecności mikrosomów biosynteza postępuje dalej do cholesterolu. Procesy te przebiegają wobec TPNH (33, 114). Cyklizacja skwalenu przebiega tylko w warunkach aerobiozy w odróżnieniu od biosyntezy tego związku odbywającej się tylko w warunkach beztlenowych. W procesie cyklizacji niezbędny jest swoisty enzym oksycyklaza skwalenu I, w czystej postaci wyosobniona z wątroby (125).

Lanosterol w tkankach zwierzęcych jest przetwarzany w cholesterol. Proces ten połączony jest z eliminacją trzech grup metylowych lanoste-



Schemat 6. Powstawanie cholesterolu z lanosterolu

rolu utlenianych aż do dwutlenku węgla (85). Utlenianie przebiega też w miazgach wątrobowych (86) i biegnie etapami. Najpierw enzymy oksydacyjne utleniają grupy metylowe do grup hydroksymetylowych, potem tkankowe dehydrogenazy zamieniają te w grupy aldehydowe, dehydrogenazy aldehydowe dalej utleniają je do grup karboksylowych, usuwanych w postaci dwutlenku węgla przez dekarboksylazy.

Z lanosterolu najpierw powstaje 17-norlanostadienol ($\Delta^{8,24}$ -4,4-dwumetylocholestadienol) (47), następnie najprawdopodobniej 4,4-dwumetylo- $\Delta^{8,24}$ -cholestadienon, potem kolejno drogą dekarboksylacji są usuwane dwie grupy metylowe przy C 4 — powstaje zymosterol. Sterol ten znaleziono po raz pierwszy w drożdżach. Z płodów wyosobniono desmosterol — przypuszczalne następne ogniwo biosyntezy cholesterolu. Związek ten różni się od zymosterolu innym położeniem wiązania podwójnego w pierścieniu B sterolu. Przemieszczenie tego wiązania podwójnego odbywa się drogą utlenienia i odszczepienia wody. Wreszcie przez redukcję desmosterolu tworzy się cholesterol (schemat 6).

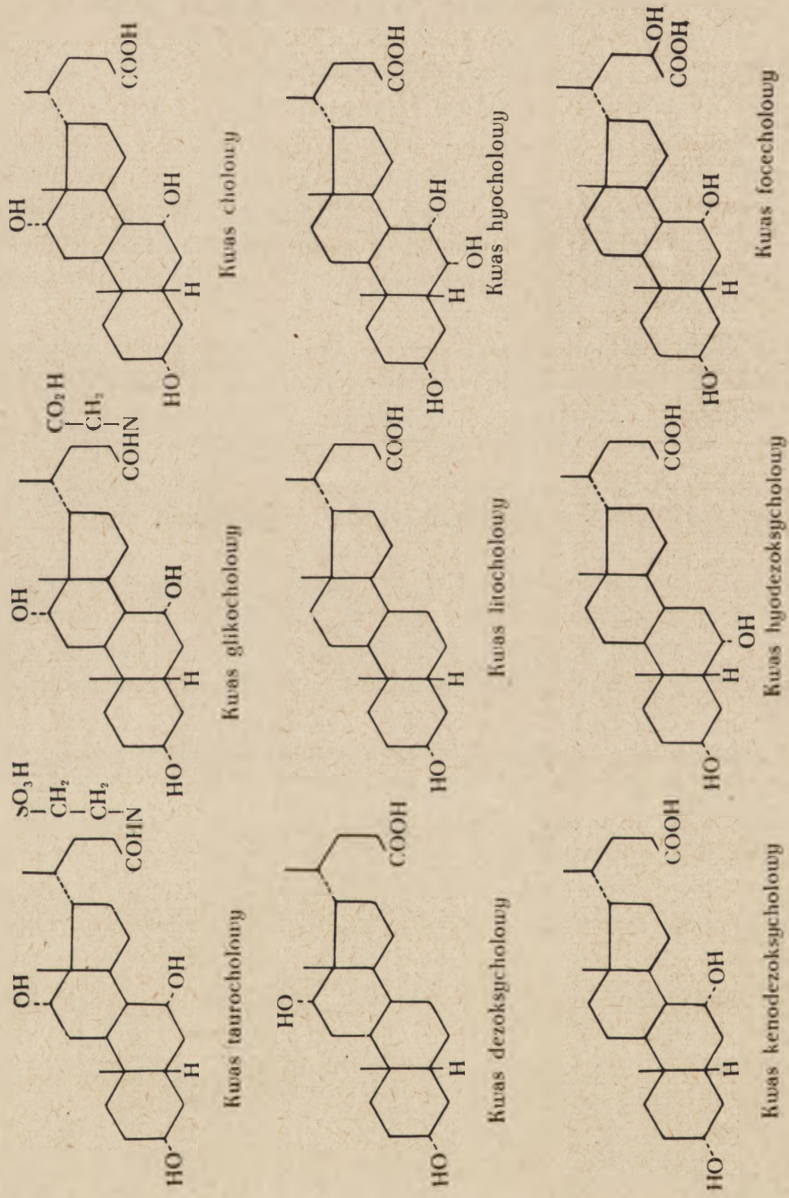
II. Tworzenie się kwasów żółciowych

Wątroba jest narządem, w którym nie tylko odbywają się intensywne procesy syntezy cholesterolu, lecz który służy również do wydalania tego związku z żółci w postaci rozpuszczalnego w wodzie kompleksu z lecytyną oraz w postaci kwasów żółciowych — produktów uwodorowania i utlenienia cholesterolu (13). Podczas tworzenia kwasów żółciowych z cholesterolu następują przemieszczenia przestrzenne wewnątrzcząsteczkowe. Cholesterol jest związkiem pochodnym cholestanu; kwasy żółciowe — koprostanu, ich pierścienie A i B mają ułożenia cis, a grupy hydroksylowe ułożenia α .

Kwasy żółciowe tworzą się tylko w wątrobach kręgowców. U większości ssaków w żółci znajdują się kwasy: cholowy, kenodezoksycholowy, dezoksycholowy oraz niewielkie ilości kwasu litholowego. Żółć świń zawiera kwas hyocholowy z grupami hydroksylowymi przy C 3, 6, 7 i hyodezyksycholowy z grupami hydroksylowymi przy C 3, 6, żółć fok — kwas focecholowy, żółć rekinów — alkohol scymnol pod postacią estru z kwasem siarkowym — kwas scymnolosiarkowy.

W żółci kwasy żółciowe występują pod postacią rozpuszczalnych w wodzie soli sodowych połączeń amidowych z glicyną, tj. kwasów glikocholowych, bądź z produktem utleniania cysteiny — tauryną, tj. kwasów taurocholowych (tablica 1).

Bloch, Berg i Rittenberg (13) wykazali obecność deuteru w kwasie cholowym żółci psa żywionego cholesterolem znakowanym deu-



Tablica 1. Kwasy żółciowe.

terem. U szczurów cholesterol znakowany węglem promieniotwórczym jest ilościowo przetwarzany w znakowany nim kwas cholowy (116). Cholesterol znakowany przy C 26 utlenia się w ustroju z wydzielaniem $^{14}\text{CO}_2$ (30), wówczas gdy znakowany w C 4 nie utlenia się do promieniotwórczego dwutlenku węgla i w ciągu dwóch tygodni wydalą się w 95% z kałem (85% jako kwasy żółciowe, 10% jako sterole) i w 1% w moczu. Po wstrzyknięciu znakowanego ^{14}C cholesterolu w żółci szczura najpierw zjawiają się znakowane kwasy taurolitocholowy i taurokenodezoksycholowy, później kwas taurocholowy. Również u ludzi kwas cholowy tworzy się w wątrobie tylko z cholesterolu syntezowanego (z octanów) w ustroju lub dostarczonego w pokarmach (104). Układ steroidowy pozostaje nie naruszony poza wprowadzeniem do niego grup hydroksylowych, ostatnie trzy atomy węgla łańcucha alifatycznego utleniają się zupełnie z wytworzeniem grupy karboksylowej.

Synteza kwasu cholowego z cholesterolu jest procesem nieodwracalnym; cholesterol nie może być tworzony z powrotem z kwasów żółciowych. Wykazano to w badaniach na szczurach, którym podawano kwas cholowy znakowany trytem (29). Nie tworzył się wówczas w tkankach cholesterol zawierający tryt, który głównie był wydalany w kale.

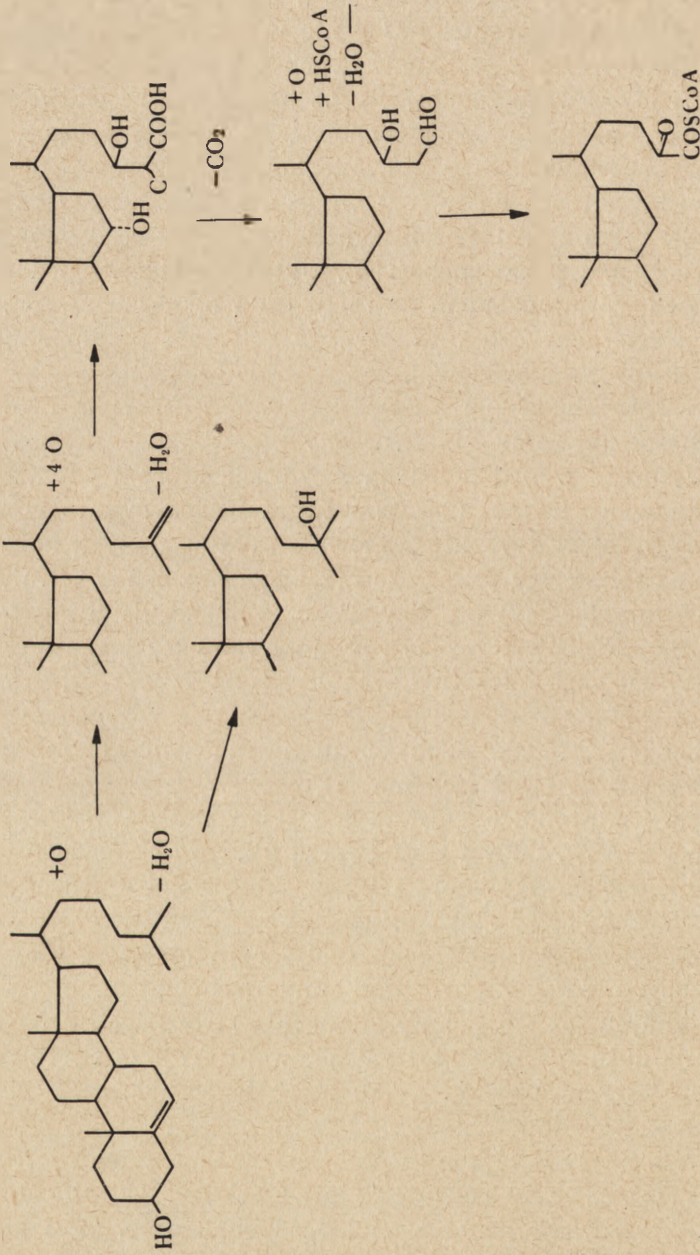
Utlnianie cholesterolu przy C 26 przebiega również *in vitro* w skrawkach (78) lub miążgach (2) wątroby. Podczas biooksydacji najpierw tworzy się Δ^{25} -dehydrocholesterol (77), produkowany też przez wyosobnione mitochondria (45) obok 24-hydroksycholesterolu. Proces utleniania biegnie dalej przez etapy hydroksyaldehydokwasu, hydroksyaldehydu i ketokwasu. Wątroba posiada zdolność utleniania łańcucha alifatycznego steroli tylko do C 24 (139) (schemat 7).

Homogenaty wątrobowe zawierające tylko mikrosomy w obecności jonów magnezu, ATP, DPN i CoA tworzą z kwasu cholowego i tauryny kwas taurocholowy, a z glicyny i kwasu cholowego — kwas glikocholowy (26, 114). Bremer (25) wykazał, że najpierw tworzy się połączenie kwasu cholowego z koenzymem acetylowym, które reaguje z tauryną lub glicyną, dając odpowiednie amidy (schemat 8).

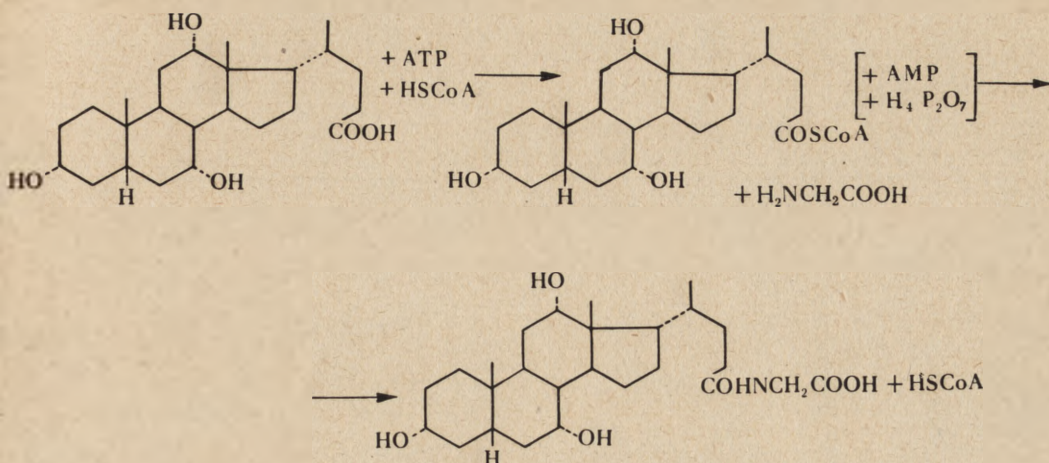
Enzymy znajdujące się w mikrosomach wątrobowych różnych zwierząt wykazują dużą specyficzność gatunkową: u królika tworzy się tylko kwas glikocholowy, u kury — tylko kwas taurocholowy, u szczura — zarówno gliko-, jak i taurocholowy.

Wątroba nie rozszczepia z powrotem glikocholanów ani taurocholanów na składniki (72), za to hydrolizują je łatwo bakterie jelitowe (109).

Żółć ludzka zawiera około 60% kwasu cholowego, 20% kwasu dezoksycholowego i około 20% kwasu kenodezoksycholowego oraz ślady kwasu litocholowego. Kwasy te w około 80% znajdują się jako glikocholany, w 20% pod postacią taurocholanów. Tworzą one kompleksy



Schemat 7. Utlenienie cholesterolu do kwasów żółciowych.



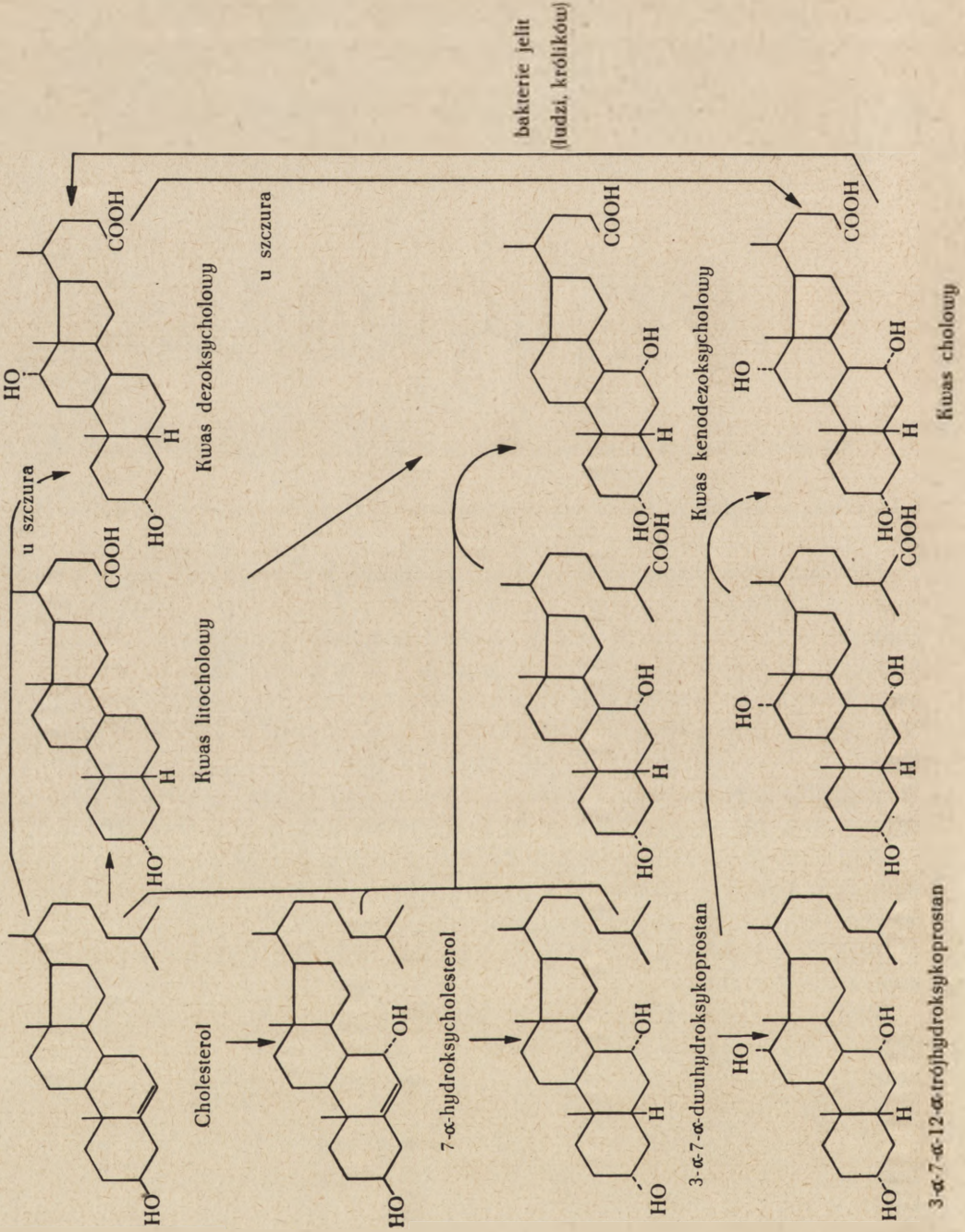
Schemat 8. Tworzenie się kwasu glikocholowego w tkankach wątroby.

z lecytyną rozpuszczalne w wodzie i umożliwiające rozpuszczanie w żółci cholesterolu wydalanego z wątroby do jelit.

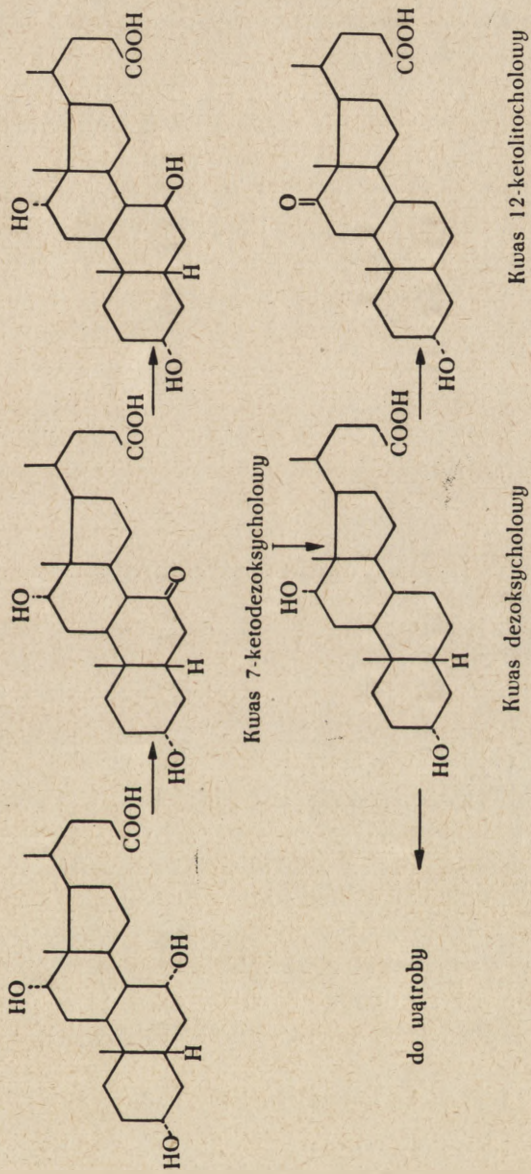
Badania prowadzone znakowanym cholesterolem wykazały, że w wątrobie wskutek autooksydacji tlenem tworzy się najpierw 7- α -hydroksycholesterol (70), a z niego pod wpływem enzymów redukujących i utleniających 3- α -7- α -dwyhydroksykoprostan (7), a po dalszym utlenianiu kwas kenodezoksycholowy. Z dwyhydroksykoprostanu powstaje też 3- α -7- α -12- α -trójhydroksykoprostan (6) utleniany dalej do kwasu cholowego. Kwas lithocholowy powstaje bezpośrednio z cholesterolu (schemat 9). W wątrobie szczura bezpośrednio z cholesterolu tworzy się kwas dezoksycholowy, nie wytwarzany przez ludzkie komórki wątrobowe. U ludzi i wielu innych ssaków powstaje on w jelitach z kwasu cholowego pod wpływem bakterii. Wchłaniany z jelit z krwią żyły wrotnej dostaje się do wątroby, tam wiąże się z tauryną lub glicyną i wydala się z powrotem w żółci. Żółć ludzka wypływająca z przetoki dróg żółciowych nie zawiera kwasu dezoksycholowego.

Wątroby większości ssaków nie posiadają zdolności utleniania kwasu dezoksycholowego do kwasu cholowego. Kwas dezoksycholowy żółci ludzkiej pochodzi jedynie tylko z kwasu cholowego odhydroksylowanego w jelitach działaniem bakterii jelitowych.

W wątrobie ludzkiej kwas cholowy nie powstaje z kwasów kenodezoksycholowego, dezoksycholowego i lithocholowego (71). U większości zwierząt nie jest możliwa dalsza hydroksylacja pierścienia steroidowego wówczas, gdy łańcuch alifatyczny został utleniony do grupy kwasowej. Ze zwierząt laboratoryjnych wyjątkiem tu jest szczur, w którego wątrobie kwas dezoksycholowy utlenia się do kwasu cholowego.



Schemat 9. Tworzenie się kwasów żółciowych z cholesterolu.



Schemat 10. Przemiany kwasu cholowego przez bakterie jelitowe.

Kwasy żółciowe wydalone z żółcią do jelit są w nich rozkładane przez florę bakteryjną. Najpierw enzymy bakteryjne odszczepiają od kwasów żółciowych taurynę i glicynę, potem utleniają kwas cholowy do kwasu 7-ketodezoksycholowego, redukują go do kwasu 3- α -7- β -12- α -trójhydroksycholanowego lub kwasu dezoksycholowego (schemat 10). Ten ostatni może być utleniany do kwasu 12-ketolitocholowego. W kale znajdujemy głównie kwasy: cholowy, dezoksycholowy i 12-ketolitocholowy (84).

Kwasy żółciowe, a w pierwszym rzędzie kwasy cholowy, dezoksycholowy i kenodezoksycholowy są z powrotem wchłaniane z jelit i z krwią żyły wrotnej dostają się do wątroby i ponownie wiążą się z tauryną i glicyną i są znów wydalone z żółcią do jelit. W ciągu doby kwasy te wielokrotnie krążą między wątrobą a jelitami prądami żółci i krwi żyły wrotnej, spełniając w jelitach rolę fizjologicznych emulgatorów ciał tłuszczowych, i dzięki zdolności tworzenia rozpuszczalnych w wodzie połączeń z lipoidami pokarmowymi umożliwiają ich wchłanianie przez błonę śluzową jelit.

Część kwasów żółciowych jest wydalana z kałem i w ten sposób część cholesterolu ustrojowego przemienionego w kwasy żółciowe opuszcza ustrój.

III. Biooksydacja cholesterolu

Enzymy komórek wątroby posiadają zdolność utleniania do dwutlenku węgla tylko trzech ostatnich atomów węgla łańcucha alifatycznego cholesterolu. Inne gruczoły, jak kora nadnerczy, ciało żółte, łożysko posiadają układy enzymatyczne utleniające ten łańcuch do pozostałości dwuwęglowej, wreszcie w jądrach, jajnikach, łożysku, ciałku żółtym, korze nadnerczy znajdują się układy utleniające ten łańcuch całkowicie. W gruczołach tych powstają hormony steroidowe, regulujące w ustroju czynności płciowe, przemianę białkowo-węglowodanową i mineralną. Do utlenienia przebiegającego wobec jonów metali ciężkich i nukleotydu trójfosfopirydynowego wykorzystywany jest tlen cząsteczkowy.

Enzymy utleniające związki steroidowe występują również w grzybach i pleśniach (43). Wiele z tych drobnoustrojów obecnie znalazło zastosowanie w przemysłowej produkcji hormonów steroidowych.

1. Biogeneza hormonów kory nadnerczy

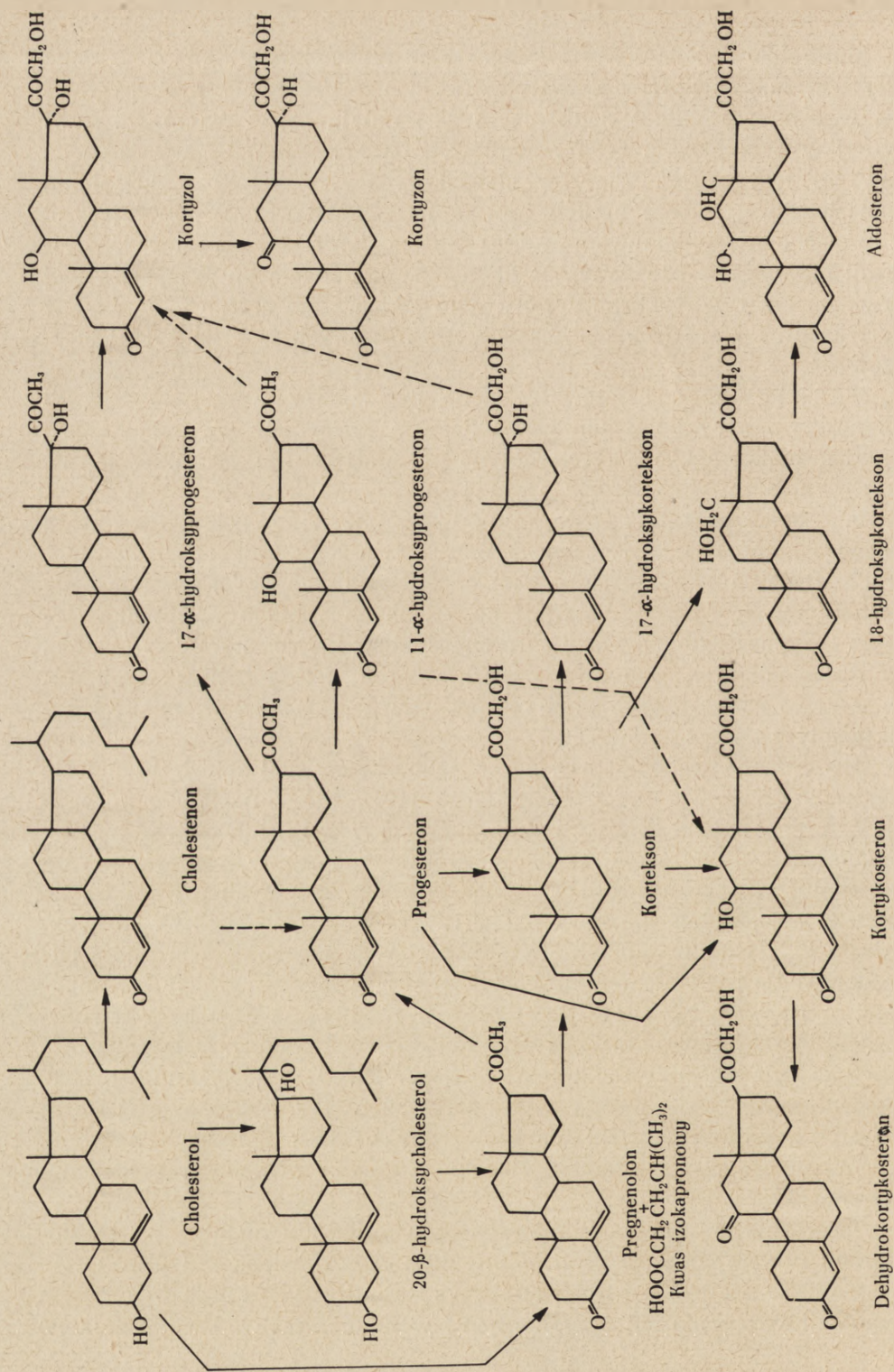
Kora nadnerczy tworzy hormony steroidowe, regulujące przemianę sodowo-potasową ustroju (mineralokortykosteroidy) i działające na przemianę węglowodanowo-białkową (glikokortykosteroidy). Te ostatnie są również obdarzone silnym działaniem przeciwzapalnym i znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu.

Mineralokortykosteroidy tworzą się w niewielkich ilościach w *zona glomerulosa*, glikokortykosteroidy w ilościach znacznie większych — głównie w *zona fasciculata* nadnerczy i łatwo dają się wykazać we krwi żyłnej wyciekającej z tych narządów. Z kory nadnerczy wyosobniono powyżej trzydziestu związków steroidowych — produktów utleniania cholesterolu. Niektóre z nich są być może artefaktami, powstającymi z innych ciał steroidowych podczas wyosobniania. Metodami chromatografii bibułowej stwierdzono, że nadnercza wydzielają do przepływającej krwi: kortyzol, kortykosteron obok niewielkich ilości aldosteronu, śladów korteksonu i 17-hydroksykorteksonu, wykrywanych w krwi żył nadnerczowych.

Hechter (53) zastosował podaną przez Vogta metodę perfuzji nadnerczy krwi do badań nad biogenezą hormonów kory nadnerczy, dodając znakowanego cholesterolu do perfundowanego płynu. W płynie wypływającym z nadnerczy wykrył znakowane kortykosteroidy, przy czym ilość ich wzrastała po dodaniu do płynu adrenokortykotrofiny, która pobudza komórki nadnerczy do żywszego tworzenia hormonów steroidowych. Badania te rozszerzone zostały przez innych badaczy, którzy do perfundowanego płynu dodawali znakowanych węglem promieniotwórczym przypuszczalnych prekursorów biosyntezy kortykosteroidów (54, 56). W badaniach tych zastosowano też klasyczne metody syntezy tych ciał *in vitro* ze znakowanych prekursorów używając skrawków, miążg i homogenatów z kory nadnerczy.

Stwierdzono (schemat 11), że w nadnerczach cholesterol utlenia się najpierw do 20- β -hydroksycholesterolu (108), który następnie rozpada się do pregnenolonu i kwasu izokapronowego (77). Pregnenolon w wyniku przemieszczenia wiązania podwójnego zamienia się w progesteron (8), a ten pod wpływem swoistych układów enzymatycznych utlenia się do korteksonu. Swoista dla kory nadnerczy 11- α -steroidooksydaza (107, 52) utlenia kortekson do kortykosteronu, z którego następnie w wyniku odwodowania powstaje dehydrokortykosteron. Swoiste oksydazy kory nadnerczy utleniają też progesteron przy C 17, tworząc 17- α -hydroksyprogesteron — substancję macierzystą glikokortykosteroidów. Dalsze utlenianie tego związku prowadzi kolejno do kortyzolu (51) i kortyzonu (91, 106). Biosynteza kortyzolu może również zachodzić z 11- α -hydroksyprogesteronu albo z produktu utleniania korteksonu — 17- α -hydroksykorteksonu. Tworzenie się progesteronu z cholesterolu może przebiegać przez cholesterolenon.

Tworzenie się głównego mineralokortykosteroidu nadnerczy — aldosteronu powstającego w *zona glomerulosa* w odróżnieniu od glikokortykosteroidów nie jest kontrolowane przez adrenokortykotrofinę. Mechanizm regulacji tworzenia się tego hormonu w nadnerczach i wydzielania go



Schemat 11. Biosynteza hormonów kory nadnerczy z cholesterolu.

do krwioobiegu nie jest jasny. Niektórzy badacze przypuszczają, że synteza aldosteronu jest pobudzana przez hipotetyczny hormon tworzony w śródmózgowiu i wiąże się ze stanem ukrwienia nerek, na które aldosteron wywiera główne swe fizjologiczne działanie, regulując wydalanie soli sodowych i potasowych do moczu.

Po inkubacji $4\text{-}^{14}\text{C}$ -cholesterolu z bezkomórkowymi homogenatami nadnerczy wołowych, zawierającymi mitochondria, mikrosomy i sok komórkowy, powstaje $4\text{-}^{14}\text{C}$ -aldosteron (107). W opisanych warunkach powstaje on też ze znakowanego korteksonu obok 18-hydroksykorteksonu (61), który zdaje się być pośrednim ogniwem tej biosyntezy, utleniając się do 11- α -hydroksy-18-hydroksykorteksonu; ten pod wpływem dehydrogenazy alkoholowej utlenia się dalej do aldosteronu.

Aldosteron znaleziono w płynie używanym do perfuzji nadnerczy krowy zawierającym progesteron (101, 102). Ayres i współpracownicy (4) wykazali, że hormon ten może tworzyć się w nadnerczach z progesteronu, korteksonu i kortykosteronu (schemat 11).

2. Biosynteza męskich hormonów płciowych

Interstitialne komórki Leydiga jąder tworzą z cholesterolu męskie hormony płciowe wydzielane do krwioobiegu, a w pierwszym rzędzie najważniejszy hormon — testosteron. We krwi żyłnej wypływającej z jąder wykryto testosteron i androstendion (132), we krwi *vena spermatica* ludzi — testosteron (74). Gonadotrofiny wzmagają syntezę testosteronu w jądrach (69).

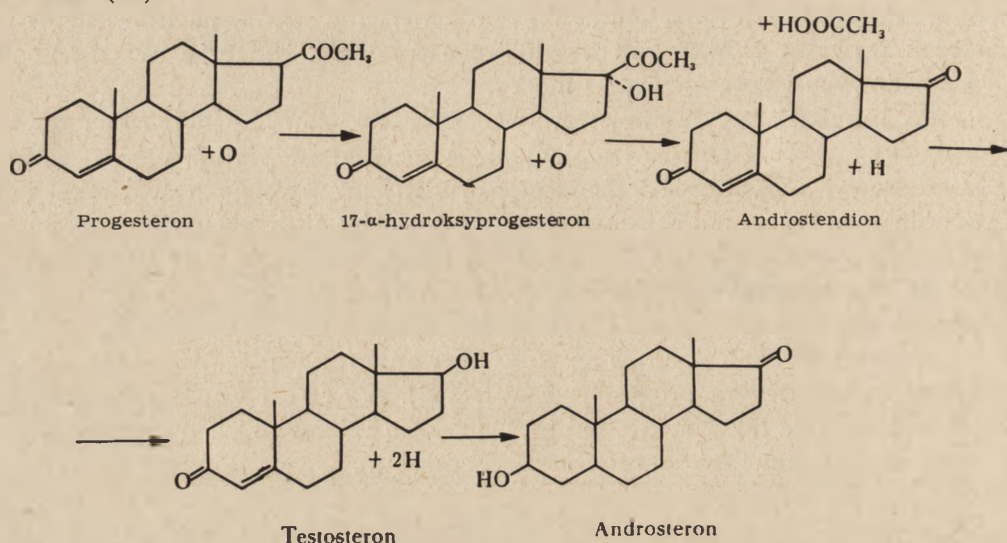
Z cholesterolu znakowanego węglem promieniotwórczym powstają w jądrach znakowane hormony androgeniczne. Produktami pośrednimi tej przemiany są: progesteron i 17- α -hydroksyprogesteron (118). Enzymy oksydacyjne jąder utleniają ten związek dalej do androstendionu i cząsteczki kwasu octowego (76). Wreszcie biologiczna redukcja androstendionu w jądrach prowadzi do tworzenia się testosteronu (schemat 12).

Testosteron następnie jest wydzielany do krwioobiegu, inaktywowany w wątrobie, zamieniając się w androsteron wydalany do moczu pod postacią nieczynnego biologicznie glikuronidu.

Hormony androgeniczne w niewielkich ilościach tworzą się w jajniku i łożysku, są bowiem pośrednimi produktami biosyntezy żeńskich hormonów płciowych w tych narządach. Powstają one w większych ilościach również w korze nadnerczy, częściowo jako produkty utleniania kortykosteroidów.

Krew żylna nadnerczy zwierząt zawiera androstendion, 11- β -hydroksyandrostendion i dehydroepiandrostenon (100). W krwi żyłnej nadnerczy

psa znaleziono: andrenosteron, androstendion, 11- β -hydroksyandrostendion (54).



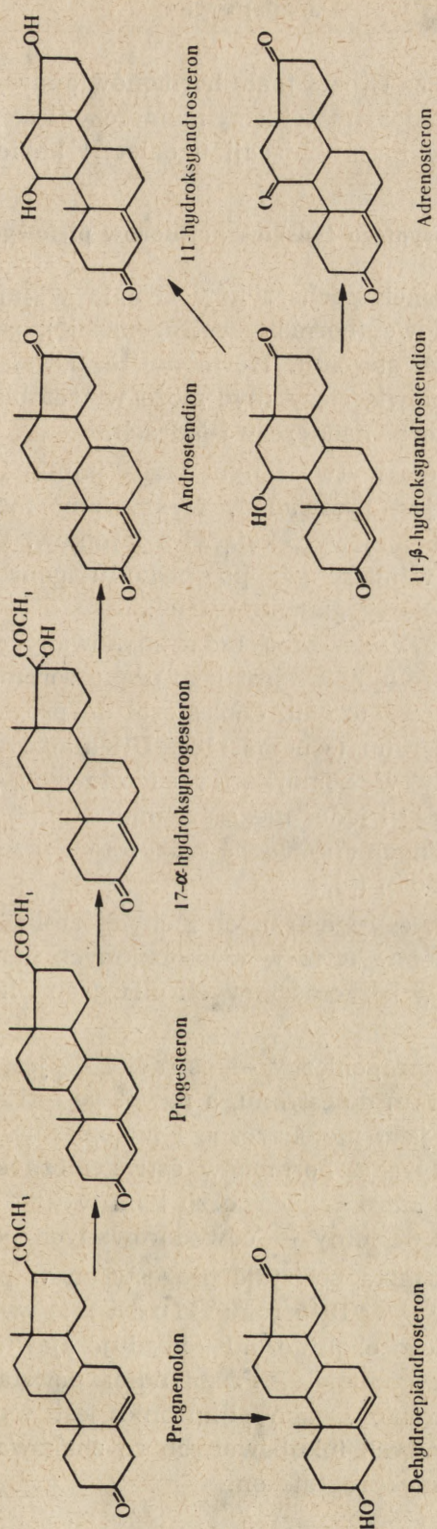
Schemat 12. Biosynteza męskich hormonów płciowych.

Bloch znalazł, że androgeniczne hormony znakowane węglem promieniotwórczym powstają w nadnerczach ze znakowanego cholesterolu lub progesteronu. W wypływającej z nadnerczy krwi żyłnej wykryto znakowany 11- β -hydroksyandrostendion, gdy dodano do krwi wpływającej do nich znakowanego progesteronu (65). Bezkomórkowe homogenaty z kory nadnerczy tworzą znakowany androstendion ze znakowanego progesteronu (95).

Kora nadnerczy posiada swoje enzymy oksydacyjne, utleniające układ steroidowy przy C 11 i C 17. Powstające w nadnerczach hormony androgeniczne z grupami hydroksylowymi lub ketonowymi przy C 17 na ogół wywierają silne działanie biologiczne, utlenione również przy C 11 działają słabo.

Mięszak wątrobowy zdaje się też utleniać progesteron, 11- β -hydroksyprogesteron i 17-hydroksyprogesteron do 17-ketosteroidów oraz 11-hydroksy-17-ketosteroidów wydalanych w moczu pod postacią glikuronidów. 17-ketosteroidy moczu głównie pochodzą z jąder i kory nadnerczy, 11-hydroksy-17-ketosteroidy — głównie lub wyłącznie z nadnerczy.

Biologiczne utlenianie cholesterolu odbywa się w korze nadnerczy podobnie jak w jądrach. Z cholesterolu tworzy się pregnenolon, a z niego progesteron, 17- β -hydroksyprogesteron, dalej androstendion, 11- β -hydroksyandrostendion, andrenosteron. Z pregnenolonu tworzy się też dehydroepiandrosteron (schemat 13).



Schemat 13. Powstawanie hormonów androgenicznych w korze nadnerczy.

Normalnie nadnercza tworzą mało hormonów androgenicznych. W stanach patologicznych nadczynności kory nadnerczy ilość ta wybitnie wzrasta, powodując objawy maskulinizacji u dzieci i kobiet.

3. Biosynteza żeńskich hormonów płciowych

W komórkach osłonek pęcherzyków Graafa w jajnikach tworzą się żeńskie hormony płciowe (hormony estrogeniczne), posiadające zaromatyzowany pierścień A steroidu. Hormony te powstają też w łożysku (estriol) w drugiej połowie ciąży (być może w trofoblaście) i w niewielkich ilościach też w korze nadnerczy i jądrach.

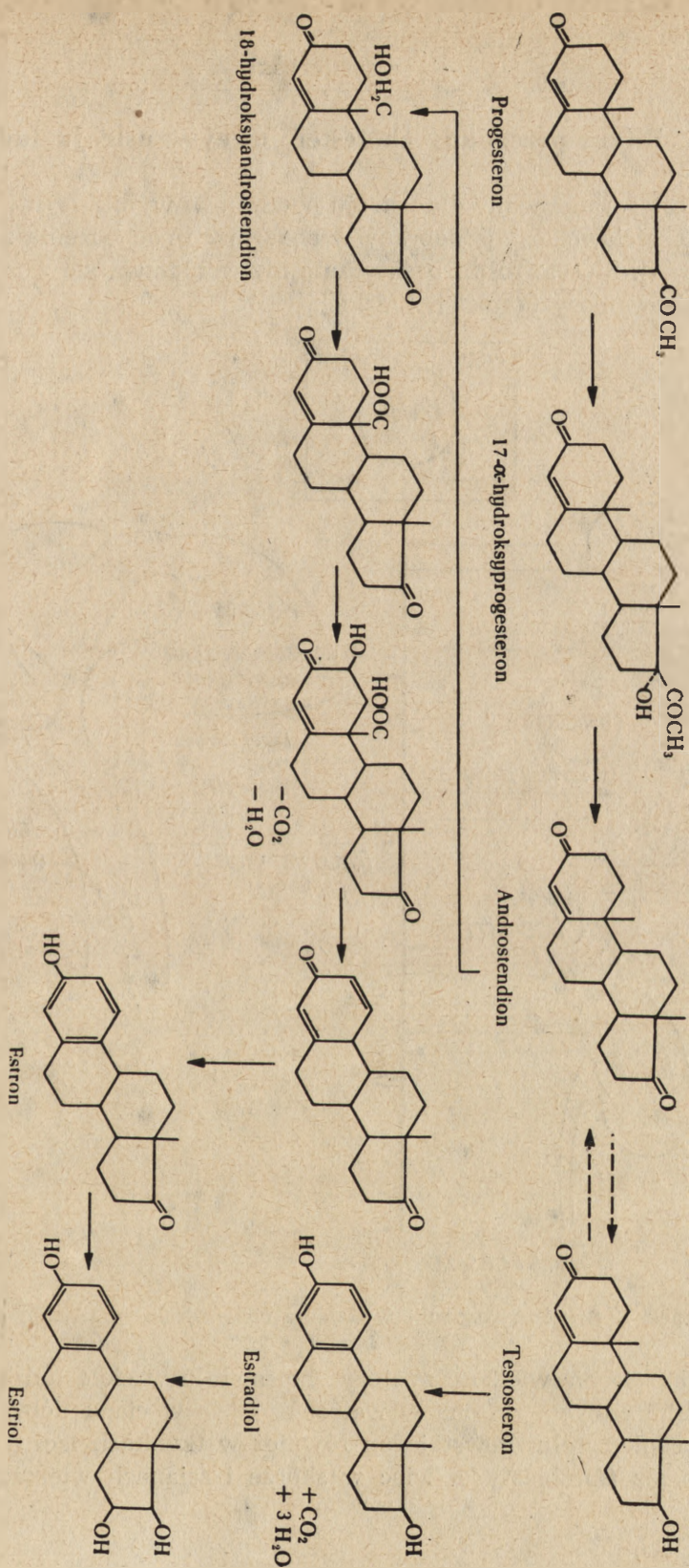
Głównym hormonem wytwarzanym przez jajniki i najbardziej czynnym estrogenicznie jest β -estradiol, wykrywany metodami chromatograficznymi w krwi żyłnej wyciekającej z jajników. Wytwarzanie estradiolu w jajnikach wzmacnia się po podaniu gonadotrofin przysadki mózgowej. Łożysko tworzy głównie estriol.

Werbin (131) wykazał, że u ludzi znakowany estron powstaje ze znakowanego cholesterolu, który jest jego prekursorem. Układ fermentów oksydacyjnych jajników utlenia cholesterol do progesteronu i dalej do 17- α -hydroksyprogesteronu (schemat 14). Utlenianie postępuje dalej do androstendionu, który w komórkach gruczołowych jajników, łożyska, a nawet kory nadnerczy i jąder ulega aromatyzacji — odwodorowaniu do hormonów estrogenicznych (79). Jądra ludzi i koni przetwarzają znakowany testosteron w estradiol (5).

Synteza hormonów estrogenicznych z cholesterolu, progesteronu i testosteronu przebiega też *in vitro* w wyosobnionych narządach, skrawkach z narządów, a nawet w bezkomórkowych miazgach i homogenatach z jajników.

Główny hormon estrogeniczny — estradiol — jest utleniany głównie w wątrobie (i w łożysku) do estronu, a nawet do estriolu. Hormony te są wydalone z moczem jako nietoksyczne i biologicznie nieczynne glikuronidy. U koni aromatyzacja hormonów estrogenicznych postępuje dalej, obejmuje pierścień B steroidu. W moczu koni wykryto estry kwasu siarkowego ekwiliny i ekwileniny — odwodorowanych pochodnych estronu.

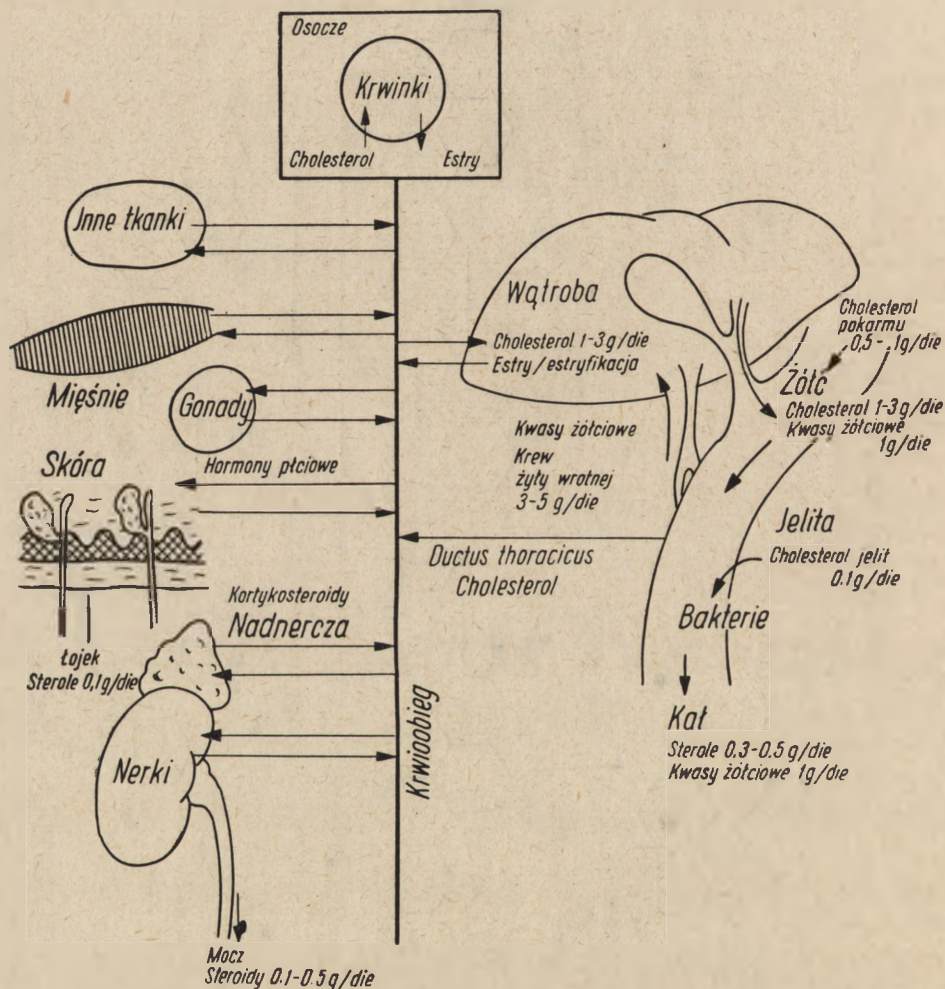
W ciele żółtym jajnika powstaje progesteron w podobny sposób jak w korze nadnerczy. Już w 1945 roku Bloch (11) wykrył, że podawanie ciężarnym znakowanego cholesterolu powoduje zjawianie się w ich moczu znakowanego pregnandiolu. Pregnandiol powstaje przez redukcję progesteronu w wątrobie i jako glikuronid jest wydalany z moczem. W miazgach z ciał żółtych inkubowanych ze znakowanym cholesterolem wykrywano znakowany progesteron.



Schemat 14. Powstawanie hormonów estrogenicznych.

IV. Bilans przemiany cholesterolowej w ustroju ludzkim

Cholesterol niezbędny dla ustroju powstaje w wyniku syntezy w tkankach, a częściowo zostaje pobrany w pokarmach pochodzenia zwierzęcego (rysunek 1). Sterole roślin praktycznie nie wchłaniają się z jelit i nie są metabolizowane w tkankach ludzkich.



Rysunek 1. Synteza, rozpad i wydalanie cholesterolu w ustroju ludzkim.

Trudno ocenić wielkość syntezy cholesterolu w ciele ludzkim. Najintensywniej odbywa się ona w wątrobie, gdzie w ciągu doby tworzy się 1—3 g cholesterolu. Powstaje on również w tkankach łącznych wytwarzanych przez fibroblasty, a więc w skórze i ścianach większych naczyń

krwionośnych. Procesy syntezy w mniejszym stopniu przebiegają w nadadach, korze nadnerczy, narządach gruczołowych, a nawet w mięśniach.

Człowiek średnio na dobę otrzymuje 0,5—1 g cholesterolu w pokarmach. Oczywiście przy diecie, zawierającej znaczne ilości żółtka jaj, mózgu lub masła, ilość ta może wybitnie wzrastać.

Cholesterol głównie wchłania się w dolnej części jelit cienkich wraz z tłuszczami. Wchłanianie jest bardzo zmienne i zależne od wielu czynników: w pierwszym rzędzie od rodzaju pokarmu, waha się więc w granicach 5—60% i wynosi maksymalnie 10—20 mg/kg na dobę. Najłatwiej wchłaniany jest cholesterol pokarmowy rozpuszczony w tłuszczach bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe. Wchłanianie odbywa się tylko wobec soli kwasów żółciowych żółci emulgujących tłuszcze i cholesterol na drobne zawiesiny, łatwo trawione i rozpuszczalne w roztworach soli tych kwasów. Kompleksy cholesterolu z kwasami żółciowymi rozpuszczają się w wodzie i łatwo wnikają w błonę śluzową jelit. Enzymy lipolityczne soków trzustkowego i jelitowego rozszczepiają estry cholesterolowe pokarmów do cholesterolu i kwasów tłuszczowych.

Wchłanianie cholesterolu przez ściany jelit jest procesem biochemicznym, w którym biorą udział liczne enzymy. Wchłaniany cholesterol jest estryfikowany w błonie śluzowej przy współudziale jelitowej esterazy cholesterolowej i wraz z powstającymi tłuszczami i fosfatydami, pod postacią małych kuleczek — chilomikronów średnicy 0,5—3 μ m przenika do naczyń chłonnych jelit.

Z prądem chłonki jelitowej cholesterol jest transportowany do krwionośnego obiegu przez piersiowy przewód limfatyczny i wraz z chłonką wlewa się do żył. Tą drogą 70—90% cholesterolu pokarmowego dostaje się do krwi, reszta przenoszona jest prądem krwi żyły wrotnej do wątroby. Część cholesterolu odpływającego z jelit pochodzi z biosyntezy odbywającej się w ścianach przewodu pokarmowego.

Wchłanianie cholesterolu z jelit i jego transport do krwi odbywają się wolno; osiąga on po doustnym podaniu maksymalny poziom we krwi dopiero po 36—72 godzinach, następnie w ciągu dalszych 12—24 godzin poziom ten obniża się do stanu prawidłowego (cholesterynemii pokarmowa).

Chilomikrony są wychwytywane przez komórki żerne (Kupffera) wątroby, komórki fagocytarne płuc i innych narządów ciała i są w nich gromadzone i trawione. Komórki tuczne wydalają wtedy do krwi heparynę, wzmagającą wydzielanie lipaz i esteraz cholinowych do krwi tkanek i aktywujące je, co prowadzi do trawienia chilomikronów i wyjaśnienia mętnego osocza krwi. Esterazy cholinowe krwi zdają się głównie pochodzić z wątroby i trzustki.

Biosynteza cholesterolu w tkankach z produktów utleniania węglowodanów, białek i tłuszczów (kwasu octowego, kwasu pirogronowego) przebiega szybko w ciągu paru godzin, ekstryfikacja — wolniej, bo do dwóch dni. Rozpad cholesterolu w ustroju jest powolny w porównaniu z szybkością rozpadu węglowodanów i białek; jego okres półtrwania we krwi wynosi 6—8 dni, w wątrobie krótszy — 4—6 dni, w całym ustroju jest nieco dłuższy z powodu leniwego metabolizmu cholesterolowego w niektórych narządach ciała, na przykład w ośrodkowym układzie nerwowym. Cholesterol jest ciągle odnawiany, syntezowany i utleniany w tkankach, wydalany z ustroju pod postacią utlenionych produktów przemiany materii.

U zwierząt dojrzałych cholesterol jest najintensywniej syntezowany w komórkach siateczkowych wątroby stanowiących 33% wagi tego narządu (75). W narządach, gdzie procesy syntezy cholesterolu odbywają się leniwie, na przykład w mózgu, znajduje się głównie cholesterol wolny; w narządach gruczołowych, gdzie cholesterol tworzy się szybko, jest dużo estrów cholesterolowych z nienasyconymi (esencjonalnymi) kwasami tłuszczowymi: linolowym, linoleinowym, arachidonowym oraz olejowym. W osoczu krwi wzajemny stosunek cholesterolu i jego estrów waha się w niezbyt szerokich granicach. Uszkodzenia wątroby powodują obniżenia poziomów estrów cholesterolowych w osoczu krwi, gdzie w dużej mierze powstają w tym narządzie.

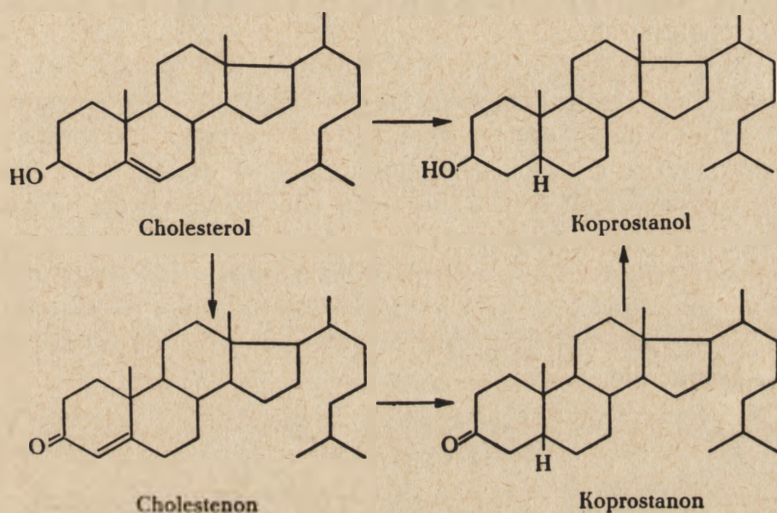
W komórkach wątroby cholesterol występuje głównie w kompleksach z fosfatydami, tłuszczami i białkami. Podobne kompleksy znajdujemy w osoczu krwi: lipoproteidy α , o mniejszych cząsteczkach i większej gęstości, i lipoglobuliny- β , o cząsteczkach większych, lżejsze, zawierające więcej cholesterolu. Lipoproteidy te prawdopodobnie powstają w wątrobie i są z niej wydalone do krwi. Służą one do transportu cholesterolu do różnych narządów ciała. Istnieje pewien stan równowagi między cholesterolem osocza i wątroby. Zwyżka cholesterolu we krwi hamuje jego syntezę w wątrobie. Wątroba jest głównym bezpośrednim śpichlerzem cholesterolu ustrojowego. Nadmiar jego jest w niej odkładany i w miarę potrzeby jest mobilizowany i przenoszony prądem krwi do innych narządów ciała. Nadmierne gromadzenie się cholesterolu w ustroju powoduje hipercholesterynię i wzrost β -lipoglobulin w osoczu.

We krwi i wątrobie człowieka znajduje się 12—15 g cholesterolu — jest to część najbardziej czynna biologicznie, ulegająca najszybszym przemianom.

Cholesterol utlenia się w ustroju do kwasów żółciowych wydalanych z żółcią do kału oraz do metabolitów hormonów sterydowych wydalanych z moczem. Około 0,1 g cholesterolu i tyleż skwalenu jest wydalane w ciągu doby przez gruczoły łojowe skóry człowieka, jako łojek impregnu-

jący zrogowaciały naskórek. W łojkach zwierzęcych znajdują się też lanosterol i agnosterol. Kał ludzki obok kwasów żółciowych zawiera też obojętne związki steroidowe, głównie koprosterol obok cholestanolu, dwu-hydrocholesterolu i niewielkich ilości produktów ich utleniania.

Steroidy kałowe pochodzą głównie z nie wchłoniętego cholesterolu pokarmowego i tworzą się pod wpływem działania bakterii jelit grubych, które bezpośrednio redukuje cholesterol do koprostanolu (koprosterolu) (103), cholestanolu lub najpierw utleniają go do cholestenonu, a ten redukuje do koprostanonu i koprosterolu (111) (schemat 15). Procesy te przebiegają też *in vitro* z czystymi hodowlami bakterii jelitowych.



Schemat 15. Przemiany cholesterolu w jelitach grubych ssaków.

Ogółem w kale wydala się na dobę 0,3—0,5 g obojętnych związków steroidowych.

Żółć zawiera też pokaźne ilości cholesterolu wydalanego do niej przez komórki wątrobowe. W ciągu doby wątroba człowieka wydala z żółcią do jelit 1—3 g cholesterolu wchłaniającego się w większej części z powrotem z jelit. Również niewielkie ilości cholesterolu 0,1 g na dobę są wydane przez błonę śluzową jelit z sokiem jelitowym i złuszczonymi nabłonkami.

Wydane z żółcią kwasy glikocholowy i taurocholowy ulegają w jelitach rozszczepieniu. Większość uwolnionych kwasów żółciowych ponownie wchłania się z jelit i dostaje się przez żyłę wrotną z powrotem do wątroby. W ciągu doby w ustroju ludzkim między wątrobą a jelitami wielokrotnie krąży 3—5 g kwasów żółciowych drogami żółciowymi i żyłą wrotną. Część kwasów żółciowych ulega zmianom chemicznym pod

wpływem bakterii jelitowych i metabolity te w ilości około 1 g na dobę są u normalnego człowieka wydalone z kałem.

Mocz ludzki zawiera produkty utleniania cholesterolu w tkankach pod postacią rozpuszczalnych w wodzie soli sodowych glikuronidów (u niektórych zwierząt ssących — soli sodowych siarczanów). Związki te powstają głównie w wątrobie z hormonów wytwarzanych przez gonady i korę nadnerczy. Z hormonów jąder i nadnerczy tworzą się glikuronidy 17-ketosteroidów i 11-hydroksy-17-ketosteroidów, z progesteronu i korteksonu glikuronid pregnandioli, z hormonów estrogenicznych glikuronidy estronu i estriolu, obok innych steroidów tej grupy wydalanych w niewielkich ilościach. W ciągu doby nerki ludzkie wydają 0,1—0,5 g produktów utleniania cholesterolu.

W ustroju normalnego człowieka bilans cholesterolowy jest wyrównany, ilości cholesterolu syntetyzowane w tkankach i dostarczane w pokarmach odpowiadają ilościom wydalanym z ustroju pod postacią metabolitów, wskutek tego poziom cholesterolu w osoczu krwi waha się w fizjologicznych granicach. Zaburzenia chorobowe powodują zachwianie tej równowagi. Wydalanie i utlenianie cholesterolu może przebiegać leniwie, podaż jego w pokarmach może być duża, co prowadzi do hipercholesterynmii. Niedostateczna synteza cholesterolu w tkankach, niedostatek jego w pokarmach i nadmierne utlenianie w tkankach powoduje hipcholesterynię.

LITERATURA

1. Amdur B., Rilling H., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2646 (1957).
2. Anfinsen C. B., Horning M. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1511 (1953).
3. Anker H. S., *J. Biol. Chem.*, **176**, 1337 (1948).
4. Ayres P., Gould R. P., Simpson S. A., Tait J. B., *Biochem. J.*, **63**, 19 P (1956).
5. Baggett B., Engel L. L., Savard K., Dorfman K. I. *Fed. Proc.*, **14**, 175 (1955).
6. Bergström S., Eriksson S., *Acta. Chem. Scand.*, **8**, 1373 (1954.)
7. Bergström S., Lindstedt S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **19**, 556 (1956).
8. Beyer K., Samuels L. T., *J. Biol. Chem.*, **219**, 69 (1956).
9. Blecher M., Gurin S., *J. Biol. Chem.*, **209**, 953 (1954).
10. Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **155**, 243 (1944).
11. Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **157**, 661 (1945).
12. Bloch K., *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*, **13**, 29 (1948).
13. Bloch K., Berg B. N., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **146**, 511 (1943).
14. Bloch K., Borek K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **162**, 441 (1946).
15. Bloch K., Clark L. C., Harary I., *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 3859 (1954).
16. Bloch K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **145**, 297 (1942).
17. Bloch K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **145**, 625 (1942).

18. Bloch K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **155**, 243 (1944).
19. Bloch K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **155**, 255 (1944).
20. Borek K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **179**, 843 (1949).
21. Boxer G. P., Shonn C. E., Gilfillamy E. W., Emerson C. A., Oginsky E., *J. Arch. Biochem.*, **59**, 24 (1955).
22. Boyd G. S., *Biochem. J.*, **55**, 892 (1953).
23. Brady R. O., Durin S., *J. Biol. Chem.*, **186**, 461 (1950).
24. Brady R. O., Gurin S., *J. Biol. Chem.*, **189**, 371 (1951).
25. Bremer J., *Acta Chem. Scand.*, **10**, 56 (1956).
26. Bremer J., Gloor U., *Acta Chem. Scand.*, **9**, 689 (1955).
27. Bucher N. R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 498 (1953).
28. Bucher N. R. L., Garrahan K., *J. Biol. Chem.*, **222**, 1 (1956).
29. Byers S., Biggs M. W., *Acta Biochim. Biophys.*, **29**, 301 (1952).
30. Chaikoff I. L., Bloom B., Sipperstein M. D., Kiyasu J. Y., Reinhardt W.C., Dauben W. G., Fastham J.F., *J. Biol. Chem.*, **194**, 407 (1952).
31. Channon H. J., *Biochem. J.*, **20**, 400 (1926).
32. Channon H. J., Tristram G. B., *Biochem. J.*, **31**, 738 (1937).
33. Clayton R. B., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **218**, 305 (1956), 319 (1956).
34. Clayton R. B., Bloch K., *Fed. Proc.*, **14**, 625 (1955).
35. Cornforth J. W., *Rev. Pure Appl. Chem.*, **4**, 275 (1954).
36. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Popjak G., Youhotsky—Gore I. *Biochem. J.*, **66**, 10 P (1957).
37. Cornforth J. W., Youhotsky—Gore I., Popjak G., *Biochem. J.*, **64**, 38 P (1956).
38. Cornforth J. W., Youhotsky—Gore I., Popjak G., *Biochem. J.*, **65**, 94 (1957).
39. Cox G. E., Nelson C. G., Wood E. B., Taylor C. B., *Fed. Proc.*, **13**, 31 (1954).
40. Curran G. L., Clube O. L., *J. Biol. Chem.*, **204**, 215 (1953).
41. Curran G. L., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **190**, 170 (1951).
42. Dituri F., Rabinovitz J. L., Hullin R. P., Gurin S., *J. Biol. Chem.*, **229**, 825 (1957).
43. Eppstein S. M., Meister P. O., Murray H. O., Peterson D. H., *Vitamines and Hormones*, **14**, 359 (1951).
44. Frantz J. D., Bucher N. R. L., *J. Biol. Chem.*, **206**, 471 (1951).
45. Fredricksen D. S., Ono K., *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 183 (1956).
46. Garattini S., Marpurgo G., Passerini N., *Experientia*, **14**, 85 (1958).
47. Gautschi F., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 684 (1957).
48. Gould R. G., Popjak G., *Biochem. J.*, **66**, 51 P (1957).
49. Gould R. G., Taylor C. B., Hagerman J. S., Warner J., Campbell D., *J. Biol. Chem.*, **201**, 519 (1953).
50. Hanohan P. J., al Wakil S. J., *Arch. Biochem.*, **37**, 167 (1952).
51. Hayno M., Saba N., Dorfman R. I., Hechter O., *Recent Progress in Hormone Research*, **12**, 79 (1956).
52. Heard R. D., Blight E. G., Cann A. S., Jellinek P. H., Donnell W. J., Rac B. G., Webb J. L., *Recent Progress in Hormone Research*, **12**, 45 (1956).
53. Hechter O., *Fed. Proc.*, **8**, 70 (1949).

54. Hechter O., Macchi I., Korman H., Frank E., Frank H., *Am. J. Physiol.* **29**, 182 (1955).
55. Hechter O. Pincus G., *Recent Progress in Hormone Research*, **6**, 216 (1951).
56. Hechter O., Zaffaroni A., Jacobsen R. P., Levy H., Jeanloz R., Schyneker V., Pincus G., *Recent Progress in Hormone Research*, **6**, 216 (1951).
57. Heilbron J. M., Kamm E. D., Owens W. D., *J. Chem. Soc.*, 1630 (1926).
58. Hunter G. D., Popjak G., *Arch. Biochem.*, **42**, 481 (1953).
59. Hunter G. D., Popjak G., *Biochem. J.*, **53**, XXXIV (1953).
60. Jacobsohn G. M., Corley R. C., *Fed. Proc.*, **16**, 861 (1957).
61. Kahnt F. W., Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1237 (1958).
62. Klein H. P., *Fed. Proc.*, **10**, 209 (1951).
63. Klein H. P., Lippmann F., *J. Biol. Chem.*, **203**, 95 (1953).
64. Klein H. P., Lippmann F., *J. Biol. Chem.*, **203**, 101 (1953).
65. Kushinsky G., Ph. D. Thesis Department of Chemistry University of Boston, (1955).
66. Landon L. J., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.*, **209**, 493 (1954).
67. Langdon R. G., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1869 (1952).
68. Langdon R. G., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **200**, 135 (1953).
69. Leach R. B., Maddock W. O., Tikuyama I., Paulsen C. O., Nelson W. O., *Recent Progress in Hormone Research*, **12**, 377 (1956).
70. Lindstedt S., *Acta Chem. Scand.*, **11**, 417 (1957).
71. Lindstedt S., *Arkiv Kemi*, **11**, 145 (1957).
72. Lindstedt S., Norman A., *Acta Chem. Scand.*, **11**, 421 (1957).
73. Little H. L., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **183**, 33 (1950).
74. Lucas W. M., Whitmore W. F., West C. D., *J. Clin. Endocrin. and Metab.*, **14**, 465 (1957).
75. di Luzio N. R., *Nature*, **185**, 616 (1960).
76. Lynn W. S., Brown R., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 403 (1956).
77. Lynn W. S., Staple E., Gurin S., *Fed. Proc.*, **14**, 783 (1955).
78. Meier J. R., Sipperstein M. D., Chaikoff I. L., *J. Biol. Chem.*, **198**, 105 (1952).
79. Meyer A. S., *Experientia*, **11**, 99 (1955).
80. Modon A., *Angew. Chemie*, **65**, 333 (1953).
81. Morris M. D., Chaikoff I. L., Fels J. M., Abraham S., Fansah N. O., *J. Biol. Chem.*, **224**, 1039 (1957).
82. Nicholas H. J., *Fed. Proc.*, **16**, 324 (1957).
83. Noble N. L., Boucek R. J., *Fed. Proc.*, **16**, 94 (1957).
84. Norman A. S., Sjoevall S., *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 467 (1958).
85. Olson J. A., Bloch K., *Fed. Proc.*, **15**, 1056 (1956).
86. Olson J. A., Lindberg M., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **226**, 941 (1957).
87. Ottke R. C., Tatum E. J., Zabin I., Blocha J. Biol. Chem., **189**, 429 (1951).
88. Phillips A. H., Tchen T. T., Bloch K., *Fed. Proc.*, **17**, 289 (1958).
89. Pine A., Bloch K., Anker H. S., *J. Biol. Chem.*, **183**, 441 (1950).
90. Pine N. L. R., Mc Garrahan K., *J. Biol. Chem.*, **222**, 1 (1956).
91. Plager J. E., Samuels L. T., *J. Biol. Chem.*, **211**, 21 (1955).
92. Popjak G., *Arch. Biochem.*, **48**, 102 (1954).

93. Rabinovitz J. L., Dituri F., Cobcy F., Gurin S., *Fed. Proc.*, **14**, 760 (1955).
94. Rabinovitz J. L., Gurin S., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5168 (1954).
95. Rao B. G., Heard R. D. H., *Arch. Biochim. Biophys.*, **66**, 504 (1957).
96. Rilling H., Tchen T. T., Bloch K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **44**, 167 (1958).
97. Rittenberg D., *J. Biol. Chem.*, **155**, 243 (1944).
98. Rittenberg D., Schönheimer R., *J. Biol. Chem.*, **121**, 233 (1937).
99. Robinson R., *Soc. Chem. Indust.*, **53**, 1062 (1934).
100. Romanoff E. B., Hudson P., Pincus G., *J. Clin. Endocrin. Methab.*, **13**, 1546 (1953).
101. Rosemberg E., Rosenfeld G., Ungar F., Dorfman R. I., *Endocrin.*, **58**, 225 (1956).
102. Rosemberg E., Rosenfeld G., Ungar F., Dorfman R. I., *Endocrin* **58**, 703 (1956).
103. Rosenfeld R. S., Fukzshima D. K. O., Heliman L. G., Gallagher T. F., *J. Biol. Chem.*, **211**, 301 (1954).
104. Rosenfeld R. S., Hellman L., Gallagher T. F., *Fed. Proc.*, **14**, 271 (1955).
105. Ruzicka L., *Experientia*, **9**, 357 (1953).
106. Ryan K., Engel L. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2654 (1956).
107. Saba N., Hechter O., *Fed. Proc.*, **14**, 775 (1955).
108. Salomon S., Levitan P., Lieberman S., *Proc. Canad. Physiol. Soc.* 20-th. Meeting Montreal, 54 (1956).
109. Schmidt L. H., Hughes O. B., *J. Biol. Chem.*, **143**, 771 (1942).
110. Schneider P. B., Clayton R. B., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **224**, 175 (1957).
111. Schönheimer R., Dam H., Gottberg K., *J. Biol. Chem.*, **110**, 607 (1935).
112. Schwenk E., Alexander G. J., Fish C. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 37 (1956).
113. Shunk C. H., Linn B. O., Huff I. W., Gillfillan J. L., Skeggs H. R., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3294 (1957).
114. Sipperstein M. D., *Fed. Proc.*, **14**, 282 (1955).
115. Sipperstein M. D., Chaikoff I. L., Chernik S. S., *Science*, **113**, 747 (1951).
116. Sipperstein M. D., Nichols W., Chaikoff I. L., *Circulation*, **7**, 34 (1953).
117. Skeggs H. R., Wright L. D., Cresson E. J., MacRae G. D. E., Hoffman C. H., Wolf D. E., Folkers K., *J. Bacter.*, **72**, 519 (1956).
118. Slaunwhite W. R., Samuels L. T., *J. Biol. Chem.*, **220**, 341 (1956).
119. Sonderhoff R., Thomas H., *Annal. der Chemie*, **530**, 195 (1937).
120. Srere P. A., Chaikoff I. L., Dauben W. S., *J. Biol. Chem.*, **176**, 829 (1948).
121. Srere P. A., Chaikoff I. L., Treitman S. S., Burstein L. S., *J. Biol. Chem.*, **182**, 628 (1950).
122. Tawormina P. A., Gibbs M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6210 (1956).
123. Tawormina P. A., Gibbs M. H., Huff J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4498 (1956).

124. Tchen T. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6345 (1957).
 125. Tchen T. T., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6085 (1955).
 126. Tchen T. T., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1516 (1956).
 127. Tchen T. T., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **226**, 921 (1957).
 128. Tchen T. T., Bloch K., *J. Biol. Chem.*, **226**, 931 (1957).
 129. Thomas P. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 195 (1937).
 130. Tennent P. M., Zanetti M. E., Atkinson D. I., Kuran G. W., Opdyke D. E., *J. Biol. Chem.*, **228**, 241 (1957).
 131. Werbin H., Plotz J., LeRoy G. V., Davis E. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1012 (1957).
 132. West C. D., Hollander V. P., Kritchewsky I. H., Dobriner K., *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **12**, 915 (1952).
 133. Werthessen N. T., Milch L. J., Redmond R. F., Smith L. L., Smith E. C., *Amer. J. of Physiol.*, **178**, 23 (1954).
 134. Woodward R. B., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 202 (1953).
 135. Wolf D. E., Hoffman C. H., Aldrich P. E., Skeggs H. R., Wright L. D., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4499 (1956).
 136. Wolf D., Hoffman C. H., Aldrich P. E., Skeggs H. R., Wright L. D., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1486 (1957).
 137. Wright L. D., *Fed. Proc.*, **16**, 1171 (1957).
 138. Yacovitz H., Norris L. C., Hansen F. C., *J. Biol. Chem.*, **192**, 141 (1951).
 139. Zabin I., Barker W. F., *J. Biol. Chem.*, **205**, 633 (1953).
- Monografie
140. Cook R. P., *Cholesterol*, Academic Press, New York 1958.
 141. Page I. H., *Connective Tissue Thrombosis and Arteriosclerosis*, Academic Press, New York. 1959.
 142. Pincus G., *Hormones and Arteriosclerosis*, Academic Press, New York 1959.
 143. Wolstenholme G. E. W., O'Connor M. B., *Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, J. A. Churchill, London 1959.
 144. Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessel I., *Angew. Chemie*, **70**, 738 (1958).

MAGDALENA FIKUS*

Kolagen kręgowców

Collagen of Vertebrates

The structure, physico-chemical properties and biosynthesis of collagen of vertebrates have been surveyed.

Kolagen kręgowców jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych białek i stanowi około 35% ich ogólnej zawartości w tych organizmach. Jest on podstawowym składnikiem skóry, ścięgien i tkanki łącznej.

Badanie kolagenu ma zarówno znaczenie teoretyczne dla poznania struktury białek włóknistych, jak i praktyczne — jest on bowiem surowcem w przemyśle garbarskim oraz w produkcji klejów i żelatyn. Ostatnio kolagen zwrócił uwagę lekarzy ze względu na to, że w niektórych chorobach gośćcowych, noszących nazwę kolagenoz, obserwuje się rozpadowe zmiany kolagenu tkanki łącznej. Zmiany strukturalne kolagenu w tej tkance i w ścięgnach, zależne od wieku zwierzęcia, są ponadto pewnym miernikiem procesu starzenia się organizmu. Nic więc dziwnego, że przedmiotem badań w wielu pracowniach na całym świecie stała się struktura i właściwości fizykochemiczne kolagenu oraz jego biosynteza.

Do dnia dzisiejszego utrzymuje się w podręcznikach opis kolagenu jako skleroproteidu nierozpuszczalnego w wodzie, roztworach soli, rozcieńczonych kwasach i zasadach lub alkoholach, a przechodzącego przy dłuższym ogrzewaniu w wodzie o temperaturze 100° w formę łatwiej rozpuszczalną — żelatynę. Jednakże szereg nowszych prac doprowadziło do otrzymania należących do grupy kolagenów białek, które wykazują wiele istotnych różnic w porównaniu z kolagenem opisywanym w podręcznikach.

I. Rodzaje kolagenów

Już w 1900 roku Zacchariades zauważył, że ścięgno ogona szczura, umieszczane w roztworach różnych kwasów (azotowy, siarkowy, solny, mrówkowy, octowy), w różnym stopniu pęcznieje zależnie od ro-

* Mgr, asystent Zakładu Biochemii Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa.

dzaju i stężenia kwasu, temperatury doświadczenia oraz od wieku zwierzęcia, z którego wyosobniono tkankę (107). W wiele lat później N a g e o t t e potwierdził obserwacje Zacchariadesa i wykazał, że jednocześnie część kolagenu przechodzi do roztworu, skąd można go odzyskać stosując odpowiednie wysolenie (81). Wysolone, rozpuszczalne w kwasach białko ściętna nazwał autor kolagenem A. W 1947 roku O r i e c h o w i c z (89) opisał białko — prokolagen przechodzący do roztworu w czasie kwaśnej ekstrakcji tkanki łącznej (bufor cytrynianowy).

W pracach uczonych węgierskich (4) wysunięto hipotezę, że kompleks prokolagenu z włóknistym metakolagenem, pozostającym w tkance po ekstrakcji cytrynianem, jest właściwym kolagenem organizmów żywych i że po rozpadzie tego kompleksu białko przestaje spełniać swą rolę biologiczną.

H i g h b e r g e r, G r o s s i S c h m i t t (62) zbadali białko otrzymane z tkanki łącznej w wyciągu o odczynie zasadowym. Stwierdzili, że po dializie wyciągu wobec buforu cytrynianowego o pH 3,8 i następnej dializie wobec wody powstają dwa typy włókien poprzecznie prążkowanych: jedno o okresie 640 Å, drugie tzw. włókna FLS, o okresie 2000—3000 Å. Po dializie wyciągu wyłącznie wobec buforu cytrynianowego znajduje się w osadzie również trzeci typ włókien, tzw. SLS, o okresie 2000 Å (99, 54, 55). Autorzy przyjmują, że te trzy strukturalne formy kolagenu powstają ze wspólnego prekursora, tzw. tropokolagenu, i stanowią różne postacie jego agregacji. Odkrycia te zostały potwierdzone w innej pracowni (15), w której znaleziono dla włókien tropokolagenu średnicę 14 Å, okres 2900 Å i masę cząsteczkową około 300 000.

Białko o pewnych cechach kolagenów otrzymał także J a c k s o n stosując ekstrakcję tkanek łącznych buforem fosforanowym o pH 7 (66).

Ogólnie można by scharakteryzować białka wypreparowane z tkanki łącznej jako grupy kolagenów, które różnią się rozpuszczalnością w roztworach kwaśnych, zasadowych lub obojętnych. Do niedawna jeszcze uważano je za indywidualne białka, ale ostatnio przypuszcza się, że są to postacie przejściowe w procesie tworzenia się ostatecznego produktu białkowego starej tkanki łącznej, to jest kolagenu, posiadającego uprzednio przytoczone cechy, wymieniane w podręcznikach biochemii. W młodym organizmie tworzą się początkowo mało spolimeryzowane włókna kolagenu, łatwo ekstrahujące się z tkanki roztworami soli o odczynie obojętnym lub zasadowym. W miarę postępu polimeryzacji powstają pęczki włókien, ekstrahujące się dopiero roztworami silnie dyspergujących kwaśnych buforów (cytrynianowy, bursztynianowy). W starych organizmach znajduje się jedynie nierozpuszczalny, wysoko spolimeryzowany kolagen (47).

Pewne różnice w fizykochemicznych i chemicznych cechach kolage-

nów występują także w zależności od ich pochodzenia: np. kolageny otrzymane ze skóry owcy, kota i psa charakteryzują się mniejszą zawartością azotu białkowego niż kolagen ze skóry cielęcia. Różnice te są zależne od składu aminokwasowego, mikro- i makroorientacji jednostek strukturalnych (włókna i pęczki włókien), stopnia uwodnienia i innych czynników.

Próby klasyfikacji i uporządkowania nomenklatury kolagenów napotykały dotychczas trudności, a w piśmiennictwie znajdują się często sprzeczne dane o substancjach nazywanych tak samo, lecz otrzymywanych różnymi metodami lub z różnych tkanek.

Uwzględniając sposób otrzymywania można podzielić kolageny na dwie grupy:

- 1) kolageny rodzime (*native*), które otrzymuje się z tkanki łącznej przez usunięcie cukrowców, tłuszczowców i obcych białek (13, 19, 36);
- 2) kolageny rozpuszczalne: a) w buforach o odczynie obojętnym i w roztworach soli b) w zasadach c) w kwasach i kwaśnych buforach.

II. Budowa i własności kolagenu rodzimego

1. Makrostruktura

Poznanie makrostruktury kolagenu rodzimego stało się możliwe dzięki zastosowaniu mikroskopu elektronowego i analizy rentgenograficznej. Mimo że przy interpretacji wyników badań różnych autorów powstawały różne modele strukturalne, niemniej jednak pewne uogólnienia można uważać już za bezsporne. W budowie kolagenu zaobserwowano mianowicie szereg włókienek o szerokości 200—2000 Å i długości kilkuset Å, z poprzecznym prążkowaniem o okresie 640 Å. Na skutek działania sił mechanicznych okres ten może się zmieniać od 500 do 800 Å. Większość autorów przyjmuje pogląd, że włókna kolagenu (72) składają się z trzech zwiniętych spiralnie łańcuchów peptydowych.

W modelu proponowanym przez R a m a c h a n d r a n a (93, 94) dwie z każdych trzech grup iminowych jednego łańcucha tworzą wiązania wodorowe z tlenem dwóch grup karbonylowych sąsiedniego łańcucha (57). Trzecia grupa iminowa i tlen trzeciej grupy karbonylowej, znajdujące się na powierzchni spiralnego cylindra, uczestniczą w tworzeniu wiązań pomiędzy cylindrami. Z tlenem tej grupy karbonylowej wiąże się prawdopodobnie wodór grupy hydroksylowej hydroksyproliny. Jeżeli wiązania pomiędzy cylindrami są istotnie utworzone poprzez grupy hydroksylowe tego aminokwasu, to należałoby oczekiwać współzależności między hydrotermicznym skurczem włókna a zawartością hydroksyproliny. Doświadczenia przeprowadzone w tym kierunku dały wynik pozytywny (56, 59, 58).

Rich (96) wysunął pewne zastrzeżenia w stosunku do omówionego modelu. Zgadając się z ogólną teorią spiralnej budowy proponuje on model z jednostek o symetrii trygonalnej (zamiast heksagonalnej poprzednio cytowanego autora) i jednym powtarzającym się typie wiązań wodorowych między sąsiednimi łańcuchami. Tworzenie się wiązań wodorowych poprzez hydroksylowe grupy hydroksyproliny następuje — według tego autora — wewnątrz potrójnego łańcucha, a nie pomiędzy poszczególnymi cylindrami.

Keech przyjmuje budowę włókienka kolagenu z drobniejszych jednostek, tzw. taktoidów, które zachowują charakterystyczną okresowość (71). Jeszcze inny proponowany model cząsteczki kolagenu — to cylinder zbudowany z prążkowanych włókien, który otacza bezpostaciową masę; konstrukcja taka zwiększałaby sprężystość włókna jako całości (74).

Ustalono następujące odległości w obrębie jednostki strukturalnej kolagenu;

- 1) 2,86 Å — długość powtarzających się jednostek CO; CHR i NH₂ w łańcuchu polipeptydowym;
- 2) 4,6 Å — odległość między sąsiednimi łańcuchami peptydowymi;
- 3) 10—16 Å — odległość między dwiema warstwami łańcuchów (w przestrzeni tej mieszczą się boczne łańcuchy, a stopień ich uwodnienia określa jej rozmiary);
- 4) 20—28,6 Å — odległość między zwojami łańcucha;
- 5) 640 Å — istota tej odległości podlega dyskusji i może być np. związana z pofałdowaniem włókna (104).

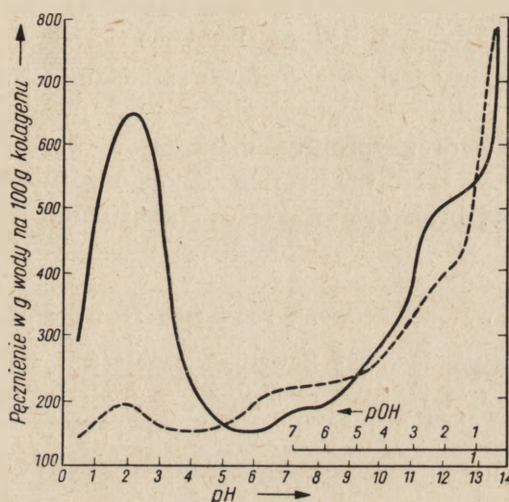
2. Zdolność pęcznienia i żelatynizacji

Charakterystyczną cechą kolagenu rodzimego jest jego pęcznienie w środowiskach: kwaśnym, obojętnym i zasadowym. Zjawisko to może mieć charakter osmotyczny i wówczas jest spowodowane rozrywaniem wiązań jonowych, co prowadzi do rozszerzania i skracania włókien. W przypadku pęcznienia liotropowego, rozrywają się wiązania wodorowe pod działaniem jonów, na skutek czego włókna stają się szersze (osłabienie spójni między poszczególnymi łańcuchami).

Maksimum pęcznienia kolagenu w środowisku kwaśnym przypada na pH 2,4 (rysunek 1). Według Banga i Balo (3) największa ilość wiązań między prokolagenem i metakolagenem ulega rozerwaniu przy stężeniach kwasu octowego od 0,06% do 0,025%. Dla określonej wartości pH pęcznienie maleje proporcjonalnie do wzrostu stężenia chlorku sodowego dodawanego do układu w zakresie od 0,1 do 0,5 M. Obecność nawet niewielkich ilości ATP hamuje pęcznienie w środowisku kwaśnym,

przy czym ATP łączy się z kolagenem (3). Pęcznienie w słabych kwasach posiada zarówno charakter liotropowy, jak i osmotyczny.

Bardziej złożonym zjawiskiem jest pęcznienie kolagenu w środowisku zasadowym (20, 21, 22). Przy zwiększaniu pH od 11,5 do 13,0 obserwuje się wzrost pęcznienia postępujący w miarę alkalizowania środowiska (rysunek 1). Wpływ chlorku sodowego jest mniejszy w tych warunkach niż w przypadku środowiska kwaśnego. Przy alkalizacji środowiska zachodzi prawdopodobnie rozrywanie wiązań makrostrukturalnych i obniża się znacznie spistość kolagenu.



Rysunek 1. Pęcznienie kolagenu w układach HCl/NaCl i NaOH/NaCl w 20° wg (20)
 — bez dodania soli,
 - - - 0,5 NaCl.

Przy ogrzewaniu kolagenu w środowisku wodnym następuje w pewnej temperaturze (zależnej od pH roztworu i od pochodzenia kolagenu) tzw. hydrotermiczny skurcz włókien, przy czym do roztworu przechodzą składniki białkowe zawierające wielocukrowce. Podobny skurcz można wywołać również czynnikami chemicznymi, np. dodaniem mocznika, chlorku sodowego, jodku lub rodanku potasowego. Skurcz włókien utrudnia ich pęcznienie (2, 4, 5).

Żelatynę, tj. bezpostaciową formę kolagenu, otrzymać można trzema drogami:

a) ekstrahując tkankę łączną poddaną przez dłuższy czas działaniu zasad (przechodząca do roztworu żelatyna posiada punkt izoelektryczny 4, 7);

b) ekstrahując tkankę łączną kwasem (punkt izoelektryczny otrzymanej żelatyny 8—9);

c) ogrzewając kolagen w wodzie (punkt izoelektryczny otrzymanej żelatyny 5—6).

Przyjmuje się, że tzw. żelatynizacja kolagenu wywołana jest rozrywaniem wiązań wodorowych i niektórych wiązań bardziej trwałych jak np. estrowych. Żelatynizacja przebiega prawdopodobnie w dwóch stadiach: początkowo pękają tzw. wiązania sieciowe między łańcuchami peptydowymi, dopiero później następuje częściowy rozpad łańcuchów (1). Skład aminokwasowy żelatyny i kolagenu, jak również kolejność ułożenia aminokwasów są bardzo zbliżone.

3. Budowa chemiczna

W tabelicy 1 podany jest przykładowo skład aminokwasowy kolagenu rodzimego skóry wołu. W zestawieniu zwraca uwagę duża zawartość glicyny, proliny i hydroksyproliny, mała zaś — tyrozyny i tryptofanu (który można wykryć tylko w ultrafiolecie), co odróżnia kolagen od białek surowicy (83), oraz brak cystyny — w odróżnieniu od innych sklero-proteidów (17).

Tablica 1

Skład aminokwasowy kolagenu rodzimego ze skóry wołu (wg 25)

Nazwa aminokwasu	Zawartość wyrażona w % N białkowego	Zawartość wyrażona w g/100 g kolagenu
Alanina	8,72	10,32
Allohydroksylizyna	0,14	0,15
Arginina	14,22	8,22
Cystyna	brak	brak
Fenylalanina	1,07	2,35
Glicyna	26,66	26,57
Histydyna	1,02	0,70
Hydroksylizyna	0,93	1,00
Hydroksyprolina	7,37	12,83
Izoleucyna	1,08	1,88
Kwas asparaginowy	3,93	6,95
Kwas glutaminowy	5,69	11,16
Leucyna	2,14	3,73
Lizyna	4,08	3,96
Metionina	0,49	0,97
Prolina	9,43	14,42
Seryna	3,06	4,27
Treonina	1,43	2,26
Tryptofan	ślady	ślady
Tyrozyna	0,41	0,99
Walina	1,58	2,46

Kolejność ułożenia aminokwasów w cząsteczce kolagenu jest jeszcze bardzo mało poznana. Łagodna hydroliza kwasowa lub enzymatyczna

(31, 29, 30) dała dość znaczne ilości następujących peptydów: pro-hydrogly; glic-pro-hydro, co wskazuje na obecność pewnych powtarzających się ugrupowań. Ostatnio odkryto obecność wiązania peptydowego, w którym uczestniczy grupa ϵ -NH₂ lizyny (79).

Na powierzchni cząsteczki znajduje się mało wolnych grup aminowych, karboksylowych, guanidynowych i hydroksylowych, jednakże ujawniają się one stosunkowo łatwo pod działaniem słabych czynników chemicznych (23, 24). Grupy czynne kolagenu badane były za pomocą acetylowania (45, 16), metylowania (14) i dezaminowania (18).

Grassman i Schleich wykazali w kolagenie rodzimym obecność około 1% węglowodanów jak: glikoza, galaktoza, mannoza, fukoza, glikozamina (44, 6). Wykryto również śluzowielocukrowce jak: kwas hyaluronowy, chondroityna, kwas chondroitynosiarkowy A, B i C oraz siarczany heparyny (80).

Połączenia węglowodanów z kolagenem mogą zawierać wiązania albo typu O-glikozydowego (z grupami hydroksylowymi białka) albo estrowego (z grupami karboksylowymi białka). Prawdopodobnie przeważa typ O-glikozydowy, natomiast możliwość istnienia więzi N-glikozydowych została wykluczona (43). O typie więzi między śluzowielocukrowcem i kolagenem wiadomo niewiele; przypuszcza się, że biorą w niej udział grupy SO₃ śluzowielocukrowca i grupy N-końcowe cząsteczki glicyny kolagenu. W kompleksie żelatyna—śluzowielocukrowiec związane są również karboksylowe grupy śluzowielocukrowców (36).

Do niedawna przyjmowano, że od obecności śluzowielocukrowców zależy tworzenie się prążkowanej struktury włókien kolagenu (53, 63). Kwas chondroitynosiarkowy mógłby służyć jako swojego rodzaju „matryca”, dzięki okresowo powtarzającym się grupom SO₃ w jego łańcuchu. Istotnie w procesie embrionalnego rozwoju tkanki łącznej obserwuje się proporcjonalność między zawartością wolnego kwasu chondroitynosiarkowego B a ilością utworzonych wiązek kolagenu (77). Odwrotną zależność obserwuje się w kolagenozie — wzrost ilości śluzowielocukrowców przy utracie zdolności wytwarzania się wiązek kolagenowych (8, 9). Ostatnie badania nie wskazują na to, aby śluzowielocukrowce odgrywały rolę czynnika decydującego w tworzeniu się struktury kolagenu. Przypuszcza się, że związki te wpływają tylko na stabilizację utworzonych włókien (58, 90, 18). Według niektórych autorów stosunkowa łatwość usuwania z preparatu kolagenu śluzowielocukrowców wskazywałaby raczej na brak wiązań atomowych, a istnienie tylko wiązań jonowych między białkiem i śluzowielocukrowcem. Heksozy związane są z kolagenem trwale, nie stwierdzono jednak ich wpływu na tworzenie się struktury kolagenu (73).

III. Budowa i własności kolagenów rozpuszczalnych

1. Kolageny rozpuszczalne w środowisku obojętnym

Kolagen rozpuszczalny w środowisku obojętnym (bufory lub roztwory soli o pH 7) otrzymuje się przez ekstrakcję tkanki łącznej buforem fosforanowym i następne wysolenie chlorkiem sodowym (67).

Masa cząsteczkowa tej grupy kolagenów jest rzędu $1 \cdot 10^6$; nie są to jednak związki jednorodne, lecz agregaty o różnej długości (67). Fessler, przeprowadzając ekstrakcję w różnej temperaturze, otrzymał trzy frakcje kolagenów rozpuszczalnych w buforze fosforanowym, które różnią się składem i własnościami (37).

Kolagen rozpuszczalny w obojętnych roztworach daje po wytrąceniu włókna bezpostaciowe, a po dializie wobec buforu cytrynianowego — dwa typy włókien: prążkowane (o okresie 2200—5000 Å) i bezpostaciowe. W porównaniu z prokolagenem kolageny tej grupy zawierają mniej proliny i hydroksyproliny, a więcej tyrozyny (69).

2. Kolageny rozpuszczalne w środowisku zasadowym

Kolagen rozpuszczalny w środowisku zasadowym (około 4% ogólnej ilości kolagenów skóry) otrzymuje się przez ekstrakcję tkanki łącznej nasyconym roztworem dwuzasadowego fosforanu sodowego o pH 9 (61, 62). Masa cząsteczkowa takiego kolagenu wykazuje wartości zbliżone do otrzymywanych dla kolagenów rozpuszczalnych w środowisku obojętnym.

Po dializie kolagen otrzymany przez ekstrakcję zasadową nie rozpuszcza się już w buforach o pH 9, natomiast rozpuszcza się w buforach o pH 7—8 dając roztwory trwałe w temperaturze 0° . W temperaturze pokojowej z roztworów tych następuje powolne wytrącanie białka rozpuszczalnego w pH poniżej 4,4, czyli przejście w formę kolagenu rozpuszczalną w kwasach (62).

3. Kolageny rozpuszczalne w środowisku kwaśnym

Kolageny rozpuszczalne w środowisku kwaśnym są najlepiej poznanyymi i najdokładniej opisanymi w piśmiennictwie frakcjami kolagenów rozpuszczalnych. Przez ekstrakcję tkanki łącznej kwasem octowym o pH 4,5 otrzymuje się kolagen A (82, 34, 26), a buforem cytrynianowym o pH 4,0 — prokolagen (89).

Kolagen A w roztworze tworzy agregaty o masie cząsteczkowej od $3,6 \cdot 10^6$ — $10 \cdot 10^6$ (95). Agregaty te łatwo dysocjują pod działaniem

mocnych kwasów. Przy alkalizacji roztworu kolagen A przechodzi w żel (81).

Masa cząsteczkowa prokolagenu wynosi $7 \cdot 10^5$ (w buforze cytrynianowym), a długość cząsteczki — około 70 000 Å. W temperaturze 37° w pH 4, w obecności mocznika, chlorku wapniowego lub jodku potasowego następuje rozpad agregatów i dziesięciokrotne obniżenie masy cząsteczkowej (78, 84).

Według danych Kulonena (76) prokolagen rozpuszcza się w rozcieńczonych kwasach i kwaśnych buforach o pH poniżej 4,4 dając roztwór o stężeniu 0,9%, natomiast w pH 5—7 można uzyskać roztwory zawierające tylko 0,15—0,4% białka. Rozpuszczalność kolagenu w buforze cytrynianowym tłumaczy Oriechowicz dyspergującym działaniem tego anionu na prokolagen.

W wyniku denaturacji prokolagenu mocznikiem otrzymano dwa składniki nazwane prokolagenem α i β ; w białku rodzimym składniki te są prawdopodobnie słabo związane. Taki sam rozpad obserwuje się przy wytrącaniu prokolagenu z roztworu pod działaniem rodanku potasowego w buforze fosforanowym. Prokolagen β jest uboższy w hydroksyprolinę od prokolagenu α (86, 87, 88).

Wysoka lepkość roztworów kolagenu obniża się szybko przy wzroście temperatury — następuje żelatynizacja. Minimalna temperatura, od której rozpoczyna się obniżenie lepkości, zależy od pH środowiska i obecności pewnych substancji, np. mocznika. Przy pH 2 wynosi ona 32°, przy pH 3,8 — 38°, przy pH 5,0 — 41°, a przy pH 7,0 — 65°. W 0,1 M buforze cytrynianowym o pH 4,0 i 3,0 M stężeniu mocznika obniżenie lepkości rozpoczyna się w temperaturze 30°, a przy 6,0 M stężeniu mocznika — już w temperaturze 23°. Przyjmuje się, że związana z obniżeniem lepkości denaturacja cieplna przebiega w dwu stadiach. Pierwszym z nich jest rozpad polimerów, następnym — głębsze zmiany w cząsteczce białka (78, 102).

Kolageny rozpuszczalne w kwasach, badane za pomocą promieni Rentgena lub w mikroskopie elektronowym, dają obraz mało różniący się od kolagenu rodzimego. Prokolagen wykazuje obecność dwu typów włókien. Jedne z nich wykazują prążkowanie o okresie 640 Å (analogicznie do kolagenu rodzimego), drugie — zależnie od techniki ekstrakcji — prążkowanie o okresie od 2000 Å do 2600 Å.

Proces tworzenia się włókien kolagenu przy wytrącaniu z roztworu solami przebiega stopniowo. Początkowo pojawiają się cienkie włókienka o okresie 210 Å, które łączą się następnie tworząc włókna coraz grubsze. Ilość tworzących się włókien wzrasta proporcjonalnie do stężenia soli (104).

Z uwagi na możliwość przebiegu procesu tego typu *in vivo* specjalne

zainteresowanie budzi wytrącanie kolagenu z roztworów przez związki naturalne, jak śluzowielocukrowce i glikoproteidy obecne w normalnej tkance łącznej. I tak sole kwasu hyaluronowego w zakresie pH od 2,3—9,6 wytrącają kolagen w postaci zagregowanych, długich, cienkich włókien. Podobnie działa kwas chondroitynosiarkowy (pH od 2—8) i heparyna (pH od 1,5—8) (10, 27, 36, 64).

Następujące dane przemawiają za tym, że między kolagenem a cukrowcem powstają wówczas wiązania chemiczne (32):

- 1) zakres pH , w którym tworzy się osad, zależy od rodzaju śluzowielocukrowca;

- 2) dla każdego z tych cukrowców istnieje optymalna dawka strącająca;

- 3) w roztworze zmniejsza się jednocześnie ilość białka i dodanego cukrowca, a odnajduje się w powstającym osadzie;

- 4) rodzaj osadu zależy od dodanego śluzowielocukrowca;

- 5) oba składniki osadu nie rozdzielają się przy działaniu łagodnych czynników (przemycie wodą, ogrzewanie do temperatury 48°).

Kolageny wytrącają się również z roztworu po dodaniu substancji nietypowych dla tkanki łącznej, takich jak nukleotydy (11), fibrynogen, owoalbumina (7), endotoksyny (12).

Skład aminokwasowy kolagenów rozpuszczalnych w kwasach jest bardzo podobny do składu kolagenu rodzimego. Oriechowicz stwierdza w prokolagenie brak tyrozyny, tryptofanu, cystyny i cysteiny; w porównaniu z kolagenem rodzimym występują tu jednak różnice w zawartości fenyloalaniny, histydyny, proliny, hydroksyproliny i kwasu glutaminowego, ponadto zaś obserwuje się obecność cytruliny. Dane te potwierdzają i inni autorzy (60).

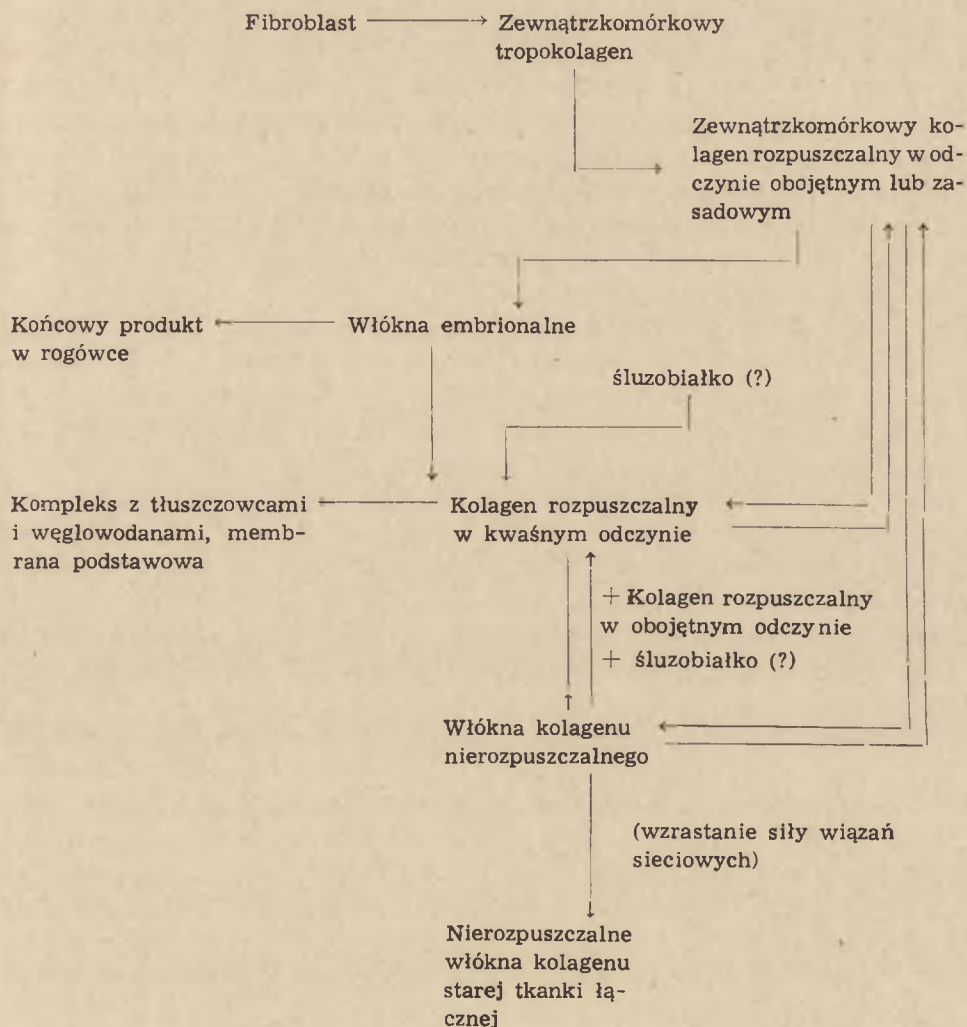
IV. Biosynteza kolagenu

Dotychczasowy stan wiedzy o biosyntezie kolagenu — to w dużej mierze hipotezy, nie zawsze poparte danymi eksperymentalnymi. Przyjmuje się, że kolagen tworzy się zarówno wewnątrz fibroblastów, jak i w przestrzeni międzykomórkowej (68, 70) w sąsiedztwie błony komórkowej. Na schemacie 1 przedstawiono przypuszczalny przebieg biosyntezy kolagenu.

Wydaje się, że istnieje możliwość procesów odwracalnych, tj. prowadzących od raz utworzonego, nierozpuszczalnego kolagenu do form rozpuszczalnych (106).

Do badania biosyntezy kolagenu stosowano podawanie szczurom glicyny znaczonej izotopem ^{14}C w grupie metylenowej (61, 83). Wykazano, że w młodych organizmach kolagen podlega dość aktywnej odnowie,

szczególnie w kościach i wątrobie, mniej — w skórze i ścięgnach. U starych szczurów najwyższą aktywność odnowy znaleziono w kościach, a najniższą — w ścięgnach.



Schemat 1. Możliwe drogi syntezy i przekształcenia kolagenu *in vivo* (wg 68).

Istnienie wielu frakcji kolagenów, różniących się między sobą rozpuszczalnością w środowiskach o różnym pH , nasunęło myśl o możliwości występowania w tkance łącznej zdyspergowanych cząsteczek prekursorów. Przypuszcza się (47), że następuje „dopasowywanie się” swoistych, przestrzennie identycznych cząstek, umożliwiające ruchami Browna wew-

nałtż słabo zagregowanej struktury. Reakcja polimeryzacji przeprowadzana *in vitro* jest odwracalna po krótkim czasie nagrzewania (49).

O ilości ekstrahującego się z tkanki kolagenu zimnymi obojętnymi roztworami soli decyduje wiek i stan odżywienia zwierzęcia, ilość ta zwiększa się w fazie wzrostu i przybierania na wadze. W okresie głodu zwierzęcia zmniejsza się ilość kolagenu tego typu. Zmniejszenie to można interpretować albo jako zanik syntezy przy równoczesnej polimeryzacji obecnego rozpuszczalnego kolagenu na nierozpuszczalne włókna, albo jako wynik jego metabolicznego rozpadu. Obserwacje nad polimeryzacją w 37° *in vitro* popierają pierwszą sugestię. Jeszcze w kilka dni po okresie głodu nie udaje się wyodrębnić rozpuszczalnego kolagenu; następuje to dopiero po utworzeniu rezerwy białkowej, która, jak przypuszcza się, konieczna jest dla syntezy kolagenu.

Dawno już obserwowane zanikanie syntezy kolagenu u zwierząt pobawionych witaminy C poddano ponownie badaniom (41, 86, 76). Okazało się, że katalizujący wpływ na syntezę kolagenu wywiera jedynie kwas askorbinowy oraz kwas dehydroaskorbinowy, natomiast bez wpływu pozostaje dodanie do diety takich analogów, jak kwas glikoaskorbinowy, izoaskorbinowy i dwuhydroksymaleinowy. W nienaruszonej tkance łącznej skóry zwierząt pozostających na diecie bez witaminy C zanika całkowicie kolagen rozpuszczalny w obojętnych roztworach soli (50). Witamina C, podana zwierzęciu lokalnie, wywołuje lokalne wytwarzanie kolagenu, czego nie obserwuje się w hodowlach tkanek (40). Przypuszcza się, iż rola witaminy C w syntezie kolagenu związana jest z hydroksylacją lizyny i proliny (97).

Podając zwierzęciu znaczną prolinę, znajduje się w kolagenie znaczne ilości promieniotwórczej hydroksyproliny, natomiast podana znaczona hydroksyprolina włącza się tylko w kilku procentach do kolagenu (46). Wskazuje to, że hydroksylacja zachodzi na etapie tworzenia się peptydów lub białka.

Badania nad hydroksylizyną kolagenu — jedyne dotychczas znanego białka zawierającego ten aminokwas — wykazały istnienie podobnej zależności. Hydroksylacja lizyny zachodzi na określonym etapie syntezy białka, bowiem brak włączenia do kolagenu podanej wolnej hydroksylizyny (93, 101, 100).

W przeglądzie ograniczono się do omówienia kolagenu ssaków. Warto wspomnieć jeszcze o kolagenie otrzymanym z pęcherza pławnego ryb, tak zwanym „ichtiokolu”, który można zaliczyć do grupy kolagenów rozpuszczalnych w środowisku kwaśnym (98, 38, 39, 35). Ostatnio rozpoczęto również badania nad kolagenopodobnymi białkami zwierząt bezkręgowych; wykazują one wiele cech fizykochemicznych zbliżonych z cechami kolagenów ssaków (52, 91).

LITERATURA

1. Ames W. M., *J. Soc. Chem. Ind.*, **63**, 200 (1944).
2. Banga I., *Nature*, **172**, 1099 (1953).
3. Banga I., Balo J., *Biochimija*, **22**, 60 (1957).
4. Banga I., Balo J., Szabo D., *Nature*, **274**, 788 (1954).
5. Banga I., Balo J., Szabo D., *Acta Morph. Acad. Sc. Hung.*, **6**, 391 (1956).
6. Bangle R., Alford W. C., *J. Histochem. Cytochem.*, **2**, 62 (1954).
7. Bazin S., Delaunay A., *C. R. Acad. Sc.*, **242**, 2414 (1956).
8. Bazin S., Delaunay A., *C. R. Acad. Sc.*, **243**, 1942 (1956).
9. Bazin S., Delaunay A., *Ann. Inst. Past.*, **92**, 459 (1957).
10. Bazin S., Delaunay A., *Ann. Inst. Past.*, **93**, 624 (1957).
11. Bazin S., Delaunay A., *C. R. Acad. Sc.*, **244**, 261 (1957).
12. Bazin S., Delaunay A., *Ann. Inst. Past.*, **94**, 94, 7 (1958).
13. Bergmann M., Stein W. H., *J. Biol. Chem.*, **128**, 217 (1939).
14. Blackburn S., Carter E. G. H., Phillips H., *Bioch. J.*, **35**, 627 (1941).
15. Boedetker H., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 248 (1955).
16. Bose S. M., Thomas K. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 46 (1958).
17. Bowes J. H., Kenten R. H., *Bioch. J.*, **43**, 358 (1948).
18. Bowes J. H., Kenten R. H., *Bioch. J.*, **44**, 142 (1949).
19. Bowes J. H., Kenten R. H., *Bioch. J.*, **45**, 281 (1949).
20. Bowes J. H., Kenten R. H., *Bioch. J.*, **46**, 1 (1950).
21. Bowes J. H., Kenten R. H., *Bioch. J.*, **46**, 524 (1950).
22. Bowes J. H., Kenten R. H., *Bioch. J.*, **46**, 530 (1950).
23. Bowes J. H., Moss J. A., *Nature*, **168**, 514 (1951).
24. Bowes J. H., Moss J. A., *Bioch. J.*, **55**, 735 (1953).
25. Bowes J. H., Elliott R. G., Moss J. A., *Bioch. J.*, **61**, 143 (1955).
26. Brisou M., *Biol. med.*, **41**, 264 (1952).
27. Byczkow S. M., Fomina B. A., *Wopr. Med. Chim.*, **1**, 33 (1955).
28. Cassel J. M., Kanagy J. R., *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **42**, 557 (1949).
29. Courts A., *Bioch. J.*, **58**, 74 (1954).
30. Courts A., *Bioch. J.*, **59**, 382 (1955).
31. Cowan P. M., Mc Gavin S., North A. C. T., *Nature*, **176**, 1062 (1955).
32. Delaunay A., Bazin S., *Rap. XXXI Congr. Franc. med.*, (1957).
33. Delaunay A., Bazin S., Henon M., *C. R. Acad. Sc.*, **241**, 826 (1955).
34. Delaunay M., Guillaumie M., Delaunay A., *Ann. Inst. Past.*, **76**, 16 (1949).
35. Eastoe J. E., *Bioch. J.*, **65**, 363 (1957).
36. Eindbinder J., Schubert M., *J. Biol. Chem.*, **188**, 335 (1951).
37. Fessler J. H., *Fed. Proc.*, **16**, 37 (1957).
38. Gallop P. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 486 (1955).
39. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **3**, 545 (1957).
40. Gould B. S., *J. Biol. Chem.*, **232**, 637 (1958).
41. Gould B. S., Woessner J. F., *J. Biol. Chem.*, **226**, 289 (1957).
42. Grassmann W., Hofmann U., Kühn K., Hörmann H., Endres H., Wolf K., *A Symposium of Connective Tissue*, Blackwell Sc. Publ. Oxford. (1957).

43. Grassmann W., Hörmann H., Hafter R., *Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.*, **311**, 19 (1958).
44. Grassmann W., Schleich H., *Bioch. Z.*, **277**, 230 (1935).
45. Green R. W., *Bioch. J.*, **54**, 181 (1953).
46. Green N. M., Lowther D. A., *Bioch. J.*, **71**, 55 (1959).
47. Gross J., *J. Exp. Med.*, **107**, 247 (1958).
48. Gross J., *J. Exp. Med.*, **107**, 265 (1958).
49. Gross J., *J. Exp. Med.*, **108**, 215 (1958).
50. Gross J., *J. Exp. Med.*, **109**, 557 (1959).
51. Gross J., Kirk D., *J. Biol. Chem.*, **233**, 355 (1958).
52. Gross J., Dumsha B., Glazer N., *Bioch. Biophys. Acta*, **30**, 293 (1958).
53. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **80**, 462 (1952).
54. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O., *Proc. Natl. Acad. Sc.*, **40**, 679 (1954).
55. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O., *Proc. Natl. Acad. Sc.*, **41**, 1 (1955).
56. Gustawson K. H., *Svensk. Kem. Tidskr.*, **65**, 70 (1953).
57. Gustawson K. H., *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1299 (1954).
58. Gustawson K. H., *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1298 (1954).
59. Gustawson K. H., *Nature*, **175**, 70 (1955).
60. Gustawson K. H., *The Chemistry and Reactivity of Collagen*, Acad. Pres, New York (1956).
61. Harkness R. D., Marko A. M., Muir H. M., Neuberger A., *Nature and Structure of Collagen*, Butterworths Sc. Publ. (1953).
62. Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 331 (1950).
63. Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O., *Proc. Natl. Acad. Sc.*, **37**, 286 (1951).
64. Highberger J. H., Gross J., Schmitt F. O., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **80**, 462 (1952).
65. Hörmann H., Fries G., *Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.*, **311**, 19 (1958).
66. Jackson D. S., *Bioch. J.*, **54**, 638 (1953).
67. Jackson D. S., *Nature*, **176**, 69 (1955).
68. Jackson D. S., *A Symposium of Connective Tissue*, Blackwell Sc. Publ., Oxford (1957).
69. Jackson D. S., Leach A. A., Jacobs S., *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 418 (1958).
70. Jackson S. F., *A Symposium of Connective Tissue*, Blackwell Sc. Publ., Oxford (1957).
71. Keech M. K., *Ann. Rheum. Dis.*, **17**, 23 (1958).
72. Kennedy J. J., *Science*, **121**, 673 (1955).
73. Kühn K., Grassmann W., Hofmann U., *Zeit. f. Naturforsch.*, **146**, (1959).
74. Kuhnke E., *Z. Rheumaforsch*, **17**, 259 (1958).
75. Kulonen E., *Excerpta Med.*, Sect. II, **9**, 1157 (1956).
76. Kulonen E., Mathews M. B., Dorfman A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 424 (1954).
77. Loewi G., Meyer K., *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 453 (1958).

78. Mathews M. B., Kulonen E., Dorfman A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 247 (1954).
78. Mathews M. B., Kulonen E., Dorfman A., *Arch. Biochem. Biophys.*,
80. Meyer K., Hofmann P., Linker A., A Symposium of Connective Tissue, Blackwell Sc. Publ., Oxford (1957).
81. Nageotte J., *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 156 (1930).
82. Nageotte J., Guyon L., *C. R. Assoc. Anat.* XXIX Reun. 408 (1934).
83. Neuberger A., Slack H. G. B., *Bioch. J.*, **53**, 47 (1953).
84. Oriechowicz W. N., *Int. Congr. Bioch. Paris* **2**, 106 (1952).
85. Oriechowicz W. N., Pawlichina L. B., *Wopr. Med. Chim.*, **3**, 195 (1957).
86. Oriechowicz W. N., Szpikiter W. O., *Dokl. Akad. Nauk*, **101**, 529 (1955).
87. Oriechowicz W. N., Szpikiter W. O., *Dokl. Akad. Nauk*, **115**, 137 (1957).
88. Oriechowicz W. N., Szpikiter W. O., *Biochimija*, **23**, 285 (1958).
89. Oriechowicz W. N., Tustanowskij A. A., *Biul. Exp. Biol. Med.*, **23**, 197 (1947).
90. Partridge S., *Bioch. J.*, **43**, 387 (1948).
91. Piez K. A., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 24 (1959).
92. Piez K. A., Likins R. C., *J. Biol. Chem.*, **229**, 101 (1957).
93. Ramachandran G. N., Kartha G., *Nature*, **174**, 269 (1954).
94. Ramachandran G. N., Kartha G., *Nature*, **176**, 593 (1955).
95. Randall J. T., Brown G. L., Jackson S. F., Kelly F. C., Notrh A. C. T., Seeds W. E., Wilkinson G. R., *Nature and Structure of Collagen* Butterworths Sc. Publ., (1953).
96. Rich A., Crick F. H. C., *Nature*, **176**, 915 (1955).
97. Robertson W. B., Hiwett J., Clifford H., *J. Biol. Chem.*, **234**, 105 (1959).
98. Salo T. P., *Arch. Bioch.*, **28**, 68 (1950).
99. Schmitt F. O., Gross J., Highberger J. H., *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S.*, **39**, 459 (1953).
100. Sinex F. M., Van Slyke D. D., Christman D. R., *J. Biol. Chem.*, **234**, 918 (1959).
101. Van Slyke D. D., Sinex P. M., *J. Biol. Chem.*, **232**, 797 (1958).
102. Tomlin S. G., Turner K. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 170 (1957).
103. Tustanowskij A. A., Szpikiter W. O., *Wopr. Med. Chim.*, **4**, 70 (1952).
104. Vanamee P., Porter K. R., *J. Exp. Med.*, **94**, 255 (1951).
105. Wassermann F., Lindenbaum A., *J. Bioph. Biol. Cytol.*, **2**, 299 (1956).
106. Williams G., *J. Path. Bact.*, **72**, 569 (1956).
107. Zacchariades P. A., *C. R. Soc. Biol.*, **52**, 182 (1900).

STANISŁAW LEWAK*

Składniki cukrowe antybiotyków makrolidowych

Shugars of Macrolide Antibiotics

The occurrence and structure of deoxy-dimethylaminohexoses and deoxyhexoses of the macrolide antibiotics are reviewed.

W ostatnich latach w wielu ośrodkach podjęto badania nad antybiotykami wytwarzanymi przez promieniowce. Wśród nowo poznanych związków zwrócono uwagę na grupę heterozydów wyróżniających się własnościami chemicznymi i biologicznymi. Związki te wykazują szereg analogii w budowie: ich aglikony tworzą pierścienie laktonowe o znacznej liczbie członów. W związkach, których struktura została już ustalona, liczba atomów tworzących pierścień wynosi od 12 do 17. Z tych przyczyn Woodward (44) w 1957 r. zgrupował te antybiotyki w oddzielną klasę, nadając im nazwę makrolidy.

Cukry, składniki makrolidów, są metylopentozami (6-dezoksyheksozami). Przynajmniej jeden z nich jest dwumetyloaminocukrem i nadaje charakter zasadowy cząsteczce antybiotyku.

Dotychczas poznano kilkanaście makrolidów. W tablicy 1 podano nazwy antybiotyków tej grupy, szczep promieniowca, z którego zostały one po raz pierwszy wydrebnione, oraz ich skład elementarny.

Związki należące do grupy makrolidów mają bardzo podobne widma przeciwbakteryjne. Są one czynne przeciwko większości mikroorganizmów gramododatnich. Niektóre z nich są czynne również w stosunku do bakterii gramoujemnych z rodzajów *Neisseria*, *Hemophilus* i *Brucella*. Różnice w czynności przeciwbakteryjnej makrolidów mają charakter raczej ilościowy niż jakościowy (21). Stwierdzono, że działają one na komórkę bakteryjną w okresie podziału i że działanie ich ma charakter bakteriostatyczny lub bakteriobójczy w zależności od wrażliwości mikroorganizmu i stężenia antybiotyku (18).

* Dr, st. asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tablica 1

Antybiotyki grupy makrolidów

Nazwa antybiotyku	Gatunek <i>Streptomyces</i>	Wzór sumaryczny	Literatura
Pikromycyna	<i>S. felleus</i> Lindenbein	$C_{13}H_{13}O_7N$	3
Metymycyna	<i>S. M 2140</i>	$C_{25}H_{13}O_7N$	12
Neometymycyna	<i>S. M 2140</i>	$C_{32}H_{13}O_7N$	11
Narbomycyna	<i>S. narbonensis</i>	$C_{28}H_{47}O_7N$	9
Erytromycyna	<i>S. erythreus</i>	$C_{37}H_{62}O_{13}N$	6,27
Erytromycyna B	<i>S. erythreus</i>	$C_{37}H_{67}O_{17}N$	30
Gryzeomycyna	szczep zbliżony do <i>S. griseolus</i>	nieznany	41
Oleandomycyna	<i>S. antibioticus</i>	$C_{36}H_{31}O_{12}N$	37
Magnamycyna	<i>S. halstedii</i>	$C_{42}H_{67}O_{16}N$	29,39
Magnamycyna B	<i>S. halstedii</i>	$C_{42}H_{67}O_{16}N$	22
Foromacydyna A	} szczep <i>Streptomyces</i> dotychczas nie opisany	$C_{18}H_{78}O_{12}N_2$	8,31
" B		$C_{47}H_{30}O_{16}N_2$	8,31
" C		$C_{48}H_{82}O_{16}N_2$	8,31
" D		nieznany	8,31
Leukomycyna	szczep zbliżony do <i>S. antibioticus</i>	$C_{30-38}H_{34-56}O_{11-13}N$	20,34
Leukomycyna B	szczep zbliżony do <i>S. antibioticus</i>	$C_{41}H_{86}O_{16}N$	35
Angolamycyna	<i>S. eurythermus</i>	nieznany	7

Podobnie jak w przypadku innych antybiotyków, hamowanie rozwoju mikroorganizmów przez makrolidy powoduje powstawanie szczepów odpornych. Jeśli pewien szczep bakteryjny został uodporniony na działanie określonego antybiotyku i jest równocześnie niewrażliwy w stosunku do innego — mamy wówczas do czynienia z odpornością krzyżową między tymi dwoma antybiotykami. Odporność krzyżowa jest zazwyczaj związana z podobieństwem mechanizmu działania przeciwbakteryjnego antybiotyków, które z kolei jest często wyrazem analogii w ich budowie chemicznej.

Żaden z makrolidów nie wykazuje odporności krzyżowej z powszechnie stosowanymi antybiotykami jak penicylina, streptomycyna, chloramfenikol, terramycyna i aureomycyna (27, 37, 39). Natomiast zjawisko odporności krzyżowej wewnątrz grupy makrolidów było wielokrotnie obserwowane (38, 41). Fakt ten przemawia również za wyodrębnieniem makrolidów w oddzielną grupę antybiotyków.

Przyczyną dużego zainteresowania makrolidami jest ich nieznaczna toksyczność oraz fakt, że często okazują się one czynne w stosunku do mikroorganizmów odpornych na inne antybiotyki. Dwa makrolidy, ery-

tromycyna i magnamycyna (zwana również karbomycyną), znalazły już zastosowanie w lecznictwie i są produkowane na skalę przemysłową*.

Klasyfikację makrolidów można przeprowadzić biorąc pod uwagę strukturę pierścienia aglikonowego lub czynność biologiczną. Można również przeprowadzić ten podział na podstawie ilości reszt cukrowych wchodzących w cząsteczkę makrolidu i na podstawie sposobu powiązania składników cukrowych z aglikonem.

Spśród dotychczas poznanych makrolidów cztery zawierają tylko jedną resztę cukrową. Są to: pikromycyna, metymycyna, neometymycyna i narbomycyna. Należy zauważyć, że wszystkie te cztery antybiotyki zawierają ten sam cukier: desozaminę (IV).

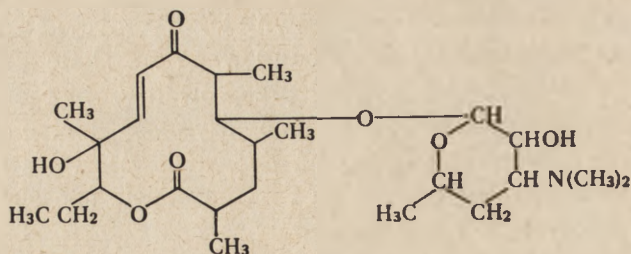
Obecność dwóch reszt cukrowych stwierdzono w cząsteczkach erytromycyny, oleandomycyny i magnamycyny. Erytromycyna zawiera cukry desozaminę (IV) i kladinozę (XV) oleandomycyna — desozaminę (IV) i L-oleandrozę (XIX), natomiast magnamycyna jest glikozydem mykaminozy (X) i mykarozy (XIII). Ostatni cukier wykryto również w produktach hydrolizy formacydyn A, B, C i D. Budowa tych czterech makrolidów jest dotychczas mało zbadana; udało się jedynie stwierdzić, że zawierają one więcej niż jeden składnik cukrowy (8). Stwierdzono również obecność przynajmniej dwóch cukrów w produktach hydrolizy angolamycyny (7). Najmniej zaawansowane badania nad gryzeomycyną i leukomycyną nie dostarczyły jeszcze żadnych danych o składnikach cukrowych tych makrolidów (34, 35, 41).

Dwie reszty cukrowe wchodzące w skład cząsteczki makrolidu mogą być powiązane z pierścieniowym aglikonem bądź każda oddzielnie, bądź też tworząc wiązanie glikozydowe między sobą. Erytromycyna i oleandomycyna są przykładem pierwszego typu połączenia, natomiast magnamycyna jest biozydem.

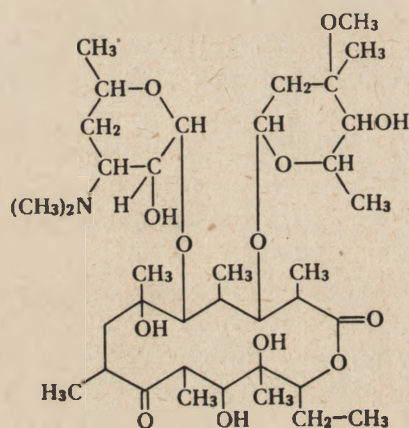
Przykładem makrolidu zawierającego jedną cząsteczkę cukru jest pikromycyna (I), przykładem antybiotyków, w których dwie reszty cukrowe są powiązane w odmienny sposób z pierścieniem laktonowym — erytromycyna i magnamycyna (II, III).

Hydroliza makrolidów powodująca uwolnienie składników cukrowych wymaga starannie kontrolowanych warunków. Całkowita hydroliza pikromycyny (4), erytromycyny (14, 19, 36) oraz magnamycyny (44) nie jest możliwa bez głębokich zmian struktury lub nawet całkowitego rozkładu aglikonu. Trudności hydrolizy formacydyn (8), leukomycyny (34) i angolamycyny (7) nie pozwoliły na wyodrębnienie składników cukrowych tych makrolidów i ustalenie ich budowy.

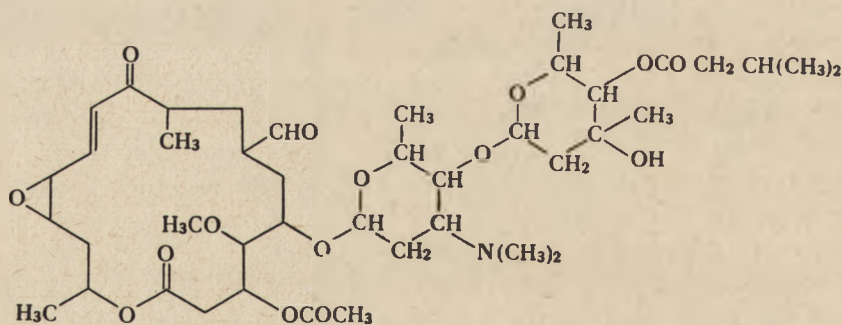
* W literaturze polskiej obszerniejszy opis własności biologicznych makrolidów oraz budowy ich aglikonów podano w monografii Korzybskiego i Kuryłowicza (25) oraz w artykule Lewaka w *Wiadomościach Chemicznych* (26).



I



II



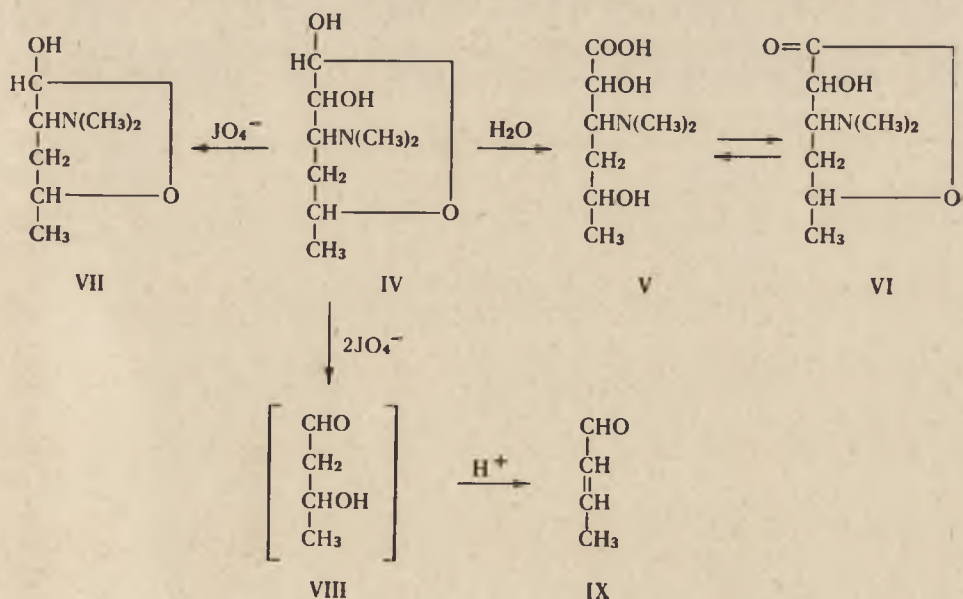
III

W produktach kwaśnej hydrolizy makrolidów znaleziono pięć związków o charakterze cukrowym, których strukturę zdołano ustalić. Dwa z nich są 3,6-dwudezoksy-3-dwumetyloaminoaldoheksozami, trzy pozostałe — 2,6-dwudezoksyaldoheksozami. W większości przypadków nie ustalono konfiguracji na asymetrycznych atomach węgla tych cukrów z powodu trudności otrzymania ich w większej ilości.

Pierwszym zbadanym makrolidem była pikromycyna wyodrębniona w 1951 roku przez Brockmanna i współpracowników (3). Hydrolicząc ten antybiotyk otrzymali oni aminocukier (4), który nazwali pikrocyną i przeprowadzili dowód jego budowy w sposób następujący (5).

Pikrocyna, posiadając charakter zasady, tworzy łatwo chlorowoderek o wzorze sumarycznym $C_8H_{17}O_3N \cdot HCl$. Pod wpływem 4 N wodorotlenku sodowego pikrocyna traci całkowicie azot pod postacią dwumetyloaminy już w temperaturze pokojowej. To spostrzeżenie pozwala stwierdzić, że w cząsteczce tego cukru dwa atomy węgla tworzą wraz z atomem azotu grupę dwumetyloaminową. Z drugiej strony analiza funkcyjna wykazała obecność w cząsteczce pikrocyny jednej grupy C-metylowej i dwóch czynnych atomów wodoru. Powstawanie pochodnej dwuacetylowej w wyniku reakcji z bezwodnikiem octowym pozwoliło na stwierdzenie, że oba czynne atomy wodoru pikrocyny wchodzą w skład grup hydroksylowych. Biorąc pod uwagę, że pikrocyna daje wszystkie reakcje charakterystyczne dla aldoz, oczywiste było, że jest ona dwumetyloamino-trójdęzoksy-cukrem o jednej wolnej grupie alkoholowej. Dla ostatecznego ustalenia budowy pikrocyny pozostawało więc określenie pozycji podstawników łańcucha węglowego.

Chlorowoderek pikrocyny (IV) łatwo reaguje z jednym równoważnikiem nadjodanu, tworząc pentozę (VII). Kwas karboksylowy (V), otrzymany przez utlenianie pikrocyny tlenkiem rtęciowym nie daje tej reakcji. Te dwa doświadczenia pozwoliły umiejscowić grupę alkoholową w pozy-



Schemat 1. Pikrocyna (desozamina) i produkty jej przemiany.

cji α względem hydroksylu ozydowego. Kwas (V) łatwo tworzy lakton (VI), którego własności wskazują na budowę δ laktonu. Zarówno ta obserwacja, jak i fakt, że pentoza (VII) występuje w postaci furanozowej (co wykazano na podstawie widma IR), wskazują, że pikrocyna ma budowę piranozową, a zatem trzeci atom tlenu występujący w jej cząsteczce związany jest z atomem węgla 5.

Powstawanie jodoformu podczas traktowania pikrocyny lub produktów jej utleniania (V) i (VII) za pomocą jodu w środowisku alkalicznym wskazuje na to, że grupa metylowa jest związana z atomem węgla posiadającym podstawnik tlenowy. Pozycja grupy metylowej na krańcu łańcucha węglowego została ostatecznie ustalona przez wyodrębnienie aldehydu krotonowego (IX) z produktów utleniania pikrocyny za pomocą nadmiaru nadjodanu. Prawdopodobnie w tej reakcji powstaje pierwotnie aldehyd β -hydroksymasłowy (VIII), który następnie przekształca się w aldehyd krotonowy (IX).

Znane jest zjawisko wydzielania amoniaku przez połączenia β -amino-karbonyłowe pod wpływem alkaliów. Biorąc ten fakt pod uwagę Brockmann zaproponował położenie grupy dwumetyloaminowej przy atomie węgla 3 cząsteczki pikrocyny. Powstawanie aldehydu krotonowego podczas utleniania tego cukru całkowicie potwierdziło to przypuszczenie.

Omówione wyniki badań pozwoliły na ustalenie dla pikrocyny budowy 3-dwumetyloamino-3,4,6-trójdzoksypiranozy (IV).

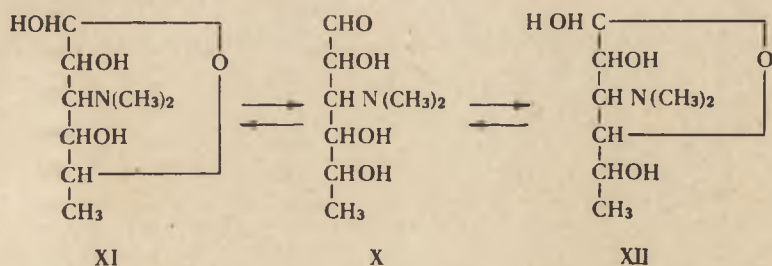
Kwaśna hydroliza innego makrolidu, erytromycyny, dała również dwumetyloaminocukier (19). Flynn, Sigall, Wiley i Gerzon (14) prowadzili w Ameryce badania nad strukturą tego cukru, nazwanego desozaminą, w tym samym czasie co Brockmann i współpracownicy ustalali w Niemczech budowę pikrocyny. Badania, prowadzone niezależnie jedne od drugich, przebiegały w sposób bardzo podobny i doprowadziły do tych samych wyników. Desozamina utleniona przez nadjodan dawała 2-dwumetyloamino-pentozę (VII), a na skutek dalej posuniętego utleniania — aldehyd krotonowy (IX). Flynn i współpracownicy przekształcili desozaminę w jej metyloglikozyd. Różnica w labilności ugrupowania dwumetyloaminowego desozaminy i metylodesozaminidu wskazywała, że miejscem tej grupy jest atom węgla 3 cukru. Pozycję krańcową grupy metylowej określono na skutek dodatniej reakcji jodoformowej, jaką wykazywała desozamina i jej pochodne. W wyniku tych badań określono desozaminę jako 3-dwumetyloamino-3,4,6-trójdzoksyheksozę (IV). Porównanie desozaminy z pikrocyną wykazało identyczność obu związków.

Biorąc pod uwagę względy historyczne cukier ten powinien nosić nazwę pikrocyny, ponieważ jest składnikiem pikromycyny — makrolidu wyodrębnionego jako pierwszy antybiotyk tej grupy. Jednakże nazwa

desozamina, przyjęta przez badaczy amerykańskich, była używana w ciągu prac poświęconych ustaleniu struktury nie tylko erytromycyny, ale również metamycyny (10), neometamycyny (11), narbomycyny (9), oleandomycyny (13) i stała się bardziej powszechna niż wprowadzona przez Brockmanna i współpracowników nazwa pikrocyna.

Inny dwumetyloaminocukier znaleziono w produktach hydrolizy dwóch makrolidów: magnamycyny (33) i magnamycyny B (22). Budowa tego związku została ustalona przez Hochsteina i Regnę w 1955 r. (23). Cukier ten nazwany mykaminozą jest dwumetyloaminodwudezoksyheksozą o wzorze sumarycznym $C_8H_{17}O_4N$. Reakcja z nadjodanem wskazuje na sąsiednie położenie grupy alkoholowej i hydroksylu ozydowego. Położenie ugrupowania dwumetyloaminowego ustalono w sposób analogiczny jak dla desozaminy (pikrocyny): znaczna labilność tej grupy w cząsteczce mykaminozy i względna stabilność reszty dwumetyloaminowej metylomykaminozydu i pentozy odpowiadającej związkowi (VII) wskazuje, że grupa ta znajduje się w pozycji β względem ugrupowania ozydowego.

Przez acetylowanie mykaminozy otrzymano dwa różne trójactany. Fakt ten może być wytłumaczony przez tworzenie się trójactanów dwóch różnych form cyklicznych tego cukru, furanozowej (XII) i piranozowej (XI), i wskazuje, że dwa pozostałe atomy tlenu są powiązane z atomami węgla 4 i 5 mykaminozy. Grupa metylowa zajmowałaby zatem pozycję krańcową łańcucha węglowego cukru. Przypuszczenie to potwierdziły wyniki reakcji mykaminozy z nadjodanem. Hochstein i Regna wyodrębnili aldehyd octowy z produktów utleniania mykaminozy przez dwa równoważniki nadjodanu.



Schemat 2. Formy tautomeryczne mykaminozy.

Na podstawie przedstawionych faktów przypisano mykaminozie budowę 3-dwumetyloamino-3,6-dwudezoksyheksozy (X — forma aldehydowa, XI — furanozowa, XII — piranozowa).

Zwraca uwagę duże podobieństwo budowy mykaminozy i desozaminy. Te dwa dwumetyloaminocukry różnią się między sobą tylko podstawnikiem na C4. W mykaminozie występuje w tym położeniu grupa hydro-

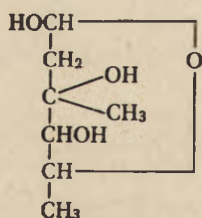
ksylowa, brak jej natomiast w desozaminie. Desozamina jest zatem 4-dezoksymykaminozą.

Chromatografia produktów kwaśnej hydrolizy formacydyn A, B, C i D wykazała obecność dwumetyloaminocukru (8). Stwierdzono, że nie jest on identyczny z desozaminą, jednak budowa tego związku nie została dotychczas określona.

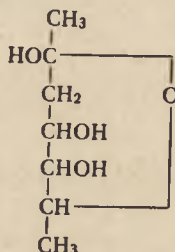
Prace nad ustalaniem budowy dwumetyloaminocukrów makrolidów pozwoliły na poznanie nowej reakcji tych związków. Według publikacji wcześniejszych (1) substancje posiadające grupę dwumetyloaminową związaną z atomem węgla sąsiadującym z atomem mającym funkcję alkoholową nie są utleniane przez nadjodan. Tymczasem Flynn, Sigall, Wiley i Gerzon (14) wykazali, że wiązanie między atomami węgla 2 i 3 desozaminy może być zaatakowane przez ten odczynnik. Ta dość powolna reakcja była obserwowana również przez Brockmanna (5) oraz Hochsteina i Regnė (23) podczas prac nad ustalaniem budowy mykaminozy.

Budowę składnika cukrowego makrolidów nie posiadającego charakteru zasady ustalili po raz pierwszy Woodward i współpracownicy w 1953 r. (33). Cukier ten nazwany mykarozą otrzymano przez kwaśną hydrolizę magnamycyny i formacydyn; ma on wzór sumaryczny $C_7H_{14}O_4$ i zawiera w swej cząsteczce dwie grupy C-metylowe i trzy hydroksylowe. Mykaroza reaguje z dwoma równoważnikami nadjodanu, co wskazuje na sąsiednie rozmieszczenie grup alkoholowych. W produktach utleniania mykarozy przez jeden mol nadjodanu udało się stwierdzić obecność aldehydu acetylooctowego.

W świetle tych danych doświadczalnych ilość możliwych struktur dla mykarozy ograniczyła się do dwóch, reprezentowanych przez wzory (XIII) i (XIV). Jeden z nich odpowiada aldoheksosie z grupą metylową w łańcuchu bocznym, drugi — 2-ketoheptosie.



XIII



XIV

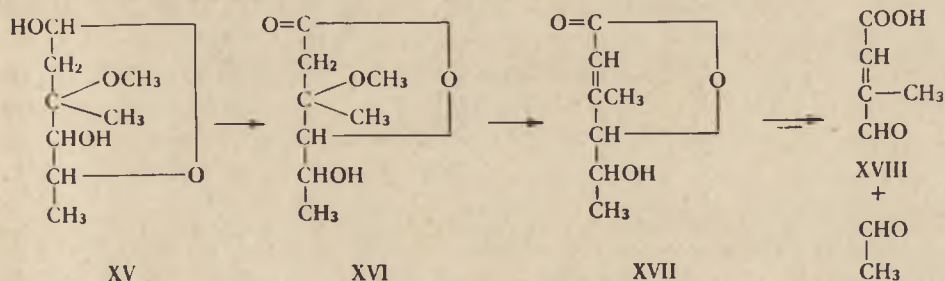
Dodatni wynik reakcji mykarozy z odczynnikami Fehlinga wskazywał na budowę (XIII) dla tego cukru. Budowa ta została całkowicie potwierdzona przez utlenianie mykarozy za pomocą bromu, w wyniku czego

otrzymano lakton kwasu aldonowego o wzorze sumarycznym $C_{17}H_{12}O_4$. Utlenianie ketozy (XIV) nie mogłoby dać kwaśnego produktu o podobnym składzie elementarnym.

W cząsteczce magnamycyny mykaroza jest estryfikowana przez kwas izowalerianowy. Miejsce reszty izowalerylowej w metylo-izowalerylo-mykarozydzie otrzymanym przez metanolizę magnamycyny ustalono na podstawie braku reakcji tego połączenia z nadjodanem. Jedynym miejscem przyłączenia reszty kwasowej uniemożliwiającym reakcję metylo-izowalerylo-mykarozydu z nadjodanem jest hydroksyl czwartego atomu węgla.

O wiele większe trudności napotkano podczas określania budowy cukru otrzymanego przez hydrolizę erytromycyny (14, 19, 42, 43). Cukier ten, nazwany kladinozą, daje wyniki analizy elementarnej odpowiadające wzorowi sumarycznemu $C_8H_{16}O_4$, wykazuje dodatnią reakcję charakterystyczną dla cukrów redukujących i dodatnią reakcję jodoformową. Cząsteczka kladinozy zawiera dwie grupy C-metylowe, jedną metoksyłową i dwie grupy alkoholowe. Grupy te nie sąsiadują ze sobą, bowiem kladinoza nie reaguje z kwasem nadjodowym. Brak reakcji z kwasem nadjodowym wykazał ponadto, że kladinoza jest 2-dezoksycukrem.

Przez utlenienie kladinozy za pomocą bromu otrzymano połączenie o charakterze γ -laktonu. Działanie alkaliów na ten związek powodowało eliminację grupy metoksyłowej i powstanie α , β -nienasyconego laktonu. Wileyowi i Weaverowi (43), którzy prowadzili prace nad ustaleniem budowy kladinozy, nie udało się wprawdzie oczyścić i scharakteryzować obu laktonów z powodu ich nietrwałości, ustalili jednak, że związki te reagują z jednym równoważnikiem nadjodanu dając aldehyd octowy i kwas β -formylo-krotonowy (XVIII), co pozwoliło umiejscowić dwa hydroksyle kladinozy przy atomach węgla 4 i 5, a dwie grupy metylowe przy atomach 3 i 5 łańcucha węglowego cukru. Nietrwałość grupy metoksyłowej i otrzymanie kwasu β -formylokrotonowego w wyniku degradacji kladinozy wskazuje na ugrupowanie 3-metylo-3-metoksy- w cząsteczce tego cukru.

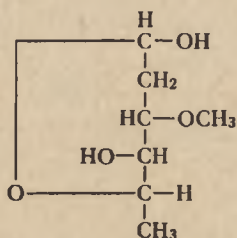


Schemat 3. Kladinoza i produkty jej przemiany

Na podstawie powyższych danych przyjęto dla kladinozy budowę (XV), dla laktonu otrzymanego w wyniku jej utleniania budowę (XVI), zaś dla związku otrzymanego w wyniku eliminacji grupy metoksyłowej budowę (XVII).

Pomimo iż konfiguracja przestrzenna asymetrycznych atomów węgla mykarozy i kladinozy nie została jeszcze określona, oczywiste jest podobieństwo tych dwóch cukrowych składników makrolidów. Jest bardzo prawdopodobne, że kladinoza jest eterem 3-metylowym mykarozy.

Trzeci cukier makrolidów nie zawierający grupy aminowej, wyodrębniony przez hydrolizę oleandomycyny (13, 45), w odróżnieniu od mykarozy i kladinozy ma łańcuch nierozgałęziony. Cukier ten, nazwany L-oleandrozą, o wzorze sumarycznym $C_7H_{14}O_4$, jest 2,6-dwudezoksy-3-O-metylo-L-mannozą (XIX).



XIX

Budowę L-oleandrozy ustalono w wyniku utleniania nadjodanem i badania produktów tej reakcji oraz przez utlenianie kwasem azotowym i bromem. Cukier ten znano już uprzednio — został on wyodrębniony w 1937 r. (28) z produktów hydrolizy glikozydów nasercowych, jego budowa wyjaśniona w 1938 r. przez Tscheschego, Bohle'a i Neumanna (40), a dziesięć lat później całkowicie potwierdzona na drodze syntezy (2).

Jak już wspomniano, reszty cukrowe mogą być w rozmaity sposób powiązane z aglikonem makrolidowym. W niektórych przypadkach stwierdzenie, czy dwie cząsteczki cukru są połączone oddzielnie z różnymi grupami alkoholowymi pierścienia laktonowego makrolidu, czy też tylko z jedną w postaci biozy — możliwe jest na drodze blokowania wolnych hydroksyli antybiotyku przez metylowanie lub acetylowanie. Oznaczenie ilości grup alkoholowych w cząsteczce aglikonu, otrzymanego w wyniku hydrolizy tak zablokowanego makrolidu, pozwala na określenie sposobu wiązania między aglikonem i cukrami.

Metoda ta nie nadaje się jednak do zastosowania w dość częstych przypadkach, gdy hydroliza makrolidu powoduje zmiany w strukturze aglikonu. Z tego względu stosuje się inny sposób postępowania. Zauwa-

żono, że znacznie łatwiej przebiega częściowa hydroliza makrolidów, zachodząca z odłączeniem jednej jednostki cukrowej. Wymaga ona dużo łagodniejszych warunków niż hydroliza całkowita. Porównanie własności wyjściowego dwucukrowego glikozydu i otrzymanego monozydu pozwala na stwierdzenie sposobu powiązania cukrów.

Przykładem zastosowania tej metody są badania Woodwarda nad strukturą magnamycyny (44). Makrolid ten zawiera jako składniki cukrowe mykaminozę i 4-izowalerylomykarozę. Podczas hydrolizy przeprowadzonej w łagodnych warunkach magnamycyna traci mykarozę, pozostaje produkt częściowej hydrolizy, nazwany karimbozą, który jest glikozydem mykaminozy i aglikonu makrolidu. Karimboza (pK 8,3) jest silniejszą zasadą niż magnamycyna (pK 7,0). Wskazuje to, że w cząsteczce wyjściowego makrolidu mykaroza jest związana z hydroksylem mykaminozy — sąsiednim w stosunku do ugrupowania dwumetyloaminowego ostatniego cukru; elektrofilowy układ acetalu mykarozy znajdujący się w pobliżu grupy dwumetyloaminowej obniża zasadowość tej grupy. A zatem należy przyjąć dla dwucukru magnamycyny budowę 4-(4'-izowalerylomykaro)-mykaminozy (por. wzór III).

Podczas prac nad ustaleniem budowy innych makrolidów, zawierających dwie reszty cukrowe: erytromycyny (15) i oleandomycyny (13) nie zaobserwowano zmiany zasadowości produktu częściowej hydrolizy antybiotyków. A zatem w tych makrolidach cząsteczki cukru nie są związane ze sobą.

Pomimo iż ostatnio opublikowano wiele prac nad biosyntezą makrolidów (16, 17, 44), jednakże dotychczas nieznane są drogi budowania przez mikroorganizmy składników cukrowych tych antybiotyków.

Biosynteza ich związana jest prawdopodobnie z komórkową przemianą cukrową, lecz jak dotychczas nie ma żadnych sprawdzianów tego przypuszczenia (41). Mykaroza (XIII) i kladinoza (XV) są 3-metyloheksozami i nie wiadomo, czy powstają one w wyniku dołączenia grupy metylowej do łańcucha sześciowęglowego, czy też z innych niż heksozy jednostek elementarnych. Aminocukry: desozamina (IV) i mykaminoza (X) różnią się znacznie budową od rozpowszechnionych w świecie zwierzęcym 2-aminocukrów: glikozaminy i galaktozaminy, których biosynteza i przemiany zostały ostatnio dość dokładnie poznane (32). Nie wiadomo natomiast, czy aminocukry makrolidów powstają w wyniku przemian zachodzących w już utworzonej jednostce sześciowęglowej, jakkolwiek to przypuszczenie wydaje się bardzo prawdopodobne.

Nieznana jest również rola składników cukrowych w aktywności biologicznej makrolidów. Jednak zbliżona czynność przeciwbakteryjna różnych makrolidów i podobieństwo budowy ich cukrów sugeruje możliwość wpływu składników cukrowych na aktywność tych antybiotyków.

Należy podkreślić, że obecność 3-dwumetyloaminodezoksyheksoz została stwierdzona wyłącznie w cząsteczkach makrolidów. 2,6-Dwudezoksyheksozy znaleziono również w innej grupie substancji o znacznej aktywności biologicznej, a mianowicie glikozydach nasercowych. Wspólnym cukrem występującym zarówno w makrolidach, jak i w glikozydach nasercowych jest L-oleandryna.

Zagadnienie budowy składników cukrowych makrolidów jest częścią badań biologicznych, chemicznych i farmakologicznych, stawiających sobie za zadanie ustalenie zależności między budową chemiczną a czynnością biologiczną. Rozpoczęte ostatnio prace nad syntezą tych związków (24) pozwolą prawdopodobnie wkrótce na otrzymanie ich w większej ilości i dostarczą materiału do badań biologicznych.

LITERATURA

1. Adams R., *Organic Reactions*, N. Y. 2, 343 (1944).
2. Blindenbacher F., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* 31, 2061 (1948).
3. Brockmann H., Henkel W., *Naturwiss.* 37, 138 (1950).
4. Brockmann H., Genth L., Strufe R., *Ber.* 85, 426 (1952).
5. Brockmann H., König H. B., Oster R., *Ber.* 87, 856 (1954).
6. Clark Jr. R. K., *Antibiotics a. Chem.* 3, 663 (1953).
7. Corbaz R., Ettlinger L., Gäumann E., Keller-Schierlein W., Neipp L., Prelog V., Reusser P., Zähler H., *Helv. Chim. Acta* 38, 1202 (1955).
8. Corbaz R., Ettlinger L., Gäumann E., Keller-Schierlein W., Kradolfer F., Kyburz E., Neipp L., Prelog V., Wettstein A., Zähler H., *Helv. Chim. Acta* 39, 304 (1956).
9. Djerassi C., Bowers A., Khastagi H. N., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1729 (1956).
10. Djerassi C., Zderic J. A., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2907 (1956).
11. Djerassi C., Halpern O., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2022 (1957).
12. Donin M. N., Pagano J., Dutcher J. D., Mac Kee C. M., *Antib. Ann.* 179 (1953—54).
13. Els H., Celmer. W. D., Murai K., *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3717 (1958).
14. Flynn E. H., Sigal M. V., Wiley P. F., Gerzon K., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3121 (1954).
15. Flynn E. H., Monahan R., Gerzon K., Wiley P. F., Sigal M. W., Quarck M. C., *Angew. Chem.* 69, 150 (1957).
16. Gerzon K., Flynn E. H., Sigal M. V., Wiley P. F., Monahan R., Quarck M. C., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6396 (1959).
17. Grisebach H., Achenbach H., Grisebach M. C., *Naturwiss.* 47, 206 (1960).
18. Haight T. H., Finland M., *Proc. Soc. Exp. Biol.* 81, 188 (1952).
19. Hasbrouck R., Carven F. C., *Antibiotics a. Chem.* 3, 1040 (1953).
20. Hata T., Sanoy, Ohki N., Yokoyama Y., Hatsumae A., Ito S., *J. Antibiotics ser. A* 6, 87 (1953).
21. Hata T., Koge F., Kanamuri H., *J. Antibiotics ser. A* 6, 109 (1953).

22. Hochstein F. A., Murai K., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5081 (1954).
23. Hochstein F. H., Regna P. P., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3353 (1955).
24. Huber G., Schier O., Druey J., *Helv. Chim. Acta* **42**, 2447 (1959).
25. Korzybski T., Kuryłowicz W., *Antybiotyki — pochodzenie, rodzaje i własności*, PWN, Warszawa 1959.
26. Lewak S., *Wiadomości Chem.* **8**, 433 (1958).
27. McGuire J. M., Bunch R. L., Anderson R. C., Boaz H. E., Flynn E. H., Powell H. M., Smith J. W., *Antibiotics a. Chem.* **2**, 281, (1952).
28. Neumann W., *Ber.* **70**, 1547 (1937).
29. Pagano J. F., Weinstein J. M., MacKee C. M., *Antibiotics a. Chem.* **3**, 899 (1953).
30. Pettinga C., Stark W. M., Van Abeele F. R., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 569 (1954).
31. Pinnert-Sindico S., Nitet L., Preudhomme J., Cosar C., *Antibiotic Ann.*, 724 (1954—55).
32. Popowicz J., *Postępy Biochemii* **6**, 287 (1960).
33. Regna P. P., Hochstein F. H., Wagner R. J., Woodward R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4625 (1953).
34. Sano Y., *J. Antibiotics ser A* **7**, 93 (1954).
35. Sano Y., *J. Antibiotics ser A* **9**, 202 (1956).
36. Sigal M. V., Wiley P. F., Gerzon K., Flynn E. H., Quarck M. C., Weaver O., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 388 (1956).
37. Sobin B. A., English A. R., Celmer W. D., *Antibiotic Ann.*, 827 (1954—55).
38. Szybalski W., *Appl. Microbiology* **2**, 57 (1954).
39. Tanner Jr. F. W., English A. R., Lees T. M., Routien J. R., *Antibiotics a. Chem.* **2**, 441 (1952).
40. Tschesche R., Bohle K., Neumann W., *Ber.* **71**, 1927 (1938).
41. Van Dijck P. J., Van de Voorde W. R., de Somer P., *Antibiotics a. Chem.* **3**, 1243 (1953).
42. Wiley P. F., Weaver O., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3422 (1955).
43. Wiley P. F., Weaver O., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 808 (1956).
44. Woodward R. B., *Angew. Chem.* **69**, 50 (1957).
45. Hochstein F. A., Els H., Celmer W.D., Shapiro B. L., Woodward R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3225 (1960).

tów fotosyntezy przez floem jest ściśle związane z aktywnością metaboliczną tej tkanki, przewodzenie zaś składników mineralnych oraz produktów metabolizmu korzenia poprzez martwe komórki ksylemu wywołane jest w dużej mierze działaniem siły ssącej żywych komórek. Siła ssąca komórek jest zjawiskiem fizycznym, powstającym w wyniku parowania wody w procesie transpiracji. Jednakże oprócz tej siły poważną rolę w przewodzeniu związków organicznych i mineralnych poprzez ksylem odgrywa również aktywność metaboliczna korzenia przejawiająca się w parciu korzeniowym.

Wiadomości nasze o roli korzenia w tym złożonym procesie fizjologicznym były do niedawna skąpe. Wiemy, że korzeń w odróżnieniu od autotroficznych części nadziemnych jest organem heterotroficznym i wobec tego różni się znacznie od nich swą funkcją fizjologiczną. Aktywność fizjologiczna korzenia uzależniona jest w poważnym stopniu od dopływu produktów fotosyntezy, podobnie jak wzrost części nadziemnych uzależniony jest w dużej mierze od intensywności pobierania składników mineralnych. Korzeń i organy nadziemne wzajemnie się uzupełniają i ich sprawne funkcjonowanie warunkuje zarówno prawidłowy rozwój, jak i wzrost rośliny. Przeto poznanie mechanizmu obiegu związków organicznych pomiędzy korzeniem a częścią nadziemną posiada podstawowe znaczenie w fizjologii i biochemii roślin.

Osiągnięcia ostatnich lat pozwalają już obecnie w nieco szerszym ujęciu przeprowadzić dyskusję nad czynnikami wpływającymi na obieg związków organicznych w roślinie.

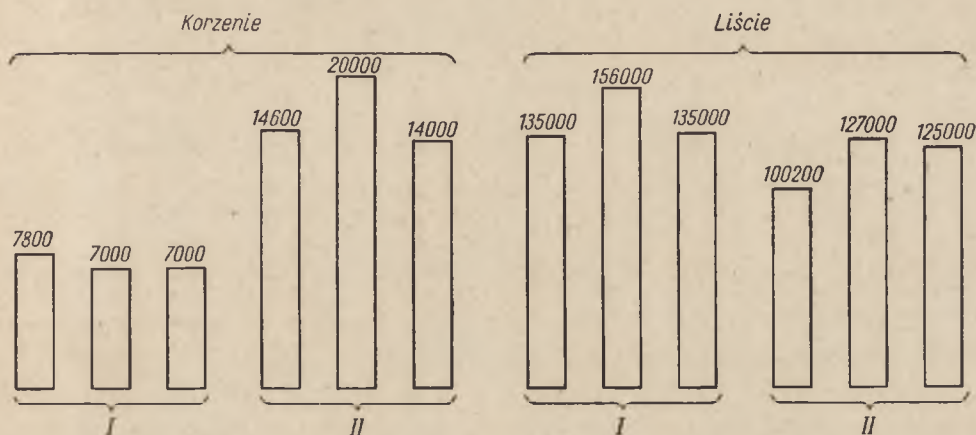
Badania przeprowadzone w 1957 roku przez K u r s a n o w a i jego współpracowników dostarczyły dużo interesującego materiału (16, 17, 32), który w znacznej mierze przyczynił się do zmian dawniejszego poglądu na obieg związków organicznych. Nie doceniano uprzednio znaczenia ksylemu i jego funkcji i dlatego dużym osiągnięciem wspomnianych autorów było stwierdzenie zależności pomiędzy natężeniem przewodzenia związków organicznych poprzez floem a natężeniem przewodzenia metabolitów korzenia poprzez ksylem.

Intensywność obiegu związków organicznych jest niewątpliwie uzależniona od aktywności metabolicznej całej rośliny. Jednakże K u r s a n o w główną rolę przypisuje korzeniom, które — jego zdaniem — wykazują wyższą aktywność metaboliczną w porównaniu z innymi organami rośliny.

Regulowanie natężenia obiegu związków organicznych w roślinie jest jedną z funkcji korzenia, na którą wpływa wiele różnych procesów fizjologicznych, a w szczególności pobieranie składników mineralnych, oddychanie, fotosynteza, wzrost oraz parcie korzeniowe.

I. Wpływ pobierania składników mineralnych

Dane doświadczalne Pristupy i Kursanowa uzyskane w 1957 roku wskazują, że w przewodzeniu związków organicznych w dwu przeciwnych kierunkach korzeń posiada dominujące znaczenie (32). Autorzy ci, badając różne czynniki warunkujące natężenie obiegu związków organicznych, wykazali znaczny wpływ na ten proces składników mineralnych pobieranych przez korzeń. W sposób wyraźny charakteryzują ten fakt dane zestawione na rysunku 1, z których wynika, że rośliny hodowane na pożywce mineralnej i asymilujące przez pewien czas $^{14}\text{CO}_2$ w procesie fotosyntezy gromadziły w korzeniach znacznie więcej produktów znaczonych ^{14}C niż rośliny rosnące w wodzie.



Rys. 1. Radioaktywność (w imp/min na organ) korzeni i liści 22-dniowych roślin dyni po 180-minutowej fotosyntezie w atmosferze $^{14}\text{CO}_2$ i następnym 48-godzinym przebywaniu w atmosferze normalnej według (32).

I — hodowanych w wodzie destylowanej, II — hodowanych na pożywce Priaznikowa.

Interesujące jest również stwierdzenie, że chwilowy brak składników mineralnych w małym stopniu hamuje natężenie fotosyntezy, natomiast silnie hamuje przewodzenie produktów fotosyntezy do korzenia. Wytlumaczenie tego zjawiska nie będzie trudne, jeżeli uwzględni się współzależność występującą pomiędzy procesami fizjologicznymi i biochemicznymi. Nagromadzenie produktów fotosyntezy w nadziemnych częściach roślin w warunkach chwilowego braku składników mineralnych (rysunek 1) można uważać za wynik zużycia zapasów mineralnego fosforanu w reakcjach fotosyntetycznej fosforylacji (42). Zgodnie z poglądem Arnona (2) oraz Kandlera (15) w następstwie tych reakcji i w wy-

niku silnej konkurencji o nieorganiczny fosforan oksydacyjna fosforylacja ulega znacznemu zahamowaniu. W rezultacie braku związków wysokoenergetycznych ulega również zahamowaniu przewodzenie produktów fotosyntezy poprzez floem do korzenia.

Pristupa i Kursanow (32), badając aktywność metaboliczną korzenia oraz w związku z tym intensywność przewodzenia cukrów z części nadziemnej do korzenia, stwierdzili, że cukry ulegają w korzeniu w krótkim czasie przemianom i przechodzą w znacznej części w związki o charakterze anionowym (tablica 1):

Tablica 1

Podział radioaktywności pomiędzy węglowodanami i substancjami o charakterze jonowym w częściach nadziemnych i korzeniach dyni po 80 minutach fotosyntezy w atmosferze $^{14}\text{CO}_2$ /32/

Organ rośliny	Radioaktywność wyciągu alkoholowego imp/min/organ		Radioaktywność związków o charakterze anionowym	
	ogólna	po przepuszczeniu przez anionit	imp/min/organ	%
Łodyga i liście (górna część)	4300	3750	550	13
Łodyga i liście (dolna część)	1300	1200	100	8
Korzeń	8200	5500	2700	33

Związki te według poglądów wymienionych badaczy wchodzą następnie w połączenia z kationami i w tej formie po krótkim czasie powracają poprzez ksylem do części nadziemnych rośliny. Dowodem słuszności tych poglądów jest w dużej mierze stwierdzone przez wielu autorów (10, 16, 17, 47, 52, 53) występowanie w eksudatach korzeniowych znacznych ilości związków organicznych i organomineralnych.

Szybkość przewodzenia związków organicznych u dyni jest znaczna i wynosi we floemie 70 cm/godz. (32). Ruch związków organicznych w obu kierunkach jest intensywny i, jak wskazują dane tablicy 2, po 80 minutach znajduje się w korzeniu 48% radioaktywności asymilatów. W czasie następnych 40 minut radioaktywność substancji nagromadzonych w korzeniu spadła do 18%. Fakt ten świadczy, że w ciągu tego czasu więcej niż połowa substancji doprowadzonych do korzenia wróciło po przekształceniu do organów nadziemnych.

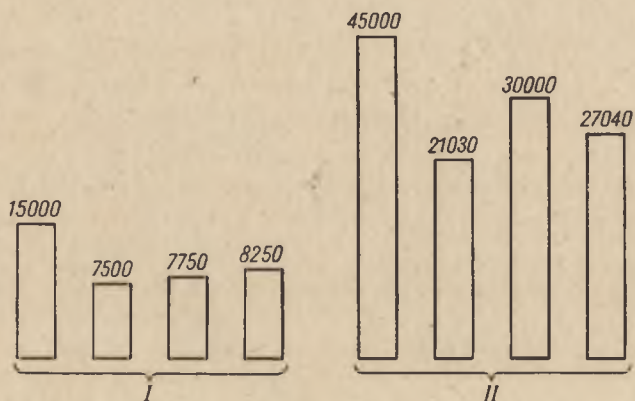
Dalsze prace Kursanowa w pewnym sensie przyczyniają się do wyjaśnienia mechanizmu obiegu związków organicznych. Autor ten

Tablica 2

Radioaktywność nadziemnych organów i korzeni 22-dniowych roślin dyni, fotosyntezujących w ciągu 80 minut w atmosferze $^{14}\text{CO}_2$, a następnie w atmosferze normalnej (32)

Organ rośliny	Procentowy udział w ogólnej radioaktywności rośliny po czasie doświadczenia		
	40 min	80 min	120 min
Część nadziemna	61,0	51,5	82,0
Korzeń	39,0	48,5	18,0

i jego współpracownicy szczególną uwagę zwrócili na działanie pewnych składników mineralnych, które ich zdaniem wywierają wpływ na aktywność metaboliczną rośliny, a w szczególności na metabolizm cukrów. Pierwszym etapem tych prac były badania nad określeniem działania



Rys. 2. Radioaktywność (w imp/min na organ produktów fotosyntezy przeniesionych do korzenia według (32).

I — w destylowanej wodzie, II — w 0,0015 M roztworze NH_4NO_3 .

azotu oraz fosforu na metabolizm cukrów w korzeniu oraz na jakościowy i ilościowy skład metabolitów korzenia przewodzonych przez ksylem do części nadziemnych roślin. Krótkotrwałe wyłączenie azotu z pożywki (rysunek 2) silnie hamuje przewodzenie asymilatów do korzenia, jak również przewodzenie metabolitów korzenia do części nadziemnych rośliny. Autorzy uważają, że brak NH_3 niezbędnego do aminacji ketokwasów przyczynia się do znacznych zaburzeń normalnego metabolizmu cukrów i ogranicza tym samym zużycie ich w korzeniu.

Poparciem tego poglądu są wyniki badań wielu autorów (16, 18, 25, 35, 36 i 52) wskazujące, że znaczną część azotu transportowanego z korzenia poprzez ksylem do części nadziemnych rośliny stanowią azotowe

związki organiczne, głównie aminokwasy. Wykazano również, że dla sprawnego obiegu związków organicznych i dla podtrzymania normalnych procesów przemiany cukrów konieczna jest obecność azotu mineralnego, warunkującego w korzeniu syntezę organicznych związków azotowych, które następnie są transportowane do części nadziemnych rośliny.

Spośród innych składników mineralnych, których nawet krótkotrwały brak silnie hamuje krążenie związków organicznych, należy wymienić fosfor. Wychodząc z założenia, że obecność nieorganicznych fosforanów jest niezbędnym warunkiem syntezy wysokoenergetycznych związków fosforanowych, które biorą udział prawie we wszystkich reakcjach biosyntezy, można przypuszczać, że w warunkach głodu fosforanowego nastąpią poważne zmiany w metabolizmie rośliny oraz w intensywności obiegu związków organicznych.

Z badań Kursanowa i Kulajewy (27) wynika, że metabolizm cukrów w korzeniu w warunkach normalnych jest bardzo intensywny i dlatego mimo znacznego ich dopływu z części nadziemnych korzenie młodych roślin wykazują niską zawartość cukrów. W badaniach tych szczególną uwagę zwrócono na zawartość kwasu pirogronowego, który jest dobrym wskaźnikiem, określającym drogę przemian cukrów ze względu na swą rolę końcowego produktu glikolizy oraz substratu wyjściowego cyklu Krebsa. Autorzy stwierdzili, że w warunkach głodu fosforanowego wzrasta zawartość kwasu pirogronowego, natomiast obniża się zawartość kwasu α -ketoglutazarowego (tablica 3). Nagromadzenie kwasu pirogronowego jest tutaj dowodem zahamowania drogi przemiany kwasów organicznych w cyklu Krebsa.

Tablica 3

Wpływ fosforu na zawartość ketokwasów w korzeniach
23-dniowych roślin dyni (17)

Rodzaj pożywki	Zawartość ketokwasów w μ gramach na 1 g świeżej masy			
	kwas pirogronowy		kwas α -ketoglutazarowy	
	dośw. I	dośw. II	dośw. I	dośw. II
Pełna	32	37	195	272
Bez fosforu	46	42	120	128

Charakterystyczną zmianą składu jakościowego i ilościowego kwasów organicznych w korzeniu na skutek głodu fosforanowego jest także wzrost zawartości kwasu glioksalowego, a obniżenie zawartości kwasu α -ketoglutazarowego (tablica 3). Pojawienie się kwasu glioksalowego przy krótko-

trwałym głodzie fosforanowym (tablica 4) jest dowodem naruszenia normalnej drogi metabolizmu kwasu pirogronowego.

Tablica 4

Zawartość kwasu glioksalowego w korzeniu i części nadziemnej dyni w różnych warunkach żywienia fosforem (32)

Rodzaj pożywki	Zawartość kwasu glioksalowego w μg na 1 g świeżej masy	
	w korzeniu	w części nadziemnej
Pełna	0	0
Bez fosforu	75	825

Nagromadzenie kwasu glioksalowego tłumaczą cytowani autorzy tym, że przy braku nieorganicznych fosforanów kwas octowy może być tylko w małym stopniu aktywowany przez koenzym A i dlatego jego przemiana nie przebiega według cyklu Krebsa, tylko poprzez kwas glikolowy i glioksalowy. Nagromadzenie kwasu glioksalowego w tych warunkach jest wynikiem niecałkowitego utlenienia cukrów. Należy zaznaczyć, że w warunkach dostatecznego zaopatrzenia korzeni w nieorganiczny fosforan kwas glioksalowy nie powstaje. Stwierdzenie obecności dehydrogenazy kwasu glikolowego w tkankach roślinnych (24, 26, 46) potwierdza możliwość przemiany kwasu octowego poprzez kwas glikolowy do kwasu glioksalowego.

Badając wpływ braku fosforu na intensywność procesu karboksylacji przy zastosowaniu $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, Kursanow i Kulajewa wykazali, że korzenie, rosnące w ciągu 48 godzin na pożywce nie zawierającej fosforu, zawierają więcej kwasu cytrynowego niż korzenie kontrolne. Powstały w tych warunkach kwas cytrynowy odznaczał się bardzo słabą radioaktywnością (tablica 5). Natomiast w warunkach dostatecznego zaopatrzenia w nieorganiczny fosforan kwas cytrynowy występował w małej ilości, lecz odznaczał się wysoką radioaktywnością (17). Wyniki te świadczą o możliwości istnienia różnych dróg metabolizmu cukrów, prowadzących do syntezy kwasu cytrynowego. Autorzy sugerują, że w warunkach dostatecznego zaopatrzenia tkanek korzenia w nieorganiczny fosforan kwas cytrynowy powstaje w wyniku karboksylacji pośrednich produktów cyklu Krebsa, a przy niedoborze nieorganicznego fosforanu — na innej drodze; w warunkach głodu fosforanowego znacznie obniża się intensywność wiązania CO_2 w tkankach korzeniowych. Z badań Uttera, Kurahashi i Rose (49) oraz Tschena i Venne-

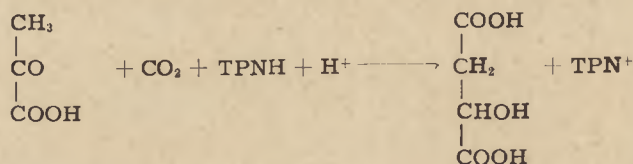
sł and (45) wynika, że przyczyną obniżenia zdolności wiązania CO_2 w procesie karboksylacji w tkankach korzenia jest przede wszystkim brak TPN i IDP.

Tablica 5

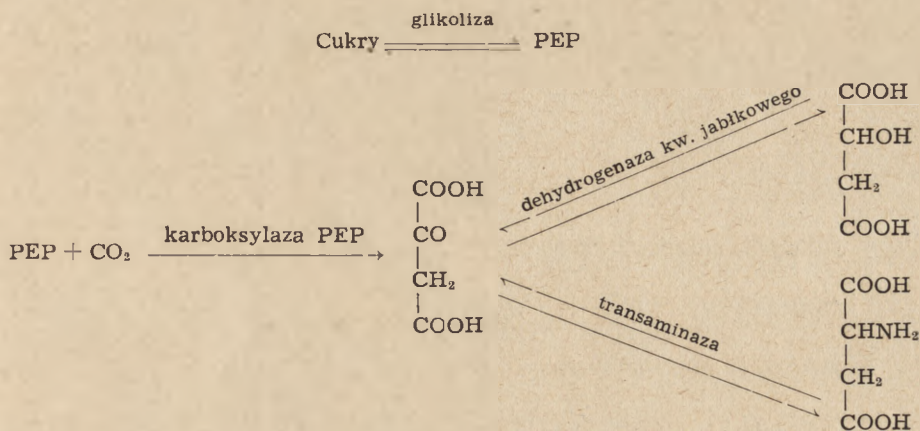
Wpływ fosforu na procesy karboksylacji w tkankach korzenia dyni. Dane uzyskane po upływie 3 godzin od umieszczenia korzeni w pożywce z dodatkiem $0,005 \text{ N NaH}^{14}\text{CO}_3$ (32)

Rodzaj kwasu	Radioaktywność kwasu zawartego w 1 g świeżej masy w imp/min na pożywce:	
	z fosforem	bez fosforu
Cytrynowy	190	23
Jabłkowy	960	243
Bursztynowy	142	0
Fumarowy	46	17
Gliksalowy	4	0
„x“	240	90
Nie określony	5	72
Ogólna radioaktywność kwasów	1587	445

Drugim charakterystycznym efektem zmiany dróg metabolizmu cukrów w korzeniu przy braku fosforanu jest wysoka radioaktywność kwasu jabłkowego, która w omówionym doświadczeniu (17) osiągnęła 70% ogólnej radioaktywności wszystkich kwasów organicznych (tablica 5). W tym przypadku synteza kwasu jabłkowego może przebiegać w różny sposób. Bezpośrednio tworzy się on przez karboksylację kwasu pirogronowego przy udziale enzymu kwasu jabłkowego (*malic enzym*) według następującej reakcji (29).



Pośrednia droga prowadzi poprzez kwas szczawiowoocetowy, który — jak wynika z badań Saltmana, Kunitake, Spoltera i Stittsa (39) — powstaje z kwasu fosfoenolopirogronowego (PEP):



Bandurski (35) stwierdził, że karboksylacja kwasu pirogronowego prowadząca do powstawania kwasu szczawiowoocetowego jest w tkankach roślinnych, w przeciwieństwie do tkanek zwierzęcych, reakcją nieodwracalną.

Omówione wyniki świadczą o tym, że w warunkach niedoboru fosforanu metabolizm cukrów w korzeniu przebiega na drodze różnej od cyklu Krebsa i w konsekwencji prowadzi do poważnych zmian w ogólnym metabolizmie związków organicznych. Zmiany te, związane z ograniczeniem oksydatywnej fosforylacji, obniżają intensywność obiegu związków organicznych pomiędzy częścią nadziemną a korzeniem.

Dalsze z kolei badania Kulajewy, Siliny i Kursanowa (16) wykazały, że w warunkach chwilowego braku fosforanu wzrasta w korzeniu oraz w jego eksudacie zawartość argininy i glutaminy, natomiast obniża się zawartość alaniny, kwasu γ -aminomasłowego, lizyny, histydyny i proliny (rysunek 3). Z porównania chromatogramów oraz tablicy 3 wynika, że obniżenie zawartości alaniny wiąże się ze wzrostem zawartości kwasu pirogronowego, a wzrost zawartości glutaminy z obniżeniem zawartości kwasu α -ketoglutazarowego.

Wymienieni autorzy wyrażają pogląd, że przyczyną obniżenia się zawartości alaniny przy chwilowym braku fosforanu może być niska zawartość fosfopirydoksalu, który bierze udział w transaminacji pomiędzy kwasem glutaminowym i kwasem pirogronowym. Natomiast wzrost zawartości glutaminy, której prekursorem jest kwas glutaminowy, jest bezpośrednim dowodem, że poziom fosforanu w roślinie w małym stopniu wpływa na przebieg aminacji kwasu α -ketoglutazarowego.

Na podkreślenie zasługuje wzrost zawartości argininy. Zgodnie z poglądami Mothesa (24) rośliny w warunkach głodu węglowodanowego, przy braku dostatecznej ilości właściwych akceptorów amoniaku, tworzą specyficzne związki posiadające w swej cząsteczce większą liczbę grup

Nazwa aminokwasu	Korzenie Poż. -P +P			Eksudat Poż. -P +P		
<i>Cystyna</i>						
<i>Lizyna</i>						
<i>Substancja niezidentyfikowana</i>						
<i>Arginina</i>						
<i>Substancja niezidentyfikowana</i>						
<i>Glutamina</i>						
<i>Kwas asparaginowy</i>						
<i>Kwas glutaminowy</i>						
<i>Alanina</i>						
<i>Aminokwas x</i>						
<i>Prolina</i>						
<i>Kwas γ-aminomastowy</i>						
<i>Walina</i>						

Rys. 3. Chromatogramy wolnych aminokwasów zawartych w tkankach i eksudacie korzeni w różnych warunkach karmienia fosforanem według (16).

Poż — rośliny na pełnej pożywce;

— P — rośliny na pożywce z wyłączeniem fosforanu;

+ P — rośliny początkowo na pożywce pozbawionej fosforanu, a następnie na pełnej pożywce.

aminowych, jak na przykład arginina, cytrulina lub allantoina. Efekt głodu węglowodanowego może być wywołany brakiem fosforanu wpływającym hamująco, jak wynika z badań Pristupy i Kursanowa (32), na przewodzenie asymilatów z części nadziemnych do korzenia.

Dane doświadczalne wskazują również, że w warunkach głodu fosforanowego zahamowana zostaje synteza wielu ważnych aminokwasów niezbędnych dla syntezy białka (16). Niezdolność do syntezy tych aminokwasów można tłumaczyć brakiem ich bezpośrednich prekursorów. W rezultacie zmiany te prowadzą do znacznego obniżenia procentowej zawartości azotu białkowego przy równoczesnym wzroście azotu niebiałkowego (tablica 6).

Tablica 6

Zawartość różnych form azotu w korzeniach dyni w różnych warunkach karmienia fosforanem (w mg N na 1 g świeżej masy korzenia) wg (16)

Forma azotu	Zawartość azotu (w świeżej masie po karmieniu pożywką)					
	pełną		— P		+ P	
	mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
Ogólny	46,5	100,0	44,6	100,0	44,8	100,0
Białkowy	40,0	86,1	33,9	76,8	34,6	77,2
Niebiałkowy	6,5	13,9	10,3	23,2	10,2	22,8
Aminowy	0,6	1,3	1,1	2,5	1,0	2,3
Amidowy	2,1	4,6	3,2	7,2	2,7	6,0
Amoniakalny	1,2	2,5	0,5	1,1	0,7	1,6
Inny	2,6	5,6	5,5	12,4	5,8	12,9

— P — rośliny na pożywce z wyłączeniem fosforanu;

+ P — rośliny początkowo na pożywce pozbawionej fosforanu, a następnie na pełnej pożywce.

Obniżenie procentowej zawartości białka w korzeniu jest zjawiskiem niekorzystnym i świadczy o przewadze procesów katabolicznych, co prowadzi do obniżenia aktywności metabolicznej korzenia i do zahamowania obiegu związków organicznych.

II. Wpływ fotosyntezy

Funkcja fizjologiczna korzenia jako organu heterotroficznego, przejawiającego między innymi swą aktywność fizjologiczną w parciu korzeniowym oraz w procesach obiegu związków organicznych, jest w dużej mierze uzależniona od organów nadziemnych. Stąd też na aktywność fizjologiczną korzenia poważny wpływ wywiera fotosynteza. Wpływ fotosyntezy na intensywność przewodzenia związków organicznych i mineralnych oraz na ich obieg w roślinie był przedmiotem badań wielu autorów (4, 11, 12, 50, 53).

Biddulph (4) jak również Goodall (11, 12) stwierdzili, że przewodzenie asymilatów poprzez floem z liści do łodygi i do korzenia przebiega na świetle dwa razy szybciej niż w ciemności. Nowsze badania Waklinowej, Domana i Rubina wykazały (50), że fotosynteza jest istotnym procesem wzmagającym intensywność przewodzenia związków organicznych z części nadziemnej do korzeni, jak również w kierunku odwrotnym, natomiast światło w warunkach, w których fotosynteza nie zachodzi, nie wywiera żadnego wpływu.

Kukurydza po 5 minutach asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ i następnie po 8-miu go-

dzinach przebywania na świetle w obecności nie znaczonego CO_2 gromadzi w swych korzeniach dwukrotnie więcej substancji zawierających ^{14}C , aniżeli przetrzymywana na świetle z wyłączeniem CO_2 .

Z prac licznych autorów (5, 23, 28, 44, 50) wynika, że wraz z fotosyntezą przebiega intensywna synteza białek i wielocukrowców we wszystkich organach rośliny, a w warunkach zahamowania fotosyntezy przeważają procesy rozpadu tych składników. Jak wiadomo, synteza białek i wielocukrowców wymaga stałego dopływu zarówno niskocząsteczkowych związków organicznych, jak i związków mineralnych i tym samym przyczynia się do wzmożenia ich obiegu w roślinie. Badanie zmian w natężeniu przewodzenia składników mineralnych i organicznych poprzez ksylem w przebiegu dobowym wykazało regularność wahań z występowaniem maksimum w godzinach popołudniowych, a minimum w nocy.

Korelację pomiędzy fotosyntezą a pobieraniem nieorganicznych fosforanów stwierdził także Helder (13). Z danych Biddulpha (4), Arisza (1) oraz Simonisa i Ehrenberga (41) wynika, że wzrastające zapotrzebowanie na fosforan w procesie fotosyntezy wzmacnia pobieranie tego składnika przez korzenie. Według poglądów Robertsona (37) intensywność pobierania jonów, a zwłaszcza anionów przez korzeń, jest w dużej mierze skorelowana z natężeniem oddychania. Stąd więc wzrost natężenia oddychania powoduje z jednej strony szybsze zużycie produktów fotosyntezy w korzeniu, a z drugiej strony przyczynia się do intensywniejszego ich dopływu z części nadziemnej do korzenia.

Takie tłumaczenie wzajemnego związku pomiędzy fotosyntezą, pobieraniem składników mineralnych (zwłaszcza fosforanów) oraz natężeniem obiegu związków organicznych w roślinie znajduje potwierdzenie w poprzednio przedstawionych wynikach badań wielu autorów. Nie zawsze jednak fotosynteza przyczynia się do wzrostu natężenia przewodzenia związków organicznych. Może być ona czynnikiem hamującym przewodzenia asymilatów do korzenia w warunkach głodu fosforanowego, jak to wynika z omówionych danych doświadczalnych Pristupy i Kurasanowa (32).

III. Wpływ natężenia oddychania i oksydatywnej fosforylacji

Jak wiadomo, procesy oddychania tlenowego dostarczają energii, która w reakcjach oksydatywnej fosforylacji gromadzi się w związkach makroergicznych. Natężenie tych procesów jest więc głównym czynnikiem regulującym aktywność metaboliczną rośliny, a w szczególności korzenia, co z kolei warunkuje obieg związków organicznych i mineral-

nych. Zależność pomiędzy tymi procesami została stwierdzona przez wielu badaczy (14, 21, 30, 41, 48, 51).

Turkina i Dubinina (48) oraz Willenbrink (51) wykazali, że zastosowanie DNP lub arsenianów, nie hamujące w roślinie oddychania, lecz hamujące oksydacyjną fosforylację, ogranicza w znacznym stopniu przewodzenie w rurkach sitowych związków organicznych oraz fosforu i azotu. Wyniki tych badań świadczą, że nie tyle proces oddychania, ile związana z nim oksydacyjna fosforylacja jest zasadniczym czynnikiem transportu związków organicznych we floemie. Stwierdzono podobną zależność pomiędzy intensywnością pobierania składników mineralnych oraz transportem ich poprzez ksylem a natężeniem oksydatywnej fosforylacji (14, 21, 30, 40). Czynniki hamujące oksydacyjną fosforylację hamują pobieranie oraz przemieszczanie składników mineralnych z korzeni do organów nadziemnych, lecz tylko w ciemności.

Dalszym etapem badań, których wyniki mogłyby się przyczynić do wyjaśnienia procesów krążenia związków organicznych w roślinie, powinno być poznanie procesów biochemicznych w strukturach podkomórkowych. Badania mechanizmu pobierania i przewodzenia składników mineralnych przez komórki włosnikowe oraz transportu składników mineralnych do organów nadziemnych przyczynią się niewątpliwie do wyjaśnienia tego zagadnienia. Należy tu uwzględnić fakt, że transport ten odbywa się nie tylko w formie jonów, lecz również w postaci labilnych połączeń organiczno-mineralnych. Świadczą o tym wyniki licznych badań nad składem eksudatów korzeniowych po odcięciu części nadziemnych. W eksudatach tych, jak wykazali Wolffgang i Mothes (52), Engelbrecht (10), Reuter (35), oraz Kursanow i Kulajewa (17), obok znacznych ilości związków organicznych (jak aminokwasy, kwasy organiczne) występuje szereg połączeń organiczno-mineralnych. Pewne znaczenie w transporcie składników mineralnych do części nadziemnych przypisują niektórzy badacze tak zwanym „nośnikom”. Maisel, Benson i Tolbert (22) oraz Scott-Russell, Martin i Bishop (41) wyrażają pogląd, że dla fosforanu nośnikiem jest cholina. Pewną rolę w transporcie fosforanów odgrywają również nukleotydy (19, 21).

Wyniki badań cytowanych autorów wskazują, że transportowane z korzeni poprzez naczynia aminokwasy, nukleotydy, białka rozpuszczalne oraz związki organiczno-mineralne są wykorzystywane jako takie lub dostarczają prekursorów do syntezy związków organicznych w częściach nadziemnych rośliny. Organy nadziemne z kolei dostarczają do korzenia asymilaty, które tu ulegają głębokim przemianom i wracają już w innej formie do części nadziemnych.

IV. Wpływ innych czynników

1. Transpiracja

Wyniki badań Russella i Shorrocks (38), Penota (31) oraz Ratnera, Akimoczki i Uchiny (34) wskazują, że w warunkach dosłatecznego zaopatrzenia rośliny w fosfor natężenie przewodzenia tego składnika mineralnego poprzez ksylem w znacznej mierze uzależnione jest od natężenia transpiracji. Natomiast w warunkach niedoboru fosforu nie stwierdzono wyżej wspomnianej zależności.

2. Substancje wzrostowe

Wiadomo, że w tkankach rosnących, zawierających duże stężenie substancji wzrostowych, przewodzenie związków organicznych i mineralnych jest intensywniejsze niż w tkankach starych. Można więc sądzić, że odpowiednie stężenie substancji wzrostowych wywiera wpływ na kierunek i intensywność transportu związków organicznych. Wyniki badań Choudhriego (7) wskazują, że opryskiwanie liści kwasem 2,4-dwuchlorofenoksyoctowym przyczynia się do wzrostu w nich zawartości asymilatów, oraz że stosowanie substancji wzrostowych na pewnych odcinkach łodygi fasoli powoduje w tych miejscach również wzrost zawartości asymilatów. Świadczy to o wzmożonym dopływie asymilatów do miejsc opryskanych substancjami wzrostowymi oraz zahamowaniu odpływu asymilatów z liści opryskanych.

3. Fazy rozwojowe

Rozpatrując proces obiegu związków organicznych, nie można pominąć znaczenia faz rozwojowych rośliny. Badania Prokofjewa, Żdanowa i Sobolewa (33) wskazują, że w fazie kwitnienia i zawiązywania nasion słonecznika 90% produktów fotosyntezy liścia przemieszcza się do organów generatywnych. Podobne wyniki otrzymali dla soi Bielikow (6), dla pomidorów Sisler, Dugger i Gauh (43) oraz Murneek (27). Świadczy to, że u roślin monokarpicznych wraz ze wzrostem nasion i owoców ulega zahamowaniu aktywność metaboliczna korzeni, najprawdopodobniej na skutek głodu węglowodanowego, co w konsekwencji prowadzi w krótkim czasie do śmierci rośliny. Dlatego też usuwanie kaczanów u kukurydzy (20), lub zawiązanych owoców u bawełny (9) przywracało normalny obieg związków organicznych pomiędzy korzeniem a częścią nadziemną i wzmagало wzrost organów wegetatywnych u tych roślin.

Sukcesy badań nad funkcją fizjologiczną korzenia w obiegu związków organicznych w roślinie bez wątpienia otwierają przed nauką o wzroście i rozwoju roślin coraz szersze horyzonty, lecz równocześnie im wnikliwiej próbuje się poznać mechanizm obiegu tych związków, tym wyraźniej ukazuje się złożoność tego zjawiska.

LITERATURA

1. Arisz W. H., *Protoplasma*, 46, 5 (1956).
2. Arnon D. J., *Nature*, 172, 1039 (1953).
3. Bandurski R., *J. Biol. Chem.*, 217, 137 (1955).
4. Biddulph O., *Am. J. Bot.*, 28, 348 (1941).
5. Bidwell R. G. S., Krotkow G., Reed G. B., *Can. J. Bot.*, 33, 189 (1955).
6. Bielikow J. F., *Fizjol. rastienij*, 2, 354 (1955).
7. Choudhri R. S., Cornell University, Ph. D. Thesis.
8. Clagett C., Tolbert N., Burris R., *J. Biol. Chem.*, 178, 977 (1949).
9. Eaton F. M., *J. Agr.*, 43, 875 (1931).
10. Engelbrecht L., *Biochemie der Kulturpflanzen*, 1, 86 (1957).
11. Goodall D. W., *Ann. of Bot. N. S.*, 9, 101 (1945).
12. Goodall D. W., *Ann. of Bot. N. S.*, 10, 305 (1946).
13. Helder R. J., Intern. Conf. Paris 9-th. — 25-th Sept. 1957, Vol. 4, Pergamon Press, London — Oxford — New York — Paris 1958, str. 369—381.
14. Honda S. I., *Plant Physiol.*, 31, 62 (1956).
15. Kandler O., *Z. Naturforsch.*, 12 b, 271 (1957).
16. Kulajewa O. N., Silina E. I., Kursanow A. L., *Fizjol. rastienij*, 4, 520 (1957).
17. Kursanow A. L., Kulajewa O. N., *Fizjol. rastienij*, 4, 320 (1957).
18. Kursanow A. L., Tujewa O. F., Wiereschczagin A. G., *Fizjol. rastienij*, 1, 12 (1954).
19. Kylin A., Hylmö B., *Physiol. Plantarum*, 10, 467 (1957).
20. Loomis W. E., *Iowa State Coll. J. Sci.*, 9, 295 (1935).
21. Loughman B. C., Russell R. S., *J. Expl. Bot.*, 8, 23, 280 (1957).
22. Maisel J., Benson A., Tolbert H., *Plant physiol.*, 31, 407 (1956) suppl XXIV.
23. Marthur S. N., *Agra Univ. J. Res. (Sci)*, 6, 69 (1957).
24. Mothes K., *Biochemie der Kulturpflanzen*, 1, 103 (1957).
25. Mothes K., Engelbrecht L., *Flora*, 144, 586 (1957).
26. Mothes K., Wagner A., *Biochimija*, 22, 171 (1957).
27. Murneek A. E., *Univ. Mo. Agr. Expt. Sta. Res. Bul.*, 90, I pp. (1926).
28. Nelson Ch. D., Krotkow G., *Can. J. Bot.*, 34, 423 (1956).
29. Ochoa S., Mehler A., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, 167, 871 (1947).
30. Ordin L., Jacobson L., *Plant Physiol.*, 30, 21 (1955).
31. Penot M., *Rev. gen. Bot.*, 63, 544 (1956).
32. Priestupa N. A., Kursanow A. Z., *Fizjol. rastienij*, 5, 417 (1957).
33. Prokofjew A. A., Zdanowa L. P., Sobolew A.M., *Fizjol. rastienij*, 5, 425 (1957).
34. Ratner E. I., Akimoczkina T. A., Uchina S. F., *Fizjol. rastienij*, 6, 1 (1959).

35. Reuter G., *Biochemie der Kulturpflanzen*, 1, 260 (1957).
36. Reuter D., Wolffgang I. H., *Flora*, 142 (1954).
37. Robertson R. W., *Handbbuch d. Pflanzenphysiologie* (W. Ruhland) t. II. Berlin — Göttingen — Heidelberg 1956, str. 449—465.
38. Russell R. S., Shorrocks V. M. Internat. Conf. Paris 9-th — 25-th Sept. 1957, Vol. 4, Pergamon Press, London — Oxford — New York — Paris 1958, str. 286—303.
39. Saltman P., Kunitake G., Spolter H., Stitts C., *Plant Physiol.* 31, 464 (1956).
40. Scott-Russell R., Martin R. P., Bishop O. N., *J. Exper. Bot.*, 4, 136 (1953).
41. Scott-Russell R., Martin R. P., Bishop O. N., *J. Exper. Bot.*, 5, 327 (1954).
42. Simonis W., Ehrenberg M., Internat. Conf. Paris 9-th — 25-th Sept. 1957, Vol. 4, Pergamon Press, London — Oxford — New York — Paris 1958, str. 449—457.
43. Sisler E. C., Dugger W. M., Gauh H. G., *Plant Physiol.*, 31, 11 (1956).
44. Stephenson M. L., Thimann K. V., Zamecnik P. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 1 (1956).
45. Tchen T., Vennesland B., *J. Biol. Chem.*, 213, 533 (1955).
46. Tolbert N., Cohan M., *J. Biol. Chem.*, 204, 633 (1953).
47. Trubieckowa O. M., Żirnowa H. G., *Fizjol. rastienij*, 6, 129 (1959).
48. Turkina M. W., Dubinina J. M., *D. A. N. ZSRR*, 95, 199 (1954).
49. Utter M., Kurahashi K., Rose V., *J. Biol. Chem.*, 207, 2 (1954).
50. Waklinowa S. G., Doman N. G., Rubin B. A., *Fizjol. rastienij*, 5, 516 (1958).
51. Willenbrink J., *Planta*, 48, 269 (1957).
52. Wolffgang H., Mothes K., *Naturwissenschaften*, 40, 23, 606 (1953).
53. Żujew L. A., Gołubiewa P. F., *Agrochimija — Poczwowiedienje*, A. N. ZSSR, Moskwa 1958, str. 115—122.

<http://rcin.org.pl>

1. Przepuszczalność protoplazmy

Przez wiele lat zagadnienie przenikania związków przez protoplazmę komórek roślinnych łączono ściśle z jej przepuszczalnością. W 1904 r. powstała lipidalna teoria Overtona, która tłumaczyła różną szybkość wnikania związków do wakuoli niejednakową ich rozpuszczalnością w lipidach. W 1926 r. Ruhland wiąże zjawiska przepuszczalności plazmy z wielkością porów istniejących pomiędzy strukturalnymi utworami warstw pogranicznych protoplazmy. Jest to tzw. teoria ultrafiltru. Wreszcie w 1937 r. Collander, uwzględniając założenia obu poprzednich hipotez, uzależnia przenikanie związków od mozaikowej struktury plazmy, w której można wyróżnić fragmenty z przewagą grup hydrofilnych lub też hydrofobowych.

Żadna ze wspomnianych hipotez nie wyjaśnia jednak wszystkich obserwowanych doświadczalnie faktów. W różnych doświadczeniach z roślinami badano nie tylko szybkość przenikania związków organicznych, lecz także wpływ temperatury, inhibitorów enzymatycznych i wielu innych czynników na ten proces. Różne inhibitory hamowały przenikanie badanych związków. W przypadku cukrów obserwowano współczynnik temperaturowy szybkości migracji zbliżony do wartości Q_{10} wielu reakcji enzymatycznych (79). Często stwierdzano też, że substancje o bardzo zbliżonych właściwościach fizycznych i budowie chemicznej przenikają przez cytoplazmę z różną szybkością (np. glikoza i fruktoza). Wszystkie te fakty prowadzą do wniosku, że mechanizm przenikania różnych związków nie jest jednakowy i związany jest z przemianami zachodzącymi w komórkach. Dlatego też statyczne pojęcie przepuszczalności protoplazmy ustąpiło miejsce pojęciu przepuszczalności fizjologicznej.

Według Brooksa i Brooksa (cyt. wg 34) przepuszczalność protoplazmy może być scharakteryzowana „szybkością przenikania substancji — przez przepuszczalną warstwę — przy określonej sile motorycznej (*driving force*)”. Odróżniają oni pojęcie przepuszczalności w wąskim znaczeniu tego słowa — biorąc pod uwagę fizyczne własności błon plazmatycznych — i w szerszym, w którym przenikanie związków uzależnione jest ściśle od fizjologicznych właściwości protoplazmy, między innymi od sił, warunkujących ruch substancji poprzez protoplazmę. Jeżeli — zdaniem Kramera (34) — jakaś substancja nie przenika do komórki, może to być spowodowane nie tylko nieprzepuszczalnością błony, lecz również brakiem siły warunkującej ruch tej substancji.

W ostatnich czasach punkt ciężkości badań nad migracją różnych substancji przesunął się zatem ze zjawisk przepuszczalności (w klasycznym ujęciu) na badania sił motorycznych tego ruchu. Choć obecnie nie znamy jeszcze dokładnie charakteru tych sił, wydaje się niewątpliwe,

że są one ściśle uzależnione od procesów przemiany materii w komórkach, a szczególnie od procesu oddychania. W odniesieniu do przenikania cukrów świadczą o tym liczne prace, wykazujące osłabienie, a niekiedy nawet całkowite zahamowanie absorpcji tych substancji w złych warunkach tlenowych (3, 9, 10, 35, 55, 80).

Przemieszczanie związków uzależnione od procesu oddychania, które odbywa się wbrew gradientowi stężenia, nazwano aktywnym transportem (*active transport*) — w odróżnieniu od biernego transportu (*passive transport*), przebiegającego zgodnie z prawami dyfuzji (34).

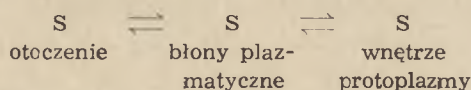
2. Mechanizm aktywnego transportu

Mechanizm aktywnego transportu jest mało znany, choć istnieją liczne hipotezy, oparte w większym stopniu na teoretycznych rozważaniach niż na faktach doświadczalnych. Ponadto badania w tej dziedzinie przeprowadzono głównie na tkankach zwierzęcych, bakteriach lub drożdżach. Dlatego też wnioski wyciągnięte na ich podstawie należy przenosić z dość dużą ostrożnością na zjawiska przebiegające w komórkach roślin wyższych.

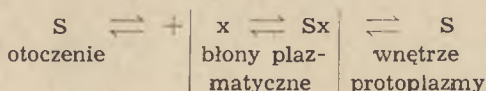
Większość autorów wiąże mechanizm aktywnego transportu w żywych komórkach z obecnością specyficznych cząsteczek (najprawdopodobniej makromolekuł), występujących w pogranicznych warstwach cytoplazmy. Cząsteczki te mogą odgrywać rolę przenośników (*carriers*). Przypuszcza się, że tworzą one kompleksowe związki z przenoszonym substratem i w takiej postaci wędrują przez protoplazmę aż do powierzchni tonoplastu, gdzie następuje ponowne rozszczepienie kompleksu, a przenoszony związek zostaje wydzielony do wakuoli. Taka wędrówka może odbywać się na zasadzie dyfuzji — zgodnie z gradientem stężenia tych kompleksów — nawet w tym przypadku, gdy przenikający związek wędruje wbrew gradientowi stężenia. Po rozkładzie takiego kompleksu przenośnik powraca na powierzchnię protoplastu.

Steinbach (66) przedstawił możliwości przenikania substancji (S) przez cytoplazmę, które obrazują następujące schematy:

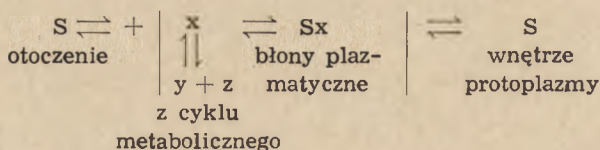
- 1) na zasadzie dyfuzji (biernie przenikanie):



- 2) przy udziale przenośników (x) (aktywny transport):



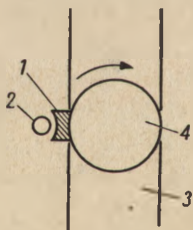
3) przy udziale przenośników z wykorzystaniem energii pochodzącej z oddychania (transport aktywny i selektywny):



Wielu autorów przyjmuje, że przenośniki są to związki wysokoenergetyczne typu ATP lub też ufosforylowane białka. Steward i Street (cyt. wg 34) oraz Steward i Millard (67) sądzą, że rolę przenośników w badanym przez nich mechanizmie przemieszczania jonów (głównie anionów) spełniają nowo powstające cząsteczki białek. Podobnie hipotezy Lundegardta (42), Conwaya (14), Epsteina (23) i Osterhouta (52) przyjmują udział przenośników w przemieszczaniu jonów, przy czym ich autorzy uwzględniają ścisły związek aktywnego transportu z oddychaniem.

Pomimo że charakter nośników nie został jeszcze dokładnie poznany, można przypuszczać, że wykazują one specyficzność w stosunku do przenoszonego substratu. Na ich powierzchni występuje prawdopodobnie jeden lub kilka punktów aktywnej adsorpcji, w których przenoszone cząsteczki przyłączają się w bliżej nieokreślony sposób.

Danielli (18) podaje kilka hipotetycznych schematów działania przenośników. Na rysunku 1 przedstawiono model działania przenośnika



Rys. 1. Model działania przenośnika rotacyjnego.

- 1 — punkt aktywnej adsorpcji,
- 2 — przenoszony substrat,
- 3 — błona plazmatyczna,
- 4 — przenośnik wykonujący ruch rotacyjny

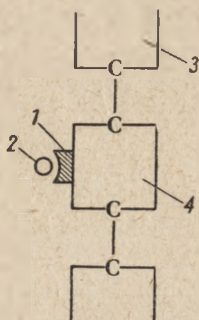
rotacyjnego, którego średnica odpowiada grubości błony plazmatycznej. Przenośnik taki na swej powierzchni posiada przypuszczalnie punkt aktywnej adsorpcji, do którego przyłącza się przenoszony substrat. Wędrówka przenoszonego związku odbywa się wraz z ruchem obrotowym przenośnika.

Rysunek 2 przedstawia inny schemat działania przenośnika, w którym ruch rotacyjny może wykonywać nie cała cząsteczka, lecz jakiś jej

fragment, obracający się wokół osi utworzonej z dwóch kowalencyjnych wiązań typu C-C, C-O lub C-N. Energia zużywana przy rotacji takiego segmentu wynosi $2 \times 3000 = 6000$ kal/mol. Przybliżoną średnią szybkość rotacji można obliczyć przy pomocy następującego wzoru:

$$k \cdot T = I \cdot \omega^2,$$

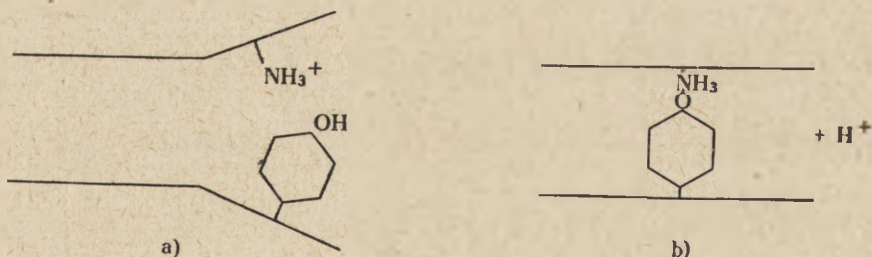
gdzie I — moment bezwładności, ω — prędkość kątowna segmentu.



Rys. 2. Model działania przenośnika z rotującym segmentem.

- 1 — punkt aktywnej adsorpcji,
- 2 — substancja przenoszona,
- 3 — błona plazmatyczna,
- 4 — segment wykonujący ruch rotacyjny.

Goldacre (28) przypuszcza, że rolę przenośników mogą spełniać białka protoplazmatyczne, zdolne do wykonywania rytmicznych skurczów i rozkurczów. Białko w rozkurczu, posiadając dodatnie i ujemne ładunki, może adsorbować pewne jony. W czasie skurczu następuje kompensacja ładunków i wydzielenie zaadsorbowanego jonu — jednak po przeciwnej stronie błony. Tym jonem może być też jon wodorowy (rysunki 3 i 4).

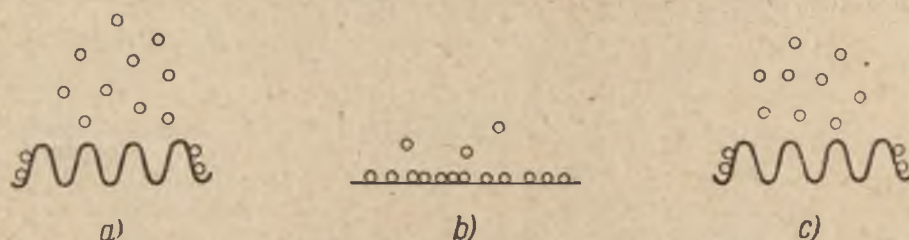


Rys. 3. Zmiany ładunku cząsteczki białka (wg 28).

- a) w stanie rozkurczu,
- b) w stanie skurczu.

Niemale znaczenie miałyby poznanie mechanizmu przenoszenia energii pochodzącej z procesu oddychania i wykorzystania jej w aktywnym tran-

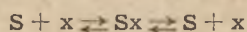
sporcie. Jest to jednak problem do dziś nie rozwiązany. Przypuszcza się, że energia jest tu wykorzystywana przy syntezie albo rozkładzie kompleksów przenośnik—substrat lub też przy samej ich wędrówce.



Rys. 4. Zmiany adsorpcji barwnika przez cząsteczkę białka (wg 28).

- a) w stanie skurczu (w roztworze barwnika),
- b) w stanie rozkurczu (adsorpcja barwnika na powierzchni),
- c) wydzielanie barwnika w czasie ponownego skurczu

W świetle omówionych faktów łatwiej jest zrozumieć, dlaczego fizjologiczna przepuszczalność protoplazmy jest niejednakowa dla różnych związków. Może to wynikać zarówno z powinowactwa substratu (S) do danego przenośnika (x), jak i z kinetyki reakcji:



Jak widać, rola przenośników białkowych przypomina katalityczne działanie enzymów. Mitchell i Moayle (46) sądzą, że specyficzne białka działające jako przenośniki w komórkach bakterii mają charakter enzymów. Cohen i Monad (cyt. wg 46) wprowadzili pojęcie permeazy, tj. enzymu katalizującego przenikanie związków przez protoplazmę. Jest to niewątpliwie pewnego rodzaju rozszerzenie pojęcia działania enzymów, którym obecnie przypisuje się rolę polifunkcyjnych centrów również w aktywnym transporcie (18).

Poza bezpośrednim udziałem enzymów w aktywnym transporcie istnieje możliwość wielu pośrednich powiązań ich działania z tym procesem. Ponieważ energia zużywana w aktywnym transporcie pochodzi najprawdopodobniej z ATP, zatem także działanie enzymów katalizujących syntezę wysokoenergetycznych związków nie pozostaje zapewne bez wpływu na wędrówkę związków.

Niejednokrotnie gromadzenie określonej substancji w komórce jest uzależnione od szybkości, z jaką ulega ona przemianom. Na przykład aktywny transport glikozy uzależniony jest częściowo od szybkości reakcji



a zatem pośrednio od działania enzymów biorących w niej udział.

3. Formy transportowe cukrów

Cukry wnikają bardzo wolno do komórki. Opór, jaki napotykają one przy przenikaniu przez plazmolemę i tonoplast, jest uwarunkowany między innymi hydrofilnym charakterem cukrów. Duża ilość wiązań wodorowych z wodą utrudnia ich wnikanie przez lipofilne warstwy cytoplazmy. W przypadku cząsteczki glikozy, wyliczona energia aktywacji wnikania do cytoplazmy na drodze dyfuzji jest bardzo duża i wynosi 15—25 tysięcy kal/mol. Natomiast przenikanie glikozy do komórek czerwonych ciałek krwi człowieka lub królika wymaga energii aktywacji wynoszącej tylko 4000 kal/mol (18). Najprawdopodobniej obniżenie energii aktywacji w opisanym przypadku następuje pod wpływem bliżej nieznanych przenośników glikozy, po połączeniu z którymi opór stawiany przez cytoplazmę jest mniejszy.

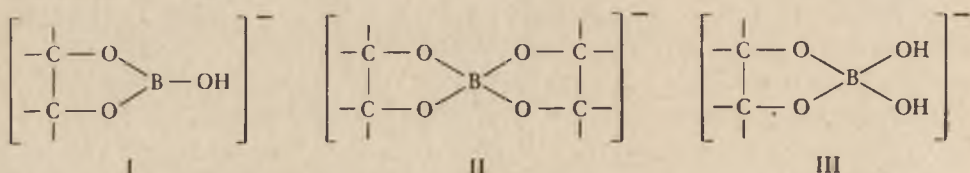
Sprzeczne są dane o wnikaniu sacharozy do komórek. Ruhl and, Fitting i Höfler (cyt wg 72) stwierdzili, że dwucukier ten przenika wolniej od cukrów prostych. W liściach jęczmienia (58), komórkach drożdży (57), porostach (29) i komórkach korzeni marchwi (11) wykazano, że sacharoza dostarczona z zewnątrz ulega hydrolizie na powierzchni protoplazmy przed wniknięciem do wnętrza komórek. Nie potwierdziły tego badania Weatherley a (78) prowadzone na dyskach liści *Atropa*.

Dormer i Street (21) oraz Street i Lowe (68) wysunęli hipotezę przenikania cukrów w postaci zdysocjowanych estrów kwasu fosforowego. Według tych autorów cukry mogą ulegać fosforylacji na powierzchni protoplastu, po czym wewnątrz komórki następuje ich defosforylacja. Podobny mechanizm wykazano w komórkach mięśni, serca i wątroby, na ich powierzchni powstają heksozomonofosforany (cyt. wg 68). Rothstein (57) stwierdził, że cukry na powierzchni komórek drożdży ulegają estryfikacji kosztem ATP, po czym przenikają w głąb komórki. Wanner (77) na podstawie doświadczeń prowadzonych na roślinach drzewiastych wyciąga wniosek, że cukry przenikają z jednej komórki do drugiej w formie heksozomonofosforanów.

W odróżnieniu od tych obserwacji Vittorio, Krotkow i Reed (84) badając siewki pszenicy stwierdzili ujemny wpływ fosforanu potasu na absorpcję glikozy, gdyż wolna glikoza znakowana ^{14}C pochłaniana była w większych ilościach niż glikozo-1-fosforan. W doświadczeniach Turnowskiej-Starck (74) obserwowano również znaczne osłabienie absorpcji sacharozy w skórcie pochodzącej z wewnętrznej strony łuski cebuli w przypadku, gdy do roztworu tego cukru dodano fosforanu. Wpływ ten najwyraźniej wystąpił przy zastosowaniu $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, choć uwidocznił się również w przypadku NaH_2PO_4 i KH_2PO_4 .

Jak dotychczas, trudno jest bliżej określić rolę fosforanu w aktywnym transporcie. Być może, łączy się ona z przemianami związanymi

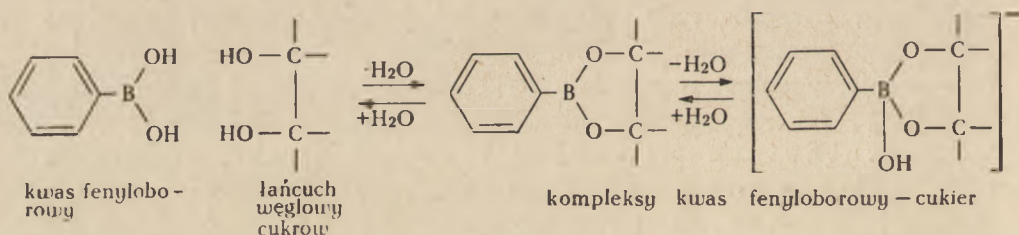
z wydatkowaniem energii w procesie przenikania cukrów z komórki do komórki.



Węglowodany, poza połączeniami z kwasem fosforowym, tworzą z łatwością kilka typów związków kompleksowych z kwasem borowym i jego pochodnymi. Zittle (89) oraz K hym, Zill i Cohn (33) podają liczne przykłady takich związków zarówno dla mono- i oligosacharydów, jak też polisacharydów oraz polialkoholi. Związki takie mogą występować w postaci anionów (I, II, III).

Można by przypuszczać, że bor w błonach komórkowych, protoplazmie i innych częściach komórki bogatych w węglowodany występuje w połączeniach podobnego typu. Jednakże dotychczas nie wyizolowano z rośliny żadnego związku organicznego, zawierającego bor, pomimo że podejmowano próby w tym kierunku (83). Jest to wynikiem, być może, dużej labilności związków tego typu.

Torssell (71) opisuje jeszcze inne związki cukrowo-borowe, w których bor występuje jako kwas fenyloborowy (schemat 1). Takie związki,



Schemat 1. Powstawanie związku kwas fenyloborowy — cukier wg Torssella (71).

dzięki obecności grupy fenyłowej, mają charakter lipofilny. Dlatego też można przypuszczać, że opór, jaki napotykają one przy przenikaniu do komórki, jest mniejszy niż opór stawiany wolnym cząsteczkom cukru.

Jest zatem możliwe, że cukry migrują w roślinie w postaci związków z kwasem borowym albo fenyloborowym lub też związki borowe mogą w inny sposób wpływać na aktywny transport węglowodanów. Przypuszczenia te wynikają również z obserwacji, że przy deficycie borowym przede wszystkim występują zawsze zaburzenia w przemianie węglowodanów. Niektórzy badacze (4) sądzą, że brak boru wpływa na zmiany fizycznych własności koloidów, a stąd w roślinach z deficytem boru mogą wystąpić pewne zmiany w przepuszczalności protoplazmy.

O'Kelley (51) badał wpływ boru na absorpcję cukrów przez pyłek *Tecoma radicans*. Wzrost absorpcji wywołany dodatkiem boru do roztworu cukrów nie przewyższał nigdy 22%. Obserwowano wyraźniejszy wzrost pochłaniania w przypadku zastosowania sacharozy niż glikozy. Nie stwierdzono dodatniego wpływu boru na absorpcję fruktozy, a nawet przeciwnie — obserwowano tu pewną depresję wnikania tego cukru do ziarn pyłku.

Nelson i Gorham (49) stwierdzili dodatni wpływ boru na wielkość absorpcji radioaktywnej glikozy w liściach soi. Wpływ ten uwiłdocił się szczególnie wyraźnie, gdy roztwór poza cukrem i kwasem borowym zawierał substancję obniżającą napięcie powierzchniowe (detergent).

Turnowska-Starck (75) badając wpływ boru na absorpcję sacharozy przez izolowane liście fasoli zaobserwowała wzrost pochłaniania cukru, gdy do roztworu dodano kwasu borowego. Wpływ ten obserwowano zarówno na normalnych roślinach, jak i wykazujących początkowe objawy braku boru.

II. Przemieszczanie węglowodanów w tkankach przewodzących

Główną drogą wędrówki substancji organicznych są tkanki floemu, a wśród nich — rurki sitowe. Przemieszczanie asymilatów poprzez floem niesłusznie nazywa się niekiedy prądem zstępującym (jako pojęcie przeciwstawne prądowi wstępującemu). Asymilaty wędrują bowiem nie tylko w kierunku korzeni, lecz również ku wierzchołkowi wzrostu pędów. Szybkość migracji cukrów we floemie wynosi 0,4—1,6 m/godz., co oczywiście tysiące razy przewyższa szybkość dyfuzji.

Wielu badaczy stwierdza, że formą transportową cukrów w sitach większości roślin jest sacharoza (7, 36, 39, 40, 41, 69, 73, 77, 85, 86). Tylko u nielicznych gatunków drzew (86) oraz u dyni (56) wykryto przewagę oligosacharydów (głównie stachiozy i werbaskozy) w soku uzyskanym z floemu. Autorzy przypuszczają, że wykryte oligosacharydy stanowią formę transportową węglowodanów u tych roślin.

1. Wpływ boru i fosforu

Wielu autorów wysuwa możliwość udziału fosforu w procesie przemieszczania cukrów przez floem, podobnie jak w przypadku migracji cukrów w tkankach parenchymatycznych. Ponieważ w sitach dominuje jednak sacharoza, stąd wyłoniła się konieczność zbadania, czy cukier ten wnika do sit dzięki fosforylacji i defosforylacji, która może odbywać się na powierzchni protoplazmy (5).

Przez długi czas nie udawało się wykazać w roślinach obecności estrów sacharozo-fosforanowych. W 1943 roku Doudoroff (20) wykrył enzym powodujący fosforylację sacharozy u *Pseudomonas saccharifera*. W kilka lat później Buchanan (cyt. wg 2) zidentyfikował chromatograficznie fosforan sacharozy w wyciągach z liści buraka; po hydrolizie związek ten dawał fruktozo-1-fosforan i glikozę.

W celu określenia ewentualnej roli fosforu w przemieszczaniu cukrów oznaczono estry fosforanowo-cukrowe w tkankach przewodzących. Kursanow i Wyskriebiencewa (39) wykazali w tkankach przewodzących bawelny dużą radioaktywność niezidentyfikowanych estrów fosforanowych, po ekspozycji roślin na światło, w atmosferze $^{14}\text{CO}_2$.

Bauer (5) oraz Kursanow i Turkina (38) wykazali we floemie buraka cukrowego aktywne fosfatazy i fosforylasy. Sheil, McGregor i Street (60) stwierdzili znaczną aktywność fosfataz zarówno w tkankach merytematycznych, jak i we floemie korzeni pomidora. Jednakże wydaje się, że obecność aktywnych fosfataz i fosforylaz w wiązkach siłowo-naczyniowych nie przesądza sprawy bezpośredniego udziału fosforu w przemieszczaniu cukrów w sitach. Mogą one bowiem odgrywać rolę zarówno przy syntezie sacharozy, jak i w innych procesach nie związanych bezpośrednio z transportem węglowodanów. Zeigler (85) analizował sok uzyskany z rurek sitowych drzew. Nie stwierdził on wahań w zawartości fosforu w ciągu doby, potwierdził natomiast znaną w literaturze rytmikę dobowych zmian w ilości cukrów. Cukry i fosfor mineralny nie występowały we floemie w takim stosunku molarnym, który mógłby wskazywać, zdaniem tego autora, na przemieszczanie cukrów w postaci kompleksów z kwasem fosforowym. Argument ten nie pozwala jednak całkowicie wykluczyć możliwości bezpośredniego udziału fosforu w przemieszczaniu cukrów.

Podobnie jak w przypadku aktywnego transportu przez mezofil liści, tak i przy przemieszczaniu związków przez sita istnieje możliwość udziału boru. Opisane już własności boru, wykazane w doświadczeniach *in vitro*, i fakt gromadzenia cukrów w organach asymilacyjnych (liściach) w przypadku deficytu borowego (30, 31, 48, 50, 59, 81) pozwalają przypuszczać, że rola boru wiąże się nie tylko z przemianami, lecz również z wędrówką węglowodanów.

Gauch i Dugger (25, 26, 27) wysunęli hipotezę ścisłej zależności między przemieszczaniem asymilatów i fizjologiczną rolą boru. Autorzy ci obserwowali bowiem znacznie większą radioaktywność roślin, którym na liść podano roztwór radioaktywnej sacharozy wraz z borem, w porównaniu z roślinami, które otrzymały wyłącznie sacharozę. W innej serii doświadczeń (61) bor wpłynął jednak najsilniej na przemieszczanie u roślin, które otrzymały w pożywce małą dawkę tego mikroelementu i nie

wykazywały zewnętrznych objawów jego braku. W doświadczeniach tych wprowadzano cukry przez odcięty ogonek liścia i dlatego mogły się one przemieszczać nie normalną drogą — przez floem, ale wraz z prądem transpiracji. Na możliwość udziału boru w przemieszczaniu węglowodanów wskazują także inne prace (22, 45, 65).

Skok (62, 63, 64) odnosi się krytycznie do wspomnianych hipotez. W doświadczeniach prowadzonych na młodych siewkach słonecznika nie stwierdził on bezpośredniego wpływu boru na przemieszczanie wprowadzonych na liście radioaktywnych cukrów do innych części siewki. Zdaniem autora, pewne zakłócenia w migracji węglowodanów w przypadku deficytu borowego mogą być jego pośrednim następstwem. Również Szkolnik (70) przypuszcza, że bor wpływa tylko pośrednio na przemieszczanie asymilatów, gdyż przy braku tego mikroelementu obserwuje się zahamowanie wzrostu organów heterotroficznych, co obliża ich zapotrzebowanie na węglowodany. Johnston i Doore (30) oraz Mc Ilrath i Palser (44) tłumaczą zahamowanie odpływu asymilatów z liści w przypadku braku boru morfologicznymi i anatomicznymi zmianami w tkankach przewodzących a szczególnie we floemie.

Ostatnie przypuszczenie nie znajduje potwierdzenia w doświadczeniach Turnowskiej-Starck (76). W młodych siewkach fasoli, ubogich w bor, w których nie występowały jednak jeszcze nekrotyczne zmiany we floemie, obserwowano bowiem znaczne osłabienie przemieszczania radioaktywnej sacharozy, w porównaniu z roślinami normalnie zaopatrzonymi w ten mikroelement. Dodatkowym dowodem świadczącym, że to zahamowanie transportu było wynikiem fizjologicznych, a nie anatomicznych zmian spowodowanych deficytem boru, jest fakt, że przemieszczanie sacharozy odbywało się kilkakrotnie intensywniej w przypadku, gdy rośliny otrzymały kwas borny jednocześnie z sacharozą. Szczególnie wyraźnie wpływał bor dostarczony roślinom przez korzenie. Wyniki powyższych doświadczeń świadczą o ścisłej, fizjologicznej zależności pomiędzy funkcją boru a przemieszczaniem sacharozy, chociaż nie wyjaśniają, na czym ten związek polega.

2. Poglądy na mechanizm przewodzenia

Zagadnienie formy, w jakiej przemieszczają się węglowodany, wiąże się ściśle z mechanizmem ich transportu. Gdyby istniała możliwość przemieszczania cukrów jako zdysocjowanych estrów fosforanowych lub boranowych, wówczas można by tłumaczyć ich wędrówkę w podobny sposób, jaki przypisuje się migracji anionów.

Niektórzy badacze wiążą mechanizm przemieszczania cukrów z aktywnością układu cytochromowego (73). Willebrink (82) obserwował

zahamowanie przemieszczania węglowodanów w wiązkach przewodzących, wyizolowanych z ogonków liści pelargonii pod wpływem KCN. Cytowani badacze (73, 82) oraz Kursanow i Turkina (37) wykazali dużą intensywność oddychania wiązek.

Duża aktywność metaboliczna tkanek przewodzących nasuwa wielu badaczom myśl, że przemieszczanie w tkankach sitowych, podobnie jak migracja w tkankach parenchymatycznych, uzależnione jest od procesów egzoergicznych. Curtis (16) wykazał już w 1929 r., że brak dostępu tlenu do tkanek przewodzących hamuje w znacznym stopniu przepływ asymilatów. Jakuszkina i inni (32) stwierdzili, że kierunek przemieszczania asymilatów jest zgodny z kierunkiem wzrastającej intensywności oddychania.

We wszystkich hipotezach, łączących mechanizm przewodzenia asymilatów z metabolizmem tkanek przewodzących, dużą uwagę zwraca się na rolę protoplazmy wyściełającej rurki sitowe. Pociąga to za sobą konieczność szczegółowych badań nad fizycznymi i fizjologicznymi właściwościami tkanek przewodzących. Obszerny przegląd obecnego stanu wiedzy na ten temat zawarty jest w monograficznych artykułach Craftsa (15) oraz Esau, Curriera i Cheadle'a (24). I w tej dziedzinie badań istnieją jednak sprzeczne dane, zwłaszcza w odniesieniu do przepuszczalności plazmy w rurkach sitowych. Problematyczna jest też obecność tonoplastu oraz rotacyjny ruch protoplazmy. Sprzeczne są również dane na temat obecności enzymów glikolitycznych w rurkach sitowych.

Crafts (15) przypuszcza, że rozbieżności te wynikają z różnej metodyki badań oraz faktu prowadzenia obserwacji na komórkach znajdujących się w różnych fazach wzrostu. W młodych rurkach stwierdza się na ogół większe ilości protoplazmy, która charakteryzuje się wówczas mniejszą przepuszczalnością (w klasycznym znaczeniu tego słowa). Wraz z wiekiem maleje zawartość związków lipidowych i protoplazma nabiera bardziej hydrofilowego charakteru. Badania rurek sitowych przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazały również, że młode rurki są bogatsze w cytoplazmę (6).

Wielu badaczy wiąże mechanizm ruchu asymilatów we floemie z rotacyjnym i ślizgowym ruchem protoplazmy, dzięki któremu cząsteczki przenoszone są wzdłuż rurek sitowych (1). Wędrowka substancji przez pory w sitach odbywa się, zgodnie z tą hipotezą, na zasadzie dyfuzji.

W przeciwieństwie do hipotez aktywnego udziału protoplazmy i ruchu substancji, niezależnego od ruchu wody zawartej w rurkach sitowych, istnieje dużo prac, z których wynika, że przemieszczane związki poruszają się wraz z wodą. Twórcą teorii tzw. masowego przepływu (*mass flow*) był Münch (47). Według tej hipotezy siłą motoryczną ruchu asymilatów jest uzależniona od gradientu stężenia różnica w wartości

osmotycznej lub różnica turgoru komórek-akceptorów i komórek-donatorów. Wydaje się, że w tym mechanizmie plazma nie odgrywałaby zasadniczej roli.

Hipoteza Müncha znajduje i obecnie swych zwolenników, którzy traktują przemieszczanie jako przepływ roztworu zgodnie z gradientem turgorowym lub stężenia. Zimmerman (86, 87, 88) stwierdził, że gradient stężenia obserwowany w ciągu lata we floemie niektórych gatunków drzew znika na jesieni, po opadnięciu liści. Podobne zjawisko występowało po sztucznym usunięciu wszystkich liści w ciągu okresu wegetacyjnego. Autor sądzi, że gradient stężenia warunkuje ruch asymilatów i jest jego siłą motoryczną. Jako dalszy argument na poparcie hipotezy *mass flow* (lub *mass preassure* — przepływ pod ciśnieniem) Colwell (cyt. wg 15) przytacza obserwowane obfite wydzielanie soku z przeciętego floemu — zjawisko szczególnie charakterystyczne dla roślin z rodziny dyniowatych, jak również dla niektórych gatunków drzew. Być może jednak, że wydzielanie soku z floemu jest artefaktem, spowodowanym przecięciem tkanek przewodzących. Bauer (5) na podstawie obserwacji ruchu barwików wprowadzonych do ogonka liścia pelargonii izolowanego od rośliny stwierdził, że ruch ten jest uzależniony od gradientu turgoru. Zmieniając gradient ten w sposób sztuczny, można było modyfikować zarówno szybkość, jak i kierunek migracji badanych przez niego związków. Autor sądzi, że w podobny sposób przemieszczają się asymilaty.

Jednym z poważniejszych zarzutów wysuwanych dawniej przeciwko hipotezie *mass flow* był obserwowany fakt jednoczesnego ruchu substancji w przeciwnych kierunkach (12, 53). Obecnie przypuszcza się, że ten dwukierunkowy ruch odbywa się w różnych rurkach sitowych (5, 8).

Istnieją jednak i inne fakty, których nie można wyjaśnić w świetle hipotezy *mass flow*. Nie wszyscy autorzy stwierdzają, by kierunek wędrówki węglowodanów był zgodny z gradientem stężenia lub turgoru (17). Zaprzeczeniem tego jest choćby migracja sacharozy w buraku cukrowym z liści (uboższych w sacharozę) do korzeni lub gromadzenie cukrów w owocach. Clemens (13) badając migrację asymilatów do owoców *Kigelia africana* (ciężar jednego grona dochodzi do 20 kg) obliczył, że gdyby wszystkie cukry przemieszczały się wraz z przepływającym sokiem, wówczas w ciągu godziny musiałoby przepływać 159—449 g wody przez przekrój 1 cm². Oczywiście, jest to mało prawdopodobne.

Zwolennicy masowego przepływu nie uwzględniają oporu, jaki stawia protoplazma wyściełająca pory rurek sitowych. Opór ten, zdaniem Craftsa, jest bardzo duży i nie można go nie brać pod uwagę. Zdjęcia porów sit, wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego, wska-

zują, że protoplasty sąsiadujących rurek łączą się ze sobą tworząc jedną, strukturalną całość (24).

Najnowsze badania poświęcają coraz więcej uwagi komórkom parenchymy floemu i komórkom towarzyszącym, które charakteryzują się dużą aktywnością metaboliczną (5, 54, 77). Szczególnie czynne są tu enzymy typu fosfataz i fosforylaz. Przypuszcza się, że w tych właśnie komórkach odbywa się synteza sacharozy, wydzielanej następnie do rurek sitowych.

Przegląd niniejszy zawiera tylko najważniejsze hipotezy mechanizmu przemieszczania węglowodanów. Niestety, żadna z nich nie objaśnia wszystkich zjawisk obserwowanych w roślinach.

LITERATURA

1. Afanasjew A. W., Pieriedwizenije pitatielnych wieszczestw w rastienijach, Izdatielstwo Leningradskogo Uniwersiteta, Leningrad 1955, str. 115.
2. Albm H. S. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd 9, W. Ruhland, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1958, str. 155.
3. Arisz W. H., *Ann. Rev. Plant Phys.* 3, 109 (1952).
4. Baker J. E., Gauch H. G., Dugger W. M., *Plant Physiol.* 31, 90 (1956).
5. Bauer L., *Planta* 42, 367 (1953).
6. Beer M., *Plant Physiol.* 33, Supplement (1958).
7. Biddulph O., Cory R., *Plant Physiol.* 32, 608 (1957).
8. Biddulph O., Proceedings of the IX International Botanical Congress, Montreal, August 19—29, 1959, Vol. II, University of Toronto Press, 1959, str. 31.
9. Brown R., *Int. Rev. Cytol.* 1, 107 (1952).
10. Burr G. O., Hartt W. W., *Ann. Rev. Plant Phys.* 8, 275 (1957).
11. Burström H., *Physiologia Plantarum* 10, 741 (1957).
12. Chen S. L., *Am. J. Bot.* 38, 203 (1951).
13. Clemens H. F., *Plant Physiol.* 15, 689 (1940).
14. Conway E. J., Active transport and secretion, Symposia of the Society for Experimental Biology, Nb. 8, Cambridge University Press, Cambridge 1954, str. 297.
15. Crafts A. S., *Bot. Rev.* 17, 203 (1951).
16. Curtis O. F., *Am. J. Bot.* 16, 154 (1929).
17. Curtis O. F., Scofield H. T., *Am. J. Bot.* 20, 502 (1933).
18. Danielli J. F., Active transport and secretion, Symposia of the Society for Experimental Biology, Nb. 8, Cambridge University Press, Cambridge 1954, str. 502.
19. Day B. E., *Plant Physiol.* 27, 143 (1952).
20. Doudoroff M. J., *J. Biol. Chem.* 151, 351 (1943).
21. Dormer K. J., Street H., *Ann. Bot.* 13, 199 (1949).
22. Dugger W. M., Humphreys J. F., Calhoun B., *Plant Physiol.* 32, 364 (1957).
23. Epstein E., Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 2, W. Ruhland, Berlin — Göttingen — Heidelberg 1956, str. 398.
24. Esau K., Currier H. B., Cheadle V. I., *Ann. Rev. Plant Phys.* 8, 349 (1957).

25. Gauch H. G., Dugger W. M., *Plant physiol.* **28**, 457 (1953).
26. Gauch H. G., Dugger W. M., *Bull. Maryland Univ. Agr. Expt. St. Bul.* A. 80. Tech. 1954.
27. Gauch H. G., *Ann. Rev. Plant Phys.* **8**, 31 (1957).
28. Goldacre R. J., *Int. Rev. Cytol.* **1**, 135 (1952).
29. Harley J. L., Smith D. S., *Ann. Bot.* **20**, 513 (1956).
30. Johnston E. S., Dore W. H., *Plant Physiol.* **4**, 31 (1929).
31. Jakowlewa W. W., O pitanii rastienij, Sielschozgiz, Moskwa 1955, str. 174.
32. Jakuszkina N. J., Poroiskaja S. M., Filatowa T. S., *Fizjol. rastienij* **3**, 423 (1956).
33. Khym J. X., Zill L. P., Cohn W. E., Ion exchangers in organic and biochemistry, Interscience Publishers, New York — London 1957, str. 392.
34. Kramer P. J. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 2, W. Ruhland Berlin — Göttingen — Heidelberg 1956, str. 358.
35. Kursanow A. L., Kriukowa N. N., Siebienko D. S., *Biochimija* **13**, 456 (1948).
36. Kursanow A. L., Turkina M. W., Dubinina J. M., *Dokł. A. N. SSSR* **93**, 1115 (1953).
37. Kursanow A. L., Turkina M. W., *Dokł. A. N. SSSR* **85**, 649 (1952).
38. Kursanow A. L., Turkina M. W., *Dokł. A. N. SSSR* **95**, 885 (1954).
39. Kursanow A. L., Wyskriebiencowa I. I., *Fizjol. rastienij* **1**, 156 (1954).
40. Kursanow A. L., Czajłachjan M. H., Pawlinowa O. A., Turkina M. W., Browczenko M. J., *Fizjol. rastienij* **5**, 5 (1958).
41. Loomis W. E., *Science* **101**, 398 (1945).
42. Lundegardh H., Active transport and secretion, Symposia of the Society for Experimental Biology, Nb. 8, Cambridge University press, Cambridge 1954, str. 262.
43. Mason T. G., Phillis E., *Ann. Bot.* **50**, 455 (1936).
44. Mc Ilrath W. J., Palser B., *Bot. Gaz.* **118**, 43 (1956).
45. Mitchell J. W., Dugger W. M., Gauch H. G., *Science* **118**, 354 (1953).
46. Mitchell P., Moyle J., *Nature* **182**, 372 (1958).
47. Münch E., *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*, Verlag von Gustav Fischer, Jena 1930.
48. Neals T. F., *Nature* **183**, 483 (1959).
49. Nelson C. D., Gorham P. R., *Canad. J. Bot.* **35**, 339 (1957).
50. Odhnoff C., *Physiologia Plantarum* **10**, 984 (1957).
51. O'Kelley J. C., *Am. J. Bot.* **44**, 239 (1957).
52. Osterhout W. J., *J. Gen. Physiol.* **35**, 579 (1952).
53. Palmquist E. M., *Am. J. Bot.* **25**, 97 (1938).
54. Perkins H. J., Nelson C. D., Gorham P. R., *Can. J. Bot.* **37**, 871 (1959).
55. Phillis E., Mason T. G., *Ann. Bot.* **1**, 231 (1937).
56. Pristupa N. A., Kursanow A. N., *Fizjol. rastienij*, **4**, 417 (1957).
57. Rothstein A., Active transport and secretion, Symposia of the Society for Experimental Biology, Nb. 8, Cambridge University Press, Cambridge 1954, str. 165.
58. Säid H., *Nature* **162**, 496 (1948).
59. Scripture P. N., Mc Harque J. S., *J. Am. Soc. Agrom.* **37**, 360 (1945).

60. Sheil M., Mc Gregor, Street M. E., *Ann. Bot.* **17**, 385 (1953).
61. Sisler E. C., Dugger W. M., Gauch H. G., *Plant Physiol.* **31**, 11 (1956).
62. Skok J., *Plant Physiol.* **32**, 308 (1957).
63. Skok J., *ibid.* **32**, 648 (1957).
64. Skok J., Trace elements, Academic. Press, New York — London 1958, str. 227.
65. Spurr A. R., *Science* **126**, 78 (1957).
66. Steinbach H. B., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **2**, 323 (1951).
67. Steward F. C., Millard F. K., Active transport and secretion, Symposia of the Society for Experimental Biology, Nb. 8, Cambridge University Press, Cambridge 1954, str. 367.
68. Street W. E., Lowe J. S., *Ann. Bot.* **14**, 307 (1950).
69. Swanson C. H., El-Shishiny E. D., *Plant Physiol.* **33**, 33 (1958).
70. Szkolnik M. J., Znaczenie mikroelementow w zizni rastienij i ziemledielii, Moskwa—Leningrad 1950.
71. Torssell K., *Physiologia Plantarum* **9**, 652 (1956).
72. Troszin A. C., Problema kletocznoj pronicajemosti, Izd. Ak. Nauk SSSR, Moskwa—Leningrad 1956.
73. Turkina M. W., Dubinina J. M., *Dokl. A. N. SSSR* **95**, 199 (1953).
74. Turnowska-Starck Z., *Acta Soc. Bot. Pol.* **28**, 409 (1959).
75. Turnowska-Starck Z., *ibid.* **29**, 219 (1960).
76. Turnowska-Starck Z., *ibid.* (w druku).
77. Wanner H., *Biol. Abstr.* **29**, 24724 (1959).
78. Weatherley P. E., *New Phytol.* **52**, 76 (1953).
79. Weatherley P. E., *New Phytol.* **53**, 204 (1954).
80. Weatherley P. E., *ibid.* **54**, 13 (1955).
81. White-Stevens R. N., *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **36**, 537 (1938).
82. Willebrink J., *Planta* **48**, 269 (1957).
83. Winfield M. E., *Austral. J. Exp. Biol.* **23**, 111 (1945).
84. Vittorio P. V., Krotkow O., Reed G. B., *Biol. Abstr.* **29**, 29694 (1955).
85. Zeigler H., *Planta* **47**, 447 (1956).
86. Zimmerman M. H., *Plant Physiol.* **32**, 288 (1957).
87. Zimmerman M. H., *ibid.* **32**, 399 (1957).
88. Zimmerman M. H., *ibid.* **33**, 213 (1958).
89. Zittle C. A., *Adv. in Enzym.* **12**, 493 (1951).

RECENZJE

Recenzja książki E. H. Relyvelda

Relyveld E. H. *Toxine et antitoxine diphtériques. Étude immunologique.* Stronic 164. Wykresów i zdjęć 54, Tablic 33. Wydawnictwo Hermann, Paryż 1959.

Badania przedstawione w monografii wykonano w Oddziale beztlenowców i chemii mikrobiologicznej filii Garche Instytutu Pasteura w Paryżu, pod kierunkiem profesora Raynaud. Niektóre problemy omówione w monografii dyskutowane były już wcześniej na innym miejscu przez prof. Raynaud wspólnie z autorem i innymi pracownikami Oddziału. Oceniana praca odzwierciedla więc w rzeczywistości nie tylko poglądy autora, lecz także stanowisko pracowników Instytutu.

Monografia obejmuje siedem rozdziałów. Słowo wstępne i posłowie ułatwiają zrozumienie motywów podjęcia pracy, dróg myślowych i wyciągniętych wniosków. Z siedmiu rozdziałów pierwszy podaje plan pracy, drugi i trzeci zawierają szczegóły dotyczące preparatyki i oczyszczania toksyny błoniczej. W czwartym rozdziale przedstawiono przebieg analizy immunologicznej metodami dyfuzji w żelu, a w piątym — zagadnienia hiperimmunizacji koni anatoksyną, sporządzoną z wysoce oczyszczonej toksyny. Rozdziały 6 i 7 poświęcono studiom nad ilościowo wykonywanymi reakcjami między toksyną a antytoksyną i badaniom nad swoistymi ugrupowaniami w cząsteczce toksyny i w odpowiadających im przeciwciałach.

Przy bliższej analizie spostrzega się z łatwością, że pierwsze rozdziały są podbudową dla rozdziałów 6 i 7, w których zajęto się ważnymi zagadnieniami immunologicznymi. Dodać należy, że poszczególne rozdziały poprzedza zawsze szkic historyczny, w którym referowane są spostrzeżenia innych badaczy, a na końcu każdego z rozdziałów umieszczono zwięzłe napisane wnioski uzyskane na podstawie własnych badań autora.

Właściwości toksyny błoniczej, jak też zagadnienia reakcji między tą toksyną a homologicznym przeciwciałem, tj. antytoksyną błoniczą, były już tematem licznych dyskusji. Autor podejmuje jeszcze raz te zagadnienia, gdyż dysponuje toksyną wysoce oczyszczoną, a dawniejsze prace doświadczalne wykonane zostały przy pomocy preparatów oczyszczonych tylko częściowo.

Postępując systematycznie rozpoczął monografię od zagadnień dotyczących toksyny. Wiadomo, że jako toksyny używa się zarówno w pracy codziennej, jak też w pracach badawczych, przesączań hodowli maczugowca błonicy w podłożach płynnych. Toksyna negatywna, otrzymana tą drogą, zostaje w dalszych etapach oczyszczana. Przez długie lata podstawowym składnikiem podłoży płynnych były wyciągi mięsne i preparaty określane mianem peptonów. Skład takich podłoży był zmienny i pod względem chemicznym niedokładnie znany. W przesączań hodowli w takich podłożach obok toksyny zawarte były różnorodne związki niepożądane z punktu widzenia lekarza i mikrobiologa, a utrudniające chemiczne oczyszczanie toksyny. Z tych wszystkich przyczyn zrodziło się dążenie do uzyskania podłoży o określonym składzie chemicznym. Efektem prac z tej dziedziny są podłoża syntetyczne i tak zwane półsyntetyczne, w których podstawowym składnikiem są hydrolizaty kazeiny, żelatyny lub innych ciał. Jak w innych zakładach, tak i w Instytucie Pasteura zastąpiono w ostatnich latach dawniej używane pod-

łoża „rutynowe” przez podłoże półsyntetyczne, którego skład i przygotowanie opisano w monografii w sposób najbardziej szczegółowy. Poza tym podaje autor szczegóły dotyczące używanego szczepu maczugowca, przygotowania *inoculum* i hodowli. Podkreślam te fakty, gdyż są niezmiernie interesujące dla każdego zajmującego się zagadnieniami toksyny błoniczej, w szczególności dla każdego zajmującego się produkcją preparatów biologicznych, stosowanych w lecznictwie i profilaktyce błonicy.

Jednakże nawet przesącze hodowli z podłoży półsyntetycznych zawierają również obok toksyny jeszcze inne związki, będące z punktu widzenia toksyny jej zanieczyszczeniami. W ciągu długich lat opracowano różne procesy technologiczne dla usunięcia tych zanieczyszczeń. Na ogół stosowano te same metody, którymi oczyszcza się białka (toksyna błonicza jest również białkiem). W poszczególnych zakładach stosuje się w celu oczyszczenia toksyny wysalanie, wytrącanie za pomocą kwasów, ultrafiltrację, adsorpcję. Autor posługiwał się tymi samymi metodami, a poza tym zastosował chromatografię kolumnową przy użyciu fosforanu wapnia. Również i to postępowanie opisano najdokładniej w monografii. Z oczyszczonej toksyny sporządzono preparat krystaliczny.

Cyfry podane w monografii, ilustrujące stopień oczyszczenia toksyny i jej aktywności, brzmią imponująco. Wiadomo, że dla uzyskania szybkiej orientacji co do aktywności toksyny błoniczej stosowany jest tak zwany odczyn flokulacyjny Ramona. Odczyn wykonuje się *in vitro*, określa się stężenie antygeny (toksyny lub anatoksyny), przy jakim w obecności jednej jednostki antytoksycznej najwcześniej pojawiają się w mieszaninie kłaczk. Ilość toksyny zawartej w próbówce, w której jako pierwszej pojawiły się kłaczk, reprezentuje aktywność jednej jednostki antygenowej (flokulacyjnej) i oznaczana jest symbolem Lf. Z ilości takich jednostek flokulacyjnych, przypadających na mg N w badanym preparacie, wnioskować można o stopniu oczyszczenia antygeny. Preparaty krystalicznej toksyny, sporządzonej przez autora zawierały 3 000 Lf/mg N, podczas gdy najczystsze z dotychczas opisanych toksyn zawierały co najwyżej 2 000 — 2 400 Lf/mg N.

Oczyszczoną toksynę poddano analizie metodami dyfuzji w żelu Ouchterlonyego, jak też Oakleya i Fulthorpe'a. Porównawcze badania wykazały, że z toksyną autora powstaje jedna tylko linia precypitacyjna, zaś ze słabiej oczyszczonymi preparatami ilość linii precypitacyjnych jest większa.

Toksyna oczyszczona zmienia się, podobnie jak inne toksyny, pod wpływem formaldehydu i wyższej ciepłoty na tak zwaną anatoksynę, czyli preparat pozbawiony toksyczności, lecz posiadający zdolność uodparniania. Uzyskana tą drogą anatoksyna ulega też adsorpcji na rozmaitych solach, podobnie jak inne anatoksyny. Autor zastosował adsorpcję na fosforanie wapniowym i uzyskał tą drogą preparat znacznie bardziej aktywny biologicznie od preparatów adsorpcyjnych na solach glinu.

Uodpornianiem objęto głównie konie, używane ogólnie, jak wiadomo, do produkcji surowic leczniczych, obok tego uodparniano też króliki. W przebiegu hiperimmunizacji koni kontrolowano stale nie tylko narastanie przeciwciał, lecz również ich jakość odczynem dyfuzji w żelu. Surowicę pobierano do doświadczeń w momencie, gdy przy maksymalnym stężeniu antytoksyn w odczynie dyfuzji surowica reaguje z toksyną w postaci jednej tylko linii precypitacyjnej. Gdy zwierzę dające taką surowicę nadal uodparniano oczyszczonym antygenem, właściwości surowicy ulegały zmianie i w odczynie dyfuzji notowano szereg linii precypitacji.

Na podstawie porównawczej analizy wyników uodparniania koni antygenami silnie i słabiej oczyszczonymi, podejmuje autor próbę wytłumaczenia pewnych zjawisk notowanych niejednokrotnie w przebiegu hiperimmunizacji.

Wiadomo, że niektóre zwierzęta nie wytwarzają surowic o wielkiej zawartości antytoksyn, mimo że były w normalny, odpowiedni sposób uodparniane. Autor wyjaśnia, że przyczyna zjawiska tkwi w użyciu słabo oczyszczonego antygenu do uodparniania. Jeśli zanieczyszczenia pobudzają zwierzę również do wytwarzania przeciwciał, czyli posiadają właściwości antygenowe, dochodzi niekiedy do zjawiska konkurencji między nimi a toksycznym antygenem błoniczym, którego działanie zostaje przytłumione.

Działanie toksyny ulega, jako wiadomo, zobojętnieniu przez swoistą antytoksynę. Dowodem tego są biologiczne doświadczenia na zwierzętach wrażliwych na toksynę. Ponadto toksyczne antygeny ulegają wytrąceniu (precypitacji, flokulacji), gdy zmieszamy je w próbówce ze swoistą surowicą antytoksyczną. Surowica zatem zwierzęcia (w tym przypadku konia) uodparnianego antytoksyną błoniczą posiada dwie różne właściwości: zobojętniającą i precypitującą (toksynę). Jeśli użyta do doświadczeń toksyna była świeża, należałoby oczekiwać, że wyniki oznaczania jej mocy metodą zobojętniania, czyli *in vivo* i metodą flokulacji, czyli *in vitro*, będą się pokrywać. Stosunek wartości uzyskanych obu metodami (w terminologii angielskiej *serum ratio*) byłby w takim przypadku równy 1. W rzeczywistości stosunek ten bywa często mniejszy lub większy od 1.

Już w okresie międzywojennym wysunięto z niektórych stron hipotezę, że istnieć muszą różnorodne antytoksyny o odmiennych właściwościach biologicznych. Silne podstawy dla tej hipotezy znaleziono w wynikach analiz biochemicznych, które dowiodły, że w ślad za uodpornianiem ustrój zwierzęcy wytwarza antytoksyny związane z frakcją γ - jak też i β -globulinową. Wydawało się też, że sprawa różnic w wynikach mianowania mocy toksyn jest wyjaśniona, gdy stwierdzono, że w początkowym okresie uodparniania zwierzę wytwarza głównie antytoksynę γ -globulinową, a w późnym okresie uodparniania—antytoksynę β -globulinową. Z surowicami końskimi, zawierającymi antytoksynę γ -globulinową, stosunek wartości *in vivo/in vitro* był wysoki, wyższy od 1, a z surowicami zawierającymi β -globulinową antytoksynę — niższy od 1. Wkrótce zaczęły się jednak mnożyć spostrzeżenia budzące wątpliwości co do słuszności poglądów, łączących wyniki oznaczania mocy toksyn *in vivo* i *in vitro* z właściwościami elektroforetycznymi antytoksyn. Autor zaobserwował np. konie, które wytwarzały tylko jednego rodzaju antytoksynę: albo γ -globulinową albo też β -globulinową. Co więcej, autor obserwował takie przypadki, w których stosunek *in vivo/in vitro* był niski, mimo że surowica zawierała antytoksynę γ -globulinową.

Ilościowo wykonywane odczyny precypitacji przy użyciu znakowanej toksyny rzuciły nowe światło na zagadnienie różnicowania antytoksyn. (Toksynę znakowano przy pomocy ^{131}I według metody Masouredisa, opracowanej dla znakowania albuminy; za przykładem Pappenheimera podjęte próby znakowania toksyny drogą hodowli maczugowca w podłożu zawierającym ^{35}S wypadły ujemnie w Instytucie Pasteura). Przebieg tych doświadczeń dowiódł, że między antytoksynami zachodzą różnice niezależne od ich właściwości elektroforetycznych. Antytoksyny zobojętniające są odmienne od antytoksyn flokulujących czy precypitujących.

Dalsze obserwacje wykazały, że wynik miareczkowania mocy toksyn *in vivo* i *in vitro* zależy od stanu odporności koni w chwili rozpoczęcia cyklu uodparniania. Konie posiadające tak zwaną odporność podstawową w chwili rozpoczęcia cyklu hiperimmunizacji wytwarzają istotnie początkowo antytoksynę γ -globulinową, z którą stosunek mianowania toksyny *in vivo/in vitro* jest większy od 1. Z powstającą później antytoksyną β jest tu ten stosunek nieznacznie niższy od 1. Konie natomiast nie wykazujące stanu odporności podstawowej w chwili rozpoczę-

cia cyklu uodparniania wytwarzają antytoksyny, z którymi stosunek *in vivo/in vitro* jest zawsze niski: mniejszy od 1, mimo że wytwarzają również antytoksynę γ -, a następnie β -globulinową.

W oparciu o stwierdzony fakt zróżnicowania antytoksyn usiłuje również autor wytłumaczyć zjawisko zróżnicowania surowic pod względem ich „powinowactwa” (*aviditas*). W ciągu kilkudziesięciu lat od jego poznania, tłumaczono w rozmaity sposób istotę tego zjawiska. Według poglądów panujących w chwili obecnej, różnice w powinowactwie surowic wynikają z tego, że jedne surowice tworzą z antygenem związki trwalsze, inne zaś — mniej trwałe, łatwiej ulegające dysocjacji. Według Relyvelda natomiast tak zwane powinowactwo zależy od tego, czy surowica zawiera więcej antytoksyn zobojętniających czy precypitujących. Gdy surowica zawiera więcej przeciwciał precypitujących niż zobojętniających, nie wykazuje powinowactwa.

Właściwości elektroforetyczne antytoksyn wywierają decydujący wpływ na kształt krzywej wyników przy ilościowym wykonywaniu odczynów precypitacji. Z surowicą zawierającą antytoksynę γ -globulinową krzywa ma kształt kłosa. Ten typ krzywej znany jest od dawna z odczynów między odpornościową, przeciwbiałkową surowicą króliczą a homologicznym białkiem, np. między białkiem ludzkim a surowicą królika uodparnianego typu białkiem. W piśmiennictwie spotyka się często dla tego rodzaju krzywej określenie „króliczy typ krzywej precypitacji”. Z surowicą koni hiperimmunizowanych przez długie miesiące, toksycznym białkiem w rodzaju antygenów błoniczych, a więc z surowicą zawierającą β -globulinowe przeciwciała, krzywa wyników odczynu jest u szczytu płaska, równa. Ten typ krzywej jest znany z odczynów flokulacji Ramona. W piśmiennictwie spotyka się często dla tego rodzaju krzywej określenie „koński typ krzywej precypitacji”. Doświadczenia autora dowiodły, że kształt krzywej nie ma nic wspólnego z gatunkowymi właściwościami dawcy surowicy, lecz wyłącznie — jak wspomniano — z właściwościami elektroforetycznymi przeciwciał powstałych po uodpornieniu.

Logicznie myśląc, należałoby przypuścić że jeśli antytoksyna błonicza nie jest związkiem jednorodnym, to i toksyna błonicza, która reaguje z antytoksyną zobojętniającą i precypitującą, z γ -globulinową i β -globulinową, nie może być związkiem jednorodnym. Przeciwno tej hipotezie wysunąć można by zastrzeżenie oparte na fałszu, że oczyszczona toksyna błonicza reaguje z homologiczną surowicą w odczynach dyfuzji w żelu w sposób charakterystyczny, dając tu mianowicie tylko jedną linię precypitacji. Dla rozstrzygnięcia tego problemu autor wykonał doświadczenia równoległe z toksyną oczyszczoną i z tą toksyną poddaną wpraw w trawieniu. W tym celu, podobnie jak przedtem Pope, podawał toksynę działaniu trypsyny. W odczynie dyfuzji w żelu z taką toksyną wyniki zależały od użytej surowicy. Z surowicami, z którymi wynik mianowania mocy toksyny *in vivo/in vitro* wyrażał się liczbą większą od 1, obserwowano 2—3 linii precypitacji. Autor wnioskuje z tych doświadczeń, że cząsteczka toksyny ma rozmaite — jak się wyraża — ugrupowania, z których każde reaguje z inną antytoksyną i z których każde po wprowadzeniu do ustroju zwierzęcego działać może jako bodziec immunologiczny.

W krótkiej stosunkowo ocenie nie mogłem, rzecz jasna, omówić wszystkich problemów poruszonych przez autora. A monografia napisana zwięźle zawiera duże bogactwo problemów. W załączonym piśmiennictwie (314 pozycji) uwzględniono najważniejsze prace z dziedziny, którą autor się zajmuje. Zapoznanie się z treścią monografii przyniesie bez wątpienia wielką korzyść każdemu mikrobiologowi, immunologowi i biochemikowi, zajmującemu się zagadnieniami toksyn i antytoksyn, i to nie tylko błoniczych.

H. Meisel

PRACE DOKTORSKIE

STANISŁAW BURACZEWSKI

Niektóre przemiany biochemiczne w buraku cukrowym oraz wpływ żelazicyjanku jako bodźca chemicznego

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor prof. dr Ignacy REIFER

Uchwała Rady Wydziału Rolniczego SGGW nadająca tytuł doktora nauk rolniczych z dnia 20.V.1959.

Celem pracy było zbadanie wpływu żelazicyjanku na rośliny buraka cukrowego. Doświadczenia prowadzone uprzednio przez Katedrę Biochemii SGGW wykazywały możliwość stymulującego działania żelazicyjanku na rośliny. Także wyniki prac M. Popowa o oddziaływaniu związków chemicznych na rośliny i szerokie stosowanie zabiegu stymulacji roślin uprawnych w Bułgarii zachęcały do podjęcia tego tematu.

Analiza roślin buraka cukrowego otrzymanych z nasion moczonych w roztworach żelazicyjanku potasowego nie wykazała wpływu tej substancji na oddychanie zielonych liści (współczynnik oddychania 0,7—0,9), zawartość cukrów, azotu ogólnego, asparaginy i glutaminy w okresie wegetacji w liściach i korzeniach oraz plon korzeni. Żelazicyjanek wpływał obniżająco na pobieranie tlenu przez kiełkujące nasiona (kłębki), przy czym badane dwie odmiany buraka reagowały w różny sposób na jego działanie. Nie stwierdzono różnic w sile i energii kiełkowania nasion.

Aktywność badanych procesów biochemicznych nie różniła się w roślinach traktowanych i nie traktowanych żelazicyjankiem. W zielonych liściach *in vitro* wykazano działanie enzymów cyklu pentozowego, przy czym stwierdzono, że aktywność dehydrogenazy kwasu 6-fosfoglikonowego była wyższa od aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanu; obecność błękitu metylenowego przyspieszała reakcję katalizowaną przez dehydrogenazę kwasu 6-fosfoglikonowego. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny homogenatów liści wynosił 84 mV w roślinach 25-dniowych i około 130 mV w roślinach 50- i 120-dniowych. Inhibicja cyjankiem i azydkiem obniżała pobieranie tlenu podczas oddychania liści o około 50%. W liściach znaleziono śladowe ilości cytruliny oraz bardzo aktywną transferazę cytrulinową.

Wyniki badań nie potwierdzają roli żelazicyjanku jako stymulatora buraka cukrowego. Wykryto jedynie jego wpływ na procesy oddechowe kiełkujących nasion.

Fragmenty pracy są opublikowane w *Acta Soc. Bot. Polon.* 28, 727 (1959) i *Acta Biochim. Polon.* 6, 447 (1959).

JERZY KĄCZKOWSKI

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Promotor prof. dr Ignacy REIFER

Uchwałą Rady Wydziału Rolnego SGGW nadała tytuł *doktora nauk rolniczych* w dniu 30 IX 1959 r.

Badania nad biologicznym rozkładem alkaloidów tropanowych w powiązaniu z drogami badań biosyntezy

W doborze tematu założono, że zbadanie produktów mikrobiologicznego rozkładu alkaloidów tropanowych dostarczyłoby pewnych informacji o możliwych produktach pośrednich na drodze biosyntezy tych alkaloidów w roślinach.

Wyizolowano z gleby i przebadano dwa szczepy bakterii zdolnych do rozkładania alkaloidów tropanowych i jeden z tych szczepów (z rodziny *Corynebacteriaceae*, rodzaju *Arthrobacter*) zastosowano w dalszych badaniach.

Chromatograficznie stwierdzono, że dwa kwaśne produkty i jeden zasadowy produkt bakteryjnego rozkładu atropiny posiadają w trzech układach wartości R_f identyczne z wartościami odpowiednich związków, powstałych w wyniku hydrolizy kwasowej, czy zasadowej tego alkaloidu. Na podstawie temperatur topnienia wyizolowanych produktów rozkładu bakteryjnego oraz porównania krzywej absorpcji w ultrafiolecie z krzywą podaną w literaturze dla kwasu tropowego zidentyfikowano wymienione produkty jako kwasy tropowy i atropowy oraz tropinę.

Drugi zasadowy produkt bakteryjnego rozkładu atropiny zbadano przez porównanie jego wartości R_f w różnych układach z odpowiednimi wartościami produktów takich przemian tropiny, jak utlenienie, odwodnienie, demetylacja itp. Produkt demetylacji tropiny — tropigenina — wykazywał w różnych układach wartości R_f identyczne z wartościami badanego drugiego zasadowego produktu rozkładu bakteryjnego.

Z proszku acetonowego z masy bakteryjnej uzyskano wyciąg enzymatyczny zdolny do hydrolizowania atropiny do tropiny i kwasu tropowego o znacznej aktywności.

W celu stwierdzenia, czy produkty rozkładu bakteryjnego atropiny mogą być równocześnie związkami przejściowymi na drodze biosyntezy tego alkaloidu w roślinie, wykonano doświadczenia z karmieniem roślin *Datura stramonium* L. mieszaniną tropiny i kwasu tropowego w stosunku stechiometrycznym. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość przebiegu reakcji estyfikacji między tymi związkami, gdyż ponad 50% prób roślin doświadczalnych wykazywało wzrost zawartości alkaloidów w stosunku do prób kontrolnych.

Fragmenty pracy są opublikowane w *Acta Soc. Bot. Polon.* 28, 677 (1959) oraz *Acta Microbiol. Polon.* Nr 2 (1960).

WANDA DOBRYSZYCKA

Białka moczu prawidłowego

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego i w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu

Promotor: Doc dr Wanda MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu, nadająca tytuł *doktora farmacji* z dn. 9.VII.1960

W pracy tej postawiono sobie za zadanie zbadać niektóre własności fizykochemiczne i biologiczne białek moczu prawidłowego, nie zawierającego uromukoidu pochodzenia nabłonkowego (uromukoidu Tamma i Horsfalla), który usuwano przez wysalanie.

Do oznaczania ilościowego białka w moczu zastosowano turbidimetryczną mikrometodę taninową Mejbaum-Katzenellenbogen, polegającą na oznaczeniu zmętnienia wywołanego przez powstawanie nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. Metoda ta okazała się również przydatna do oznaczania ilościowego białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym (mukoproteidów). Do zagęszczania białek moczu zastosowano taninę i kofeinę (Mejbaum-Katzenellenbogen). Zasada postępowania jest strącanie białka z rozcieńczonych roztworów za pomocą wodnego roztworu taniny i regeneracja zagęszczonego białka przy pomocy kofeiny. Opracowano warunki wytrącania połączeń białkowo-taninowych w moczu w zależności od *pH*, stężenia taniny i kofeiny. Osiągnięto 1000-krotne zagęszczenie białka. Z początkowego stężenia około 0,002 g/100 ml zagęszczano białko do stężenia 2—3 g/100 ml. Zagęszczanie białek moczu taniną i kofeiną trwa około 2 godzin, a więc jest szybsze od wszystkich stosowanych do tej pory metod zagęszczania. Zastosowano również taninę i kofeinę do zagęszczania frakcji białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym (BRS) w moczach prawidłowych. Osiągnięto zagęszczenie frakcji BRS do stężenia 4—5 g/100 ml.

Przeprowadzono elektroforezę bibułową w *pH* 8,6 zagęszczonych białek moczu, jak również zagęszczonej frakcji białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym. Rozkład frakcji białkowych w moczach prawidłowych był następujący: albuminy 28,8%, α_1 globuliny 11,6%, α_2 — 17,4%, β — 26,8%, γ — 15,4%. Rozkład frakcji białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym był następujący: albuminy 15,0%, α_1 globuliny 16,0%, α_2 — 17,8%, β — 33,9%, γ — 17,3%. Obliczono zawartość BRS w poszczególnych frakcjach białkowych i stwierdzono, że albuminy zawierają najwyżej 50% białek rozpuszczalnych w kwasie sulfosalicylowym, natomiast frakcje globulinowe mogą w poszczególnych przypadkach składać się całkowicie z białka rozpuszczalnego w kwasie sulfosalicylowym.

W zagęszczonym białku moczu, jak również w zagęszczonej frakcji BRS, stwierdzono obecność kwaśnych mukopolisacharydów (AMPS) przez barwienie błękitem alcjanowym. W czasie elektroforezy bibułowej w pH 8,6 AMPS dysocjowały od białka i dzieliły się na trzy frakcje, wędrujące do katody szybciej niż albuminy.

W zagęszczonym białku moczu prawidłowego szukano obecności niektórych białek biologicznie czynnych. Izohemaglutyniny, znajdujące się w γ -globulinach, jak również haptoglobina (α_2 mukoproteid), chociaż wykazane w moczach patologicznych o dużym stężeniu białka, dotychczas nie zostały opisane wśród białek moczu normalnego. W zagęszczonych białkach moczu, pochodzących od osobników o grupach krwi A, B lub O stwierdzono istnienie odpowiednich przeciwciał grupowych. Nie stwierdzono zależności między mianem izohemaglutynin w moczu i w surowicy krwi tych samych osobników. Zastosowano turbidymetryczną mikrometodę taninową do ilościowego oznaczania haptoglobiny na podstawie elektroforezy bibułowej w pH 7,0. Metodę sprawdzono na surowicach normalnych, a następnie na zagęszczonych białkach moczków prawidłowych. Wykazano, że stężenie haptoglobiny w moczu wynosiło 15–70 mg^ol.

Zagęszczenie białek moczków prawidłowych taniną i kofeiną pozwoliło na uzyskanie białek o niezmiennych właściwościach fizykochemicznych (rozpuszczalność w kwasie sulfosalicylowym, zawartość kwaśnych mukopolisacharydów, ruchliwość elektroforetyczna na bibule). Zagęszczone białka mają również niezmienną aktywność biologiczną, co wykazano na przykładzie izohemaglutynin i haptoglobiny.

Fragmenty pracy zostały wydrukowane w *Archiwum Immunologii i Terapii Doświadczalnej* 7, 491 i 501 (1959). Część referatowa jest przyjęta do druku w *Postęпах Medycyny i Terapii Doświadczalnej*.

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Setna rocznica urodzin Stanisława Kostaneckiego

W dniu 16 kwietnia 1960 roku minęła setna rocznica urodzin Stanisława Kostaneckiego, profesora chemii organicznej Uniwersytetu w Bernie (Szwajcaria) w latach 1890—1910. Niestrudzony ten badacz barwników roślinnych i twórca chemii flawonoidów w ciągu swej dwudziestoletniej pracy na katedrze w Bernie wykształcił liczny zastęp chemików, a wśród nich wielu Polaków.

Pamięć wielkiego badacza uczciło Polskie Towarzystwo Chemiczne na specjalnym posiedzeniu, w którym wziął udział prof. dr Wiktor Lampe, uczeń i współpracownik Stanisława Kostaneckiego.

Symposium Biochemiczne w Białymstoku

Kontynuując sympozja zwoływane w latach poprzednich przez Komitet Biochemiczny Polskiej Akademii Nauk, Polskie Towarzystwo Biochemiczne zorganizowało w roku bieżącym w Białymstoku nowe Symposium będące siódmą z kolei imprezą tego typu w Polsce. Tym razem zasadniczym celem Symposium nie było przedstawianie sprawozdań z prac dotowanych przez Polską Akademię Nauk, ale wymiana zdań i poglądów na temat pewnych zagadnień opracowywanych w Polsce w szeregu ośrodków, a więc problemów, w zakresie których wielu pracowników na polu biochemii w Polsce ma już poważne osobiste doświadczenie.

Symposium odbyło się w dniach 8 i 9.IX.1960 r. i obradowało na temat trzech problemów: 1) wielorakości i różnorodności enzymów biorących udział w procesach oddechowych (referaty podstawowe T. Szczepkowskiego z Krakowa i W. Tysarowskiego z Białegostoku), 2) rozdzielania i oczyszczania białek oraz sprawy jednorodności tych ciał (referaty podstawowe W. Ostrowskiego z Krakowa i A. Morawieckiego z Wrocławia), 3) aminokwasów moczu i zastosowania metod chromatograficznych w badaniu aminoacydury (referaty podstawowe J. Opieńskiej-Blauth z Lublina i I. Chmielewskiej z Warszawy). Ponadto wygłoszono kilka referatów wiążących się z powyżej wymienionymi zagadnieniami: K. Kleczkowski mówił o występowaniu cyklu ornitynowego u roślin, P. Wierzchowski — o frakcjonowaniu białek tuberkuliny, M. Bagdasarian przedstawił wyniki pięknych badań przeprowadzonych wspólnie z P. Szafrąnskimi nad udziałem nukleopeptydów w biosyntezie białka. S. Angielski i J. Rogulski przedstawili ciekawe badania nad aminoacydurią spowodowaną zatruciem kwasem maleinowym, a S. Z. Bromberg-Sz nekowa — wyniki swoich badań nad aminoacydurią w chorobach nerek.

Symposium otworzył i zamknął Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, B. Skarżyński. Tematyka zebrania ujęta była w 3 posiedzenia, którym przewodniczyli: J. Heller, B. Skarżyński i W. Mozołowski. Dyskusja nad poszczególnymi referatami, w której brało udział około 40 uczestników, była bardzo ożywiona i stała na wysokim poziomie, świadcząc wymownie o tym, że nasza młoda kadra naukowa ma już daleko poza sobą okres szkoleniowy

Symposium w Białymstoku zbiegło się z 65 rocznicą urodzin profesora Włodzimierza Mozołowskiego z Gdańska. Uczestnicy zebrania wśród serdecznych owacji oddali hołd zasłużonemu przedstawicielowi biochemii w naszym kraju, któremu wręczono pokaźny zeszyt *Acta Biochemica Polonica*, jemu właśnie poświęcony. W Symposium wziął również udział przebywający z krótką wizytą w Polsce dr H. Lardy z Uniwersytetu Wisconsin w Madison (St. Zjedn. Am. Płn.), który również uczestniczył w dyskusji.

Organizacja Symposium, którą zajął się zespół białostockich pracowników nauki z W. Tysarowskim na czele, była wzorowa, jakkolwiek zakwaterowanie 250 uczestników Symposium i roztoczenia opieki nad nimi nie było prostą sprawą. Starano się nie tylko o sprawny przebieg obrad, ale i o urozmaicenie wolnego czasu (udane słuchowisko w godzinach wieczornych na dziedzińcu pałacu Braniczkich, grzybobranie i wycieczka do Białowieży). Uczestnicy opuszczali Białystok wynosząc nie tylko wielkie korzyści naukowe, ale i pamięć serdecznej gościnności gospodarzy białostockich.

Symposium w Białymstoku było niewątpliwie udaną imprezą naukową świadczącą o tym, że biochemia polska znajduje się na drodze rozwojowej budzącej ufność w przyszłość tej dyscypliny w naszym kraju.

B. Skarżyński

Pełny tekst referatów wygłoszonych na symposium oraz głosów w dyskusji ukaże się w następnych zeszytach *Postępów Biochemii*.

Międzynarodowe

VIII Kołokwium na temat „Białka płynów ustrojowych” w Brugge

Corocznie od kilku lat w małym miasteczku flamandzkim Brugge w Belgii organizowane są przez Laboratorium Sint Jans Hospital, pod protektoratem prowincjonalnego rządu Zachodniej Flandrii, kołokwia poświęcone omówieniu postępów w badaniach białek i innych składników płynów ustrojowych. W bieżącym roku VIII z kolei kołokwium odbyło się w dniach 6—8 maja. Do udziału w konferencji zaproszono około 300 osób zajmujących się rozdziałem aminokwasów, peptydów oraz białek i badaniem zmian metabolicznych tych związków jako składników płynów ustrojowych. Podczas trwania obrad wygłoszono ponad 80 referatów i doniesień traktujących o następujących zagadnieniach: 1) metody rozdziału aminokwasów, 2) własności bibuły i żelów jako środowiska dla elektroforezy białek, 3) metabolizm białek znakowanych izotopami, 4) immunoelektroforeza, 5) nowe metody badania białek, 6) glikoproteidy, 7) własności niektórych wyizolowanych białek, 8) metody kliniczne, 9) płyn mózgo-rdzeniowy, 10) dysproteinemie.

Obrady odbywały się w trzech sekcjach, których posiedzenia poprzedziła sesja plenarna. Na tej sesji wygłosili referaty m. in. Wunderly (Zurych) na temat struktury żelu agarowego, Grabar (Paryż) opisał nową metodę wykrywania glikoproteidów na żelu agarowym w postaci pochodnych fenylohydrazyny po uprzednim utlenieniu cukrowców kwasem nadjodowym. Orehowicz (Moskwa) mówił o rozdziale pepsyny i pepsynogenu za pomocą dwuetyloaminoetylocelulozy, a Bodman (Londyn) omówił szczegółowo rolę cukrowców, a zwłaszcza kwasu

sialinowego związanego z białkami w procesach fizjologicznych i patologicznych, głównie w schorzeniach nowotworowych. Peeters (Brugge), organizator kolokwium, przedstawił wyniki rozdziału lipoproteidów surowicy za pomocą wysokonapięciowej elektroforezy bibułowej. Zamiast referatu autor zaprezentował piękny kolorowy film ilustrujący szczegóły metodyczne i uzyskane wyniki. Przesuwaniu się obrazów filmowych towarzyszyła dyskretnie oryginalna flamandzka muzyka ludowa. Ten artystyczny sposób referowania osiągnięć naukowych spotkał się z ogólnym uznaniem.

Przebieg obrad w poszczególnych sekcjach (nowe techniki, biochemia i patologia), przedstawiał się następująco:

1. Na temat rozdziału aminokwasów wyróżniały się dwa doniesienia. Morris (Londyn) przedstawił wyniki rozdziału mieszaniny aminokwasów za pomocą wysokonapięciowej elektroforezy bibułowej. Jako elektrolitu używał mieszaniny kwasu mrówkowego, kwasu octowego i wody o pH 1,81 do 1,85. Przy zastosowaniu spadku potencjału 75—100 V/cm autor uzyskał kompletny rozdział prawie wszystkich aminokwasów w postaci ostrych smug. Bayer (Karlsruhe) zastosował chromatografię w fazie gazowej do rozdziału aminokwasów. Przez przeprowadzenie aminokwasów w odpowiednie lotne pochodne (estry N-acylo pochodnych aminokwasów) można je rozdzielić za pomocą wspomnianej techniki. Wyniki jednak nie są zadowalające i z uwagi na żmudne przygotowania wstępne nie wydaje się, aby ta metoda szybko się przyjęła. Zasługuje jednak na podkreślenie ze względu na oryginalne podejście.

2. Grüne (Kassel) omówiła fizykochemiczne własności różnych gatunków bibuły oraz jej przydatność dla chromatografii i elektroforezy. Bibuła z włókien szklanych oraz acetylowanej celulozy posiada szczególnie dogodne własności zarówno do wyżej wspomnianych celów, jak i jako porowate folie stosowane, np. do elektrodializy. Następne doniesienia tej sesji poświęcone były omówieniu własności żelu agarowego i skrobiowego do celów immunochemicznych. Metoda podwójnej dyfuzji dla badania własności układu antygen—antycało była szczegółowo przedstawiona przez Meffroy-Biget i Salvinien (Montpelier). Badano warunki, w jakich współczynnik dyfuzji smugi precypitacyjnej jest stały i daje się najłatwiej wyznaczyć, co ma praktyczne znaczenie dla charakterystyki białek posiadających własności antygenowe.

3. Białka znakowane radioaktywnym węglem, jodem bądź też siarką, były używane do śledzenia różnych procesów związanych z ich metabolizmem, wytwarzaniem przeciwciał, rozmieszczeniem w organizmie etc. Timasheff i Townend (Filadelfia) przedstawili wyniki badań genetycznej kontroli występowania form A i B beta-laktoglobulinu. Badania oparto na fakcie, że to białko w kwaśnym pH rozpada się na dwa połówkowe fragmenty i z powrotem asocjuje przy zobojętnianiu na cząsteczkę o masie 36 000. Dla wyjaśnienia, w jaki sposób może tworzyć się hybryd beta-laktoglobulinów A i B, zastosowano znakowany C¹⁴-waliną beta-laktoglobulin A, podczas gdy odmiana B była nieradioaktywna. Mieszaninę obu składników zakwaszano, następnie zobojętniano i rozdzielano elektroforetycznie na frakcje. Na tej podstawie stwierdzono, że obie połówki obu form beta-laktoglobulinu są identyczne. Różnica strukturalna pomiędzy A i B, która indukowana jest genetycznie, dotyczyć ma tylko miejsca, gdzie obie podjednostki wiążą się razem, natomiast nie jest związana z wewnątrzcząsteczkowym przesunięciem, jak to ma miejsce w przypadku hemoglobin.

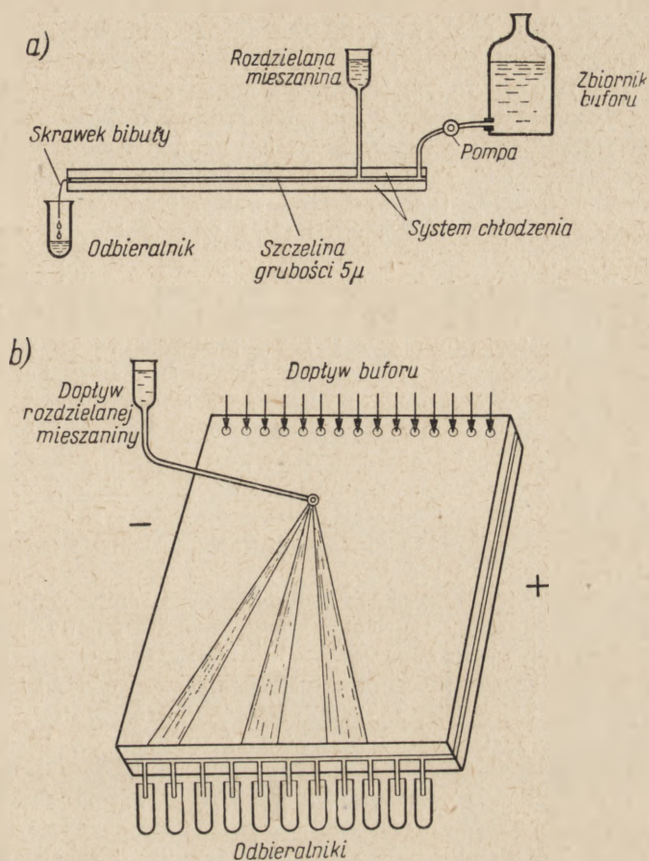
4. Najwięcej referatów i dyskusji poświęcono metodyce immunoelektroforezy i jej wynikom. Przez hydrolizę fibrynogenu za pomocą plazminy otrzymano dwa

polipeptydy dające się rozdzielić elektroforetycznie (Grabar i współprac., Paryż) oraz na kolumnie z wymiennikiem celulozowym. Badając następnie reakcję obu fragmentów z surowicą, zawierającą przeciwciała przeciw fibrynogenowi, stwierdzono, że oba polipeptydy wykazują własności antygenowe w równym stopniu, dając strąty z surowicą odpornościową. Z tych obserwacji wynika, że oba składniki fibrynogenu zawierają ugrupowania antygenowe i reagują z przeciwciałem niezależnie jeden od drugiego. Fakt ten obrazuje heterogenność przeciwciał przeciwbiałkowych. Interesującym podejściem metodycznym było przedstawione przez Clausena (Kopenhaga) połączenie immunoelektroforezy z autoradiografią. Przed rozdziałem elektroforetycznym dodawano do surowicy znakowane substancje transportowane normalnie przez białka surowicy, jak np. tyroksyna i jej pochodne, żelazo, witamin B₁₂ i inne. Po uzyskaniu smug precypitacyjnych wykonywano autoradiogram porównując oba obrazy. Autor wykazał, że tyroksyna i trójodotyrosyna transportowane są przez trzy różne frakcje, żelazo jest transportowane nie tylko przez beta-globulin, lecz także przez frakcje α_2 -globulinów. Witamin B₁₂ jest transportowany głównie przez frakcję α_2 -globulinów i przez albumin. Podobną technikę dla rozwiązania analogicznych zagadnień stosowali Aly i Gillich (Marburg).

Blanck (La Tour-de Peilz) zademonstrował metodę dwuwymiarowej immunoelektroforezy, która daje znacznie lepsze rozdzielenie składników surowicy, zwłaszcza frakcji α -, β - i γ -globulinów w porównaniu z jednowymiarową elektroforezą. Dubiski i Kelus (Warszawa) na podstawie analizy immunologicznej wykazali co najmniej 5 różnych antygenów we frakcji γ -globulinów krwi królika. Występowanie poszczególnych antygenów jest uwarunkowane genetycznie, co można było stwierdzić na podstawie segregacji poszczególnych populacji zwierząt. Antygenowe własności produktów hydrolizy papainą γ -globulinów królika badał Kelus i współpracownicy (Cambridge).

5. Zastosowanie przy rozdziale elektroforetycznym elektrolitu o małej sile jonowej ($\mu = 0,002$) daje znaczny wzrost ruchliwości białek i większe uwydatnienie różnic między poszczególnymi frakcjami. Przeprowadzenie elektroforezy w tak rozcieńczonym elektrolicie jest utrudnione zarówno w aparacie Tiseliusa, jak i za pomocą elektroforezy bibułowej na skutek silnego efektu elektroosmozy. Dlatego specjalnego znaczenia nabrała metoda rozdziału elektroforetycznego w środowisku stabilizowanym roztworem sacharozy, która zapobiega prądom konwekcyjnym i ogranicza elektroosmozę. Nyns i Lontie (Leuven) przedstawili szereg przykładów rozdziału mieszanin białkowych za pomocą elektroforezy w rozcieńczonych elektrolitach stabilizowanych sacharozą, uzyskując doskonały rozdział poszczególnych składników mieszaniny.

Grassmann i współpracownicy (Monachium) zademonstrowali nowe urządzenie do preparatywnego rozdziału substancji koloidowych w polu elektrycznym w roztworze swobodnym. Zasada tego postępowania jest podobna do tej, na jakiej jest oparta ciągła elektroforeza bibułowa z tą różnicą, że zamiast bibuły zastosowano cienką warstwę (ok. 5) elektrolitu niestabilizowanego, przepływającego w płaszczynie poziomej przez odpowiednio skonstruowaną chłodzoną komorę. Zasada aparatu przedstawiona jest na rys. 1. Za pomocą aparatu Grassmanna można rozdzielić preparatywnie w ciągu dnia około 100 ml surowicy i zebrać poszczególne frakcje do odbieralników. Jest to bardzo duży krok naprzód w rozwoju metod elektroforetycznego rozdziału mieszanin białkowych dla celów preparatywnych. Całkowicie wyeliminowano środowisko stałe i powrócono do roztworu swobodnego. Udało się w ten sposób usunąć zupełnie szkodliwe efekty elektrokinetyczne i adsorpcyjne związane ze środowiskiem stałym, a równocześnie



Rysunek 1. Schemat aparatu Grassmanna: a) widok z boku, b) widok z góry i z boku.

zachowana została zasada pasmowego rozdzielania frakcji w odróżnieniu od zasady stężenia frakcji w aparacie Tiseliusa. Wystawiony na wystawie aparat Grassmanna wzbudzi szczególnie żywe zainteresowanie wśród uczestników konferencji.

Referat niżej podpisanego dotyczył rozdzielania mieszanin białkowych w niskoprocentowym żelu agarowym z dodatkiem adsorbentów. Dodając do 0,2% żelu agarowego w stosownym buforze określoną ilość takich substancji jak skrobia, proszek celulozowy, celit, dwutlenek tytanu i Hyflo-super Cel, uzyskuje się środowisko, w którym 95—99% stanowi woda, a resztę składniki stałe. Przez to rozdział w takim układzie jest bardzo zbliżony do rozdzielania w swobodnym roztworze i cechuje się dużą zdolnością rozdzielczą. Szczególnie korzystne wyniki otrzymano przy stosowaniu 1—5% zawiesiny Hyflo-super Cel, który wykazuje niski efekt adsorpcji, elektroosmozy i zwiększa ruchliwość białek w porównaniu z czystym żelem agarowym.

6. Stosunkowo mało miejsca i czasu poświęcono glikoproteidom. Klasyczna metoda histochemicznego barwienia glikoproteidów na bibule, polegająca na utlenianiu kwasem nadjodowym i redukcji siarczynowej fuksyny, poddana została

krytyce (Holzer, Berlin); skrytykowano również modyfikację procedury Kōiv a i Grōwalla (Harboe i Hanssen, Kopenhaga) jako dającą w oryginalnej wersji wyniki trudno powtarzalne i nie nadające się do interpretacji ilościowej. Bourrillon i Michon (Paryż) izolowali z moczu glikoproteidy, frakcjonowali je za pomocą etanolu i charakteryzowali poszczególne frakcje. Otrzymano dwie frakcje o ciekawym składzie: heksoza, acetyloheksozamina, 6-dezoksyheksoza oraz kwas sialinowy; glikoproteid zawiera około 30% białka. Z płynu opłucnowego Michon i współpracownicy (Paryż) wyizolowali glikoproteid, który wykazuje własności fizykochemiczne orozomukoidu Winzlera, wyosobnionego z surowicy krwi i jest z nim identyczny.

7. Z różnych tkanek i płynów ustrojowych wyizolowano ostatnio kilka nowych białek oraz określono ich własności biologiczne. Z surowicy krwi Moretti (Paryż) wyizolował haptoglobiny: typ I i II, stwierdzając że haptoglobina II jest glikoproteidem. Przez frakcjonowanie białek śluzówki jelita bydłęcego Brady (Cork) uzyskał czysty preparat deaminazy adenosynowej wolny od zasadowej fosfatazy. Enzym wykazuje dużą specyficzność i dezaminuje tylko nukleotyd bądź też dezoksynukleozyd adeniny. Loeven (Lejda) wyosobnił z trzustki preparat, zawierający następujące czynniki: elastoproteinazę, elastomukazę, która wykazuje aktywność tylko w obecności elastoproteinazy, oraz czynnik E_2 , który powstaje z tej ostatniej jako produkt denaturacji i hamuje działanie elastomukazy.

8. Kilka referatów dotyczących metod chemiczno-klinicznych odnosiło się wyłącznie do oznaczania białka w surowicy lub w moczu. Tidstrom (Kopenhaga) przedstawił mikrometodę ilościowego oznaczania białka w moczu opartą na standardowym barwieniu pasków bibuły po elektroforetycznym rozdzieleniu. Białko oznacza się w 0,1 ml moczu z dokładnością do 4%. Podobne podejście do oznaczania fibrynogenu w osoczu zastosował Penaranda (Le Mans). Do krwi dodaje heparynę, którą zapobiega jej krzepnięciu. Podczas elektroforezy fibrynogen wędruje pomiędzy frakcjami β - i γ -globulinów, a po wybarwieniu paska określa się ilościowo stężenie włókniaka na podstawie odpowiednio sporządzonego standardu. Hollendoorn (Amsterdam) opisał metodę oznaczania fibrynogenu na podstawie pomiaru lepkości. Oznaczając fibrynogen w różnych stanach patologicznych autor stwierdził, że w niektórych schorzeniach obserwuje się kilkakrotny wzrost ilościowo stężenie włókniaka na podstawie odpowiednio sporządzonego standardu. Wania odczynów zmętnienia stosowanych w klinikach, jak odczynów: Kunkela, Mc Lagana, tymolowego etc. badał Hirayma (Marburg). Rozdzielał najpierw surowicę na żelu agarowym, następnie umieszczał płytkę w roztworze odpowiedniego odczynnika wywołującego zmętnienie z białkami surowicy. Wytworzone smugi wybarwiał i analizował. Przez zmianę stężenia odczynników, dodawanie przyspieszaczy i inhibitorów można było bliżej poznać mechanizm występowania dodatnich odczynów zmętnienia w różnych stanach patologicznych.

9. Wyniki badań nad składem białkowym prawidłowego i patologicznego płynu mózgowo-rdzeniowego były przedstawione w referatach Lowenthala i współpracowników (Antwerpia). Za pomocą tzw. enzymoelektroforezy autorzy badali szereg enzymów jak dehydrogenaza kwasu mlekowego, dehydrogenaza sorbitolu i inne, uzyskując cenne informacje na temat procesów enzymatycznych tkanki mózgowej podczas przebiegu schorzeń neurologicznych. Badania uzupełniane były kontrolą składu białkowego i aktywności enzymatycznej w surowicy krwi.

10. Współczesne metody preparatyki i analizy biochemicznej pozwalają na znacznie dokładniejsze opracowywanie problemów związanych z występowaniem i funkcją białek patologicznych, syntetyzowanych podczas zaburzeń systemowych.

Tzw. dysproteinemiom poświęcono z tego względu na kolokwium szczególnie dużo czasu. Podczas analizy surowic i moczu w przypadkach *plazmocytoma* stwierdzono, że w organizmie powstaje szereg odrębnych białek, wędrujących elektroforetycznie z α_2 -, β - i γ -globulinami. Białko Bence-Jonesa w moczu podczas analizy wykazuje do 7 odrębnych frakcji (Wie me, G a n d a w a), nie jest to więc jednorodny produkt przemiany szpiczaka mnogiego. Komórki szpiczaka transplutowano myszom, a następnie analizowano skład białek surowicy za pomocą elektroforezy i ultrawirówki. Na tej podstawie zróżnicowano 8 różnych typów komórek plazmatycznych, produkujących charakterystyczne odrębne typy białek, wędrujące podczas elektroforezy z różnymi frakcjami białek surowicy.

Przez zastosowanie immunofluorescencyjnej metody Coona wykazano, że patologiczne białka są produkowane przez nowotwór i obecne są w cytoplazmie jego komórek (F a h e y i współpracownicy, Londyn).

Inne badania dotyczyły czynnika reumatycznego, który został wyosobniony z surowicy pacjentów i scharakteryzowany przez C o k e'a (Londyn). K o h n (Londyn) badał występowanie tzw. białka C podczas oparzeń. Białko pojawia się w surowicy zwykle w 24 godzin po oparzeniu i narasta w zależności od rozległości oparzenia. W miarę postępu leczenia patologiczne białko zanika aż do momentu niewykrywalności. Duckert i współpracownicy (Zurych), stosując chromatografię na wymienniku celulozowym oraz elektroforezę na żelu skrobiowym, wyizolowali i scharakteryzowali niektóre czynniki biorące udział w krzepnięciu krwi. Otrzymano mianowicie w czystym stanie czynnik VII, X oraz przedfazowy akcelerator.

Interesującą właściwość siderofiliny stwierdził Schade (Bethesda). Proteid ten dodany do pożywki hamuje wzrost licznych szczepów bakterii, przy czym im bardziej białko jest niewysyczone żelazem, tym efekt hamujący jest wyższy. Na tej podstawie można nawet ilościowo mikrobiologicznie oznaczać siderofilinę w surowicy, używając np. szczepu *Staphylococcus aureus*.

Obrady VIII kolokwium w Brugge zakończone zostały przeglądowym referatem Huismana (Augusta — Georgia) na temat chromatograficznych metod rozdzielania białek.

Jak wspomniano organizatorem i gospodarzem kolokwium był dr Hubert Peeters, kierownik Laboratorium Sint Jans Hospital w Brugge, przy poparciu materialnym prowincjonalnego rządu Zachodniej Flandrii. W skład komitetu naukowego zjazdu wchodziły tacy naukowcy, jak P. Grabar, T. H. J. Huisman, R. Lontie, H. Peeters, H. E. Schultze, C. P. Stewart, A. Tiselius i Ch. Wunderly. Organizacja i obsługa zjazdu była doskonała, dokładnie przestrzegano czasu przeznaczanego na wygłaszanie referatów i na dyskusję. Ponieważ cały materiał kolokwium dotyczył głównie problemów metodycznych w zakresie badania białek, dość żywa dyskusja odnosiła się głównie do szczegółów technicznych opisywanych doświadczeń. W trzecim dniu obrad zorganizowano dyskusję okrągłego stołu poświęconą postępom frakcjonowania płynów ustrojowych. Przewodniczył dr Peeters, a w dyskusji brali udział najlepsi specjaliści z tej dziedziny obecni na konferencji.

Podczas obrad czynne były dwie wystawy: naukowa i przemysłowa, na których demonstrowano aparaturę z zakresu elektroforezy i chromatografii bibułowej. Pierwszego dnia obrad wieczorem odbył się wspólny obiad przy świecach w XIII-wiecznej sali Sint Jans Hospital. Następny wieczór uczestnicy kolokwium spędzili na przyjęciu wydanym przez gubernatora Zachodnich Flandrów w salach starego ratusza. Na zakończenie zjazdu organizatorzy przygotowali wycieczkę do

Ostendy, połączoną ze zwiedzaniem portu rybackiego oraz ogrodu i muzeum ornitologicznego ptaków wybrzeży Bałtyku.

W. Ostrowski

Kraków, dnia 11 czerwca 1960 r.

Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (I półrocze 1960 roku)

Oddział w Łodzi

W okresie sprawozdawczym odbyły się 4 zebrania naukowe Oddziału.

W dniu 9.XII.1959 r. W. Więckowski omówił zagadnienie mikrooznaczenia fosforu, a T. Krajewski i H. Urbanek referowali własną modyfikację metody Kutnera i Lichtensteina w zastosowaniu do mikrooznaczania fosforu na drodze suchej. W zebraniu wzięło udział 29 osób.

W dniu 13.I.1960 r. po dokończeniu dyskusji nad oznaczaniem fosforu H. Panusz omówił w oparciu o własne badania metody izolowania jąder komórkowych. Obecnych było 41 osób.

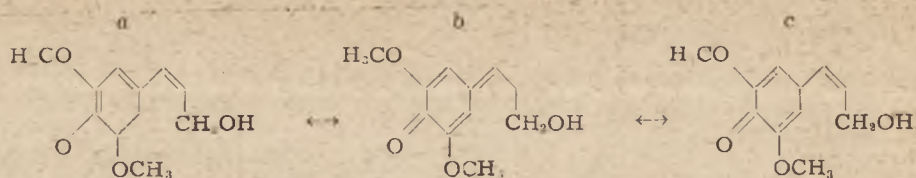
W dniu 9.III.1960 r. T. Krajewski przedstawił wyniki własnych badań nad budową fibrynogenu i włókniaka oraz udziałem w niej związków fosforowych. W zebraniu wzięło udział 21 osób.

Na IV posiedzeniu, wspólnym z Łódzkim Oddziałem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, przy udziale 40 osób, przedstawiono trzy referaty. R. Kadłubowski i S. Kofmatka omówili swoje badania nad działaniem ar. natycznych nitro- i aminozwiązków na dehydrogenazę kwasu bursztynowego *in vivo* i *in vitro*. Następnie R. Kadłubowski i H. Skałeczka przedstawili wyniki dalszych doświadczeń nad wpływem substancji wzrostowych na zawartość ciał czynnych w roślinach leczniczych. W ostatnim referacie W. Więckowski i M. Gniazdowski omówili własne badania nad oznaczaniem ilości fosforu.

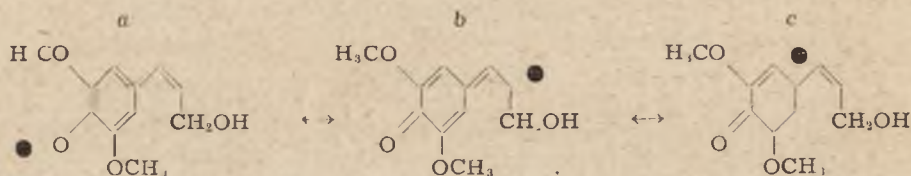
ERRATA

Str.	wiersz	jest	powinno być
3	4 od góry	DNA have	DNA have been
38	8 od góry	tcr obserwowali towa- rzą podaniu rybo- flawiny syn-	W żadnym doświad- czeniu nie udawało się jednak przeprowadze- nie syn-
75	5 od dołu	referacji	refrakcji
117	19 od góry	częściej	częściowej
149	10 od góry	żelazocyjanku	żelazicyjanku
181	3 od góry	acetoin	acetoin
249	7 od góry	1948	1958
250	16 od dołu	związania	zawiązania
251	19 od dołu	mikroelementów	makroelementów
252	18 od góry	<i>halictroides</i>	<i>thalictroides</i>
255	4 od dołu	właściwie	właściwym
256	2 od góry		450 mug
257	11 od dołu	<i>Acta Pichimica Polonica</i> 7 (1960)	<i>Medica Polonica</i> 1 27 (1990)
331	14 od dołu	Q ₆	Q ₉
347	5 od dołu	β	α
"	4 od dołu	14β	14α
"	3 od dołu	α	β
"	2 od dołu	14α	14β
348	1 od góry	14α	14β
"	3 od góry	14β	14α
358	w tablicy pozy- cja 5 od dołu	kwarcetyna	kwercetyna
369	15 od dołu	Toxines and antitoxi- nes	Toxine et antitoxine
404	1 od dołu	$[\alpha_2^A \beta_2^A]^{+2}$	$[\alpha_2^A \beta_2^{SA}]^{+2}$
405	6 od góry	$[\alpha^A \beta_2^C]^{+4}$	$[\alpha_2^A \beta_2^C]^{+4}$
"	9 od góry	$[\alpha_2^I \beta_2^A]$	$[\alpha_2^J \beta_2^A]$
430	4 od dołu	tiocetany	tiooctany
470	pozycja 141	Artherosclerosis	Atherosclerosis
"	pozycja 142	Artherosclerosis	Atherosclerosis
517	5 od góry	sive	sieve
522	19 od dołu	Moayle	Moyle

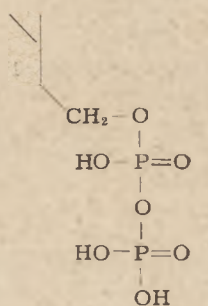
Str. 364, wzór III jest:



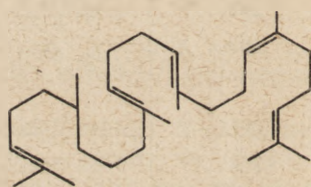
powinien być:



Str. 444 w schemacie 4 wzory są:

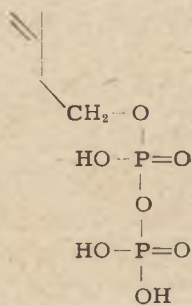


Czynny izopren

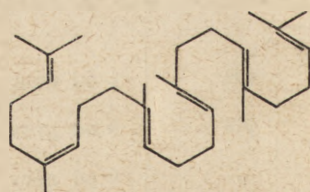


Skwalen

powinny być



Czynny izopren



Skwalen

SPIS TREŚCI

W. Leyko i L. Buczek — Budowa przestrzenna hemoglobiny	395
L. Żelewski — Rola dwufosforanowych koenzymów glikolizy	409
K. Toczko — Mechanizm działania tiaminy	425
J. Supniewski — Biosynteza i biooksydacja cholesterolu w tkankach zwierzęcych	437
M. Fikus — Kolagen kręgowców	471
S. Lewak — Składniki cukrowe antybiotyków makrolidowych	487
G. Jeske — Fizjologiczna funkcja korzenia w obiegu i metabolizmie związków organicznych w roślinie	501
Z. Turnowska-Starck — Przemieszczanie węglowodanów w roślinach	517
 KRONIKA	
Recenzja książki E. H. Relyvelda (H. Meisel)	533
Niektóre przemiany biochemiczne w buraku cukrowym oraz wpływ żelazicyjanku jako bodźca chemicznego (S. Buraczewski)	537
Badania nad biologicznym rozkładem alkaloidów tropanowych w powiązaniu z drogami ich biosyntezy (J. Kączkowski)	538
Białka moczu prawidłowego (W. Dobryszczycka)	539
Setna rocznica urodzin Stanisława Kostaneckiego	541
Symposium Biochemiczne w Białymstoku (B. Skarżyński)	541
Międzynarodowe VIII kolokwium na temat „Białka płynów ustrojowych” w Brugge (W. Ostrowski)	542
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	548

SPIS TREŚCI

W. Leyko i L. Buczek — Budowa przestrzenna hemoglobiny	395
L. Żelewski — Rola dwufosforanowych koenzymów glikolizy	409
K. Toczko — Mechanizm działania tiaminy	425
J. Supniewski — Biosynteza i biooksydacja cholesterolu w tkankach zwierzęcych	437
M. Fikus — Kolagen kręgowców	471
S. Lewak — Składniki cukrowe antybiotyków makrolidowych	487
G. Jeske — Fizjologiczna funkcja korzenia w obiegu i metabolizmie związków organicznych w roślinie	501
Z. Turnowska-Starck — Przemieszczanie węglowodanów w roślinach	517
 KRONIKA	
Recenzja książki E. H. Relyvelda (H. Meisel)	533
Niektóre przemiany biochemiczne w buraku cukrowym oraz wpływ żelazicyjanku jako bodźca chemicznego (S. Buraczewski)	537
Badania nad biologicznym rozkładem alkaloidów tropanowych w powiązaniu z drogami ich biosyntezy (J. Kączkowski)	538
Białka moczu prawidłowego (W. Dobryszczycka)	539
Setna rocznica urodzin Stanisława Kostaneckiego	541
Symposium Biochemiczne w Białymstoku (B. Skarżyński)	541
Międzynarodowe VIII kolokwium na temat „Białka płynów ustrojowych” w Brugge (W. Ostrowski)	542
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	548

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

Wykaz stosowanych skrótów czasopism podają *Roczniki Chem.* 30, 659 (1956).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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