

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

Handwritten signature

1966

tom 12

nr 2

KWARTALNIK

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej sens powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu a każda rubryka powinna być zaopatrzona w odpowiedni tytuł.

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1966
tom XII
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań), J. Trojanowski
(Lublin).

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa 12, ul. Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 508

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1966

Nakład 1390 (1239 + 151)	Oddano do składania 24.I.66 r.
Ark. wyd. 9,0. Ark. druk. 7,5	Podpisano do druku w kwietniu 66
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w kwietniu 66.
Cena zł 20.—	Zam. nr 159/66. M-64

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA.

Edmunda Bańkowska *, W. T. Dobrzański **, H. Osowiecki ***

Transformacje bakteryjne

Bacterial Transformations

The properties of transforming DNA, competence of recipient population, adsorption, penetration, integration and recombination of reacting DNA's, phenotypic expression of transformed cells and interspecific transformations are discussed.

Komórki niektórych szczepów bakteryjnych mogą uzyskać nową, trwałą cechę dziedziczną na skutek wniknięcia do nich kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) pochodzącego ze szczepu należącego do tego samego lub pokrewnego gatunku bakterii. Zjawisko to polega na wbudowaniu do genomu komórki biorcy małego segmentu egzogenego DNA, zawierającego nowy marker i zostało określone mianem transformacji.

Zjawisko transformacji bakterii odkrył Griffith w 1928 roku (80). Zakaził on myszki mieszaniną bakterii, która zawierała żywe, bezotoczkowe, a więc niezjadliwe dwoinki zapalenia płuc jednego typu i otoczkowe, ale zabite dwoinki zapalenia płuc innego typu. W organizmie myszki nastąpiła dziedziczna zmiana cech dwoinek zapalenia płuc; dwoinki bezotoczkowe stały się chorobotwórcze przez nabycie zdolności wytwarzania otoczek tego typu, który był swoisty dla zabitych otoczkowych dwoinek zapalenia płuc. Stosując podobną mieszaninę bakterii Dawson i Sia (47) otrzymali analogiczne wyniki *in vitro*. Badania Alloway'a (8) wykazały, że transformacja otoczkowa dwoinek zapalenia płuc zachodzi też *in vitro* w układzie, w którym martwe bakterie zastąpiono ekstraktami z komórek dawcy. Z doświadczeń tych wnioskowano, że z martwych otoczkowych dwoinek zapalenia płuc lub z ekstraktów z nich otrzymanych, przenika do żywych bezotoczkowych komórek jakaś substancja warunkująca powstanie otoczki.

Przez długi okres czasu natura chemiczna czynnika transformującego była nieznana. Dopiero w 1944 roku Avery i wsp. (14) udowodnili, że

* Dr, st. asystent Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

** Doc. dr, Zakład Mikrobiologii i Higieny AM w Warszawie

*** Dr, adiunkt Zakładu Mikrobiologii i Higieny AM w Warszawie

Wykaz skrótów: tDNA transformujący DNA

czynnikiem transformującym jest DNA. Było to wielkim krokiem naprzód w rozwoju badań biologicznych, ponieważ do tego czasu za czynną genetycznie substancję uważano białko. Preparaty DNA zachowują zdolność transformowania niezależnie od stopnia oczyszczenia. Hotchkiss (90) otrzymał z dwoinek zapalenia płuc preparaty transformującego DNA (tDNA) o zawartości białka nie większej niż 0,02%. Przy tym stopniu oczyszczenia ilość DNA, przypadająca na jedną transformowaną komórkę nie zawierała nawet jednej cząsteczki białka. Również Zamenhof i wsp. (240, 241) otrzymali wysoce oczyszczony preparat tDNA z *Hem. influenzae*. Niewielkie domieszki białka, kwasu rybonukleinowego (RNA) i czynnych serologicznie wielocukrów, nie mogły być przyczyną aktywności biologicznej preparatów transformujących. Późniejsze badania nad transformacją, jak i odkrycie zjawiska transdukcji i koniugacji u bakterii, oraz wyjaśnienie mechanizmu zakażenia komórek przez wirusy potwierdziły znaczenie kwasów nukleinowych — DNA i RNA — jako jedynych nośników cech genetycznych.

Zdolność ulegania transformacji zaobserwowano u szeregu szczepów należących do różnych rodzajów bakterii, a mianowicie: *Hemophilus* (4, 5, 76), *Neisseria* (7, 35, 36), *Pneumococcus* (96, 32, 139), *Streptococcus* (29, 158, 159, 168, 169, 170), *Bacillus* (85, 111, 122, 137, 198, 211), *Moraxella* (25, 26), *Rhizobium* (15, 17, 244, 245), *Agrobacterium* (104) i *Xanthomonas* (45, 46, 232). Boivin w 1945 roku (24), a niedawno Mehta i wsp. (140) donieśli także o transformacji u *Escherichia coli*, jednak pomimo licznych prób doświadczenia te nie znalazły dotąd potwierdzenia. Transformację u *E. coli* uzyskali natomiast Kaiser i Hogness (101) przy użyciu specjalnego systemu transformującego. Transformowali oni komórki mutantu *E. coli* K12 niezdolne do fermentacji galaktozy w komórki fermentujące, stosując tDNA izolowany z faga lambda dg (fag defektywny, transdukujący geny galaktozy; pochodzi on z faga lambda, który jest fagiem łagodnym dla *E. coli* K12). Warunkiem tej transformacji było poddanie lizogennych komórek biocy do działania faga lambda tuż przed lub równocześnie z wprowadzeniem do hodowli tDNA. Za pomocą tDNA wyodrębnionego z transdukujących fagów SP 10 i PBS 2 można również wywołać transformację u *Bac. subtilis* (124, 148). Transformujący DNA uzyskano także syntetycznie w układzie enzymatycznym Kornberga; donieśli o tym Litman i Szybalski (120).

Specjalny rodzaj transformacji opisali Abel i Trautner (2). Jest nim namnażanie wirusów ospy krowiej w komórkach *Bac. subtilis* po wprowadzeniu do komórek biocy podjednostek wirusowych zawierających głównie DNA. Autorzy zaproponowali dla zjawiska tego nazwę „transfekcja”, wskazując na pewne właściwości różniące je od klasycznej transformacji.

Różnorodność cech, które udało się transformować jest względnie duża. Oprócz zdolności syntezy wielocukrów otoczkowych przez *Dipl. pneumo-*

nae, *Hem. influenzae* i *Neisseria meningitidis*, udało się przekazać zdolność syntezy niektórych enzymów. U *Dipl. pneumoniae* wprowadzono za pomocą tDNA zdolność syntezy dehydrogenazy mannitolu (96, 133), amyloamaltazy (108), enzymu fermentującego salicynę (13), dehydrogenazy kwasu mlekowego (57, 231). U *Bac. subtilis* można wprowadzić zdolność syntezy sacharazy, β -galaktozydazy, enzymów potrzebnych do syntezy kwasu antranilowego, indolu, tryptofanu i kwasu nikotynowego (9, 144, 211, 212), histydyny (55) oraz argininy (125). Mutantom *Rhizobium* można w drodze transformacji przywrócić zdolność wytwarzania enzymu potrzebnego do syntezy cysteiny (16). Niezarodnikujące mutanty *Bac. subtilis* przez transformację mogą uzyskać zdolność do sporulacji (198, 199). U *Agrobacterium* opisano transformację szczepów niezdolnych dla roślin w kierunku zjadliwości (104). U dwoinek zapalenia płuc rosnących w postaci dwoinek (fil^-) można indukować zdolność do tworzenia łańcuszków (fil^+) (227), a u *Bac. subtilis* — ruchliwość (213). Jednak najczęściej badane jest przekazywanie w transformacji cech oporności na różne antybiotyki i inne leki. Często również transformuje się auktotrofy w prototrofy; tego typu zmiany są bardzo dogodne do badań, ponieważ umożliwiają selekcję transformantów, a zatem ilościowy pomiar transformacji. Według Z a m e n h o f a i wsp. (242) w procesie transformacji można też przenieść genetyczne determinanty określające stopień mutacji szeregu cech w danym szczepie.

I. Niektóre właściwości preparatów transformującego DNA

Stosując preparaty tDNA znaczone ^{32}P udowodniono ostatecznie, że w procesie transformacji DNA jest rzeczywiście pobierany do wnętrza komórek (113, 237). Pobieranie tDNA przez komórki i aktywność transformująca zależą od jego ciężaru cząsteczkowego. Preparaty tDNA z bakterii otrzymywane normalnie stosowanymi metodami (126) zawierają cząsteczki o ciężarze cząsteczkowym rzędu $1 \cdot 10^7$. Są to więc fragmenty genomu bakteryjnego, a nie cząsteczki odpowiadające całemu chromosomowi. (W czasie preparatyki chromosomy bakteryjne pękają, najprawdopodobniej w miejscach przypadkowych). Wskutek działania tzw. sił ścinających na cząsteczki DNA w roztworze (np. podczas pipetowania roztworu) występuje pękanie cząsteczek w połowie długości (88, 118). DNA o ciężarze cząsteczkowym niższym niż $1 \cdot 10^6$ nie powoduje transformacji bakterii (113, 114, 121, 182, 215). L e r m a n i T o l m a c h (113, 114) wykazali, że wraz ze zmniejszaniem ciężaru cząsteczkowego DNA nie tylko maleje aktywność transformacyjna, lecz również zmniejsza się ilość DNA wnikającego do komórek biorcy. Okazało się przy tym, iż aktywność transformacyjna jest ściślej uzależniona od stopnia spolimeryzowania DNA niż proces wnikania cząsteczek. Spadek zdolności do wnikania i transformacji jest niezależny od sposobu degradacji DNA. Występuje on po dzia-

łaniu na DNA ultradźwięków, po łagodnym traktowaniu dezoksyrybonukleazą (DN-aza) jak i po mechanicznej degradacji DNA.

Drugim warunkiem pobrania DNA przez komórki, oprócz stopnia jego spolimeryzowania, jest zachowanie struktury dwuniciowej. Dwuniciowa struktura charakterystyczna dla natywnego DNA może zostać zniszczona w wyniku denaturacji (135) pod wpływem niskiego lub wysokiego stężenia jonów wodorowych (136), formamidu (138) czy podwyższonej temperatury.

Temperatura, w której występuje denaturacja zależy od rodzaju DNA, siły jonowej i pH roztworu. W warunkach stosowanych przez większość autorów (0,015M cytrynian sodu w 0,15M NaCl o pH 7) (62, 128, 137) denaturacja wszystkich preparatów DNA zachodzi w granicach temperatur 60-120°C. W wyniku denaturacji dwuniciowa struktura DNA zostaje zniszczona wskutek rozerwania wiązań wodorowych między komplementarnymi nićmi, rozwinięcia się podwójnej spirali i rozdzielenia nici (136). Denaturacji DNA, zachodzącej w zakresie kilku stopni, towarzyszy efekt hyperchromazji, tzn. wzrost absorpcji w 260 m μ . Temperatura odpowiadająca połowie tego przyrostu absorpcji została nazwana temperaturą topnienia (temperatura krytyczna, temperatura przejścia) — T_m . Przy danej sile jonowej i pH wartość T_m roztworu DNA wykazuje liniową zależność od procentowego udziału sumy moli guaniny i cytozyny (G+C) w DNA — im wyższa zawartość G+C tym wyższa jest T_m (129, 130). Lepkość roztworów zdenaturowanego DNA jest niższa niż preparatów natywnego (50), natomiast wyższa jest gęstość w gradiencie CsCl (220) a jednocześnie DNA uzyskuje aktywność antygenową, która jest charakterystyczna tylko dla DNA w stanie jednoniciowym (115, 116). Zmienia się również wrażliwość na działanie pewnych czynników np. formaldehydu (214).

W czasie rozdzielania na pojedyncze nici w przebiegu denaturacji następuje spadek aktywności transformacyjnej DNA (51, 73, 81, 87, 114, 134, 180).

Poszczególne markery nie są inaktywowane jednocześnie a różnica temperatur inaktywacji dwóch różnych markerów może sięgać nawet kilku stopni. W DNA dwoinek zapalenia płuc np. cecha oporności na aminopterynę jest inaktywowana dopiero w temperaturze powyżej 93°, podczas gdy temperatura inaktywacji cechy oporności na mikrokocynę wynosi już 89° (180). Wskazywałoby to, że cząsteczki niosące poszczególne markery w danym preparacie DNA różnią się zawartością G+C.

Jednakże nawet zdenaturowane preparaty tDNA, poddane działaniu temperatury, powodującej zupełną denaturację syntetycznego poli(dG):(dC) wykazują resztkową aktywność transformacyjną (73, 87, 114, 134, 180). Wydaje się, że ta resztkowa aktywność w przypadku DNA z dwoinek zapalenia płuc oraz DNA z *Hem. influenzae* nie jest spowodowana większą opornością na ogrzewanie niewielkiej frakcji dwuniciowego DNA, ani

też renaturacją zachodzącą mimo niekorzystnych warunków, ale jest właściwością pojedynczych nici polinukleotydowych w zdenaturowanym preparacie DNA. Wskazują na to badania grupy Doty'ego (136, 184), Guilda (81) oraz Ginozy i Zimma (73). Za taką koncepcją przemawia między innymi fakt, że procent pozostałej aktywności jest niezależny od stężenia zdenaturowanego DNA. Według Rownda i wsp. (184) w przypadku *Hem. influenzae* byłyby to pojedyncze nici, najprawdopodobniej zawierające dużą ilość wewnątrznicowych wiązań wodorowych (20). Guild (81) uzyskał transformację przy pomocy zdenaturowanego DNA, który w gradiencie CsCl zajmował pozycję jednoniciowego DNA. Jednoniciowy DNA wnikał do komórek o wiele trudniej niż natywny DNA, dwuniciowy, ale jego aktywność transformująca odniesiona do ilości pobranej przez bakterie (mierzonej pobraniem ^{32}P) była nawet wyższa niż aktywność dwuniciowego DNA natywnego. Wyniki Guilda i Robinsona (84) a także Suzuki i wsp. (221) świadczyłyby, że obie nici zdenaturowanej cząsteczki DNA mogą wywoływać transformację, choć jedna nić niesie bezpośrednio informację, a druga może spowodować przekazanie nowej cechy dopiero po zsyntetyzowaniu nici komplementarnej obdarzonej markerem. Nowsze badania Rownda i Lannay (wg 135) wskazują jednak, że w zdenaturowanych preparatach DNA *Hem. influenzae* mogą istnieć cząsteczki tylko częściowo zdenaturowane, które zachowały w pewnym stopniu aktywność biologiczną. W przypadku DNA *Bac. subtilis* natomiast wydaje się bardziej prawdopodobne, że aktywność resztkowa jest związana z cząsteczkami, które zostały nie całkowicie rozdzielone i w których niewielkie fragmenty zachowują strukturę dwuniciową (21; Rownd i wsp. *Abstr. Biophys. Soc.* 1963, TB-7, cyt. wg 135), co stwarzałoby większą szansę reaktywacji takich cząsteczek niezależnie od stężenia preparatu.

Zdenaturowane preparaty DNA, które utraciły prawie całkowicie aktywność mogą ją w dużej mierze (do 60%) odzyskać przez powolne chłodzenie. W czasie takiej renaturacji następuje powtórne łączenie się pojedynczych komplementarnych nici (135). Renaturacja jest tym większa, im wyższe jest stężenie DNA w roztworze. W czasie renaturacji mogą powstawać cząsteczki-hybrydy DNA, w których każda z dwóch nici pochodzi z innego zdenaturowanego uprzednio preparatu. Hybrydy takie mogą powstać jedynie, jeśli sekwencje nukleotydowe „rodzicielskich” preparatów DNA są identyczne lub bardzo podobne; dlatego też renaturacja może być sprawdzianem heterologiczności lub homologiczności poszczególnych DNA (131). Gdy renaturuje się mieszaninę zdenaturowanych cząsteczek DNA pochodzących z dwóch różnych mutantów tego samego szczepu, a więc DNA, których sekwencja nukleotydów różni się tylko na bardzo małym odcinku, to stopień renaturacji jest równie wysoki jak przy renaturacji preparatu zawierającego DNA tylko z jednego szczepu (201). W ten sposób udało się Herriottowi (87) otrzymać

cząsteczki hybrydy DNA *Hem. influenzae* niosące aktywność transformującą pochodzącą równocześnie z obu „rodzicielskich” DNA. Można to było zaobserwować w wyniku renaturacji mieszaniny DNA *Hem. influenzae* opornego na nowobiocynę (katomycynę) i DNA *Hem. influenzae* opornego na streptomycynę (Sm). Pewien procent powstałych hybrydów DNA transformował szczep biorcy jednocześnie w kierunku oporności na Sm i nowobiocynę. Bresler i wsp. renaturując mieszaninę DNA z dwóch mutantów *Bac. subtilis* również otrzymali hybrydy mające zdolność transformowania biorców jednocześnie w kierunku obu, pierwotnie osobnych cech (30, 31). Wyniki te mogą wskazywać także na różny niż u dwoinek zapalenia płuc mechanizm pobierania tDNA i na odmienne jego losy we wnętrzu komórki biorcy. Sugerują one, że w przypadku *Hem. influenzae* i *Bac. subtilis*, tDNA nie tylko pobierany jest w formie dwuniciowej, ale że zachowuje on strukturę dwuniciową po wejściu do komórek i prawdopodobnie w takiej postaci jest wbudowywany do genomu biorcy (167).

Po długim ogrzewaniu roztworów DNA poniżej temperatury topnienia występuje tzw. inaktywacja subkrytyczna DNA (72, 73). Powoduje ona obniżenie, a następnie utratę aktywności transformacyjnej. Proces inaktywacji subkrytycznej jest nieodwracalny i straconej aktywności transformacyjnej nie można reaktywować. Inaktywacja ta jest spowodowana depurynacją oraz rozcinaniem łańcucha DNA na krótsze odcinki na skutek hydrolizy wiązań fosfodwuestrowych (53, 210). Wrażliwość poszczególnych markerów na takie ogrzewanie nie jest jednakowa. Wydaje się, że podstawą selektywnej inaktywacji subkrytycznej jest wielkość markerów — im większy marker, tym bardziej jest wrażliwy. Świadczy o tym m.in. większa wrażliwość kompleksu markerów sprzężonych niż poszczególnych markerów badanych osobno (180, 210).

Szeroki profil topnienia preparatu DNA, obejmujący kilka stopni, wskazuje na niejednorodność jego cząsteczek DNA pod względem zawartości G+C; np. profil topnienia DNA izolowanego z komórek organizmów wyższych wskazuje, że różnice między skrajnymi zawartościami G+C w cząsteczkach tego preparatu mogą sięgać kilku procent (71). Jak już wspominaliśmy, różne temperatury inaktywacji poszczególnych markerów mogą również sugerować, że cząsteczki DNA niosące poszczególne markery różnią się zawartością G+C (180). Z drugiej strony wiadomo, że DNA heterogenny pod względem składu nukleotydowego tworzy charakterystycznego kształtu pasma przy wirowaniu w gradiencie CsCl. Fakty te były podstawą do prób rozdzielania DNA na bardziej homogenne frakcje o zwiększonej zawartości poszczególnych markerów. Roger (179) frakcjonowała DNA dwoinek zapalenia płuc przez częściową denaturację w różnych temperaturach i następnie rozdzielała zdenaturowane i natywne DNA na kolumnie z ziemi okrzemkowej pokrytej metylowaną albuminą. Spośród badanych markerów najmniej wrażliwą na ogrzewa-

nie okazała się cecha oporności na aminopterynę. Aktywność transformacyjną oporności na aminopterynę znajdowano we frakcji natywnego DNA pozostającej po częściowej denaturacji. Przy nasycającym stężeniu DNA otrzymano około trzy razy większą liczbę transformantów stosując tę frakcję, niż gdy używano DNA niefrakcjonowanego. Wydaje się więc, że frakcja o kilkakrotnie zwiększonej specyficznej aktywności cechy oporności na aminopterynę zawierała stosunkowo więcej opornych na ogrzewanie cząsteczek DNA, niosących cechę oporności na aminopterynę, niż niezdenaturowanych cząsteczek niosących inne markery. Częściowe rozfrakcjonowanie aktywności transformacyjnej DNA dwoinek zapalenia płuc uzyskali również Rolfe i Ephrussi-Taylor (181) przy pomocy wirowania w gradiencie CsCl. Cząsteczki DNA niosące poszczególne markery były bardziej homogenne pod względem gęstości w gradiencie CsCl niż cały preparat DNA i wykazywały stałą średnią gęstość charakterystyczną dla danego markera, np. marker oporności na streptomycynę był związany z cząsteczkami DNA o wyższej gęstości niż większość preparatu DNA. Ganesan i Lenderberg (71) wykazali, że również w poszczególnych frakcjach tDNA z *Bac. subtilis* otrzymanych po wirowaniu w CsCl występują różnice w aktywności specyficznej szeregu markerów. Zgodne z wynikami ultrawirowania były profile inaktywacji cieplnej wskazujące na powiązanie różnych markerów z cząsteczkami o odmiennej zawartości G+C. Stosując częściową denaturację a następnie frakcjonowanie DNA w gradiencie CsCl Ganesan i Lederberg uzyskali około dziesięciokrotny wzrost aktywności specyficznej jednego z markerów — his 1 (wymaganie histydyny). Cząsteczki, z którymi związany był marker his 1 wykazywały o około 3% wyższą zawartość G+C niż cały preparat DNA. Próby frakcjonowania tDNA metodą chromatografii prócz bardzo dyskusyjnych wyników Lermana (112) i Bendicha (22, 23) nie dały pozytywnych rezultatów.

Należy podkreślić, że nawet w uwieńczonych powodzeniem próbach rozdzielania cząsteczek niosących różne markery zdołano uzyskać tylko kilkakrotny wzrost aktywności specyficznej. Wydaje się, że całkowite rozdzielenie od siebie cząsteczek DNA niosących różne markery jest niemożliwe, ponieważ cząsteczki uzyskiwane w czasie izolacji DNA z bakterii powstają w wyniku pęknięć chromosomu w przypadkowych miejscach. Jednocześnie prace Guilda (82, 83), Opary-Kubińskiej i Szybalskiego (149) oraz Mindicha i Hotchkissa (141) wskazują, że różnice w krytycznej temperaturze inaktywacji poszczególnych markerów mogą być spowodowane różną sekwencją nukleotydów w cząsteczkach niosących różne markery, a nie różnicami w procentowej zawartości G+C w tych cząsteczkach. Mindich i Hotchkiss wskazują również na niemożliwość porównywania wyników otrzymywanych różnymi metodami; wydaje się bowiem, że podczas gdy wartość T_m zależy

od sekwencji zasad w poszczególnych odcinkach DNA, to wyniki chromatografii kolumnowej i wirowania w gradiencie gęstości zależą od przeciwnego składu zasad całej cząsteczki DNA.

II. Wpływ promieniowania na transformujący DNA

Badanie wpływu różnego rodzaju promieniowania na tDNA daje informacje zarówno o samym zjawisku transformacji i właściwościach tDNA jak i o mechanizmie działania promieni na struktury biologicznie aktywne.

Ostatnie lata przyniosły wiele nowych danych o mechanizmie działania promieni UV na żywe komórki i na izolowane składniki komórek (patrz 48, 191, 202, 206, 207, 233). Z tego powodu omówimy przede wszystkim wpływ promieni UV na tDNA.

Naświetlenie transformującego DNA różnymi rodzajami promieniowania obniża jego aktywność biologiczną. Podobny skutek wywołuje rozpad atomów ^{32}P włączonych do DNA (66). Przy wzrastających dawkach energii, niezależnie od rodzaju promieniowania, stopniowo zmniejsza się aktywność biologiczna tDNA. Stopień inaktywacji a w pewnej mierze także kształt krzywej inaktywacji zależą od pochodzenia DNA, od postaci i stężenia naświetlanego preparatu DNA, od badanego markera oraz od warunków eksperymentu (166, inne pozycje piśm. patrz 173, 196). Stopień inaktywacji markera pod wpływem tej samej dawki promieni UV może być różny w zależności od tego, czy aktywność badano w transformacji homo- czy heterospecyficznej (P a k u ł a 155). W oparciu o analizę krzywych inaktywacji tDNA po naświetleniu promieniami jonizującymi, usiłowano określić przybliżoną wielkość różnych markerów wyrażoną jako ciężar cząsteczkowy. Obliczone wartości wahały się w granicach $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$. Ostatnio wyłania się jednak coraz więcej zastrzeżeń czy obliczenia te rzeczywiście prowadzą do określenia wielkości markerów (196).

Promienie UV w niewielkim tylko stopniu zmniejszają zdolność wnikania tDNA do komórek biocy, uszkadzają natomiast aktywność tDNA w dalszych fazach transformacji, prawdopodobnie przede wszystkim zdolność integracji tDNA z genomem biocy (114).

Kilku autorów zajmowało się zagadnieniem wrażliwości na promienie UV jedno- i dwuniciowego tDNA (natywnego, zdenaturowanego i renaturowanego ciepłem). Cabrera-Juárez i Herriott (33) nie stwierdzili różnic we wrażliwości na promienie UV markerów oporności na streptomycynę i nowobiocynę w natywnym i zdenaturowanym tDNA z *Hem. influenzae*. Natomiast Rebeyrotte (176) stwierdził u dwoinek zapalenia płuc, że marker oporności na streptomycynę był znacznie bardziej wrażliwy na UV w jednoniciowym tDNA niż w dwuniciowym. Badania wykonane przy użyciu bakterii i bakteriofagów ΦX174 wskazy-

wały na większą wrażliwość jednoniciowego DNA na UV (patrz W a c k e r 233). Następnie okazało się jednak (99, 236), że wrażliwość DNA faga Φ X174 w formie jednoniciowej i dwuniciowej jest *de facto* taka sama, a obserwowane poprzednio różnice zależały od właściwości szczepów bakteryjnych, na których po naświetleniu UV fag był namnażany. Różniczne obserwacje Cabrery-Juáreza i Herriotta oraz Rebeyrotte'a sugerują celowość skontrolowania i poszerzenia badań nad wrażliwością na promienie UV jedno- i dwuniciowego tDNA.

Porównywano także wrażliwość na promienie UV różnych markerów w tym samym preparacie tDNA oraz takich samych markerów w tDNA pochodzących z różnych bakterii (np. 33, 114, 155, 189, 203, 216, 243). Stwierdzono, że wrażliwość poszczególnych markerów może się dość znacznie różnić. Nie wszystkie obserwacje w cytowanych pracach są ze sobą zbieżne, oczywiście w grę wchodzić mogą różnice doświadczalne. I tak Rupert i Goodgal (189), Stuy (216) oraz Setlow i Setlow (203) donieśli, że w tDNA z *Hem. influenzae* marker oporności na streptomycynę był bardziej wrażliwy na UV niż marker oporności na nowobiocynę, natomiast Cabrera-Juárez i Herriott (33) stwierdzili, że marker oporności na streptomycynę był nieco mniej wrażliwy niż marker oporności na nowobiocynę. Wydaje się, że wrażliwość markera na UV jest tym większa im większy jest marker. Markery sprzężone wykazują większą wrażliwość na promienie UV, niż te same markery w przypadku ich oddzielnego występowania w tDNA, np. marker oporności na streptomycynę i nowobiocynę u *Hem. influenzae* (Stuy 216)*.

Porównanie wrażliwości na UV markera oporności na streptomycynę w tDNA z różnych bakterii (*Hem. influenzae*, *Dipl. pneumoniae*, *Streptococcus challis* i *Streptococcus sanguis*) wykazało, że jest ona różna w różnych tDNA — najwrażliwszym okazał się marker w *Hem. influenzae* (Pakuła 155).

W kwasie dezoksyrybonukleinowym promienie UV powodują dimezyzację tyminy, powstawanie dodatkowych wiązań między komplementarnymi łańcuchami DNA, powstawanie pewnych typów wiązań między DNA i białkiem w dezoksyrybonukleoproteidach, uwodnienie niektórych zasad oraz prawdopodobnie inne dotąd niezidentyfikowane zmiany. Wg Setlowa (202) dimezyzacja cząsteczek tyminy sąsiadujących w tym samym łańcuchu jest wśród dotychczas poznanych zmian jedyną tak znaczną ilościowo zmianą, że można ją tłumaczyć głęboki wpływ promieni UV na bakterie czy tDNA. Bezpośrednim dowodem na istotne biologiczne znaczenie dimezyzacji tyminy jest zwiększanie się ilości dimezów w miarę zwiększania dawki UV oraz częściowe odzyskanie aktyw-

* Ponadto wrażliwość markera może być uzależniona od składu i sekwencji nukleotydów (patrz *J. Cellular Comp. Physiol.* 64, nr 2 suppl. 1 (1964).

ności przez tDNA po rozszczepieniu dimerów tyminy w procesie fotoreaktywacji. Najnowsze obserwacje wskazują jednak również na możliwość poważnych skutków biologicznych fotohydratacji zasad DNA.

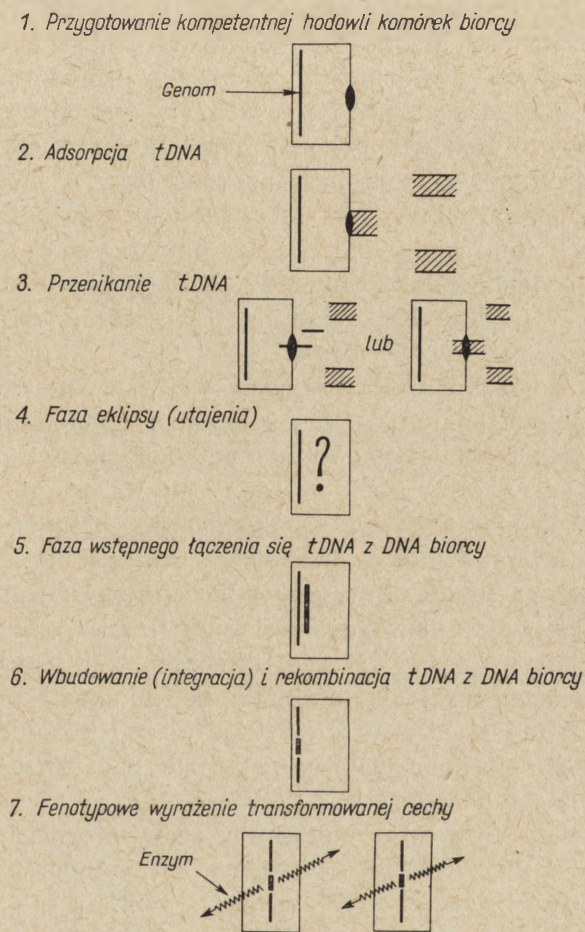
Zjawisku fotoreaktywacji uszkodzeń wywoływanych promieniami UV w komórkach bakteryjnych oraz w preparatach tDNA naświetlanych *in vitro* poświęcono wiele prac (97, 98, 188). Częściowa fotoreaktywacja *in vitro* tDNA inaktywowanego promieniami UV zachodzi a) jeśli tDNA naświetli się światłem widzialnym w obecności fotoreaktywujących enzymów zawartych w wyciągach z komórek *E. coli* lub z drożdży piekarskich; w ten sposób reaktywowano tDNA z *Hem. influenzae* i z *Dipl. pneumoniae* (78, 127, 132, 162, 177, 185, 186, 187, 190), b) jeśli zamiast enzymów reakcję katalizuje octan uranylu (cyt. wg W a c k e r a 233), c) jeśli na tDNA zinaktywowany promieniowaniem o długości fali 280 m μ działa się następnie promieniowaniem o krótszej fali (239 m μ) (203). Naświetlenie promieniami 239 m μ nie zwiększa jednak stopnia reaktywacji tDNA, w którym część uszkodzeń usunięto uprzednio działaniem światła widzialnego w obecności enzymu z drożdży piekarskich (204). Wynika to stąd, że mechanizm tych dwóch sposobów fotoreaktywacji jest taki sam i polega na rozszczepieniu dimerów tyminy powstałych pod wpływem promieni UV. Zjawisko fotoreaktywacji nie występuje po naświetleniu tDNA promieniami X oraz w tDNA, w którym część cząsteczek tyminy została zastąpiona 5-bromouracylem (np. 234).

Fotoreaktywacja nie jest jedynym mechanizmem usuwającym uszkodzenia w DNA powstałe po naświetleniu UV. Częściowe naprawienie uszkodzeń może nastąpić również w ciemności. Ostatnio stwierdzono, że w trakcie reaktywacji w ciemności u niektórych szczepów *E. coli* dimery tyminy są usuwane (wycinane) z DNA prawdopodobnie wskutek działania pewnych nukleaz (np. 27, 28, 205).

Powyżej omówiono działanie promieni UV na różne markery już obecne w tDNA poddanym naświetleniu. Wyłania się jednak pytanie, czy promienie UV działające *in vitro* na tDNA mogą spowodować pojawienie się w nim nowych markerów. Wiadomo, że promienie UV indukują *in vivo* różnego rodzaju mutacje, a także indukują mutacje u bakteriofagów znajdujących się zarówno w komórce jak i poza komórką (48). Ponadto w DNA wyizolowanym z komórki mogą pojawić się nowe markery pod wpływem takich mutagenów jak HNO₂ (89, 123, 217) czy hydroksyloamina (70). O powstaniu nowych markerów po naświetleniu promieniami UV tDNA z *Bac. subtilis* donieśli jak dotąd jedynie N e s t e r i L e d e r b e r g (144). Podobne próby z tDNA z *Hem. influenzae* i paciorkowców wypadły negatywnie (33, 150). J e n s e n i H a a s (100) nie mogli stwierdzić istnienia mutacji w tDNA izolowanym z komórek *Bac. subtilis* bezpośrednio lub wkrótce po ich naświetleniu promieniami UV. Autorzy ci są zdania, że do ujawnienia tych mutacji niezbędna jest replikacja DNA.

III. Etapy zjawiska transformacji

W zjawisku transformacji można wyróżnić kilka etapów: uzyskanie kompetentnej hodowli komórek biorcy, adsorpcja i następne przenikanie tDNA do kompetentnych komórek biorcy, wstępne łączenie się DNA dawcy i DNA biorcy, wbudowanie DNA dawcy do genomu biorcy, którego wynikiem jest rekombinacja obu DNA i w końcu fenotypowe wyrażenie nowonabytej cechy.



Rys. 1. Etapy transformacji

1. Kompetencja

Kompetencja bakterii jest przejściowym stanem populacji, w którym muszą się znajdować komórki biorcy w chwili reakcji z tDNA, aby mogło wystąpić zjawisko transformacji. Liczba gatunków bakterii, które dotychczas udało się transformować jest znikoma w porównaniu do liczby

znanych gatunków bakterii. Nie wiadomo czy przyczyną tego jest niezajomość warunków niezbędnych do uzyskania kompetencji w hodowli, czy też naturalna niezdolność do ulegania transformacji.

Czynnikiem ograniczającym możliwość transformacji u szeregu gatunków jest obecność w podłożu pozakomórkowej DN-azy wytworzonej przez populację biorcy, jak to ma miejsce w przypadku szczepów gronkoców złocistych. Istnienie grubych otoczek śluzowatych może również stanowić przeszkodę we wnikaniu DNA do wnętrza bakterii np. do dwoinek zapalenia płuc, u których jak wykazał R a v i n (172) zdolność komórek do transformacji jest tym mniejsza, im grubsza jest ich otoczka.

Warunki dla uzyskania kompetencji u szczepów transformujących się są bardzo swoiste. Dla każdego gatunku wymagane jest odpowiednie podłoże i warunki hodowli. Hodowle dwoinek zapalenia płuc stają się kompetentne w podłożu z albuminą lub surowicą (94). W hodowlach *Hem. influenzae* obecność albuminy nie jest wymagana, ale potrzebne są podłoża zawierające inne białka. Można co prawda uzyskać kompetencję *Hemophilus* w podłożu syntetycznym (109, 225), czy kompetencję dwoinek zapalenia płuc w podłożu bez albuminy (147), lecz wydajność transformacji będzie wówczas o wiele niższa.

Wydaje się, że kompetencja związana jest zarówno z cyklem życiowym poszczególnych komórek, jak i ze stanem fizjologicznym całej hodowli. U poszczególnych gatunków kompetencja pojawia się w różnym wieku hodowli i trwa przez różne okresy czasu. Narastanie jej może mieć charakter falowy, jak u dwoinek zapalenia płuc, co sugeruje powiązanie kompetencji z fazami cyklu podziałowego bakterii (92, 228). Szybkość pojawiania się kompetencji zależy od wielkości inokulum: przy większym inokulum kompetencja pojawia się wcześniej (164, 228).

W hodowli bakteryjnej tylko część komórek ulega transformacji. Wydajność transformacji waha się od ułamka do kilkunastu procent populacji biorcy w zależności od gatunku bakterii i warunków doświadczenia. Niemniej jednak T h o m a s (228) na podstawie badań nad transformacją dwoinek zapalenia płuc oraz S c h a e f f e r (193) w wyniku badań nad transformacją *Hem. influenzae* wnioskują, że w okresie szczytu kompetencji wszystkie komórki w populacji mogą być kompetentne. Niewielką wydajność transformacji Schaeffer tłumaczy tym, że nie do wszystkich komórek wnikają cząsteczki transformującego DNA niosące badany marker, lub że marker już po wniknięciu nie wbudowuje się do genomu biorcy. G o o d g a l i H e r r i o t t (77) nie potwierdzili poglądu Schaeffera. Autorzy ci na podstawie wyliczeń wydajności transformantów uzyskujących różne markery uważają, że w hodowli *Hem. influenzae* tylko część populacji staje się kompetentna. Do podobnego wniosku doszli też N e s t e r i S t o c k e r (143, 145) na podstawie badań nad transformacją *Bac. subtilis*. Stwierdzili oni, że kompetentne komórki *Bac. subtilis*, w odróżnieniu od niekompetentnych, są niewrażliwe na penicylinę, ponieważ

rozmnażanie i wzrost komórek kompetentnych są okresowo zahamowane. Na tej podstawie mogli wykazać, że tylko część populacji staje się kompetentna, ponieważ pozostała część była nadal wrażliwa na penicylinę. Komórki *Bac. subtilis*, które uzyskały kompetencję pozostają w tym stanie przez kilka godzin. Wydaje się więc, że u poszczególnych gatunków bakterii istnieją różnice w pojawianiu się kompetencji.

Mechanizm powstawania kompetencji komórek, umożliwiający wnikanie DNA do ich wnętrza, dotychczas nie jest zadowalająco wyjaśniony. Jedną z prób tłumaczenia tego zjawiska była hipoteza Thomasa, tzw. lokalnej protoplastyzacji komórek (228). Hipoteza ta opierała się na pewnych podobieństwach między komórkami kompetentnymi a częściowymi lub całkowitymi protoplastami. Według Thomasa po podziale komórki część jej powierzchni może nie być pokryta ścianą komórkową. Przez te obnażone miejsca DNA może wnikać do środka komórek w sposób mechaniczny lub częściowo mechaniczny. Na korzyść tej hipotezy może przemawiać falowy wzrost kompetencji w hodowlach, w których podziały są zsynchronizowane (92). W okresie kompetencji następuje zwiększenie przepuszczalności ściany komórkowej nie tylko dla DNA, ale również dla DN-azy (106, 229). Za hipotezą tą przemawiają także obserwacje Spizzena, że prekursorzy związków występujących w ścianie komórkowej hamują transformację (212), oraz że komórki kompetentne, podobnie jak protoplasty, są o wiele bardziej wrażliwe na szok osmotyczny niż cała populacja (229). Należy przy tym zaznaczyć, że protoplastów nie udało się znaleźć w hodowlach kompetentnych (211).

Przenikanie DNA prawdopodobnie nie jest jednak procesem zupełnie biernym, co implikuje hipoteza protoplastyzacji. Gdyby proces ten był bierny wówczas nie wytłumaczalne byłoby pobieranie przez komórki tylko wielkocząsteczkowego DNA, a nie pobieranie innych związków o ciężarze cząsteczkowym tego samego rzędu, a tym bardziej związków o mniejszych cząsteczkach — przede wszystkim DNA o ciężarze mniejszym niż 1×10^5 — 1×10^6 , czy oligonukleotydów (121, 182). Przeciwno hipotezie protoplastyzacji przemawia również wybiórczość w pobieraniu DNA występująca u niektórych transformujących się gatunków bakterii (194, 195). Wybiórczość ta objawia się tym, że pewne szczepy dobrze pobierają homologiczny DNA, a nie pobierają lub pobierają w zmniejszonych ilościach DNA heterologiczny. Obserwacje te wskazują, że mechanizm kompetencji jest prawdopodobnie dość złożony.

Fox i Hotchkiss (68) w przeciwieństwie do Thomasa starali się dowiedzieć, że pobieranie DNA przez komórki kompetentne jest procesem czynnym. Według tych autorów na enzymatyczny charakter procesu wskazuje zależność między rozwojem i spadkiem kompetencji a temperaturą oraz między stężeniem DNA a liczbą transformantów. Fox i Hotchkiss zakładali, że w okresie kompetencji bakterie syntetyzują na swojej powierzchni enzymy o swoistej zdolności wiązania DNA i wy-

liczyli, że kompetentne komórki dwoinek zapalenia płuc mają na swej powierzchni kilkadziesiąt miejsc adsorpcji (enzymatyczne receptory). Również Stuy i Stern (219) wskazują, że pobieranie tDNA przez kompetentne komórki *Hem. influenzae* nie ma charakteru biernego. Wydaje się, że kompetentne komórki *Hem. influenzae* posiadają dwa miejsca penetracji DNA (jedna komórka może pobierać jednocześnie tylko dwie cząsteczki DNA). Kinetyka procesu pobierania DNA, wyraźna zależność od temperatury, powodowanie przez 2,4-dwunitrofenol przedłużenia lag-fazy w pojawianiu się transformantów i zmniejszenia szybkości jej pojawiania sugerują udział systemu enzymatycznego w przenikaniu DNA przez ścianę komórkową. Dalsze badania nad kompetencją u bakterii, choć wniosły wiele nowych informacji, w dalszym ciągu nie dają możliwości stworzenia jasnego obrazu mechanizmu tego procesu.

Young i wsp. (239) stwierdzili istnienie różnic w składzie chemicznym ściany komórkowej u dobrze i słabo transformujących się szczepów *Bac. subtilis*. Young i Spizizen (238) zaobserwowali u *Bac. subtilis* obecność w ścianie komórkowej autolizującego enzymu, który działa na ściany komórkowe uwalniając przede wszystkim N-końcową alaninę i pewne niedializujące heteropolimery. Aktywność tego enzymu jest największa w komórkach o wysokiej zdolności do transformacji. Również badania Ephrussi-Taylor i Freed (60) nad dwoinkami zapalenia płuc wskazują na możliwość zmian w ścianie komórkowej tych bakterii w czasie kiedy rozwija się kompetencja. Autorki te wykazały, że w okresie maksymalnej kompetencji zmniejszone jest włączanie lizyny. Zahamowanie włączania lizyny, która wchodzi w skład mukopeptydu ściany komórkowej przy normalnym pobieraniu innych badanych aminokwasów, sugeruje zakłócenie syntezy składników ściany komórkowej, bez jednoczesnej zmiany w metabolizmie białek. Autorki przypuszczają, że podobnie jak u *Bac. subtilis*, w okresie kompetencji rośnie u pneumokoków aktywność enzymu autolitycznego, który swoiście uwalnia lizynę z mukopeptydu ściany komórkowej. U *Bac. subtilis*, Ephrati-Elizur (54) zauważył zależność między zdolnością do uzyskania kompetencji, a opornością komórek na aktynomycynę D; w miarę nabywania oporności malała zdolność do transformacji. Możliwe, że przyczyną jest tu również zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej, co zwiększa oporność na aktynomycynę, i co jednocześnie uniemożliwia przenikanie DNA do wnętrza komórek. Argumentem przemawiającym za powstawaniem w ścianie komórkowej zmian umożliwiających wnikanie DNA są wyniki badań Kaisera i Hognessa (101); wprowadzenie DNA, izolowanego z poronnie transdukujących fagów, do komórek *E. coli* było możliwe jedynie po uprzednim „przedziurawieniu” ścian komórkowych bakterii przez bakteriofaga. Wolne DNA fagowe może również zakazać protoplasty, nie może natomiast przenikać do normalnych komórek (208, 235).

Zespół Pakuły wykazał istnienie w przesączach kompetentnych hodowli paciorkowców, czynnika powodującego przekształcenie komórek niekompetentnych w kompetentne (164, 165). Przy użyciu tDNA znacznego ^{32}P wykazano, że potraktowanie niekompetentnych bakterii tym czynnikiem umożliwia im pobranie DNA (151). Czynnikiem ten można wytrącić i zageścić siarczanem amonu lub kwasem trójchlorooctowym (19, 165). Jest to związek wielkocząsteczkowy, najprawdopodobniej białko (wrażliwy na enzymy proteolityczne, inaktywuje się w temperaturze powyżej 60°), a dotychczasowe dane, przede wszystkim zaś kinetyka działania, wskazują na jego enzymatyczny charakter. Działanie czynnika wywołującego kompetencję zależy zarówno od czasu jak i temperatury, a optymalna temperatura wynosi 37° jak w większości reakcji enzymatycznych. Wydaje się, że czynnik ten wiąże się odwracalnie z powierzchnią bakterii: tą samą porcją czynnika po odwirowaniu komórek można wywołać kompetencję kolejno w kilku hodowlach bakteryjnych (157). Przy działaniu na drugą z kolei hodowlę bakterii, aktywność czynnika nieco wzrasta, co może sugerować, że płyn zawierający czynnik, zawiera także jakiś inhibitor, który w czasie pierwszego kontaktu z komórkami jest przez nie adsorbowany. Działanie czynnika wywołującego kompetencję ogranicza się prawie wyłącznie do szczepu, przez który został wytworzony. Udało się jednak czynnikiem wytwarzanym przez szczep paciorkowca *Challis* wymusić kompetencję u nietransformującego się w innych warunkach szczepu paciorkowca *Wicky* (165).

O wytwarzaniu podobnego wielkocząsteczkowego czynnika odpowiedzialnego za kompetencję w hodowlach dwoinek zapalenia płuc donieśli ostatnio Tomasz i Hotchkiss (230). Czynnikiem nazwany został przez autorów aktywatorem; wstępne badania sugerują że jest on białkiem. Wykazuje on większe niż u paciorkowców powinowactwo do ściany komórkowej i dlatego trudno jest wyodrębnić go z hodowli. Jednocześnie w hodowlach dwoinek zapalenia płuc pojawia się inhibitor, którego ilość narasta w miarę starzenia się hodowli; inhibitor ten hamuje reakcję wywoływaną przez aktywator, wskutek czego komórki nie ulegają transformacji. Nava i wsp. (142) twierdzą, że komórki kompetentne pneumokoków różnią się od niekompetentnych obecnością specjalnego antygeny na powierzchni komórki. Felkner i Wyss (63) zaobserwowali istnienie na powierzchni komórek *Bac. subtilis* „czynnika kompetencji”, którego nie udało się wykazać w komórkach niekompetentnych. Czynnikiem ten można wymyć z powierzchni komórek wodą destylowaną i po zagełczeniu można nim powodować przekształcanie komórek niekompetentnych w kompetentne. Felkner i Wyss uważają, że czynnik z *Bac. subtilis* w jakiś sposób wiąże się z tDNA ułatwiając jego wnikanie do wnętrza komórek. Natura chemiczna tego czynnika jest nieznana. Odwrotnie niż w przypadku czynnika prowokującego kompetencję u paciorkowców, wydaje się, że czynnik z *Bac. subtilis* wiąże się nieodwracalnie

z powierzchnią komórek — można go wyadsorbować z roztworu przez dodanie odpowiedniej ilości niekompetentnych bakterii.

Pomimo znacznych postępów w poznaniu mechanizmu czy mechanizmów kompetencji, zagadnienie to nie jest całkowicie wyjaśnione. Uzyskane dane wydają się wskazywać na różnorodność procesów kompetencji u różnych transformujących się szczepów, choć trudno obecnie ocenić czy różnice te dotyczą szczegółów tych mechanizmów czy ich natury. Z większości ostatnich prac wynika, że złożony proces pojawiania się kompetencji jest prawdopodobnie w części przypadków zjawiskiem natury enzymatycznej.

2. Wnikanie DNA do komórek biorecy

Pierwszą fazą przenikania DNA do wnętrza kompetentnej komórki jest jego adsorpcja. Używając DNA znaczonego ^{32}P Lerman i Tolmach (113), a następnie inni autorzy (68, 76, 77) stwierdzili, że część DNA adsorbuje się nieodwracalnie, część zaś odwracalnie. Część DNA zaadsorbowaną odwracalnie można usunąć z powierzchni komórki działaniem DN-azy, przemywaniem lub ociepleniem ochłodzonej hodowli (113). Dlatego też tylko nieodwracalnie związany DNA traktuje się jako taki, który przeniknął bariery komórkowe.

Kompetentne komórki w chwili pobierania DNA nie muszą rosnąć. Badania Pakuły i wsp. (157) nad etapami transformacji paciorkowców wymuszonej przez czynnik wywołujący kompetencję wykazały, że mierzone aktywnością transformacyjną pobranie tDNA przez komórki zawieszane w soli fizjologicznej wynosi zaledwie 10% ilości tDNA pobranego w pełnym podłożu. Dodanie do soli fizjologicznej bogatego podłoża transformacyjnego zwiększa pobieranie DNA proporcjonalnie do ilości dodanej pożywki. Obecność chloramfenikolu w podłożu bardzo nieznacznie zmniejsza pobieranie DNA, co wskazuje, że normalny metabolizm komórki nie jest w tym procesie konieczny. Obserwacje te są zgodne z wynikami wcześniejszych badań Goodgala i Herriotta (74, 77) oraz Stuyaa (218) nad *Hem. influenzae*. Ostatnio obserwacje te potwierdzili również Levin i Strauss (117). Brak wpływu chloramfenikolu na pobieranie DNA przez kompetentne komórki wydaje się wykluczać sugestię Kohiyamy i Saito (105) o pojawianiu się pod wpływem DNA indukcyjnej permeazy pozwalającej na wniknięcie DNA do wnętrza komórek. Nester i Stocker (143, 145) wykazali, że również komórki *Bac. subtilis* po uzyskaniu kompetencji mają bardzo ograniczony metabolizm: nie rosną, nie dzielą się i są niewrażliwe na penicylinę. Podobne rezultaty przyniosły obserwacje nad dwóinkami zapalenia płuc, u których uzyskano transformację dodając tDNA do kompetentnej hodowli zawieszanej w podłożu nie podtrzymującym wzrostu (68). Czynniki hamującymi pobieranie DNA są w przypadku *Hem. influenzae* wersen i 2,4-dwunitrofenol (219 wg 196, str. 120).

Pobieranie DNA przez komórki kompetentne nie ogranicza się do DNA homologicznego; do wnętrza komórek może również wnikać DNA izolowany z osobników należących do innych gatunków, co wykazano dwiema metodami. Pierwsza z nich polegała na porównaniu radioaktywności znajdującej się wewnątrz komórek po podaniu znakowanego ^{32}P DNA izolowanego z różnych gatunków bakterii, a nawet z organizmów wyższych. W drugiej metodzie określano obniżenie wydajności transformacji homologicznej przez równoczesne dodanie homo- lub heterologicznego DNA nie niosącego markera, a więc nietransformującego. Pakuła i wsp. (161) wykazali zupełny brak wybiórczości w pobieraniu DNA przez paciorkowce. DNA z różnych źródeł: z homologicznego gatunku, z innych gatunków bakterii oraz z grasicy cielęcej w jednakowym stopniu hamowały proces transformacji paciorkowców. Także dwoinki zapalenia płuc nie wykazują żadnej swoistości w pobieraniu DNA, co wykazali Lerman i Tolmach (113) przy pomocy DNA znakowanego ^{32}P , oraz Pakuła i wsp. (161, 162) metodą współzawodnictwa DNA w transformacji. Spizizen wykazał (212), że również komórki *Bac. subtilis* w jednakowym stopniu pobierają DNA pochodzące z różnych źródeł. Natomiast szczepy z rodzaju *Hemophilus* wykazują pewną wybiórczość w pobieraniu DNA: zahamowanie transformacji przez DNA z innych gatunków *Hemophilus* jest mniejsze niż przez DNA homologicznego szczepu, a DNA z odległych filogenetycznie gatunków bakterii np. z *E. coli* jak i DNA z grasicy cielęcej nie są w ogóle pobierane (194, 195, 197).

Wydaje się, że przenikanie transformującego DNA do komórek u różnych gatunków bakterii nie zachodzi w jednakowy sposób. Nie ma do tychczas możliwości bezpośredniego śledzenia procesu przenikania DNA, można o nim jedynie wnioskować na podstawie losów DNA już po penetracji do komórek. Wiele danych wskazuje, że u dwoinek zapalenia płuc do wnętrza komórek przenika tylko jedna nici DNA, choć warunkiem wysokiej wydajności przenikania jest dodanie tDNA w formie natywnej, dwuniciowej. Lacks (107) stwierdził, że w pierwszych minutach po pobraniu przez dwoinki zapalenia płuc tDNA znakowanego ^{32}P cała radioaktywność reizolowanego następnie z komórek biorcy DNA znajdowała się we frakcji jednoniciowego DNA, oraz we frakcji fosforu nieorganicznego. Równoległe przeprowadzone doświadczenia biologiczne wykazały, że DNA z komórek biorców izolowany w pierwszych 10 minutach po pobraniu tDNA, nie jest czynny biologicznie. Podobne wyniki uzyskali uprzednio Fox (64) oraz Fox i Hotchkiss (69). Na tej podstawie Lacks sugerował, że w czasie wnikania DNA do komórki, jego drugorzędowa struktura zostaje zniszczona, wobec czego wewnątrz komórki biorcy można odnaleźć DNA dawcy w formie jednoniciowej. Możliwe, że jest to wynikiem działania jakiegoś typu DN-azy znajdującej się na powierzchni komórki, która degraduje tylko jedną z dwu nici DNA. Richardson i wsp. (178) opisali egzonukleazę tzw. fosfatazę DNA wyizolowaną z *E. coli*,

która działa tylko na dwuniciowy DNA, rozpoczynając hydrolizę od 3'-hydroksylowego końca każdej nici. Dzięki temu około 50% każdej nici zostaje zdegradowane i pozostały DNA jest właściwie jednoniciowy, z obu stron zakończony grupami 5'-hydroksylowymi. Przejście formy jednoniciowej w dwuniciową w komórce biorcy wymaga pewnego okresu czasu. Po tym czasie, tzw. okresie *eklipsy*, można było z komórek biorców izolować biologicznie czynny DNA, zdolny do przekazywania nowo nabytej cechy następnym komórkom biorców.

Wyniki badań Lacksa, dowodzące wnikania jednej tylko nici do kompetentnych komórek dwoinek zapalenia płuc zostały poparte przez Foxa i Allena (67). Autorzy ci badali w gradiencie CsCl rozłożenie radioaktywności po wniknięciu do komórek biorców tDNA znaczonego jednocześnie D i ^{15}N . Stwierdzili oni, że w pierwszej minucie po pobraniu tDNA, radioaktywność znajduje się we frakcji jednoniciowego DNA, ale prawie natychmiast potem można ją odnaleźć we frakcji dwuniciowego DNA, będącego hybrydem DNA biorycy i DNA dawcy. Z frakcją tą jest związana cała aktywność biologiczna nowo wprowadzonego DNA. Badania te jednak nie pokrywają się z poprzednimi badaniami Foxa (65), z których wynikało, że do genomu biorycy wbudowywany jest DNA dawcy w formie dwuniciowej, nie podlegający w czasie penetracji do komórki, rozłożeniu na pojedyncze nici. Do tego wniosku Fox doszedł określając stopień utraty aktywności biologicznej reizolowanego z komórek biorycy DNA dawcy znakowanego ^{32}P ; stopień inaktywacji reizolowanego DNA był identyczny ze stopniem inaktywacji oryginalnego DNA użytego do transformacji.

Natomiast mechanizm wnikania DNA do komórek *Hem. influenzae* jest przypuszczalnie odmienny. U bakterii tych DNA prawdopodobnie wnika jako struktura dwuniciowa. Przemawiają za tym doświadczenia Herriotta (87), który transformował szczep *Hem. influenzae* za pomocą hybrydu DNA, otrzymanego drogą renaturacji mieszaniny dwóch preparatów zdenaturowanego DNA. Jedna nić tego DNA pochodziła z DNA szczepu opornego na nowobiocynę, a druga z DNA szczepu opornego na streptomycynę. Hybryd DNA indukował jednocześnie transformację obu tych cech w jednej komórce biorycy. Zatem do komórki biorycy musiały wnikać obie nici jednej cząsteczki DNA, ponieważ dwie jednocześnie transformowane cechy leżały na dwóch różnych niciach. Prawdopodobnie zatem DNA dawcy po wejściu do komórek biorycy nie znajdował się, nawet przejściowo, w postaci jednoniciowej. Obserwacje Voll i Goodgala (232) nad transformacją u *Hemophilus* wskazują na brak okresu *eklipsy* po wniknięciu tDNA do komórek tego drobnoustroju, co również świadczyłoby o przenikaniu do wnętrza komórek DNA w formie dwuniciowej. Jednak Schaeffer (196, str. 138) uważa, że dane z pracy Voll i Goodgala nie dowodzą z całą pewnością, że okres *eklipsy* nie występuje u *Hemophilus*.

Pene i Romig (167) frakcjonując w gradiencie chlorku cezu DNA izolowany ze świeżo przetransformowanych komórek doszli do wniosku, że u *Bac. subtilis*, podobnie jak u *Hem. influenzae*, tDNA przenika i wbudowuje się do genomu biorcy w formie dwuniciowej. Do tego samego wniosku doszli Bresler i wsp. (30, 31) uzyskując u *Bac. subtilis* jednoczesną transformację dwóch cech przez hybryd DNA, w którym każda z komplementarnych nici niosła tylko jeden z badanych markerów.

3. Wstępne łączenie się w pary tDNA z genomem biorecy

Według opinii Schaeffera (193) przed wbudowaniem markerów do genomu biorców i rekombinacją, niezbędne jest wstępne połączenie się w pary fragmentu DNA dawcy z chromosomem biorecy. Zdaniem tego autora niska wydajność transformacji heterospecyficznych spowodowana jest strukturalną niezgodnością transformującego kwasu dezoksyrybonukleinowego i DNA w chromosomie biorecy. Różna sekwencja zasad purynowych i pirymidynowych reagujących fragmentów nie pozwalałaby więc na dokładne dopasowanie się odpowiednich obszarów DNA dawcy i biorecy, co w konsekwencji uniemożliwiłoby całkowicie lub częściowo integrację lub rekombinację. W pewnym stopniu potwierdziły tę koncepcję badania Marmura i wsp. (137) przeprowadzone na pałeczkach z rodzaju *Bacillus* oraz Bańkowskiej (18) na paciorkowcach, dwoinkach zapalenia płuc i gronkowcach. Badania te wykazały, że gatunki, których DNA różni się zawartością G + C w granicach 0,5—1,0% nie transformują się lub tylko z niewielką wydajnością. Jednak Catlin i Cunningham na podstawie badań nad transformacjami heterospecyficznymi u *Neisseria* (43) sugerują, że w przypadku tych drobnoustrojów zawartość zasad G + C niekoniecznie musi być identyczna.

Przeciwko konieczności wstępnego łączenia się w pary tDNA z chromosomem przed jego integracją wydają się przemawiać wyniki Cavalieriego (44) i Ephrussi-Taylor (59). W lizatach dwoinki zapalenia płuc otrzymanych w ciągu pierwszych kilku minut po wnikięciu tDNA do komórek, autorzy ci mogli stwierdzić obecność tylko niskocząsteczkowych fragmentów DNA dawcy. Jednak Lacks (107) wykazał, że u dwoinki zapalenia płuc DNA transformujący można odnaleźć w komórkach biorców nie tylko we frakcji oligonukleotydowej lecz również w postaci wysokocząsteczkowej struktury jednoniciowej. Potwierdzili to Fox i Allen (67), wykazując, że, w DNA izolowanym z transformowanej populacji dwoinki zapalenia płuc, DNA dawcy można odnaleźć jedynie jako pojedynczą nić połączoną w podwójny łańcuch z DNA biorecy. Taki odcinek hybrydu DNA dawcy i biorecy obejmuje obszar 1-2 milionów daltonów, a DNA dawcy wydaje się być związany kowalennie z genomem biorecy.

Z prac R a v i n a i I y e r a (175) wynika, że duży wpływ na przebieg wstępnego łączenia się nici DNA w pary i na wydajność rekombinacji ma również wielkość cząsteczki tDNA, wnikającego do komórki biorcy.

4. Wbudowywanie markerów dawcy do genomu biorcy

Fragment genomu dawcy przyłączony wstępnie do chromosomu biorcy zawiera alternatywne cechy genetyczne w stosunku do markerów biorcy. Dla zastąpienia jednak cech biorcy przez markery dawcy muszą zajść określone procesy. Istotą tych procesów jest: 1) takie przyłączenie fragmentu DNA dawcy do genomu biorcy, że fragment ten zaczyna się replikować jednocześnie z chromosomem biorcy, 2) powstanie powiązań pomiędzy markerami istniejącymi i wprowadzonymi. Całość tych procesów określana była często terminem „integracja”. Ostatnio jednak S c h a e f f e r (196), a także H a y e s (86) sugerują ograniczenie stosowania pojęcia „integracja” tylko do zjawiska wbudowywania tDNA, a dla procesów powstawania powiązań między markerami rezerwują termin „rekombinacja”.

U organizmów wyższych posiadających podwójny garnitur chromosomalny, znane są dwa klasyczne schematy powstawania rekombinantów:

- a) *crossing over*, w którym chromosomy siostrzane pękają w homologicznych punktach i rekonstruują się przez wymianę i powtórne połączenie rozdzielonych części,
- b) *ccpy choice* (zmiana wzorca wybór matrycy, konwersja) kiedy chromosomy rodzicielskie stanowią tylko wzorec dla nowo syntetyzowanych replik, kopiowanych z jednego lub kolejno z obydwóch homologicznych chromosomów. W tym ostatnim przypadku kopiowanie może się odbywać synchronicznie lub niesynchronicznie.

Nie wiadomo jednak w jakim zakresie mechanizmy rekombinacji spotykane u organizmów wyższych odnoszą się do haploidalnych bakterii, zwłaszcza jeśli uwzględnimy przyjęty pogląd, że w komórkach bakterii chromosomem jest dwuniciowa cząsteczka DNA, która prawdopodobnie występuje w postaci kolistej. Poważną komplikacją przy rozpatrywaniu możliwych mechanizmów rekombinacji w procesie transformacji jest też fakt, że wnikająca cząsteczka tDNA stanowi jedynie fragment chromosomu dawcy — około 1/100 część całego genomu. Dalszą komplikacją, przynajmniej w przypadku transformacji pneumokoków jest to, że reagujący odcinek egzogenego DNA, tuż przed integracją istnieje w postaci jednoniciowej (107).

Zanim zajmiemy się przedyskutowaniem możliwych schematów integracji i rekombinacji w transformacjach bakteryjnych, rozpatrzmy uprzednio dostępne dane dotyczące włączania się egzogenych markerów do genomu biorców.

Przekazywanie markerów pojedynczych i sprzężonych. Z badań Ephrussi-Taylor (56) nad przekazywaniem zdolności wytwarzania otoczek u pneumokoków oraz prac Younga i Spizizena (237) nad zdolnością zarodnikowania u *Bac. subtilis* wynika, że geny istniejące w DNA dawcy są alleliczne w stosunku do genów występujących w genomie biorcy. Transformacja komórek biorców polega więc na zastępowaniu markera istniejącego w chromosomie biorcy przez alleliczny marker znajdujący się w tDNA dawcy. Przekazywanie cechy genetycznej może zachodzić w kierunku obu postaci allelicznych genu. U pneumokoków można nie tylko przekazywać zdolność wytwarzania otoczek szczepom bezotoczkowym, ale także szczepy otoczkowe mogą być skutecznie transformowane w postaci bezotoczkowe (226). Podobne rezultaty dały transformacje otoczek u serologicznych typów „b” i „d” gładkiego szczepu *Hemophilus* (3). Jednak Austrian i wsp. (12) badając szczegółowo przekazywanie otoczek u dwoinki zapalenia płuc wykazali, że nie zawsze sytuacja jest tak prosta. Geny kompleksowe (np. markery odpowiedzialne za syntezę wielocukrowców otoczkowych, której poszczególne etapy są kontrolowane przez determinanty ściśle ze sobą sprzężone) w procesie transformacji mogą być nie tylko wymieniane na alleliczne, ale także dodawane do genów już istniejących w chromosomie biorcy.

Przy transformacji bakterii w stężeniach tDNA mniejszych od nasycającego większość markerów przekazywana jest niezależnie od siebie. Takie transformanty różnią się od populacji macierzystej tylko jedną cechą (11, 226), pomimo że tDNA pochodzi z komórek różniących się kilkoma cechami w porównaniu z bioreami. Prawdopodobieństwo jednoczesnego włączenia dwóch lub kilku markerów dawcy do genomu biorcy jest bardzo małe (91) i może być przedstawione zależnością:

$$T_{AB} \leq T_A \times T_B$$

gdzie T jest liczbą transformantów, zaś A i B są selekcjonowanymi markerami dawcy.

Niezależne przekazywanie poszczególnych markerów w transformacji dowodzi, że znajdują się one na odrębnych fragmentach chromosomu dawcy, lub w takiej odległości na jednej cząsteczce tDNA, że w procesie rekombinacji może zostać wbudowany tylko jeden z markerów. Jeśli markery nie są sprzężone, występowanie nielicznych podwójnych transformantów świadczy w każdym razie o tym, że miały miejsce dwa zjawiska rekombinacji. Należy przy tym zaznaczyć, że do wnętrza tej samej komórki biorcy mogą wnikać dwie cząsteczki tDNA niosące różne markery.

Pojawianie się podwójnych transformantów jest wprawdzie zjawiskiem bardzo rzadkim, jednakże w przypadku niektórych markerów i przy użyciu określonych szczepów dawcy i biorcy, transformanty po-

dwójne pojawiają się z dużą częstotliwością. Zjawisko to opisane zostało po raz pierwszy przez Hotchkiss i Marmura (96), którzy badali u dwoinki zapalenia płuc transformację dwu cech: oporności na streptomycynę i zdolności fermentowania mannitolu. Zdaniem tych autorów jednoczesne przekazywanie tych cech jest możliwe dlatego, że w chromosomie dwoinki zapalenia płuc markery te są sprzężone i geny znajdują się blisko siebie na jednej cząsteczce tDNA, dzięki czemu są one wbudowywane do genomu biorcy jako całość. Prawdopodobieństwo uzyskania podwójnych transformantów przy badaniu cech sprzężonych jest wysokie i może być przedstawione zależnością:

$$T_{AB} > T_A \times T_B$$

Wysoką częstotliwość przekazywania cech sprzężonych uzyskano także u szczepów należących do rodzaju *Hemophilus* (75) i u *Bac. subtilis* (144). Markery sprzężone szczególnie często spotyka się w przypadku genów kierujących poszczególnymi etapami syntezy jednego metabolitu.

Porównując częstotliwość przekazywania w transformacji cech pojedynczych i sprzężonych stwierdza się, że prawdopodobieństwo integracji markerów pojedynczych jest jednak zawsze większe niż markerów sprzężonych, nawet wówczas gdy te ostatnie znajdują się bardzo blisko siebie na cząsteczce tDNA.

Częstotliwość łącznego przekazywania markerów sprzężonych jest, jak się wydaje, odwrotnie proporcjonalna do wielkości tych markerów. Potwierdza to zależność między wrażliwością markerów na ogrzewanie w temperaturze subkrytycznej czy na promienie UV a prawdopodobieństwem integracji tych markerów (103, 119). Rekombinacje kompleksowe można skutecznie wyeliminować podnosząc temperaturę inkubacji z 30 do 37° (103).

Badania nad pneumokokami wykazały, że sprzężenie genów może także wystąpić w przypadku oporności na antybiotyki. Jak donieśli Sirotnak i wsp. (209) u dwoinki zapalenia płuc istnieją trzy markery oporności na erytromycynę (ery_a , ery_b i ery_c), różniące się stopniem wrażliwości na ten antybiotyk. Jest rzeczą bardzo ciekawą, że transformanty z cechą ery_{a-b} transformują się słabo w kierunku ery_c , a transformanty ery_{a-c} nie przyjmują w ogóle markera ery_b . Podając ^{32}P DNA autorzy ci wykazali, że szczepy z markerami ery_{a-c} nie pobierają wcale DNA a szczepy z ery_{a-b} pobierają go tylko w nieznacznym stopniu.

Sprzężenie genów odpowiedzialnych za oporność na streptomycynę u dwoinki zapalenia płuc opisali Rotheim i Ravin (183). Wykazali oni, że na jednej cząsteczce DNA mogą się znajdować różne geny streptomycyno-oporności. Geny te można jednak rozdzielić w toku preparatyki tDNA i wówczas są one przekazywane niezależnie. Badając kinetykę przekazywania markerów sprzężonych u dwoinki zapalenia płuc Kent

i Hotchkiss (102) potwierdzili, że sprzężenie spowodowane jest współistnieniem genów na tej samej cząsteczce tDNA; integracja i rekombinacja tych markerów wymaga wielokrotnych pęknięć i powtórnych połączeń genomu biorcy i egzogenego fragmentu tDNA.

Interesujące są również obserwacje co do przekazywania niektórych markerów leko-oporności w transformacjach heterospecyficznych. Nickel i Goodgal (146) wykazali, że markery oporności na streptomycynę i nowobiocynę u *Hemophilus parainfluenzae* nie są sprzężone. Po wprowadzeniu tych markerów w dwóch kolejnych procesach transformacji do szczepu *Hem. influenzae* obserwuje się ich genetyczne sprzężenie u biorcy, analogiczne do sprzężenia wywoływanego mutacją szczepu *Hem. influenzae*. Podobne doświadczenia Ravina i De Sa (174) przeprowadzone na dwóinkach zapalenia płuc i paciorkowcach udowodniły, że markery oporności na streptomycynę i erytromycynę są u tych bakterii homologiczne i sprzęgają się w wyniku transformacji heterospecyficznej między pneumokokiem a paciorkowcem szczepu *Challis*.

Mechanizmy integracji i rekombinacji w procesie transformacji Hotchkiss (93) i Ravin (171) już dość dawno wykazali, że integracja markerów streptomycyno-oporności u pneumokoków zachodzi w czasie dwóch pierwszych podziałów komórek po pobraniu tDNA. Podobne dane co do czasu integracji markerów przez pneumokoki uzyskała Ephrussi-Taylor (58). Działała ona chloramfenikolem na komórki biorców w różnych odstępach czasu po pobraniu przez nie tDNA i stwierdziła, że jeśli inhibitor doda się wystarczająco wcześnie, to blokuje on wbudowywanie wprowadzonego markera. Autorka uważa, że moment, w którym chloramfenikol przestaje wpływać na wynik transformacji jest końcem okresu integracji tDNA do genomu biorcy.

Jednak Fox i Hotchkiss (69) oraz Fox (64) dzięki zastosowaniu techniki izotopowej i reekstrakcji DNA z transformantów wykazali, że u pneumokoków integracja i rekombinacja wprowadzonego markera do genomu biorcy zachodzi już po 5 minutach od chwili przerwania kontaktu tDNA z biorcą. Okres pierwszych pięciu minut jest fazą eklipsy w czasie której w lizatach nie stwierdza się żadnej aktywności transformującej. Podobne badania nad przekazywaniem markerów sprzężonych u tych samych szczepów wykazały, że już po sześciu minutach od chwili ustania kontaktu biorcy z tDNA pojawiają się transformanty z markerami sprzężonymi. Rekombinacja markerów zatem ma miejsce prawie natychmiast po ich integracji.

Czas integracji u *Hemophilus* jest jeszcze krótszy. Voll i Goodgal (232) stwierdzili, że u tych drobnoustrojów brak jest fazy eklipsy. Jak już wspomniano powyżej okres eklipsy u dwóinki zapalenia płuc związany jest z występowaniem w tym czasie tDNA w postaci jednoniciowej.

Wyniki Voll i Goodgala sugerują więc odrębność mechanizmów rekombinacji u pałeczek hemofilowych i u dwoinki zapalenia płuc. Za istnieniem innego mechanizmu rekombinacji u *Hemophilus* przemawiają także omówione już uprzednio badania Herriotta (87), który używając hybrydu tDNA z markerami oporności na streptomycynę i nowobiocynę doniósł, że do komórek biorców wnikają dwuniciowe a nie jednoniciowe cząsteczki tDNA i że w tej postaci cząsteczki te są integrowane do genomu transformowanych bakterii.

Obserwacje Breslera i wsp. (30), wskazywać mogą, że mechanizm integracji i rekombinacji u *Bac. subtilis* jest podobny do obserwowanego u pałeczek hemofilowych. Według tych autorów podwójnie auksotroficzny szczep *Bac. subtilis* daje transformanty prototroficzne, po pobraniu hybrydu tDNA, w którym markery his oraz try (zdolność wytwarzania histydyny i tryptofanu) pochodziły z dwóch różnych szczepów dawców. Taki wynik transformacji wskazuje, że tDNA do komórek biorców wniknął w całości i jako struktura dwuniciowa został wbudowany do genomu transformantów.

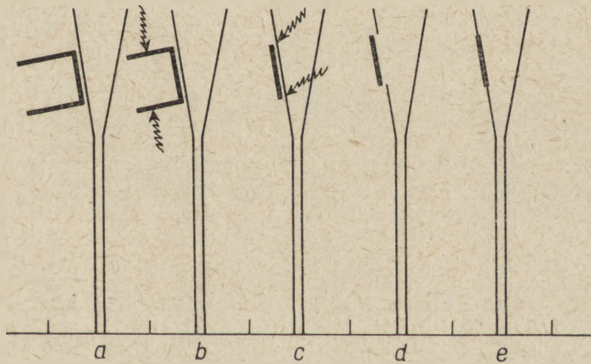
Zarówno z badań Foxa i Hotchkissa jak i Voll i Goodgala wynika, że procesy integracji i rekombinacji wprowadzonych markerów nie wymagają syntezy DNA. Reakcje wbudowania zachodzą gdy nie ma syntezy DNA lub też gdy się ona dopiero rozpoczyna. Obserwacja ta ma istotne znaczenie przy rozpatrywaniu, który z możliwych mechanizmów rekombinacji jest czynny w transformacji.

Proces rekombinacji przez zmianę wzorca (*copy choice*) jako wymagający syntezy DNA w czasie integracji markerów do genomu biorców jest mało prawdopodobny w zjawisku transformacji. Znacznie częściej przyjmuje się, że w transformacji bakterii ma miejsce *breakage and reunion* (pęknięcie i ponowne połączenie się) odpowiednik *crossing over* u organizmów wyższych. Proces ten, polegający na wymianie odcinków między tDNA a chromosomem biorcey, zachodzić może także przy częściowej syntezie DNA w komórce, wymaga jednak hydrolizy i powtórzonego utworzenia się wiązań dwustrowych w reagujących ze sobą łańcuchach polinukleotydowych. Szybalski (222) przypuszcza, że u *Bac. subtilis* istnieją enzymy odpowiedzialne za pęknięcie i ponowne połączenie się. Udowodnienie występowania tego rodzaju enzymów u transformujących się bakterii stanowiłoby w pewnym stopniu potwierdzenie działania mechanizmu „*breakage and reunion*” w procesie transformacji.

Fox (65), śledząc wpływ rozpadu ^{32}P na aktywność biologiczną tDNA reekstrahowanego z transformantów stwierdza, że proces integracji markerów u dwoinki zapalenia płuc zachodzi już w chwili rozpoczęcia się syntezy DNA w komórce i że wprowadzona cząsteczka DNA dawcy tworzy hybryd z DNA biorcey. Odkrycie przez Lacksa (107) dużej ilości niskocząsteczkowych fragmentów polinukleotydowych tDNA w okresie integracji i rekombinacji sugeruje, że tylko niewielka część DNA dawcy

jest wbudowywana do genomu biorcy. Jak wynika z prac Catlin (40) na *Neisseria* i *Moraxella*, u których mechanizm integracji i rekombinacji jest nieznan, długość łańcucha polinukleotydowego integrowanego przez biorcę jest różna dla różnych komórek w tej samej populacji.

Uwzględniając dane Lacksa (107), Foxa i Allena (67) na podstawie własnych badań nad zachowaniem się ^{32}P -DNA dawcy w komórkach biorców proponują u dwoinek zapalenia płuc następujący model wbudowywania markerów oporności na streptomycynę i sulfonamidy (patrz rysunek 2): 1. jedna z nici tDNA przyłącza się wstępnie do homologicznego odcinka łańcucha DNA biorcy; przyłączenie to zachodzi prawdopodobnie w miejscu w którym chromosom bakteryjny jest rozwinięty (otwarty), (rys. 2a), 2. w miarę jak ten proces postępuje egzonukleazy bakteryjne hydrolizują nie przyłączone nici tDNA (rys. 2b), 3. enzymy zdolne do usuwania uszkodzeń w DNA wycinają odcinek DNA biorcy, którego komplementarny region stanowi teraz przyłączony fragment tDNA (rys. 2c i 2d), 4. następuje ustalenie ciągłości chemicznej między fragmentem DNA dawcy i biorcy (rys. 2e). W wyniku dalszej replikacji chromosomu i segregacji komórek pojawiłyby się wreszcie klony bakterii obdarzone nową cechą genetyczną.



Rys. 2. Wbudowywanie tDNA u dwoinek zapalenia płuc (schemat opracowano według danych Foxa i Allena (67))

a — wstępne przyłączenie fragmentu tDNA; b — nukleazy hydrolizują nieprzyłączone odcinki tDNA; c-d — enzymy usuwające uszkodzenia w DNA wycinają odcinek DNA biorcy komplementarny do przyłączonego fragmentu tDNA; e — ostateczne wbudowanie egzogenego fragmentu DNA

Niezależnie od tego jaki mechanizm integracji i rekombinacji jest czynny w procesie transformacji, nasuwa się pytanie czy marker lub markery egzogenne są trwale włączane do genomu biorców czy też tworzą z nim tylko trwale merogenoty jak to ma miejsce np. w transdukcji (34). Według Schaeffera (196) integracja markerów małych w porównaniu z cząsteczką DNA polega na zastępowaniu w chromosomie biorcy allelicznej postaci markera. W przypadku natomiast dużych mar-

kerów (np. syntezy typowo swoistych wielocukrów u pneumokoków) włączanie kompleksu genów do genomu biorcy przez zastąpienie dużego odcinka chromosomu jest mało prawdopodobne. Markery takie są przypuszczalnie tylko dodawane do już istniejących w komórce gospodarza.

5. Wyrażenie fenotypowe markerów wbudowanych do genomu biorcy

Zanim marker wbudowany do genomu biorców ujawni się fizjologicznie w transformowanym potomstwie, mija pewien okres czasu zwany okresem fenotypowego wyrażenia nowej cechy. Uważa się, że okres ten kończy się z chwilą ustalenia się liczby transformantów w populacji, po czym następuje normalne rozmnażanie się transformantów z taką samą szybkością, jak rozmnażają się pozostałe komórki w populacji. Okres fenotypowego wyrażenia, jak również okres, w którym liczba transformantów utrzymuje się na stałym poziomie, są zależne od rodzaju transformowanej cechy i od badanych bakterii. Według Greena (79) i Hotchkiss (92) w przypadku markera streptomycyno-oporności u pneumokoków okres fenotypowego wyrażenia wynosi około 90 minut, podczas gdy czas generacji u tych bakterii waha się około 30 minut. Dla innych markerów u dwoinki zapalenia płuc np. oporności na erytromycynę okres fenotypowego wyrażenia jest mniej więcej taki sam jak dla markera oporności na streptomycynę. Ravin i DeSa (174) stwierdzili jednak, że niektóre markery oporności na erytromycynę u pneumokoków wyrażały się fenotypowo dopiero po około 6 godzinach. Pakuła i wsp. (164) donieśli, że u paciorkowców cechy oporności na nowobiocynę i erytromycynę wyrażają się fenotypowo po około 95 minutach, a marker streptomycyno-oporności aż po 125 minutach od chwili kontaktu z tDNA. Lacks i Hotchkiss (108) analizując u pneumokoków czas wyrażania fenotypowego markera fermentacji mannitolu zaobserwowali, że enzym był wytwarzany w maksymalnej ilości już po 10 minutach, a szybkość jego syntezy była liniowo zależna od częstotliwości transformacji.

Fenotypowe wyrażenie wprowadzonych w transformacji markerów zależy od normalnych procesów metabolicznych. Goodgal (74) wykazał, że u *Hemophilus* fenotypowe wyrażenie transformowanej cechy nie zachodzi, jeśli populację komórek inkubuje się w soli fizjologicznej lub jeśli metabolizm blokuje się chloramfenikolem. Te same czynniki hamują fenotypowe wyrażenie transformowanych cech u paciorkowców (157). Czynnikiem blokującym wyrażenie nowej cechy jest również 8-azaguanina (1).

IV. Transformacje heterologiczne

Zjawisko transformacji zachodzi nie tylko w obrębie gatunku, znane są również transformacje heterologiczne, gdy dawca i biorca DNA należą

do innych gatunków, a nawet do innych rodzajów. Transformacje heterologiczne (heterospecyficzne, interspecyficzne, międzygatunkowe) zostały opisane po raz pierwszy dopiero w 1954 roku przez Balassę w obrębie rodzaju *Rhizobium* (15, 17), a następnie przez Schaeffera i Ritza (200) oraz Alexandra i Leidy (6) w rodzaju *Hemophilus*. W następnych latach przeprowadzono szereg transformacji międzygatunkowych w obrębie rodzajów: *Streptococcus* (18, 29, 158, 159, 160, 163, 168-170, 174), *Bacillus* (10, 131, 137), *Neisseria* (36, 37, 38, 42), i *Moraxella* (41). Uzyskano również, ale jak dotąd tylko w dwóch przypadkach, transformacje międzyrodzajowe, a to między szczepami *Neisseria* i *Moraxella* (40) oraz między szczepami gronkowców i paciorkowców (18, 49, 159). Okazało się, że wydajności transformacji międzygatunkowych są prawie zawsze niższe niż wydajności transformacji homologicznych. Według wielu autorów możliwość przeprowadzenia transformacji międzygatunkowych i ich wydajność mogą świadczyć o stopniu pokrewieństwa dawcy i biorcy, a więc mogą być kryterium stosowanym w taksonomii (110, 131, 156, 195). Ponieważ w większości przypadków nie ma różnic w łatwości penetracji DNA homologicznego i heterologicznego do komórek biorców, różnice w wydajności transformacji muszą być spowodowane procesami zachodzącymi wewnątrz komórki już po wnikięciu DNA. Schaeffer (192, 193, 194, 195) wykazał, że niższe wydajności w transformacjach międzygatunkowych są spowodowane odmienną strukturą heterologicznego DNA, który w dużo mniejszym stopniu „pasuje” do DNA biorcy niż DNA homologiczny. Schaeffer wysunął hipotezę tłumaczącą niższe wydajności transformacji międzygatunkowych mniejszą zdolnością łączenia się heterologicznych cząsteczek DNA w efektywne w rekombinacji pary. Trudności w łączeniu się w pary heterologicznych DNA są spowodowane nie tylko odmienną strukturą samego markera, ale przede wszystkim przyległych do niego obszarów cząsteczki DNA. Badanie transformacji heterologicznych w obrębie *Neisseria* (39, 42), *Bacillus* (137) oraz u paciorkowców (18) wykazały, że istnieje zależność między wydajnością transformacji a podobieństwem przeciętnego składu zasad nukleinowych DNA. Prawdopodobnie przy takiej samej zawartości G + C w DNA biorcy i dawcy, nie tylko wydajność transformacji jest wyższa, ale do genomu biorcy może być wbudowany dłuższy odcinek DNA dawcy, niosący więcej cech, niż wówczas gdy istnieją różnice w ilościowym składzie zasad DNA (39). Wynika z tego, że identyczność lub duże podobieństwo przeciętnego składu zasad w DNA jest warunkiem udanej transformacji międzygatunkowej. Jest to warunek podstawowy, chociaż nie jedyny ponieważ:

- a) organizmy odległe w systematyce mogą posiadać taki sam skład zasad w DNA, nigdy jednak nie transformują się wzajemnie,
- b) spokrewnione organizmy o identycznym składzie zasad mogą nie dawać transformacji; konieczne jest podobieństwo sekwencji nukleo-

tydów w DNA biorcy i dawcy przynajmniej w dużym obszarze cząsteczki DNA, co jest możliwe tylko przy jednakowym, lub bardzo zbliżonym przeciętnym składzie zasad całego DNA.

Hipoteza Schaeffera nie jest jednak jedynym możliwym wytłumaczeniem niższych wydajności transformacji heterologicznych. Pewne obserwacje wskazują, że w niektórych przypadkach DNA swoisty dla gospodarza, w którym został zsyntetyzowany, jest podatny na działanie czynników degradujących po wnikięciu do komórki nowego, różnego od poprzedniego gospodarza (52, 223, 196-str. 126). Degradacja ta zachodzi prawdopodobnie pod działaniem nukleaz (52, 61, 223). Obserwacje te mogą sugerować, że niskie wydajności transformacji heterologicznych są spowodowane niszczeniem obcego DNA we wnętrzu niektórych komórek biorców, zanim jeszcze obce DNA mogło mieć szansę połączenia się w parę z cząsteczką DNA biorcy. Celowe byłoby dokładniejsze przebadanie losów DNA, po wnikięciu do komórek biorcy, w transformacjach heterologicznych, co pozwoliłoby może na zweryfikowanie obydwu hipotez. W chwili obecnej dostępny materiał doświadczalny wydaje się przemawiać za hipotezą Schaeffera.

V. Występowanie zjawiska transformacji w naturze

Proces transformacji występuje prawdopodobnie również w przyrodzie i może być jednym z naturalnych mechanizmów ewolucji. Badania Ottolenghi i Hotchkissa (152, 153) wykazały, że przesące normalnej hodowli lub hodowli potraktowanej streptomycyną wykazują aktywność transformacyjną, którą można unieczynnić DN-azą. Również we wspólnych hodowlach dawcy i biorcy powstawały transformanty bez dodawania DNA z zewnątrz. Zdolność uwalniania czynnika transformującego do podłoża rośnie równolegle z rozwojem kompetencji, co może wskazywać na większą przepuszczalność ściany komórkowej dla DNA w obie strony. Ottolenghi i MacLeod (154) potwierdzili także możliwość wystąpienia transformacji między dwoma żywymi szczepami dwoinek zapalenia płuc jednocześnie zaszczepionymi myszkom. Również Takahashi zaobserwował występowanie w naturze transformacji w obrębie *Bac. subtilis* (224), a Catlin — w obrębie *Neisseria* (36).

LITERATURA

1. Abe M., Mizuno D., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 464 (1959).
2. Abel P., Trautner T. A., *Zeitschr. Vererbungsl.* **95**, 57 (1964).
3. Alexander H. E., Leidy G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 625 (1951).
4. Alexander H. E., Leidy G., *J. Exptl. Med.* **93**, 345 (1951).
5. Alexander H. E., Leidy G., *J. Exptl. Med.* **97**, 17 (1953).
6. Alexander H. E., Leidy G., *Amer. J. Dis. Child.* **90**, 560 (1955).

7. Alexander H. E., Leidy G., *J. Exptl. Med.* **97**, 505 (1953).
8. Alloway J. I., *J. Exptl. Med.* **57**, 265 (1933).
9. Anagnostopoulos C., Crawford I. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 378 (1961).
10. Aoki H., Saito H., Ikeda Y., *J. Gen. Appl. Microbiol.* **9**, 307 (1963).
11. Austrian R., *J. Exptl. Med.* **98**, 35 (1953).
12. Austrian R., Bernheimer H. P., Smith E. E. B., Mills G. T., *J. Exptl. Med.* **110**, 585 (1959).
13. Austrian R., Collowick M. S., *Bull. John Hopkins Hospital* **92**, 375 (1953).
14. Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M., *J. Exptl. Med.* **79**, 137 (1944).
15. Balassa R., *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **2**, 51 (1954).
16. Balassa R., *Nature* **188**, 246 (1960).
17. Balassa G., *Bacteriol. Rev.* **27**, 228 (1963).
18. Bańkowska E., *Zesz. Probl. Post. Nauk Rolniczych PAN* **58**, 5 (1965).
19. Bańkowska E., Walczak W., Dane nieopublikowane.
20. Barnhart J., Herriott R. M., *Fed. Proc.* **21**, 374 (1962).
21. Becker E. F., Zimmerman B. K., Geiduschek E. P., *J. Mol. Biol.* **8**, 377 (1964).
22. Bendich A., Pahl H. B., Beiser S. M., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **21**, 31 (1956).
23. Bendich A., Pahl H. B., Rosenkranz H. S., Rosoff M., *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 31 (1958).
24. Boivin A., Vendrely R., Lehoult Y., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **221**, 646 (1945).
25. Bøvre K., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **58**, 528 (1963).
26. Bøvre K., Henriksen S. D., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **56**, 223 (1962).
27. Boyce R. P., Howard-Flanders P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 293 (1964).
28. Boyce R. P., Howard-Flanders P., *Abstr. VI-th Intern. Congr. Biochem. New York 1964*, III, str. 201.
29. Bracco R. M., Krauss M. R., Roe A. S., MacLeod C. M., *J. Exptl. Med.* **106**, 247 (1957).
30. Bresler S. E., Kreneva R. A., Kushev V. V., Mosevitskii M. I., *J. Mol. Biol.* **8**, 79 (1964).
31. Bresler S. E., Kreneva R. A., Kushev V. V., Mosevitskii M. I., *Biochimija* **29**, 477 (1964).
32. Bryan B. E., *J. Bacteriol.* **82**, 461 (1961).
33. Cabrera-Juárez E., Herriott R. M., *J. Bacteriol.* **85**, 671 (1963).
34. Campbell A., w *The Bacteria* red. Gunsalus I. C., Stanier R. Y., Academic Press, New York-London, 1964, t. V, str. 61.
35. Catlin B. W., *J. Bacteriol.* **79**, 579 (1960).
36. Catlin B. W., *Science* **131**, 608 (1960).
37. Catlin B. W., *Bact. Proc. (Am. Soc. Microbiol.)* str. 74, (1960).
38. Catlin B. W., *Bact. Proc. (Am. Soc. Microbiol.)* str. 90 (1961).
39. Catlin B. W., *J. Microbiol. Gen. Bull.* **19**, 5 (1963).
40. Catlin B. W., *J. Gen. Microbiol.* **37**, 369 (1964).
41. Catlin B. W., Cunningham L. S., *J. Gen. Microbiol.* **37**, 353 (1964).
42. Catlin B. W., Cunningham L. S., *J. Gen. Microbiol.* **26**, 303 (1961).
43. Catlin B. W., Cunningham L. S., *J. Gen. Microbiol.* **37**, 341 (1964).
44. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., *Biophys. J.* **1**, 317 (1961).
45. Corey R. R., Starr M. P., *J. Bacteriol.* **74**, 141 (1957).

46. Corey R. R., Starr M. P., *J. Bacteriol.* **74**, 146 (1957).
47. Dawson M. H., Sia R. H. P., *J. Exptl. Med.* **54**, 681 (1931).
48. Dobrzański W. T., *Post. Mikrobiol.* **4**, 3 (1965).
49. Dobrzański W. T., Osowiecki H., Materiały Sympozjum „Staphylococci and Staphylococcal Infections” Warszawa, *Post. Mikrobiol.* 1966 (w druku).
50. Doty P., Boedtke H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 482 (1959).
51. Doty P., Marmur J., Eigner J., Schildkraut C. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 461 (1960).
52. Dussoix D., Arber W., *J. Mol. Biol.* **5**, 37 (1962).
53. Eigner J., Boedtke H., Michaels G., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 165 (1961).
54. Ephrati-Elizur E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 103 (1965).
55. Ephrati-Elizur E., Srinivasan P. R., Zamenhof S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 56 (1961).
56. Ephrussi-Taylor H. E., *Exptl. Cell Res.* **2**, 589 (1951).
57. Ephrussi-Taylor H. E., *Exptl. Cell Res.* **6**, 94 (1954).
58. Ephrussi-Taylor H. E., *Microbiol. Genetics, Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **10**, 132 (1960).
59. Ephrussi-Taylor H. E., *J. Chim. Phys.* **58**, 1080 (1961).
60. Ephrussi-Taylor H. E., Freed B. A., *J. Bacteriol.* **87**, 1211 (1964).
61. Erikson R. L., Szybalski W., *Virology* **22**, 111 (1964).
62. Falkow S., Ryman J. R., Washington D., *J. Bacteriol.* **83**, 131 (1962).
63. Felkner I. C., Wyss O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 94 (1964).
64. Fox M. S., *Nature* **187**, 1004 (1960).
65. Fox M. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1043 (1962).
66. Fox M. S., *J. Mol. Biol.* **6**, 85 (1963).
67. Fox M. S., Allen M. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 412 (1964).
68. Fox M. S., Hotchkiss R. D., *Nature* **179**, 1322 (1957).
69. Fox M. S., Hotchkiss R. D., *Nature* **187**, 1002 (1960).
70. Freese E. B., Freese E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1289 (1964).
71. Ganesan A. T., Lederberg J., *J. Mol. Biol.* **9**, 683 (1964).
72. Ginoza W., Guild W. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 633 (1961).
73. Ginoza W., Zimm B. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 639 (1961).
74. Goodgal S. H., *10-th Intern. Congr. Genet. Montreal* **2**, 100 (1958).
75. Goodgal S. H., *J. Gen. Physiol.* **45**, 201 (1961).
76. Goodgal S. H., Herriott R. M., w *The Chemical Basis of Heredity* red. McElroy W., Glass B., John Hopkins University Press, Baltimore-Maryland 1957, str. 336.
77. Goodgal S. H., Herriott R. M., *J. Gen. Physiol.* **44**, 1201 (1961).
78. Goodgal S. H., Rupert C. S., Herriott R. M., w *The Chemical Basis of Heredity* red. McElroy, W., Glass B., John Hopkins University Press, Baltimore-Maryland, 1957, str. 341.
79. Green D. M. D., *Exptl. Cell Res.* **18**, 466 (1959).
80. Griffith F., *J. Hyg.* **27**, 113 (1928).
81. Guild W. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1560 (1961).
82. Guild W. R., *Abstr. Biophys. Soc.* Nr 12, 1962.
83. Guild W. R., *J. Mol. Biol.* **6**, 214 (1963).
84. Guild W. R., Robinson M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 106 (1963).
85. Gwinn D. D., Thorne C. B., *J. Bacteriol.* **87**, 519 (1964).
86. Hayes W., w *The Genetics of Bacteria and their Viruses*, wyd. Blackwell Science Publ., Oxford, 1964, str. 491.

87. Herriott R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 146 (1961).
88. Hershey A. D., Burgi E., *J. Mol. Biol.* **2**, 143 (1960).
89. Horn E., Herriott R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1409 (1962).
90. Hotchkiss R. D., w *Les unites biologiques doués de contunuité génétique* wyd. C.N.R.S., Paris 1948, str. 55.
91. Hotchkiss R. D., *Cold. Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **16**, 457 (1951).
92. Hotchkiss R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**, 49 (1954).
93. Hotchkiss R. D., w *Enzymes Units of Biological Structure and Functions*, red. Gabler O. H., 1956, str. 119.
94. Hotchkiss R. D., Ephrussi-Taylor H. E., *Fed. Proc.* **10**, 200 (1951).
95. Hotchkiss R. D., Evans A. H., *Cold. Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **23**, 85 (1958).
96. Hotchkiss R. D., Marmur J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**, 55 (1954).
97. Jagger J., *Bacteriol. Rev.* **22**, 99 (1958).
98. Jagger J., w *Radiation, Protection and Recovery* red. Hollaender A., Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, 1960, str. 352.
99. Jansz H. S., Pouwels P. H., VanRotterdam C., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 655 (1963).
100. Jensen R. A., Haas F. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 1109 (1963).
101. Kaiser A. D., Hogness D. S., *J. Mol. Biol.* **2**, 392 (1960).
102. Kent J. L., Hotchkiss R. D., *J. Mol. Biol.* **9**, 308 (1964).
103. Kent J. L., Roger M., Hotchkiss R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 717 (1963).
104. Klein D. T., Klein R. M., *J. Bacteriol.* **66**, 220 (1953).
105. Kohiyama M., Saito H., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 180 (1960).
106. Kohoutova M., *J. Gen. Microbiol.* **38**, 211 (1965).
107. Lacks S., *J. Mol. Biol.* **5**, 119 (1962).
108. Lacks S., Hotchkiss R. D., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 508 (1960).
109. Leidy G., Jaffe J., Alexander H. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **111**, 725 (1962).
110. Leidy G., Hahn E., Alexander H. E., *J. Exptl. Med.* **104**, 305 (1956).
111. Leonard C. G., Mattheis D. K., Mattheis M. J., Housewright R. D., *J. Bacteriol.* **88**, 220 (1964).
112. Lerman L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 132 (1955).
113. Lerman L. S., Tolmach L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 68 (1957).
114. Lerman L. S., Tolmach L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 371 (1959).
115. Levine L., Gordon J. A., Jencks W. P., *Biochemistry* **2**, 168 (1963).
116. Levine L., Murakami W. T., Van Vunakis H., Grossman L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1038 (1960).
117. Levine J. S., Strauss N., *J. Bacteriol.* **89**, 281 (1965).
118. Levinthal C., Davison P. F., *J. Mol. Biol.* **3**, 674 (1961).
119. Litman R. M., *J. Chim. Phys.* **58**, 997 (1961).
120. Litman R. M., Szybalski W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 473 (1963).
121. Litt M., Marmur J., Ephrussi-Taylor H. E., Doty P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 144 (1958).
122. Lorkiewicz Z., Dudek M., Ziemięcka J., *Nature* **205**, 621 (1965).
123. Luzzati D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 508 (1962).
124. Mahler I., Cahoon M., Marmur J., *J. Bacteriol.* **87**, 1423 (1964).
125. Mahler I., Neuman J., Marmur J., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 69 (1963).

126. Marmur J., *J. Mol. Biol.* **3**, 208 (1961).
127. Marmur J., Anderson W. F., Matthews L., Berns K., Gajewska E., Lane D., Doty P., *J. Cellular. Comp. Physiol.* **58**, suppl. 1. 33 (1961).
128. Marmur J., Doty P., *Nature* **183**, 1427 (1959).
129. Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **3**, 585 (1961).
130. Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **5**, 109 (1962).
131. Marmur J., Falkow S., Mandel M., *Ann. Rev. Microbiol.* **17**, 329 (1963).
132. Marmur J., Grossman L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 778 (1961).
133. Marmur J., Hotchkiss R. D., *J. Biol. Chem.* **214**, 383 (1955).
134. Marmur J., Lane D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 453 (1960).
135. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C. L., w *Progress in Nucleic Acid Research* wyd. Davidson T. N., Cohn W. E., Academic Press, New York 1963, str. 231.
136. Marmur J., Schildkraut C. L., Doty P., w *The Molecular Basis of Neoplasia 15-th Ann. Symp. Fundam. Cancer Res. Houston, Texas, University Texas Press, Austin, Texas, 1961*, str. 9.
137. Marmur J., Seaman E., Levine J., *J. Bacteriol.* **85**, 461 (1963).
138. Marmur J., Ts'o P. O. P., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 32 (1961).
139. McCarty M., Taylor H. E., Avery O. T., *Cold. Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **11**, 177 (1946).
140. Mehta B. M., Rege D. V., Sreenivasan A., *Nature* **193**, 296 (1962).
141. Mindich L., Hotchkiss R. D., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 73 (1964).
142. Nava G. C., Galis A., Beiser S. M., *Nature* **197**, 903 (1963).
143. Nester E. W., *J. Bacteriol.* **87**, 867 (1964).
144. Nester E. W., Lederberg J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 52 (1961)
145. Nester E. W., Stocker B. A. D., *J. Bacteriol.* **86**, 785 (1963).
146. Nickel L., Goodgal S. H., *J. Bacteriol.* **88**, 1538 (1964).
147. Odaka T., Watanabe T., *Nature* **184**, 471 (1959).
148. Okubo S., Stodolsky M., Bott K., Strauss B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 679 (1963).
149. Opara-Kubińska Z., Szybalski W., *Abstr. Biophys. Soc.* Nr 48 (1952).
150. Osowiecki H., Dane nieopublikowane.
151. Osowiecki H., Łancow W. A., *Bull. Acad. Sci. Polon., Cl. II*, **13**, 339 (1965).
152. Ottolenghi E., Hotchkiss R. D., *Science* **132**, 1257 (1960).
153. Ottolenghi E., Hotchkiss R. D., *J. Exptl. Med.* **116**, 491 (1962).
154. Ottolenghi E., MacLeod C. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 417 (1963).
155. Pakuła R., *Abh. Deutschen Akad. Wiss. Kl. für Medizin* **1**, 178 (1962).
156. Pakuła R., *Recent Progress in Microbiol.*, Univ. of Toronto **8**, 617 (1963).
157. Pakuła R., Cybulska J., Walczak W., *Acta Microbiol. Polon.* **12**, 245 (1963).
158. Pakuła R., Fluder Z., Hulanicka E., Walczak W., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **6**, 319 (1958).
159. Pakuła R., Hulanicka E., Walczak W., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **6**, 325 (1958).
160. Pakuła R., Hulanicka E., Walczak W., *Schw. Z. Allgem. Path. Bakteriol.* **22**, 202 (1959).
161. Pakuła R., Hulanicka E., Walczak W., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **8**, 49 (1960).
162. Pakuła R., Hulanicka-Bańkowska E., Walczak W., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II* **8**, 269 (1960).

163. Pakuła R., Hulanicka-Bańkowska E., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **9**, 79 (1961).
164. Pakuła R., Piechowska M., Bańkowska E., Walczak W., *Acta Microbiol., Polon.* **11**, 205 (1962).
165. Pakuła R., Walczak W., *J. Gen. Microbiol.* **31**, 125 (1963).
166. Pakuła R., Walczak W., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 125 (1963).
167. Pene I. J., Romig W. R., *J. Mol. Biol.* **9**, 236 (1964).
168. Perry D., Slade H., *Bacteriol. Proc. Ann. Soc. Microbiol.* str. 90 (1961).
169. Perry D., Slade H., *J. Bacteriol.* **83**, 443 (1962).
170. Perry D., Slade H., *J. Bacteriol.* **88**, 595 (1964).
171. Ravin A. W., *Proc. Intern. Congr. Genet., 10-th Congr. Montreal* **2**, 228 (1958).
172. Ravin A. W., *J. Bacteriol.* **77**, 296 (1959).
173. Ravin A. W., w *Advances in Genetics* red. Caspari E. W., Thoday J. M., Academic Press, New York, London, 1961, t. 10, 61.
174. Ravin A. W., De Sa J. D. H., *J. Bacteriol.* **87**, 86 (1964).
175. Ravin A. W., Iyer V. N., *Genetics* **47**, 1369 (1962).
176. Rebeyrotte N., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 234 (1963).
177. Rebeyrote N., Latarjet R., *Strahlentherapie* **111**, 85 (1960).
178. Richardson Ch. C., Schildkraut C. L., Kornberg A., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **28**, 9 (1963).
179. Roger M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 189 (1964).
180. Roger M., Hotchkiss R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 653 (1961).
181. Rolfe R., Ephrussi-Taylor H. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1450 (1960).
182. Rosenberg B. H., Sirotnak F. M., Cavalieri L. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 144 (1959).
183. Rotheim H. B., Ravin A. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 30 (1964).
184. Rownd R., Lanayi I., Doty P., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 225 (1961).
185. Rupert C. S., *Fed. Proc.* **17**, 301 (1958).
186. Rupert C. S., *J. Gen. Physiol.* **43**, 573 (1960).
187. Rupert C. S., *J. Cell Comp. Physiol.* **58**, suppl. 1, 57 (1961).
188. Rupert C. S., w *Photobiology*, red Giese A. C., New York Academic Press, 1963.
189. Rupert C. S., Goodgal S. H., *Nature* **185**, 556 (1960).
190. Rupert C. S., Goodgal S. H., Herriott R. M., *J. Gen. Physiol.* **41**, 451 (1958).
191. Sauerbier W., *Abh. Deutschen Akad. Wiss. Kl. für Medizin* **6**, 327 (1964).
192. Schaeffer P., *Ann. Inst. Pasteur* **91**, 192 (1956).
193. Schaeffer P., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **245**, 375 (1957).
194. Scheffer P., *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 60 (1958).
195. Schaeffer P., *Les réactions heterospécifiques dans l'étude de la transformation bactérienne* Ph. D. Thesis. Université de Paris 1961.
196. Schaeffer P., w *The Bacteria* red. Gunsalus I. C., Stanier R. Y., Academic Press, New-York, London, 1964, t. V, str. 87.
197. Schaeffer P., Edgar R. S., Rolfe R., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **154**, 1978 (1960).
198. Schaeffer P., Ionesco H., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **249**, 487 (1959).
199. Schaeffer P., Ionesco H., Jacob F., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **249**, 577 (1959).
200. Schaeffer P., Ritz E., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **240**, 1491 (1955).
201. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **3**, 595 (1961).

202. Setlow R. B., w *Mammalian Cytogenetics and Related Problems in Radiobiology*, Proc. of Symposium Brazil, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1964, str. 291.
203. Setlow R. B., Setlow J. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1250 (1962).
204. Setlow J. K., Setlow R. B., *Nature* **197**, 560 (1963).
205. Setlow R. B., Swenson P. A., Carrier W. L., *Science* **142**, 1464 (1963).
206. Shugar D., w *The Nucleic Acids* red. Chargaff E., Davidson J. N., wyd. Academic Press, New York-London 1960, t. III, str. 39.
207. Shugar D., *Abh. Deutschen Akad. Wiss. Kl. für Medizin*, **1**, 72 (1962).
208. Sinsheimer R. L., Starman B., Wagler C., Guthrie S., *J. Mol. Biol.* **4**, 142 (1962).
209. Sirotnak E. M., Lunt R. B., Hutchison D. J., *J. Bacteriol.* **86**, 735.
210. Sluis C. A., Stuy J. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 213 (1962).
211. Spizizen J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 1072 (1958).
212. Spizizen J., *Fed. Proc.* **18**, 957 (1959).
213. Stocker B. A. D. *J. Bacteriol.* **86**, 797 (1963).
214. Stollar D., Grossman L., *J. Mol. Biol.* **4**, 31 (1962).
215. Strauss N., *J. Bacteriol.* **89**, 288 (1965).
216. Stuy J. H., Praca doktorska, Uniwersytet w Utrechcie, 1961.
217. Stuy J. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 328 (1961).
218. Stuy J. H., *J. Gen. Microbiol.* **29**, 537 (1962).
219. Stuy J. H., Stern D., *J. Gen. Microbiol.* **35**, 391 (1964).
220. Sueoka N., Marmur J., Doty P., *Nature* **183**, 1429 (1959).
221. Suzuki K., Yamagami H., Shimaru Y., *Nature* **205**, 929 (1965).
222. Szybalski W., *J. Chim. Phys.* **58**, 1098 (1961).
223. Szybalski W., *Abh. Deutschen Akad. Wiss., Kl. für Medizin* **4**, 1 (1964).
224. Takahashi I., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 467 (1962).
225. Talmadge H. B., Herriott R. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 203 (1960).
226. Taylor H. E., *J. Exptl. Med.* **89**, 339 (1949).
227. Taylor H. E., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **228**, 1258 (1949).
228. Thomas R., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 467 (1955).
229. Thomas R., *Biochem. J.* **66**, 389 (1957).
230. Tomasz A., Hotchkiss R. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 480 (1964).
231. Udaka S., Konkol J., Vennesland R., *J. Bacteriol.* **78**, 714 (1959).
232. Voll M. J., Goodgal S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 505 (1961).
233. Wacker A., w *Progress in Nucleic Acid Research*, red. Davidson N. J., Cohn W. E., Academic Press, New York-Londyn, 1963, t. I, str. 369.
234. Wacker A., Menningman H. D., Szybalski W., *Nature* **196**, 685 (1962).
235. Wahl R., Ruppert J., Emerique-Blum L., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **250**, 4227 (1960).
236. Yarus M., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **8**, 614 (1964).
237. Young F. E., Spizizen J., *J. Bacteriol.* **81**, 823 (1961).
238. Young F. E., Spizizen J., *J. Biol. Chem.* **238**, 3127 (1963).
239. Young F. E., Spizizen J., Crawford S. P., *J. Biol. Chem.* **238**, 3119 (1963).
240. Zamenhof S., w *The Chemical Basis of Heredity* red. McElroy, W., Glass B., John Hopkins University Press, Baltimore-Maryland, 1957, str. 351.

241. Zamenhof S., Alexander H. E., Leidy G., *J. Exptl. Med.* **98**, 373 (1953).
242. Zamenhof S., de Giovanni-Donnelly R., Heldenmuth L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 944 (1962).
243. Zamenhof S., Leidy G., Greer S., Hahn E., *J. Bacteriol.* **74**, 194 (1957).
244. Żelazna I., *Acta Microbiol. Polon.* **13**, 283 (1964).
245. Żelazna I., *Acta Microbiol. Polon.* **13**, 291 (1964).

WANDA LEYKO *

Zawartość kwasu adenozynotrójfosforowego (ATP) w erytrocytach w przypadkach patologicznych

ATP Contents of Erythrocytes in Pathology

The ATP content of erythrocytes in pathology is reviewed. Two groups of pathological cases: these in which the changes in ATP content were evident as well as those in which no changes were observed are discussed.

Erytrocyty krwi ludzkiej zawierają stosunkowo duże ilości kwasu adenozynotrójfosforowego (ATP). Związek ten zawarty jest jedynie w komórkach krwi, natomiast brak go całkowicie w osoczu. Jego stężenie molowe w erytrocytach krwi żyłnej wynosi 0,9mM-1,6mM, co odpowiada 5-10 mg⁰/₀ adeniny we krwi pełnej. Dyskutując rolę ATP w erytrocytach wysuwano szereg hipotez, a mianowicie, że związek ten potrzebny jest do utrzymania struktury komórkowej, do transportu jonów, przede wszystkim sodu i potasu, wreszcie w procesach przeciwdziałających utlenianiu oksyhemoglobiny itp. Nie udało się jednak dotychczas potwierdzić doświadczalnie tych hipotez przede wszystkim wobec braku odpowiednio selektywnych metod oznaczania ATP w erytrocytach. Dopiero około 1960 r. udało się opracować metody izolowania i ilościowego określania zawartości ATP oraz innych nukleotydów, przy zastosowaniu jonitów, przede wszystkim *Dowex 1*.

Do oznaczenia zawartości nukleotydów w erytrocytach najbardziej przydatne okazały się dwie metody, opracowane, a następnie modyfikowane przez Bartletta (1, 2, 3, 4, 5) oraz przez Millsa (24, 25) i innych. Obie metody polegają na rozdziale chromatograficznym estrów fosforanowych na kolumnach wypełnionych żywicą *Dowex 1*. W pierwszej z nich jako roztwory wymywające stosuje się kolejno: I — 0,003n HCl, II — 0,01n HCl, III — 0,02n HCl, IV — 0,1n NH₄Cl i V — 0,2n NH₄Cl, VI —

* Doc. dr kierownik Zakładu Biochemii Analitycznej Katedry Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego.

Wykaz skrótów: 2,3-DPG — kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy; HDP — heksozodwufosforany; gpp — gościec przewlekły postępujący.

0,5n NH_4Cl , VII — 1n HCl . Otrzymuje się siedem frakcji, które zawierają: I i II — nukleozydomonofosforany i P_i , III — ADP, IV — 2,3-DPG (kw. 2,3-dwufosfoglicerynowy), V — HDP (heksozo-dwufosforany), VI — ATP, VII — niezidentyfikowany nukleotyd adeninowy. Zawarty w VI frakcji ATP można łatwo zidentyfikować, sporządzając krzywą absorpcji w zakresie 220 — 300m μ oraz oznaczając stosunek molowy P:adenina. Obecność związku adeninowego można dodatkowo potwierdzić, otrzymując falę polarograficzną adeniny (21). Jak wiadomo, żadna inna z puryn i pirymidyn, obecnych w erytrocytach, nie daje w tych warunkach fali polarograficznej — jest to jedna z najbardziej selektywnych metod oznaczania pochodnych adeniny. Przy rozdzielaniu na kolumnach stosuje się różny stopień rozdrobnienia *Dowex 1* (mesh) najczęściej w granicach: 20-50, 50-100, 100-200 mesh. Czas rozdzielania przy zastosowaniu warunków podanych w metodzie Bartletta wynosi 9-15 godzin.

W metodzie Millsa stosuje się wymywanie w ciągłym gradiencie stężeń. Jako roztwory wymywające służą 0,5n kwas mrówkowy, 4n kwas mrówkowy, 4n kwas mrówkowy + 0,8n mrówczan amonu. Czas rozdzielania na *Dowex 1* (200-400 mesh) w warunkach opisanych w tej metodzie wynosi około 50 godzin, a stosując zwiększone ciśnienie można go skrócić do około 18 godzin. Otrzymuje się znacznie więcej frakcji niż w poprzedniej metodzie, a mianowicie frakcje zawierające AMP, ADP, ATP, IMP, HDP, 2,3-DPG, CDPX, NAD, NADP, UDPX, GTP i niezidentyfikowane frakcje A i B oraz można oznaczyć fosforan nieorganiczny. Drogą rechromatografii można również wydzielić dezoksy pochodne np. cytydyny. Przy zastosowaniu tej metody identyfikacja rozdzielanych związków jest jednak uciążliwa ze względu na dość znaczne pochłanianie w nadfiolecie wykazywane przez same roztwory wymywające. Możliwe jest oznaczenie widma nukleotydów dopiero przy nieco większych długościach fal i najczęściej przy wstępnych identyfikacjach oznacza się stosunek absorpcji mierzonej w 280 i 260m μ . Stosunek ten przy pH 2 wynosi dla ATP — 0,22, dla CTP — 2,12, dla UTP — 0,38, dla GTP — 0,67 (6). Konieczne jest jednak potwierdzenie takiej identyfikacji, np. chromatografią na kolumnie roztworów wzorcowych oraz innymi sposobami.

Przy zastosowaniu powyższych metod analitycznych udało się w przeciągu ostatnich pięciu lat przeprowadzić badania nad estrami fosforanowymi erytrocytów w nielicznych jak dotąd przypadkach patologicznych.

Pragnęłabym omówić te właśnie badania, biorąc jednak pod uwagę zawartość tylko jednego związku tj. ATP. Omawiane z tego punktu widzenia stany patologiczne zostaną podzielone na dwie grupy: pierwsza z nich obejmować będzie przypadki, w których nie zaobserwowano różnic w zawartości ATP w porównaniu z normą, druga grupa — przypadki, w których zaobserwowano obniżenie lub podwyższenie ATP w porównaniu z osobami zdrowymi.

I. Stany patologiczne, w których nie zaobserwowano różnic zawartości ATP

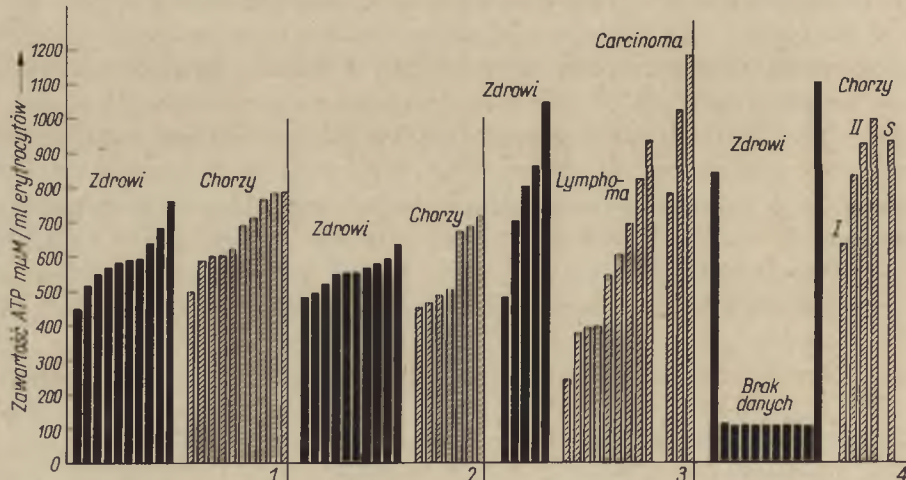
Zostaną tu omówione badania, dotyczące cukrzycy (*diabetes mellitus*), stwardnienia rozsianego (*sclerosis multiplex*), niektórych chorób nowotworowych (*Maligna lymphoma disseminata*, *morbus Hodgini*, *adenocarcinoma disseminata*, *lymphosarcoma cystadenocarcinoma papillarum*, *carcinoma epidermoidale nasi*) oraz wrodzonej anemii hemolitycznej niesferocytarnej i sferocytozy.

Cukrzycę można określić ogólnie jako chorobę przemiany materii, a szczególnie przemiany węglowodanowej. Według Joslina i wsp. (19) w schorzeniu tym obserwuje się w całym organizmie obniżenie: transportu glukozy, syntezy glikogenu, procesu glikolizy, fosforylacji tiaminy, a także przypuszczalnie przemiany kwasu pirogronowego, przemiany acetylo-CoA do kwasów tłuszczowych i procesu syntezy białek. Jednocześnie obserwuje się wzrost przemiany acetylo-CoA do kwasu acetoctowego, rozpadu kwasów tłuszczowych, rozpadu białek na aminokwasy oraz glikoneogenezy. Należy nadmienić, że przemiana pentozowa w cukrzycy jest jeszcze niedostatecznie zbadana. Jak wynika z badań Szczecińskiej i wsp. (31) w schorzeniu tym nie obserwuje się znamiennych różnic zawartości ATP w stosunku do ludzi zdrowych, według testu t Studenta $p > 0,05$. Szczecińska przeprowadzała preparatykę krwi w temperaturze pokojowej, a do rozdziału zastosowała *Dowex 1* \times \times 8, 20-50 mesh, zaś jako roztwory wymywające: HCl i NH_4Cl . Zawartość glukozy we krwi chorych na czczo wynosiła 136-335mg⁰/o.

W badaniach nad istotą stwardnienia rozsianego w pierwszym rzędzie poszukiwano przyczyn powodujących demielinizację lub jej sprzyjających. Dopatrywano się przyczyn tego schorzenia w zaburzeniach gospodarki tłuszczowej. Istnieje pogląd (30), że patomechanizm stwardnienia rozsianego polega raczej na zablokowaniu syntezy tłuszczów, niż na rozkładzie i eliminowaniu lipidów. Oprócz zaburzeń w metabolizmie tłuszczowców doszukiwano się również zaburzeń w przemianie białkowej i węglowodanowej. Tak np. Jones i wsp. (18) uważają, że zmiany w metabolizmie węglowodanowym polegają głównie na zakłóceniu przemiany kwasu pirogronowego w surowicy chorych. W związku z tym w terapii stwardnienia rozsianego szeroko stosowana jest kokarboksylaza i ATP. Cendrowski (8) uważa, że w schorzeniu tym istnieją bloki metaboliczne w przemianie węglowodanowej między kwasem pirogronowym, mlekowym oraz acetylo-CoA, a także między kwasem α -ketoglutarowym i glutaminowym. Jak wynika z badań Raczkiewicz i wsp. (27) w stwardnieniu rozsianym nie obserwuje się znamiennych różnic zawartości ATP w stosunku do ludzi zdrowych ($p > 0,05$). Warunki preparatyki krwi i rozdziału były takie same jak podano powyżej w przypadku cukrzycy.

W badaniach Millsa i wsp. (26) nad chorobami nowotworowymi erythrocyty zarówno osób zdrowych jak i chorych były inkubowane z dodatkiem glukozy, który powodował wzrost zawartości cukru we krwi o 50mg⁰o. Inkubację przeprowadzano przez 3 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze azotu. Tego rodzaju postępowanie Mills określa jako „challenge” metaboliczny. Po inkubacji dalszą preparatykę przeprowadzano w chłodni. Rozdział wykonywano na *Dowex 1* × 4, 200-400 mesh, stosując jako roztwory wymywające HCOONH₄. W przypadkach *lymphoma* i *carcinoma* nie stwierdzono znamienych różnic w zawartości ATP w stosunku do ludzi zdrowych ($p > 0,010$).

Badania nad zawartością ATP we wrodzonych chorobach hemolitycznych przeprowadziła Robinson i wsp. (28). Wrodzone anemie hemolityczne dzieli się ze względów hematologicznych na dwa zasadnicze typy — typ I i typ II, przy czym najwyraźniejsza różnica między nimi polega na przebiegu testu autohemolitycznego. W typie I — autohemoliza krwi jest albo normalna albo lekko zwiększona i można ją cofnąć przez dodatek glukozy lub ATP. W typie II — autohemoliza krwi jest znacznie wzmożona, nie zmniejszająca się po dodaniu glukozy, natomiast zmniejszana przez dodatek ATP. Robinson i wsp. przebadali jedenaście osób zdrowych z zawartością retikulocytów poniżej 2⁰o, jeden przypadek anemii typu I (zawartość retikulocytów 14,6⁰o), trzy przypadki anemii typu II (retikulocyty 35—41⁰o) i jeden przypadek dziedzicznej sferocytozy (retikulocyty 1⁰o). Krew preparowano w temperaturze 0-4°C, stosowano rozdział na żywicy *Dowex 1* × 8, 300-400 mesh, a jako roztwory wymy-



Rys. 1. Przypadki patologiczne, w których nie zaobserwowano różnic zawartości ATP w μM na ml erythrocytów

1 — *Diabetes mellitus*; HCl, NH₄Cl, 20-50 mesh, temperatura pokojowa, $p > 0,05$; 2 — *Sclerosis multiplex*; HCl, NH₄Cl, 20-50 mesh, temperatura pokojowa, $p > 0,05$; 3 — *Lymphoma* i *carcinoma*; HCOOH, HCOONH₄, 200-400 mesh, inkubacja 3 godz., 37°C z glukozą, $p > 0,10$; 4 — wrodzona niesferocytarna anemia hemolityczna (I i II) i dziedziczna sferocytoza (S); HCl, NH₄Cl, 300-400 mesh, temperatura 0-4°C

wające służyły HCl i NH₄Cl. Autorzy ci stwierdzili, że poziom nie odbiega od normy, jednak ze względu na to, że w przypadkach anemii wrodzonych krew zawiera dużo retikulocytów, w których jest prawie dwukrotnie więcej ATP niż w erytrocytach, uważają oni, że znalezione wartości oznaczają obniżenie zawartości ATP w dojrzałych erytrocytach. Autorzy ci sądzą, że powodem ewentualnego obniżenia zawartości ATP w erytrocytach dojrzałych może być obniżenie aktywności heksokinazy, oraz bliżej nie sprecyzowane defekty enzymatyczne, działające przed syntezą 2,3-DPG w anemii typu I, a za syntezą 2,3-DPG w anemii typu II. Ponieważ jednak niezależnie od interpretacji, znalezione wartości ATP nie są obniżone w stosunku do normy, umieściłam je w tej właśnie grupie. Warto tu może dodać, że zgodnie z badaniami Hofmanna i Raporta (16), retikulocyty w porównaniu z erytrocytami wykazują mniej aktywny układ dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu. Zawartość ATP i FAD jest w retikulocytach około dwukrotnie większa niż w erytrocytach.

Zawartości ATP w erytrocytach w omówionych powyżej przypadkach przedstawione są na rysunku 1.

II. Stany patologiczne, w których zaobserwowano różnice w zawartości ATP

Zostaną tu omówione przypadki gośca przewlekłego postępującego (gpp), dziedzicznego podwyższenia poziomu ATP w erytrocytach, pracy w atmosferze CS₂ oraz methemoglobinemi wywołanej u królików i psów azotynem sodu.

Cechą charakterystyczną chorób goścowych jest zanik chrząstki, mięśni, skóry i zanikanie kolagenu. Wyraża się to spadkiem wagi ciała i powoli postępującą zmianą w obrazie białek i ich utratą aż do hypoproteinemii. W patogenezie gpp ma znaczenie wydzielanie hormonów nadnerczy a sugeruje się także istnienie związku z estrogenami. Najczęstszą zmianą we krwi w tym schorzeniu jest niedokrwistość typu niedobarwliwej. Obserwuje się we krwi niedobór żelaza oraz niski poziom witaminy C, również poziom ryboflawiny leży poniżej wartości prawidłowych. Z drugiej strony obserwowano zwiększenie zawartości kwasu pirogronowego, aktywności transaminazy glutaminowo-pirogronowej, zawartości kwasu moczowego oraz kreatyny i kreatyniny. Uzyskano również dane świadczące o zwiększonej aktywności aldolazy we wczesnym okresie choroby, a zmniejszonej aktywności w późniejszych okresach. Charakterystyczne są także w tym schorzeniu przesunięcia w obrazie białek surowicy krwi oraz substancji białkowych związanych z polisacharydami, głównie gliko- i mukoproteidów. Badania Haydu (11) nad patogenezą gpp wykazały zaburzenia w metabolizmie ATP. Stwierdził on w przypadkach gpp wzrastające zapotrzebowanie tkanek na ATP

i jednoczesny wzrost aktywności ATP-azy (12). Dalsze badania tego autora (13, 14) wykazały, że leki antymalaryczne oraz sole złota i miedzi hamują aktywność ATP-azy. Natomiast według G y o r k i i S a n d e l l a (10) oraz L u f t a i P a k u ł y (24) nie ma różnic w aktywności ATP-azy we krwi ludzi zdrowych i chorych na gpp. Ostatnio L o r e n c i wsp. (23) przeprowadzając preparatykę krwi w temperaturze 0-4°C i stosując rozdział na *Dowex 1*, 50-100 mesh, wykazali, że u chorych na gpp występuje obniżenie zawartości ATP w erytrocytach o około 45% w porównaniu z osobami zdrowymi ($p < 0,05$). Na tej podstawie wysnuto wniosek, że w gpp istnieje bezwzględny niedobór ATP.

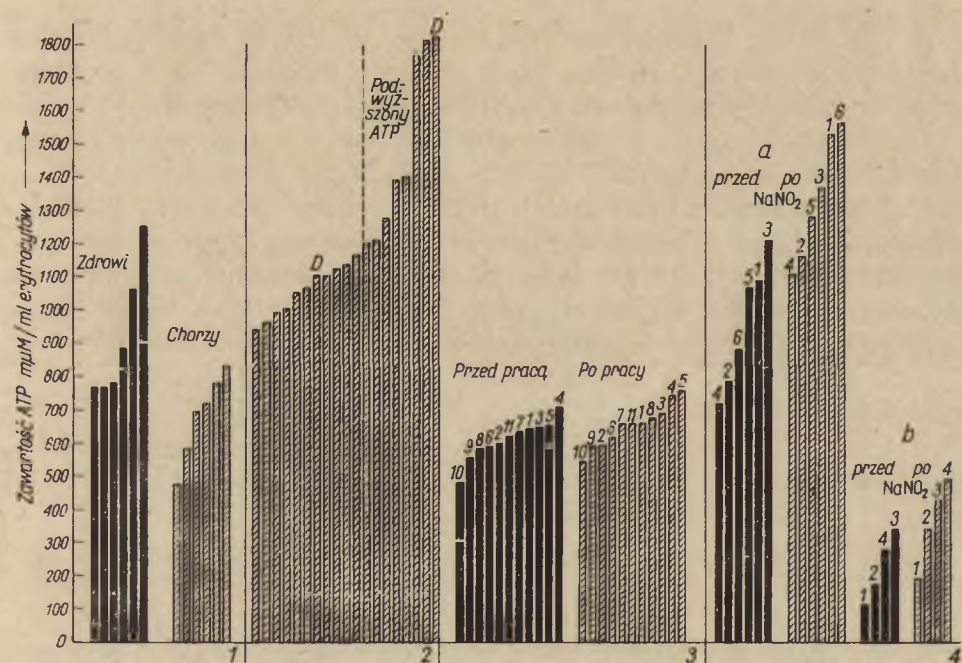
Ostatnio B r e w e r (7) doniósł, że u pewnego Murzyna, u którego występował niedobór dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu, stwierdzono dwukrotnie zwiększony poziom ATP w erytrocytach. Jak się okazało ta anomalia metabolizmu ATP była dziedziczna, przy tym w rodzinie nie obserwowano klinicznych i hematologicznych odchyłeń od normy. Zdaniem B r e w e r a podwyższenie zawartości ATP nie jest kontrolowane przez te geny, które decydują o występowaniu anemii sierpowatej i niedoboru dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu. Brewer nie zdołał jednak zidentyfikować pierwotnej anomalii biochemicznej. Oznaczał on ATP metodą Bartletta, nie podał jednak bliższych szczegółów; zawartość ATP wyraził w mikromolach ATP na gram Hb, przy czym za podwyższone wartości uważał te, które leżą powyżej 4,01 μM ATP na g Hb. Przy przyjęciu zawartości Hb równej 30g w 100ml krwi odpowiadałoby to 1203 μM ATP na 1ml erytrocytów. Dane B r e w e r a umieszczone na rysunku 2 przeliczono w ten właśnie sposób. Również Z ü r c h e r i wsp. (32) donoszą o przypadku dziedzicznie podwyższonej zawartości ATP w erytrocytach. Zdaniem tych autorów w przebadanym przez nich przypadku przyczyną była zwiększona aktywność kinazy kwasu pirogronowego. Należy nadmienić, że w rodzinie badanej przez Brewera aktywność tego enzymu była normalna.

Podwyższenie zawartości ATP w erytrocytach zaobserwowano również u osób pracujących w atmosferze CS_2 . Dwusiarczek węgla ma szczególne powinowactwo do tłuszczowców i charakteryzuje się wybitną zdolnością rozpuszczania lipidów komórkowych, co stanowi istotę jego toksycznego działania na organizm ludzki. Wiadomo, że szczególnie bogata w tłuszczce jest tkanka nerwowa i z tym wiązać należy fakt, że u osób pracujących w atmosferze CS_2 objawy zatrucia występują przede wszystkim pod postacią zmian ze strony układu nerwowego. Wysłunięto kilka różnych hipotez, tłumaczących działanie CS_2 na organizm. Według jednej z nich CS_2 może wiązać się z aminokwasami i albuminami osocza, przy czym grupa $-\text{NH}_2$ przekształcałaby się w grupę sulfhydrylową. Istnieje również hipoteza, że CS_2 powoduje przede wszystkim uszkodzenie nadnerczy, wywołując w związku z tym zaburzenia hormonalne. Badania przeprowadzone przez R a c z k i e w i c z i wsp. (27) wykazały, że po przepracowaniu 4 godzin w atmosferze CS_2 obserwuje się znamienne pod-

wyższenie zawartości ATP ($p < 0,05$) w stosunku do zawartości tego związku przed rozpoczęciem pracy. Raczkiewicz zastosowała te same warunki preparatyki i rozdziału jak przy wspomnianych powyżej badaniach nad stwardnieniem rozsianym.

Najwyraźniejsze zmiany zawartości ATP w erytrocytach otrzymano w przypadkach methemoglobinemii, wywołanej azotynem sodowym u królików i psów (15). Roztwór NaNO_2 wprowadzano dożylnie w ilości 90mg na kg ciężaru ciała u królika i 100mg na kg ciężaru ciała u psa. Krew pobierano przed wprowadzeniem NaNO_2 i 15 minut po wprowadzeniu tego związku. W grupie zwierząt kontrolnych krew pobierano dwukrotnie w odstępach 15-minutowych z każdego zwierzęcia. Na podstawie otrzymanych wyników H ł y ń c z a k (15) stwierdziła, że zarówno u królików jak i psów ($p < 0,01$) po wystąpieniu methemoglobinemii wzrasta ilość ATP w erytrocytach.

Zawartości ATP w erytrocytach w omówionych powyżej przypadkach przedstawione są na rysunku 2.



Rys. 2. Przypadki patologiczne, w których zaobserwowano różnice zawartości ATP w μM na ml erytrocytów

1 — gpp; HCl , NH_4Cl , 50-100 mesh, temperatura $0-4^\circ\text{C}$, $p < 0,05$; 2 — dziedziczny podwyższony poziom ATP (D — obniżona aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu); 3 — praca w atmosferze CS_2 ; HCl , NH_4Cl , 20-50 mesh, temperatura pokojowa, $p < 0,05$; 4 — methemoglobinemia u królików (a) i psów (b); HCl , NH_4Cl , 50-100 mesh, temperatura pokojowa, $p < 0,01$

III. Wpływ estrogenów na zawartość fosforu w erytrocytach

Nukleotydy adeninowe we krwi zawarte są, jak już wspomniałam, wyłącznie w krwinkach. Z punktu widzenia metabolizmu tych związków, erytrocyt stanowi układ wysoce autonomiczny. Jednak metabolizm ich związany jest niewątpliwie z innymi estrami fosforanowymi erytrocytów, a te z kolei ulegają wpływowi różnych czynników zewnętrznych. Jednym z tych czynników są hormony estrogenne. Christensen i Jones (9) wykazali, że siarczan β -estradiolu i wolne estrogeny zmniejszają przenikanie fosforanów do wnętrza erytrocytów. Lachowicz (20) oznaczyła zawartość $P_{\text{całk}}$ erytrocytów oraz osocza w różnych okresach ciąży, w przebiegu której następuje stały wzrost zawartości estrogenów we krwi. Jednocześnie przeprowadzała ona oznaczenia trzech frakcji estrogenów tj. estronu, 17- β -estradiolu i estriolu metodą Ittricha (17). Badania wykazały zmniejszenie się w erytrocytach zawartości $P_{\text{całk}}$ przy zwiększonej zawartości estrogenów ($p < 0,01$). Rozpatrując tę zależność dla poszczególnych frakcji, stwierdzono, że jest ona najwyraźniej zaznaczona dla 17- β -estradiolu.

Chciałabym raz jeszcze zestawić powyżej omówione dane, podkreślając te zaburzenia metabolizmu, które możnaby wykluczyć oraz te, które mogą mieć wpływ na zawartość ATP we wnętrzu erytrocytów.

Następujące zaburzenia ogólnoustrojowe nie mają wpływu na zawartość ATP w erytrocytach:

obniżenie: transportu i fosforylacji glukozy, syntezy glikogenu, glikolizy, fosforylacji tiaminy, przemiany kwasu pirogronowego, (przy czym zakłócenie tej przemiany może doprowadzić do podwyższenia poziomu kwasu pirogronowego w surowicy), przemiany acetylo-CoA na kwasy tłuszczowe, wreszcie obniżenie syntezy białek,
wzrost: przemiany acetylo-CoA na kwas aceto-octowy, rozpadu kwasów tłuszczowych, białek i glikoneogenezy.

Jak widać z powyższego zestawienia, bardzo poważne ogólnoustrojowe zaburzenia metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek nie wywierają wpływu na metabolizm erytrocytów.

Również, jak wynika z badań w przypadku wrodzonej anemii hemolitycznej, zmiany w samych erytrocytach tj. w ich strukturze oraz metabolizmie, związane z obniżeniem aktywności heksokinazy oraz ewentualnymi defektami enzymatycznymi przed i po syntezie 2,3-DPG, miałyby jedynie niewielki wpływ na zawartość ATP.

Co więc mogłoby wpływać na zawartość ATP w erytrocytach? Ze zmian zaobserwowanych w przypadku gpp możnaby sugerować, że obniżenie zawartości ATP może być związane np. z obniżeniem poziomu ryboflawiny, niedoborem Fe, zwiększeniem zawartości kwasu moczowego, zwiększeniem zawartości kreatyny i kreatyniny we krwi u chorych

na gpp. Należałoby tu może jeszcze podkreślić zaburzenia przemiany hormonów sterydowych, szczególnie estrogenów.

Podwyższeniu zawartości ATP towarzyszy: w retikulocytach mniej aktywny układ dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu oraz zwiększona zawartość FAD.

przy dziedzicznym podwyższeniu ATP — w niektórych przypadkach niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu,

przy pracy w atmosferze CS_2 — wiązanie grup $-NH_2$ białek i aminokwasów i ich przekształcanie w pochodne sulfohydrylowe, a więc uszkodzenie struktur białkowych oraz uszkodzenie nadnerczy i związane z tym zaburzenia hormonalne,

w methemoglobinemii — współdziałanie w procesie redukcji tworzącej się methemoglobiny zarówno układu beztlenowej glikozy jak i cyklu pentozowego (przy utlenianiu glukozy-6-fosforanu do kwasu 6-fosfoglikonowego, pierwszym koenzymem dehydrogenazy, biorącej udział w tej reakcji jest NADP).

Można tu jeszcze wspomnieć o dwóch pracach, które nie dotyczą wprawdzie krwi, a poruszają zjawiska być może w pewnym sensie analogiczne do zachodzących w erytrocytach. Skulachev i wsp. (29) stwierdzili w mitochondriach wątroby, że w procesach oksydo-redukcji kompleksu cytochromu b_5 , w których pojawia się wiązanie wysokiej energii, zachodzi bezpośrednie oddziaływanie wzajemne nośnika i części adeninowej nukleotydu. Longmuir i McCabe (22) badając transport tlenu w skrawkach tkanek, doszli do wniosku na podstawie rozważań kinetyki dyfuzji tlenu, że w procesie tym tlen łączy się z nośnikiem.

Na podstawie przytoczonych danych możnaby spodziewać się zwiększonych zawartości ATP w erytrocytach w przypadkach, w których występuje zmniejszona aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu być może w związku z tym zmniejszona ilość NADP oraz być może zwiększona zawartość FAD. Sądzę, że takimi przypadkami byłyby m.in. methemoglobinemia, oraz stany patologiczne związane z przekształcaniem HbO_2 na jej pochodne. Należałoby tu również brać pod uwagę wpływ hormonów sterydowych a szczególnie estrogenów.

LITERATURA

1. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 449 (1959).
2. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 459 (1959).
3. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 466 (1959).
4. Bartlett G. R., Barnett H. N., *J. Clin. Invest.* **39**, 56 (1960).
5. Bartlett G. R., Shafer A. W., *J. Clin. Invest.* **39**, 62 (1960).
6. Bock R. M., Ling Nan-Sing, Morell S. A., Lipton S. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 253 (1956).
7. Brewer G. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 430 (1965).

8. Cendrowski W., *Post. Neurol. Neurochir. Psych.* **4**, 61 (1958).
9. Christensen H. N., Jones J., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 355 (1962).
10. Györki J., Sandell B. M., *Acta Rheumatol. Scand.* **7**, 127 (1961).
11. Haydu G. G., *Am. J. Occupational Therapy* **3**, 177 (1949).
12. Haydu G. G., Wolfson A. H., *Rheumatism* **6**, 9 (1950).
13. Haydu G. G., *Am. J. Med. Sci.* **71**, 225 (1953).
14. Haydu G. G., *Rheumatism* **32**, 10 (1954).
15. Hłyńczak A. J., Leyko W., *Biul. WAM* **8**, 109 (1965). oraz *ibid* **8**, 215 (1965).
16. Hofmann E. C. G., Rapoport S., *Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.* **304**, 157 (1956).
17. Ittrich G., *Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.* **320**, 103 (1960).
18. Jones H. H., Jones H. H., jr. Bunch L. D., *Ann. Int. Med.* **33**, 831 (1950).
19. Joslin E. P., Root H. F., White P., Marble A., *The treatment of Diabetes Mellitus*, Philadelphia 1959.
20. Lachowicz L., Leyko W., *Clin. Chim. Acta*, **12**, 589 (1965).
21. Leyko W., *Abhandl. Deutsch. Akad. Wiss.* Nr 1 337 (1964).
22. Longmuir J. S., McCabe M., *Symposium Elektrochemische Methoden und Prinzipien in der Molekular-Biologie*, A-18, Jena 1965.
23. Lorenc J., Leyko W., *Clin. Chim. Acta* **9**, 585 (1964).
24. Luft S., Pakuła Z., *Reumatologia Polska* **7**, 5 (1962).
25. Mills G. C., Summers L. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 7 (1959).
26. Mills G. C., Burger D. O., Schneider M., Levin W. C., *J. Lab. Clin. Med.* **58**, 725 (1961).
27. Raczkiwicz J., Leyko W., w przygotowaniu do druku.
28. Robinson M. A., Lodder P. B., de Gruchy G. C., *Brit. J. Haematol.* **7**, 327 (1961).
29. Skulachev V. P., Goldstein J. J., Denisovich L. J., Evtodienko V. Yu., Tikhonova G. V., Chistyakov V. V., Jasaitis A. A., *Symposium Elektrochemische Methoden und Prinzipien in der Molekular-Biologie*, A-2, Jena 1965.
30. Sperry J. G., Waelsch W. M., cyt. W ann. Rev. Bioch. 1956, w art. Mc Alpine D., Compston N., Lumsden C.,
31. Szczecińska O., Leyko W., *Clin. Chim. Acta* **13**, 131 (1966).
32. Zurcher C., Loos J. A., Prins H. K., Abstract K-46, Xth Congress of the International Society of Hematology, Stockholm 1964.

ELŻBIETA WOJTECKA-ŁUKASIK *

Hydroksylacja proliny a biosynteza kolagenu

The Hydroxylation of Proline in the Synthesis of Collagen

The hydroxylation of proline to hydroxyproline during the synthesis of collagen is discussed.

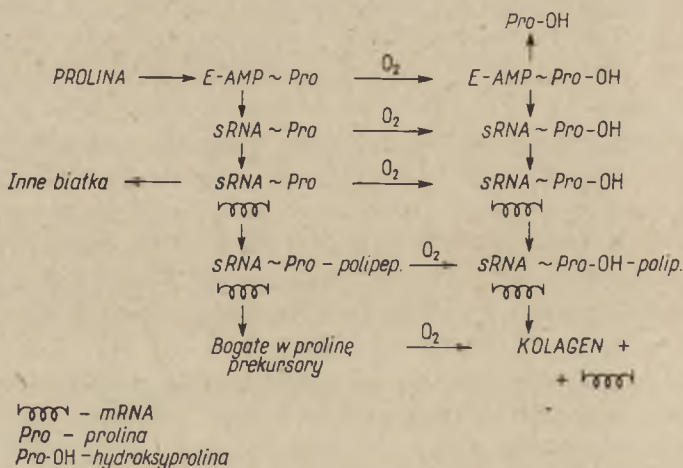
Kolagen, nierozpuszczalne włókniste białko tkanki łącznej, jest jedynym białkiem zwierzęcym, które charakteryzuje się wysoką zawartością hydroksyproliny. Średnia zawartość jej w kolagenie ssaków wynosi około 14%, u gadów znaleziono od 9,3% do 10,2%, a u ryb 5,8-7,9% (20). Duża zawartość aminokwasów pirolidynowych (proliny i hydroksyproliny) w łańcuchu polipeptydowym powoduje pewne zmiany w strukturze cząsteczki białka (20). Aminokwasy te w miejscu azotu aminowego zawierają azot iminowy, w związku z czym zamiast wiązania typu $-CO-NH-$ pojawia się wiązanie $-CO=N-$. Harrington (21) omawiając problem konfiguracji białek, cytując badania Paulinga wskazujące, że obecność aminokwasów pirolidynowych w łańcuchu polipeptydowym wpływa na ułożenie tego łańcucha w przestrzeni, ponieważ pochodne proliny są tymi miejscami, w których łańcuch polipeptydowy ulega zagięciu. O roli pochodnych proliny w przestrzennej konfiguracji białek świadczą przytoczone przez Harringtona (21) badania Szent Gyorgi'ego i Cohen'a. Wykazali oni, że w białkach o zawartości proliny mniejszej niż 30 reszt na 1000 łańcuchy polipeptydowe mają określoną konfigurację przestrzenną, natomiast kiedy zawartość proliny jest większa konfiguracja odpowiada przypadkowo zwinętemu łańcuchowi (*random coil*). Na skutek braku protonu na azocie iminowym proliny i hydroksyproliny w białkach bogatych w aminokwasy pirolidynowe mniejsza jest liczba wiązań wodorowych, utrwalających strukturę łańcuchów i to właśnie powoduje występowanie „*random coil*”.

Powstaje zagadnienie, czy do budowy cząsteczki kolagenu jest wykorzystywana wolna hydroksyprolina, czy też powstaje ona z proliny już wbudowanej w kolagen lub w struktury prokolagenowe. Wyłania się wobec tego dalsze zagadnienie, na którym etapie biosyntezy kolagenu następuje hydroksylacja proliny i w jakim stopniu zależy od niej powstawanie kolagenu.

* Mgr, asystent Zakładu Biochemii Instytutu Reumatologicznego w Warszawie.

Biosynteza kolagenu przebiega w sposób analogiczny do ogólnie przyjętego schematu dla innych białek. Badania Lowthera (35) Prockopa i wsp. (47) oraz Peterkofskyego i wsp. (41, 43) sugerują, że miejscem biosyntezy kolagenu są mikrosomy. Przeprowadzając badania przy użyciu znakowanej proliny znaleziono najwyższą aktywność we frakcji mikrosomalnej. Kretsinger i wsp. (30) stwierdzili, że z syntezą kolagenu związane są agregaty rybosomów tzw. polysomy. Doświadczenia japońskich badaczy Konno i Tetsuka (31) przeprowadzane *in vitro* na materiale z ziarniniaka wskazują, że tworami bardziej aktywnymi od mikrosomów w biosyntezie kolagenu są cięższe cząstki zawarte we frakcji 85S. Pojawiają się one w fibroblastach (56) podczas intensywnej syntezy kolagenu. Według Kajikawa i wsp. (28) są one identyczne z ergastoplazmą. Cząstki aktywne w biosyntezie kolagenu mogą być porównywane do polysomów lub do dużych tworów obecnych w gruczołach jedwabnika (39). Badania pod mikroskopem elektronowym wykazały, że różnią się one od mitochondriów.

Peterkofsky i Udenfried (43) podali ogólny schemat biosyntezy kolagenu z zaznaczeniem możliwych miejsc hydroksylacji proliny:



1. Rola wolnej hydroksyproliny w biosyntezie kolagenu

Pierwsze badania nad wbudowywaniem wolnej hydroksyproliny bezpośrednio w cząsteczkę kolagenu przeprowadzili Stetten i wsp. (57, 58) i wykazali, że wolna hydroksyprolina nie bierze udziału w biosyntezie kolagenu. Obserwacje Stettena potwierdzili Green i wsp. (17), a następnie również Konno i wsp. (31) na podstawie pomiaru włączania ³H-hydroksyproliny do ziarniniaka. Natomiast Mitoma i wsp. (38) stwierdzili, że wolna hydroksyprolina może być również włączana w kolagen, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż prolina. Ostatecznie wydaje się zatem, że wolna hydroksyprolina nie bierze udziału w bio-

syntezie kolagenu lub jej udział jest minimalny. Prekursorem hydroksyproliny w tym białku jest wolna prolina lub jej połączenia, które ulegają hydroksylacji w toku biosyntezy kolagenu.

2. Warunki biosyntezy kolagenu i hydroksylacji proliny

Niewiele wiadomo na temat warunków hydroksylacji proliny. Wydaje się, na podstawie licznych badań, że proces ten ma charakter enzymatyczny. Ustalono, że hydroksylacja proliny przebiega tylko w warunkach tlenowych. Jak wykazały doświadczenia z ^{18}O , pobierany tlen pochodzi wprost z tlenu molekularnego (11, 13, 14, 32, 48, 55). W warunkach beztlenowych szybkość hydroksylacji jest dziesięciokrotnie mniejsza (8). W czasie hydroksylacji następuje utrata wodoru z czwartego atomu węgla C_4 proliny. Stone i wsp. (59) stwierdzili utratę dwóch atomów wodoru, jednak doświadczenia Lamporta (3) a ostatnio również Prockopa i wsp. (50) wykazały utratę tylko jednego atomu wodoru.

Z badań Hurycha i wsp. (24) wynika, że hydroksylacja proliny przebiega w obecności jonów żelaza i miedzi oraz tlenu atmosferycznego. Stwierdzono również, że cyjanki hamują całkowicie hydroksylację proliny oraz syntezę kolagenu, co sugeruje obecność metalu w enzymach hydroksylujących. Tę hipotezę potwierdzają także wyniki doświadczeń przeprowadzonych z *o*-fenantroliną i α,α -dwupirydylem, substancjami, które wiążą żelazo dwuwartościowe. Trudno ustalić, czy fluorki mają specyficzny wpływ na biosyntezę kolagenu poza tym, że usuwają ze środowiska magnez, który jest niezbędny do syntezy białek. Również dyskusyjny jest wpływ pirofosforanów, które, pomimo że wiążą metale, nie hamują syntezy kolagenu prawdopodobnie dlatego, że środowisko zawiera interferujące jony magnezu i wapnia. Z doświadczeń tych można wyciągnąć wniosek, że substancje tworzące kompleksy z żelazem specyficznie hamują syntezę kolagenu nie wpływając na syntezę innych białek. Również, jak stwierdzili Konno i wsp. (51). RN-aza, chloramfenikol hialuronidaza, fiolet gencjanowy i penicylina są słabymi inhibitorami włączania aminokwasów w cząsteczkę kolagenu, znacznie silniejsze działanie wywiera natomiast *p*-chlorortęciobenzoesan. Puromycyna hamująca specyficznie syntezę białek w rybosomach przez wczesne ograniczenie wzrostu powstającego polipeptydu hamuje również, jak wykazały badania Prockopa i wsp. (27) późniejszą hydroksylację proliny w polipeptydach. Również aktynomycyna D hamuje powstawanie związanej z mikrosomami hydroksyproliny na skutek zahamowania syntezy mRNA (2).

Z badań Greena i wsp. (18) wynika, że kwas mlekowy w stężeniu do 30 mM/l wyraźnie pobudza syntezę kolagenu w fibroblastach *in vitro* z równoczesnym zahamowaniem syntezy innych białek. Mleczan sodu,

podobnie jak kwas mlekowy, przyspiesza formowanie kolagenu lecz nie hamuje syntezy niekolagenowych białek. Dane te sugerują, że działanie pobudzające związane jest z jonem mleczanowym, a hamujące z wodorowym.

3. Mechanizmy hydroksylacji proliny

Hurych i wsp. (22), Fuimoto i wsp. (13, 14) oraz Stone i wsp. (59) stwierdzili, że hydroksylacja proliny jest niezbędna dla syntezy kolagenu. Stone i wsp. (59) prowadząc badania z ^3H -proliną wykazali, że w czasie formowania cząsteczki kolagenu część proliny włączana jest bezpośrednio w łańcuch polipeptydowy, a część jej ulega hydroksylacji w postaci kompleksu z sRNA i dopiero jako hydroksyprolina zostaje wbudowana w łańcuch. Do podobnych wniosków doszli też Coronado i wsp. (7). Inkubując embriony kurze z ^{14}C -proliną wyizolowali oni oraz poddali oczyszczeniu i identyfikacji substancję, która okazała się kompleksem hydroksyproliny z sRNA. W toku dalszych swych badań autorzy ci ustalili, że hydroksylacji ulega prolina w kompleksie (8). Wyniki ostatnich badań Jacksona i wsp. (6) są również zgodne z powyższą hipotezą. Badacze ci przeprowadzali doświadczenia na układach bardzo aktywnie syntetyzujących kolagen: 8-dniowych embrionach kurzych i ranach w siódmym dniu gojenia się. Znaleźli oni w tych układach związki, które zidentyfikowali, podobnie jak Coronado, jako kompleksy hydroksyproliny z sRNA. Jackson i wsp. przypuszczają, że kompleksy te są związkami pośrednimi w syntezie kolagenu i wypowiadają się za hipotezą, że hydroksylacja proliny następuje na poziomie kompleksu prolina-sRNA, a więc jeszcze przed połączeniem proliny wiązaniem peptydowym. Wyniki doświadczeń innych badaczy również potwierdzają tę hipotezę (9, 36, 59).

Zupełnie inny pogląd na mechanizm hydroksylacji proliny reprezentują Peterkofsky i wsp. (43, 44). Stwierdzili oni, że po podaniu embrionom kurzym znakowanej proliny tak *in vivo* jak i *in vitro*, w białkach frakcji mikrosomalnej pojawia się hydroksyprolina o wysokiej radioaktywności. Wyszuli oni hipotezę, że substratami podlegającymi hydroksylacji w toku biosyntezy kolagenu są zawierające prolinę polipeptydy luźno związane z mikrosomami poprzez sRNA. Do podobnych wniosków doszli Juvva i wsp. (27), którzy badali syntezę kolagenu w obecności różnych dawek puromycyny. Stwierdzili oni, że po podaniu znakowanej proliny embrionom kurzym znakowana hydroksyprolina nie pojawia się w czasie pierwszych 30 minut inkubacji, tj. w okresie, w którym prolina jest wbudowana w polipeptydy związane z mikrosomami. Dodanie puromycyny w początkowym okresie inkubacji hamuje całkowicie syntezę kolagenu, a wprowadzenie puromycyny po 30 minutach inkubacji hamuje syntezę nieznacznie. Doświadczenia te sugerują, że po 30 minutach inkubacji większość proliny (ok. 70%) jest już związana peptydowo. Peterkofsky i wsp. (45) oraz Prockop i wsp. (52) opierając się na wy-

nikach doświadczeń nad wpływem puromycyny, rybonukleaz i nad inkorporacją ^{14}C -proliny w warunkach beztlenowych doszli do wniosku, że po 30 minutach inkubacji mikrosomy zawierają znakowaną prolinę związaną peptydowo, która w następnym etapie ulega hydroksylacji. Autorzy ci nie znaleźli dowodów wskazujących na obecność we frakcji mikrosomalnej kompleksu proliny z sRNA. Pomiary absorpcji w ultrafiolecie wykazały obecność niewielkiej ilości RNA (poniżej 10%). Stwierdzono ponadto, że substraty i enzym hydroksylujący, hydroksylaza, występują w tej samej frakcji komórkowej, a mianowicie w mikrosomach (51). Reakcja hydroksylacji wymaga ponadto obecności nieenzymatycznego czynnika występującego w rozpuszczalnej frakcji białkowej oraz donatora wodoru. Tym nieenzymatycznym czynnikiem może być proteidowo związany metal np. żelazo, gdyż wiele hydroksylaz wymaga obecności żelaza. Donatorem wodoru może być kwas askorbinowy lub 2-amino-4-hydroksydwumetylopterydyna. Doświadczenia te potwierdzają całkowicie hipotezę, że prolina jest wbudowywana bezpośrednio w polipeptydy związane z mikrosomami, gdzie następnie ulega hydroksylacji. K o n n o i wsp. (31) stwierdzili, że polipeptydowe prekursorzy kolagenu mają zapewne budowę podwójnie lub potrójnie skręconego łańcucha polipeptydowego. Ich zdaniem tylko tak zbudowany polipeptyd może być właściwym prekursorem cząsteczki kolagenu. Inni badacze również uzyskali wyniki potwierdzające omówioną hipotezę (5, 34).

4. Rola kwasu askorbinowego w biosyntezie kolagenu i hydroksylacji proliny

Znaczenie kwasu askorbinowego dla prawidłowej funkcji tkanki łącznej a szczególnie dla biosyntezy kolagenu jest przedmiotem wielu badań. R o b e r t s o n i wsp. (53), G o u l d i wsp. (15) oraz S t o n e i wsp. (59) podają, że przy niedoborze kwasu askorbinowego obserwuje się znaczne zmniejszenie szybkości syntezy kolagenu. Jak wykazały doświadczenia J a f f e r e y a i wsp. (25) przeprowadzone na 8-dniowych embrionach kurzych, usunięcie kwasu askorbinowego ze środowiska całkowicie hamuje syntezę kolagenu po czterech dniach. Synteza białek niekolagenowych pozostaje nieuszkodzona. Brak kwasu askorbinowego jak podają G r o s s i wsp. (19) nie tylko wpływa na syntezę nowego lecz także powoduje destrukcję już powstałego kolagenu. R o b e r t s o n i wsp. (53, 54) oraz G o u l d i wsp. (15) podają, że kwas askorbinowy wpływa na biosyntezę kolagenu na etapie hydroksylacji proliny. Zdaniem ich w awitaminozie C nagromadzają się bogate w prolinę polipeptydy, które nie ulegają hydroksylacji, co znacznie obniża szybkość powstawania kolagenu. Późniejsze prace G o u l d a i wsp. (16) sugerują, że w niedoborze kwasu askorbinowego powstaje metaboliczny defekt przemiany proliny w hydroksyprolinę. Inni autorzy stwierdzili, że kwas askorbinowy nie

bierze wprawdzie bezpośredniego udziału w procesie hydroksylacji, jego obecność jednak jest konieczna do utrzymania w komórce prawidłowego funkcjonowania układu hydroksylującego.

Stone i wsp. (59, 60) przedstawili schemat przemiany proliny w hydroksyprolinę, wg którego w syntezie kolagenu biorą udział dwie pule proliny, jedna z nich (PRO)^I dostarcza proliny bezpośrednio wbudowywanej w kolagen, a prolina drugiej puli (PRO)^{II} przechodzi w hydroksyprolinę (HYDRO)^{III}; kwas askorbinowy bierze udział w formowaniu hydroksyproliny.

Cmuchałowa i wsp. (6) stwierdzili, że szybkość hydroksylacji proliny zależy od poziomu kwasu askorbinowego. *In vitro* znaleziono optymalne stężenie kwasu askorbinowego, przy którym obserwuje się maksymalną hydroksylację proliny; *in vivo* natomiast wyraźnej zależności nie stwierdzono. Wpływ kwasu askorbinowego na szybkość hydroksylacji *in vivo* jest różny w różnych narządach i zależy od szybkości odnowy kolagenu. Im szybsza jest odnowa kolagenu, tym większy jest wpływ kwasu askorbinowego, stąd też wpływ ten jest wyraźny w wątrobie, a znikomy w płucach i mięśniach.

W ostatniej pracy Peterkofsky i wsp. (45) donoszą, że kwas askorbinowy w hydroksylacji proliny spełnia rolę donatora wodoru lub też działa pośrednio poprzez utrzymywanie nukleotydu pirydynowego w formie zredukowanej.

5. Rola hormonów w biosyntezie kolagenu i hydroksylacji proliny

Zauważono, że hormony mają wpływ na biosyntezę kolagenu. Kortyzol i kortyzon wybitnie obniżają szybkość syntezy kolagenu podobnie jak deksametazon i hydrokortyzol (1, 9, 10, 40). Mechanizm działania tych hormonów nie jest znany. Zdaniem Daghada i wsp. (9) hamują one wbudowywanie związków pośrednich, zawierających hydroksyprolinę, do cząsteczki kolagenu. Nocenti i wsp. (40) podają, że to obniżenie szybkości syntezy kolagenu nie jest wywołane zahamowaniem hydroksylacji proliny. Ostatnie prace Manner i wsp. (37) sugerują, że hydrokortyzon hamuje nie tylko syntezę kolagenu, lecz również tworzenie się polisomów, nie stwierdzono natomiast zahamowania syntezy mRNA i hydroksylacji proliny. Zdaniem tych autorów hormony powodują funkcjonalny defekt syntezy białka poprzez zaburzenie substruktury komórkowej.

Flanagan i wsp. (12), badając *in vivo* wpływ wyciągów z przytarczyc na szybkość syntezy kolagenu, stwierdzili znaczne obniżenie szybkości włączania znakowanej proliny do kolagenu.

Kao i wsp. (29) podają, że hormony żeńskie: estron, estradiol i progesteron wybitnie podwyższają szybkość syntezy kolagenu.

6. Uwagi końcowe

Mechanizm hydroksylacji proliny do tej pory nie został dostatecznie wyjaśniony. Przyjmuje się istnienie dwóch możliwych dróg powstawania hydroksyproliny w toku biosyntezy kolagenu:

1. hydroksylacja proliny zachodzi na poziomie kompleksu sRNA-prolina i powstająca w aktywnej formie hydroksyprolina włączana jest w cząsteczkę kolagenu,
2. hydroksylacji ulegają bogate w prolinę polipeptydy. Udział kwasu askorbinowego w biosyntezie kolagenu jest również dyskusyjny. Nie wyjaśniono ostatecznie, czy bierze on udział w hydroksylacji proliny, czy we włączaniu hydroksyproliny w cząsteczkę kolagenu, czy też wpływa pośrednio zapewniając prawidłowe działanie układu hydroksylującego w komórce.

LITERATURA

1. Bavetta L. B., Bekhor J., Nimni E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **110**, 294 (1962).
2. Bekhor J., Bavetta L. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 613 (1965).
3. Chvapil M., Hurych J., *Nature* **184**, 1145 (1959).
4. Chvapil M., Cmuchalowa B., *Nature* **186**, 806 (1960).
5. Chvapil M., Holeckowa E., Bobrle V., Hurych J., *J. Exptl. Cell. Res.* **26**, 1 (1962).
6. Cmuchalowa B., Chvapil M., *Coll. Curr.* **5**, nr 4 (1964).
7. Coronado A., Mardones E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 75 (1963).
8. Coronado A., Mardones E., Cels J., Allende J. E., *Coll. Curr.* **5**, nr 3 (1964).
9. Daughaday W. H., Maritz J. K., *J. Biol. Chem.* **237**, 2831 (1962).
10. Ebert P. S., Prockop D., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 390 (1963).
11. Ebert P. S., Prockop D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 305 (1962).
12. Flanagan B., Nichols J., *Endocrinology* **74**, 180 (1964).
13. Fojimoto D., Tamiya N., *Biochem. J.* **84**, 333 (1962).
14. Fojimoto D., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 559 (1963).
15. Gould B. S., Woessner J., *J. Biol. Chem.* **226**, 289 (1957).
16. Gould B. S., *J. Biol. Chem.* **232**, 637 (1958).
17. Green N. M., Lowther D. A., *Biochem. J.* **71**, 51 (1959).
18. Green N. M., Goldberg B., *Nature* **204**, 347 (1964).
19. Gross J., *J. Exptl. Med.* **109**, 557 (1959).
20. Hall D. A., *The Chemistry of Connective Tissue* red. N. Kugelmass, USA 1961.
21. Harrington W. F., Hippel P. H., *Adv. Protein Chem.* **16**, 1 (1961).
22. Hurych J., Chvapil M., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 1 (1962).
23. Hurych J., *Coll. Curr.* **4**, nr 5 (1963).
24. Hurych J., Chvapil M., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 361 (1965).
25. Jaffrey J., Martin G. R., *Coll. Curr.* **5**, 259 (1964).
26. Jakson D. S., Watkis D., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 152 (1964).
27. Juva K., Prockop D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 174 (1964).
28. Kajikawa K., Tanni T., Hirono R., *Acta Path. Japon.* **9**, 61 (1951).

29. Kao K. Y. T., Hitt W. E., Bush T. H., McGavack J., *Coll. Curr.* **5**, 264 (1964).
30. Kretsinger R., Manner G., Gould B. S., Rich A., *Nature* **202**, 438 (1964).
31. Konno K., Tetsuka T., *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 581 (1964).
32. Lamporf D. T. A., *J. Biol. Chem.* **238**, 1438 (1963).
33. Lamporf D. T. A., *Nature* **202**, 293 (1964).
34. Levine M., *Fed. Proc.* **21**, 169 (1962).
35. Lowther D. A., Green N. M., Chapman J. A., *Biochem. Biophys. Cytol.* **10**, 373 (1961).
36. Manner G., Gould B. S., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 243 (1963).
37. Manner G., Gould B. S., *Coll. Curr.* **5**, 1205 (1965).
38. Mitoma C., Smith T. E., Fridberg F., Rayford C., *J. Biol. Chem.* **234**, 78 (1959).
39. Miura Y., Momose K., Sunaga K., Idedak K., *J. Biochem. (Tokyo)* **52**, 33 (1962).
40. Nocenti M. R., Lederman C. E., Furey C. A., Lopano A. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **117**, 215 (1964).
41. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 184 (1961).
42. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Fed. Proc.* **21**, 169 (1962).
43. Peterkofsky B., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **238**, 3966 (1963).
44. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 257 (1963).
45. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 335 (1965).
46. Prockop D. J., Udenfriend S., Linstedt J., *J. Biol. Chem.* **236**, 1395 (1961).
47. Prockop D. J., Peterkofsky B., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **237**, 391 (1962).
48. Prockop D., Kaplan A., Udenfriend S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 162 (1962).
49. Prockop D., Kaplan A., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 499 (1963).
50. Prockop D., Ebert P., Shapiro B., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 112 (1964).
51. Prockop D., Juva K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 54 (1965).
52. Prockop D., Juva K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 661 (1965).
53. Robertson W., van B. Schwartz B., *J. Biol. Chem.* **201**, 689 (1953).
54. Robertson W., van B. Hivert J., Herman C., *J. Biol. Chem.* **234**, 105 (1959).
55. Schorpenssel A., Wolf F., *Z. Tierphysiol. Tierernahr.* **3**, 913 (1957).
56. Stearm M. L., *Am. J. Anatomy* **66**, 133 (1940).
57. Stetten M. R., Schoenheimer R., *J. Biol. Chem.* **153**, 113 (1964).
58. Stetten M., *J. Biol. Chem.* **181**, 31 (1949).
59. Stone N., Meister A., *Nature* **194**, 555 (1962).
60. Stone N., Meister A., *Fed. Proc.* **21**, 37 (1962).

ALEKSANDER KOJ*

Metabolizm albuminy osocza w świetle badań izotopowych

Metabolism of Plasma Albumin in the Light of Isotopic Investigations

Plasma albumin distribution in animal organism and the measurements of catabolic and synthetic rates of this protein are discussed. Some regulatory mechanisms involved in the maintenance of constant level of plasma albumin are reviewed.

niu losów wstrzykniętego do krwioobiegu preparatu białkowego znakowanego izotopem promieniotwórczym, zwykle izotopem jodu ^{131}J . Problemy znakowania białek stanowią odrębną dziedzinę badań i przedstawione są w licznych monografiach (17, 59, 63) oraz pracach doświadczalnych, jak to już wspomniano w poprzednim przeglądzie (49) poświęconym biosyntezie niektórych białek osocza. Jeśli ^{131}J -albumina zachowała

Osocze krwi zawiera całą plejadę białek, których pochodzenie, własności fizykochemiczne i funkcje biologiczne są rozmaite, co z kolei determinuje swoistość i różnorodność metabolizmu. Przegląd niniejszy poświęcony jest wybranym zagadnieniom przemiany albuminy, która jest głównym składnikiem białkowym osocza, a jej rola biologiczna jest ściśle określona i polega przede wszystkim na utrzymywaniu stałego ciśnienia onkotycznego.

Badanie metabolizmu albuminy *in vivo* polega najczęściej na śledzeniu w procesie znakowania swój natywny charakter, to po wstrzyknięciu jej cząsteczki mieszają się w krwioobiegu z białkiem ustrojowym i podlegają wszystkim przemianom charakterystycznym dla tego białka. W pierwszym okresie doświadczenia aktywność właściwa albuminy osocza szybko maleje wskutek przenikania do płynu pozanaczyniowego i mieszania się z białkiem zawartym w limfie. Rozróżnienie między pulą naczyniową i pozanaczyniową albuminy jest zasługą pionierskich doświadczeń Sterlinga (82) i stanowi jedno z podstawowych założeń przy rozważaniu metabolizmu tego białka. Sam proces rozkładu albuminy nie powinien wpływać na aktywność właściwą białka, gdyż zawsze usuwana jest okreś-

* Dr, st. asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie

lona frakcja albuminy zawierająca stałą proporcję znakowanych i nieznakowanych cząsteczek. Z drugiej jednak strony, wskutek rozkładu, zmniejsza się wykładniczo całkowita ilość cząsteczek znakowanego białka w ustroju. Natomiast procesy syntezy polegające na dostarczeniu do krążenia nowych nieznakowanych cząsteczek muszą prowadzić do rozcieńczenia piętna izotopowego i spadku aktywności właściwej. Szybkość procesów odnowy białka można wyrażać w wartościach względnych jako frakcję puli ustrojowej (lub naczyniowej) rozłożoną lub wytworzoną w jednostce czasu, albo też w wartościach bezwzględnych, np. w gramach na dobę. Rozróżnienie tych pojęć względnej i bezwzględnej szybkości odnowy jest bardzo istotne dla dalszych rozważań, gdyż w rzeczywistości pewne dane odnoszą się wyłącznie do wartości względnych, a inne do bezwzględnych.

Albumina zawarta jest w osoczu krwi człowieka w stężeniu 3,7-4,6⁰/. Odpowiada to w przybliżeniu 95-145g albuminy w całym łożysku naczyniowym, albo w przeliczeniu średnio 1,5-2,0g na kg wagi organizmu (85). Całkowita zawartość albuminy osocza w organizmie jest przeszło dwukrotnie większa i wynosi około 300g, co oznacza, że więcej niż połowa albuminy znajduje się w puli pozanaczyniowej. Wielkość puli naczyniowej albuminy można wyznaczyć łatwo przez pomiar stężenia tego białka w osoczu oraz przez określenie objętości osocza przy użyciu błękitu Evansa (24), lub dzięki zastosowaniu techniki rozcieńczenia izotopowego po dożylnym wstrzyknięciu albuminy znakowanej izotopem jodu ¹³¹J (11, 17, 82).

Staly poziom albuminy osocza utrzymywany jest dzięki złożonym mechanizmom regulującym, które nie zostały dotąd wyjaśnione we wszystkich szczegółach. Nieustanna wymiana białka między krwią a przestrzenią pozanaczyniową oraz zmienna szybkość procesów rozkładu i syntezy stanowią główne czynniki wyrównujące wszelkie zakłócenia homeostazy białkowej osocza.

I. Specyficzne właściwości i pochodzenie pozanaczyniowej puli albuminy osocza

Pula pozanaczyniowa albuminy nie jest ściśle ograniczona przestrzenią, jak to ma miejsce z krwią krążącą, ale rozproszona jest w szczelinach tkankowych i limfie, a zatem składa się z szeregu przedziałów, które nie pozostają ze sobą w bezpośrednim kontakcie, co stwarza możliwość niejednorodności. Wiadomo przecież, że limfa zawarta w poszczególnych narządach różni się znacznie pod względem składu, np. limfa krezkowa od limfy skórnej. Krążenie limfy jest znacznie wolniejsze niż krwi, co jest dodatkowym czynnikiem odpowiedzialnym za niejednorodność puli pozanaczyniowej albuminy. Z puli tej nie można pobierać żadnych reprezentatywnych próbek, a informacje o składzie i rozmiarach puli mają

zwykle charakter przybliżony i wtórny i opierają się na pomiarach składu limfy, przepuszczalności naczyń czy też śledzeniu losów znakowanych cząsteczek wstrzykniętych do krwioobiegu. Zawartość pozanacyniowej albuminy w poszczególnych przedziałach limfatycznych ustroju jest trudna do oceny, ale już *Humphrey* i wsp. (41) zwrócili uwagę na istotną rolę skóry i tkanki podskórnej. Autorzy ci wykazali, że skóra królika zawiera około 0,7g albuminy osocza na 100g tkanki, co w przeliczeniu na cały organizm odpowiada 25% puli naczyniowej albuminy. *Rotschild* i wsp. (74) pobierali chirurgicznie próbki skóry i mięśni człowieka po dożylnym wstrzyknięciu znakowanej albuminy. Doszli oni do wniosku, że te dwie tkanki zawierają u człowieka prawie połowę puli pozanacyniowej albuminy. *Beeken* i wsp. (3) w puli pozanacyniowej wyróżniają dwie części: wolno wymieniającą się zawartą w skórze i mięśniach, oraz drugą o szybszej wymianie z pulą naczyniową (limfa trzewna). Doświadczenia w pracowni *McFarlane* (11) wykazały, że różnica między tymi dwiema częściami puli w szybkości wymiany z białkiem krążącym w krwi, jest blisko dwukrotna, oraz że wolniej wymieniająca się część stanowi około 60% puli pozanacyniowej albuminy.

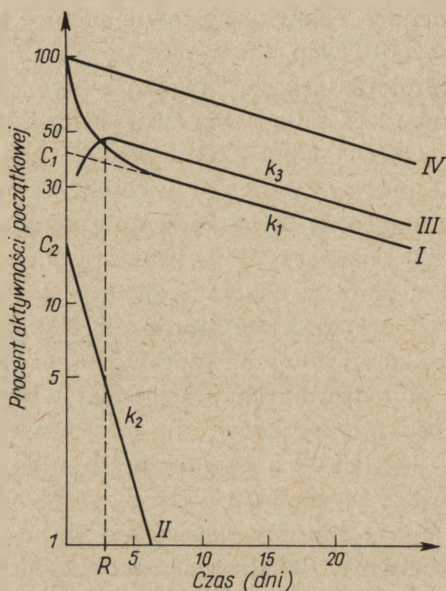
Sprawa obecności albuminy osocza wewnątrz komórek różnych narządów jest sporna, choć raczej przyjmuje się, że albumina występuje głównie w płynie pozakomórkowym. Wprawdzie *Gittlin* i wsp. (25) przy użyciu techniki fluoryzujących przeciwciał wykryli albuminę osocza w komórkach różnych narządów, ale przypuszczalnie są to ilości śladowe. *Gergely* i *Mitusova* (23) posługując się metodą immunoelektroforezy wykazali, że komórki wątroby mają zdolność wychwytywania i magazynowania albuminy osocza po dożylnym wstrzyknięciu hyperonkotycznego roztworu dekstranu. Specyficzne warunki doświadczenia i zaobserwowane ilości magazynowanej w komórkach albuminy nie świadczą jednak, że białko to w warunkach fizjologicznych stanowi istotny składnik komórek.

Jedynym miejscem syntezy albuminy osocza jest wątroba; zatem albumina pozanacyniowa pochodzi z krwi przenikając przez kapilary tkankowe. Poszczególne narządy wykazują różną przepuszczalność dla białek osocza (57): wątroba, śledziona i jelito cienkie należą do najbardziej przepuszczalnych, a mięsień do najślabej przepuszczalnych. Stosując znakowaną albuminę oraz dekstran o różnej masie cząsteczkowej *Mayerston* i wsp. (57) doszli do wniosku, że istnieją co najmniej dwa niezależne mechanizmy przedostawania się białek osocza z krwi do płynu tkankowego: obecność małych porów w śródbłonku pozwalających na przejście cząsteczek o masie poniżej 250 000, oraz czynne przenoszenie białka przez komórki w procesie nazywanym „*cytopemphisis*” dla odróżnienia od zjawiska pinocytozy, gdy białka są wchłaniane i użytkowane przez komórkę. Nie jest wprawdzie wykluczone, że białka mogą

przenikać przez ściany naczyń włosowatych w obu kierunkach, ale ponowne mieszanie się białek limfy i krwi następuje głównie przez ujście piersiowego przewodu limfatycznego do naczyń żylnych.

II. Metody pomiaru pozanaczyniowej puli albuminy

Jeśli po dożylnym wstrzyknięciu znakowanej ^{131}J -albuminy będziemy przez szereg dni pobierali próbki osocza i oznaczali aktywność właściwą białka, uzyskamy charakterystyczną krzywą przedstawioną na rysunku 1.



Rys. 1. Zmiany w aktywności i rozmieszczeniu znakowanej ^{131}J -albuminy osocza podczas trwania doświadczenia

I — Krzywa aktywności właściwej albuminy w osoczu; II — Wyznaczona graficznie krzywa dyfuzji albuminy do przestrzeni pozanaczyniowej; III — Krzywa aktywności w puli pozanaczyniowej; IV — Krzywa aktywności w całym organizmie;
R — Czas wyrównania

Kształt dwufazowej krzywej I wynika stąd, że w pierwszym okresie doświadczenia znakowane białko usuwane jest z osocza nie tylko wskutek rozkładu, ale także wskutek przenikania do puli pozanaczyniowej. Krzywą I można rozłożyć graficznie na składowe, z których każda reprezentuje proces 1-go rzędu. Wówczas krzywą I można traktować jako reprezentującą sumę dwóch (lub więcej) procesów pierwszego rzędu zgodnie z równaniem (1):

$$X = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t} + \dots \quad (1)$$

gdzie X oznacza stężenie znakowanej albuminy w osoczu w czasie t, C — ekstrapolowaną do czasu 0 aktywność początkową, e — podstawę

logarytmów naturalnych, k — stałą reakcji pierwszego rzędu. Wartości k_1 i k_2 można wyliczyć z zależności: $k = 0,693/T_{1/2}$ przy czym $T_{1/2}$ odpowiada biologicznemu półokresowi wyznaczonemu graficznie z krzywej I lub II. *Matthews* (55) zaproponowała równanie pozwalające wyliczyć stąd masę albuminy pozanaczyniowej jeśli znana jest pula naczyniowa:

$$\frac{\text{Pula pozanaczyniowa}}{\text{Pula naczyniowa}} = \frac{C_1 C_2 (k_2 - k_1)^2}{(C_1 k_2 + C_2 k_1)^2} \quad (2)$$

Interpolacja wykładniczego odcinka krzywej I do czasu 0 (wartość C_1) odpowiada hipotetycznej początkowej aktywności właściwej albuminy jeśli założymy natychmiastowe równomierne rozprowadzenie aktywności w obu pulach (naczyniowej i pozanaczyniowej). Dzieląc aktywność wstrzykniętej albuminy przez tę hipotetyczną aktywność właściwą możemy wyliczyć całkowitą ilość albuminy w ustroju, a wartość C_1 powinna odpowiadać procentowi puli naczyniowej w stosunku do całej puli ustrojowej, jak to już zaproponował *Sterling* (82). Jednakże aby metoda interpolacji była wolna od błędów musi być spełniony warunek, że po wymieszaniu znakowanego białka w obu pulach aktywność właściwa albuminy we krwi i w limfie jest identyczna w każdym punkcie ustroju. Wymaga to założenia, że rozkład albuminy odbywa się z identyczną szybkością w obu pulach proporcjonalnie do masy zawartego tam białka. Tymczasem wiadomo (co będzie omówione w dalszej części artykułu), że rozkład i synteza albuminy związane są wyłącznie z pulą naczyniową. Oznacza to, że aktywność właściwa albuminy w puli pozanaczyniowej będzie po okresie osiągnięcia równowagi zawsze wyższa niż w puli naczyniowej. Jednocześnie wiemy, że albumina limfy powraca stale do krążenia powodując podwyższenie aktywności albuminy osocza. Stąd też nawet wykładniczy odcinek krzywej I (k_1) nie reprezentuje wyłącznie odnowy białka osocza, ale także proces redystrybucji. W rzeczywistości jedyny moment gdy aktywności właściwe w obu pulach są równe jest wówczas, gdy zostaje osiągnięte maksimum w puli pozanaczyniowej (R na rysunku 1). *Campbell* i wsp. (8) opracowali metodę pomiaru puli pozanaczyniowej w oparciu o zasadę, że stosunek całkowitej aktywności w obu pulach w momencie wyrównania R odpowiada stosunkowi ilości albuminy w tych pulach. Praktycznie czas wyrównania mierzy się sporządzając wykres w skali półlogarytmicznej i odkładając aktywność właściwą albuminy osocza oraz całkowitą aktywność albuminy w puli pozanaczyniowej (jako różnicę dawki wstrzykniętej oraz zawartej w osoczu i wydalanej z moczem w postaci jodków). Dzieląc następnie całkowitą aktywność albuminy w puli pozanaczyniowej w momencie wyrównania przez aktywność właściwą albuminy osocza w tym momencie uzyskujemy wprost masę puli pozanaczyniowej. Metodą tą można mierzyć pulę pozanaczyniową w stosunkowo krótkim doświadczeniu (2-3 doby) zanim jeszcze ustali się wykładniczy charakter krzywej, co jest niezbędne do interpolacji wg

Sterlinga lub wzoru Matthews, a ponadto można ją stosować nawet wówczas, jeśli wstrzyknięty preparat znakowanej albuminy zawiera pewne ilości zdenaturowanego białka, które jest szybko usuwane z krążenia, co w obu pozostałych metodach stwarza możliwość znacznego błędu (pozornie nazbyt wielka pula poznaczyniowa). Niestety w praktyce dokładność metody Campbella ograniczają trzy czynniki:

1. maksimum całkowitej aktywności w puli poznaczyniowej ma często charakter „plateau” i wówczas trudno ustalić wielkość R;
2. aktywność w puli poznaczyniowej określana jest tylko pośrednio, a więc może być obciążona przypadkowym błędem;
3. dodatkowy błąd może powstać wskutek akumulacji w wodzie ustrojowej jodku ^{131}J pochodzącego z rozkładu białka.

W praktyce doświadczalnej i klinicznej najczęściej stosuje się prostą ekstrapolację wg Sterlinga, a tylko przy bardziej precyzyjnych pomiarach używana jest metoda graficzna i wzór Matthews. Wielkość błędu wynikłego z użycia metody ekstrapolacji zamiast wzoru (2) dla określenia poznaczyniowej puli białka zależy od szybkości katabolizmu i wielkości tej puli. Przy stosunkowo wolnej odnowie albuminy osocza człowieka różnice w aktywnościach właściwych między obu pulami są niewielkie, a wyniki uzyskane obiema metodami różnią się z reguły nie więcej niż o kilka procent. Różnice te mogą stać się bardzo znaczne przy wzmożonym rozkładzie albuminy (np. w proteinurii). Metoda czasu wyrównania stosowana jest najrzadziej, ale przy użyciu preparatu zawierającego domieszkę zdenaturowanej znakowanej albuminy (wada wielu preparatów handlowych) należy ją polecać z wyboru. Tablica 1 pozwala na porównanie trzech metod pomiaru poznaczyniowej puli albuminy u człowieka.

Tablica 1

Procentowa zawartość ustrojowej puli albuminy osocza człowieka
w przestrzeni poznaczyniowej mierzona trzema metodami

Metoda ekstrapolacji (Sterling)	Metoda graficzna (Matthews)	Metoda czasu wyrównania (Campbell i wsp.)	Pozycja literatury
64,3	57,8	54,5	(3)
60,0	58,3	54,5	(11)

Z danych zawartych w tablicy 1 widać, że istnieją systematyczne różnice wyników zależnie od użytej metody i trzeba o tym pamiętać porównując rozmaite dane z piśmiennictwa.

III. Znaczenie i funkcja poznaczyniowej puli albuminy

Szereg badań doświadczalnych wskazuje, że poznaczyniowa pula albuminy spełnia rolę kompensacyjną, ułatwiającą utrzymanie stałego poziomu tego białka w łożysku naczyniowym. Wasserman i wsp.

(86) wykazali, że intensywne krwawienie u psów (50ml na kg wagi) wywołuje gwałtowny spadek zawartości albuminy osocza, który jednakże już w okresie 24 godzin jest w dużej mierze wyrównany dzięki przeniesieniu białka z puli pozanaczyniowej. W sześć dni po krwotoku zawartość albuminy w osoczu wracała do normy, natomiast pula pozanaczyniowa była blisko dwukrotnie niższa niż przed doświadczeniem. Podobne przesunięcie albuminy z puli pozanaczyniowej do krwi zaobserwowali inni autorzy (87) u psów z niedoborem białkowym wywołanym przez dietę bezbiałkową lub plazmaferezę (upust krwi połączony z ponownym wstrzyknięciem zawiesiny krwinek w soli fizjologicznej). U psów kontrolnych około połowa całkowitej ilości albuminy znajduje się w krwiobiegu, a reszta poza łożyskiem naczyniowym; przy niedoborze białka ustala się przejściowa równowaga gdy 2/3 całkowitej ilości albuminy znajduje się w krwi, a tylko 1/3 w puli pozanaczyniowej.

Doniosłą rolę puli pozanaczyniowej w kompensowaniu niedoboru albuminy osocza potwierdzili także Rodionov i wsp. (73), Garrow (22) oraz Matthews (56) w swoich doświadczeniach z długotrwałą plazmaferezą u królików.

Wydaje się, że mniej istotna jest funkcja puli pozanaczyniowej w przyjmowaniu nadwyżek białkowych wywołanych np. długotrwałymi infuzjami albuminy (86).

IV. Katabolizm albuminy osocza i metody jego pomiaru

Podobnie jak inne białka ustroju albumina osocza ulega nieustannej odnowie: na dobę rozpada się około 3,5-5,5% całkowitej puli albuminy zawartej w organizmie człowieka (3, 85). Anker (1) przytacza dwa możliwe wyjaśnienia fizjologicznego katabolizmu białka:

1. cząsteczki białka w organizmie ulegają procesowi starzenia, zmianom struktury i denaturacji — a więc przestają spełniać swoje funkcje i zostają usunięte;
2. wiele komórek organizmu zawiera aktywne enzymy proteolityczne, które trawią białka przenikające tam w drodze dyfuzji lub pobrane w procesie pinocytozy. Ponieważ synteza białka wymaga wydatkowania energii trudno wyobrazić sobie jak w procesie ewolucji mogłyby się utrzymać takie przypadkowe, „automatyczne” procesy rozkładu natywnego białka.

Szybkość rozkładu albuminy można mierzyć przy użyciu znakowanego białka stosując rozmaite sposoby obliczeń. Najprostsza metoda polega na wyzyskaniu informacji dostarczonych przez wykładniczy odcinek krzywej I na rysunku 1. Wyznaczony graficznie biologiczny półokres ($T_{1/2}$ w dniach) pozwala na obliczenie szybkości odnowy k z zależności $k = 0,693/T_{1/2}$. W stanie równowagi szybkość syntezy białka odpowiada szybkości jego rozkładu, a k_1 przedstawia frakcję całkowitej

puli albuminy ustroju rozkładaną (lub wytwarzaną) w ciągu doby. Wartości bezwzględne szybkości rozkładu albuminy w gramach na dobę można uzyskać mnożąc wartość k_1 przez masę puli ustrojowej tego białka. Podobne informacje o wartości $T_{1/2}$ i k_1 można w zasadzie uzyskać z krzywej IV odpowiadającej aktywności całego organizmu, co w doświadczeniach na małych zwierzętach laboratoryjnych daje się łatwo wyznaczyć eksperymentalnie (8).

Metoda ta jest prosta i często stosowana, ale niestety ma szereg ograniczeń, a przede wszystkim to, że wartość mierzona odpowiada w rzeczywistości wypadkowej procesów syntezy i rozkładu. Gdy w czasie doświadczenia wielkość puli ustrojowej białka ulega zmianie, wartość k_1 może różnić się znacznie od rzeczywistej szybkości rozkładu. Wreszcie, jak już zaznaczono poprzednio, kształt krzywej I na rysunku 1 odzwierciedla nie tylko procesy odnowy, ale i zjawiska redystrybucji między pulą poza- i wewnątrznaczyniową. Błąd ten można wyeliminować stosując równanie (3) zaproponowane przez Matthews (55):

$$\frac{\text{Względna szybkość katabolizmu}}{\text{(frakcja puli ustrojowej albuminy odnawiana na dobę)}} = \frac{k_1 k_2}{C_1 k_2 + C_2 k_1} \quad (3)$$

gdzie C i k mają znaczenie jak na rysunku 1.

W oparciu o fakt, że wolny jodek ^{131}J powstający w wyniku rozkładu znakowanej albuminy wydalany jest szybko i prawie wyłącznie przez nerki (przy jednoczesnym podawaniu nieradioaktywnego jodku potasu dla zablokowania tarczycy), Campbell i wsp. (8) zaproponowali wyznaczanie szybkości rozkładu albuminy z wzoru:

$$\frac{\text{Masa albuminy ulegającej rozkładowi}}{\text{(gramy na dobę)}} = \frac{\text{Aktywność wydalona z moczem na}}{\text{dobę } (\mu\text{C})} \quad (4)$$

$$\frac{\text{Średnia akt. wł. } (\mu\text{C/g}) \text{ albuminy}}{\text{osocza}}$$

Metoda ta jest słuszna nawet wówczas, gdy szybkość rozkładu i wielkość puli zmieniają się w czasie doświadczenia. Wystarczy tylko określić całkowitą aktywność jodków wydalonych na dobę z moczem oraz wyznaczyć średnią aktywność właściwą albuminy osocza w tym okresie. Jednorazowy pomiar jest mało reprezentatywny i słuszniej jest wyznaczyć średnią z wartości uzyskanych w kilku kolejnych dniach. Ostatnio zaproponowano uproszczenie tej metody pozwalające uniknąć dobowego zbierania moczu — należy tylko określić w osoczu stosunek aktywności związanej z białkiem oraz wolnych jodków (61). Niezbędne jest jednak uzyskanie stałych parametrów wydalania jodków z moczem przez doustne podanie dużych ilości nieznakowanego jodku oraz przeprowadzenie odpowiedniej analizy matematycznej.

Wyliczanie szybkości katabolizmu z wzoru (4) powinno być w zasadzie stosowane w każdym doświadczeniu jako kontrola wyników uzyskanych metodą graficzną. Ta metoda bezpośrednia może zawieść tylko wówczas,

gdy w organizmie pojawią się inne dodatkowe pozanaczyniowe miejsca rozkładu białka (np. w przebiegu gastroenteropatii wysiękowej), lub gdy wystąpią zaburzenia w wydalaniu jodków do moczu.

Porównanie wyników uzyskanych trzema metodami wyznaczania szybkości rozkładu albuminy osocza człowieka przedstawiono w tablicy 2.

Tablica 2

Szybkość katabolizmu albuminy osocza człowieka
wyznaczona trzema metodami (wg 3)

Szybkość katabolizmu albuminy	Oznaczona metoda		
	A	B	C
w gramach na dobę	17,9	16,1	15,6
w mg/kg wagi/dobę	224	202	195

A — metoda graficzna; B — według wzoru (3); C — według wzoru (4)

Oznaczenia wykonane przez innych autorów na ogół nie odbiegają od danych zawartych w tablicy 2. *Cohen* i wsp. (11) jako wartości normalne rozkładu podają 185mg na kg wagi na dobę (przy wahaniach 136-257), co odpowiada około 4% całkowitej puli ustrojowej albuminy, a *Waldmann* i *Laster* (85) uzyskali dla zdrowych osób wartości 160-200mg na kg wagi na dobę, co odpowiada 3,5-5,3% puli ustrojowej tego białka.

Porównanie szybkości rozkładu albuminy u różnych zwierząt przedstawiono w tablicy 3. Można łatwo zaobserwować, że waha się ona znacznie, bo od około 4% u człowieka do około 60% u myszy. Jeśli te wartości wyrazić jako frakcję puli naczyniowej, to stają się one 2-3 razy większe. Ze zmniejszeniem wagi ciała przyspiesza się rozkład i odnowa białek osocza, co stanowi zjawisko analogiczne do zmian przemiany podstawowej. Jak to jednak zaobserwował *Munro* (68) ze spadkiem wagi ciała rośnie bardziej szybkość rozkładu białek osocza niż przemiana podstawowa.

Tablica 3

Porównanie szybkości katabolizmu albuminy osocza u różnych gatunków ssaków

Gatunek	Szybkość katabolizmu	Pozycja literatury
Człowiek	4,6	(14)
Pies	8,4	(13)
Królik	8,7	(58)
Szczur	21	(8)
Mysz	58	(14)

Względna szybkość katabolizmu podano w procentach jako frakcję puli ustrojowej albuminy odnawianą w ciągu doby. Wszystkie dane uzyskane przy użyciu ¹³¹I-albuminy.

V. Miejsce katabolizmu albuminy osocza

Mało jest problemów tak dyskusyjnych i spornych w zakresie metabolizmu białek osocza, jak określenie miejsca rozkładu albuminy w ustroju. Wiemy tylko z pewnością, że szybkość rozkładu nie jest jednakowa

w całej puli ustrojowej albuminy i rozkład ograniczony jest do puli naczyniowej. Szereg autorów (3, 8, 60, 70) wykazało bowiem, że aktywność jodków wydalanych z moczem, a pochodzących z rozkładu znakowanej albuminy, jest proporcjonalna do frakcji jodowanej albuminy zawartej w osoczu, a nie do całkowitej ilości znakowanej albuminy w ustroju.

Względna szybkość rozkładu albuminy wyrażona w procentach puli naczyniowej jest wielkością zadziwiająco stałą dla danego organizmu i tylko w wyjątkowych wypadkach ulega zaburzeniu. Jedno z możliwych tłumaczeń (63) polega na tym, że białko z osocza przenika do miejsca katabolizmu (lub pobierane jest w procesie pinocytozy) ze stałą szybkością, a więc bezwzględna ilość rozłożonego białka zależy od zawartości białka w osoczu, a względna szybkość usuwania jest stała i niezależna od rozmiarów puli tego białka. Szybkość odnowy różnych białek osocza (np. albuminy i globulin) jest jednak odmienna, zatem niezbędne jest dodatkowe założenie, że szybkość przenikania do miejsca rozkładu jest charakterystyczna dla danego białka.

Inkubacja znakowanej albuminy z pełną krwią *in vitro* nie prowadzi do uwalniania jodku, należy więc przypuszczać, że rozkład białka odbywa się nie w samej krwi, lecz w innych komórkach zawierających enzymy proteolityczne. Komórki te nie muszą pozostawać w fizycznej bliskości osocza, muszą jednak być łatwo dostępne dla białek krwi, przy czym same nie zawierają określonej puli albuminy. Warunkom tym odpowiadają zarówno komórki śródbłónka naczyń, komórki parenchymy wątroby, komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego śledziony, wątroby czy innych narządów, a nawet światło przewodu pokarmowego. W takim też ujęciu należy rozumieć stwierdzenie, że rozkład albuminy ma miejsce w obszarze pozostającym w bezpośrednim i łatwym kontakcie z pulą naczyniową.

Doświadczenia Millera i wsp. (34, 66) przy użyciu techniki perfuzji izolowanej wątroby szczura wskazywały na ten narząd jako główne miejsce rozkładu białka. Natomiast Gordon (10, 31, 32) doszedł do wniosku, że w organizmie szczura nie więcej niż 10% rozkładu albuminy może mieć miejsce w wątrobie. Przyczyną tych rozbieżności może być obecność zdenaturowanych cząsteczek, które znacznie szybciej są usuwane z krążenia niż cząsteczki natywne. Gordon (31) zaobserwował, że jeśli znakowane białko było częściowo lub całkowicie zdenaturowane, to w czasie pięciogodzinnej perfuzji aż 20% aktywności pojawiało się w postaci wolnego jodku. Jeśli natomiast znakowaną albuminę przed doświadczeniem poddano biologicznemu oczyszczeniu (tzw. „*biological screening*”) przez wstrzyknięcie na okres 48 godzin innemu zwierzęciu, wówczas ilość albuminy rozłożonej podczas perfuzji nie przekraczała 3,8% użytej aktywności białka. Do podobnych wyników w doświadczeniach *in vivo* na królikach doszedł Freeman (13). Stwierdził on, że po denaturacji cieplnej albumina jest wychwytywana wybiórczo przez wątrobę i po

dwóch dniach pozostaje w krążeniu nie więcej niż 3% aktywności związanej z białkiem. Przyspieszone usuwanie albuminy z krążenia może być w ogóle wskaźnikiem zaburzenia natywnego stanu białka i obserwuje się je także przy użyciu preparatu albuminy frakcjonowanej alkoholem i eterem, a nawet w przypadku, gdy podczas znakowania ^{131}J zostaje przyłączona duża ilość jodu. Natywny charakter posiadają tylko te preparaty ^{131}J -albuminy, które zawierają mniej niż jeden atom jodu na jedną cząsteczkę białka (10, 20).

Zatem wydaje się, że wątroba może być odpowiedzialna tylko za część albuminy rozkładanej w ustroju. Katz i wsp. (47) oraz Sellers (80) zwracają uwagę na możliwy udział nerki w katabolizmie albuminy osocza i dochodzą do wniosku, że co najmniej 15% ilości albuminy metabolizowanej w ustroju przypada na ten narząd. Autorzy ci sugerują ponadto, że w chorobach i stanach zapalnych nerek rozkład albuminy w nerce może znacznie wzrosnąć. Gitlin i wsp. (29) przeprowadzili bardzo ciekawe doświadczenia u myszy w celu lokalizacji rozkładu albuminy w organizmie. Oznaczali oni biologiczny półokres wydalania jodowanej albuminy u tych zwierząt po wycięciu 40% wątroby, lub usunięciu nerek, jelit, albo wreszcie po wstrzyknięciu „Thorotrastu” czy tuszu, które to czynniki blokują komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Autorzy ci dochodzą do wniosku, że za rozkład albuminy u myszy odpowiedzialne są głównie komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego, wątroba i nerki.

Inni autorzy (2) wykazali natomiast, że znakowana albumina inkubowana *in vitro* ze skrawkami lub homogenatami tkanek szczura nie jest w wyraźny sposób rozkładana — jedyny wyjątek stanowił homogenat śledziony. Ci sami badacze zauważyli, że *in vivo* u królika znakowana albumina przechodzi łatwo do przewodu pokarmowego. Obecnie nagromadziło się dużo dowodów przemawiających za udziałem jelit w rozkładzie albuminy, sporny jest tylko problem czy rzeczywiście jest to główne miejsce rozkładu niektórych białek osocza. Campbell i wsp. (9) wykazali u owcy z przetoką jelitową przedostawanie się uchwytnych ilości znakowanej albuminy osocza do treści jelitowej. Glenert i wsp. (30) po wstrzyknięciu psu ^{131}J -albuminy doszli do wniosku, że 10% rozkładu zachodzi w żołądku, około 40% w jelicie cienkim, 4% w jelicie grubym, a reszta (tylko około 45%) odbywa się w innych miejscach ustroju. Używając izolowanych operacyjnie segmentów jelita szczurów Beeken i Norman (4) stwierdzili wyraźne wydalanie i rozkład albuminy osocza w przewodzie pokarmowym tych zwierząt. Franks i wsp. (18) usuwali różne odcinki przewodu pokarmowego królików, a następnie badali u takiego zwierzęcia szybkość rozkładu albuminy osocza. Ostatecznie doszli do wniosku, że nie więcej niż 50% rozkładu albuminy (a przypuszczalnie znacznie mniej) ma miejsce w przewodzie pokarmowym, a ściślej rzecz biorąc w górnym odcinku jelita cienkiego i w żołądku. Wyniki uzyskane przy intubacji dwunastnicy i jelita cienkiego

z następną immunologiczną identyfikacją albuminy zgodne są z tezą, że pewien przeciek białka połączony z trawieniem i reabsorpcją produktów występuje nawet u zdrowych ludzi (35, 39). Jeejeebhoy (43) zaobserwował, że doustne podawanie żywicy jonowymiennej (Amberlit IRA 400) w dawkach 5g co 4 godziny pozwala na odzyskanie w kale zdrowych osób około 1% radioaktywności jodoalbuminy zawartej w ustroju. Zakładając, że żywica wiążąc znakowane jodki powstające w jelicie przy rozpadzie ^{131}J -albuminy zapobiega ich reabsorpcji autor ten wyliczył, że około 20% rozkładu albuminy w organizmie człowieka zachodzi w przewodzie pokarmowym. Doświadczenia te zostały jednak podważone (45) przez stwierdzenie, że znakowany jodek uwalniany przy rozkładzie ^{131}J -albuminy w tkankach może być wtórnie wydalany do śliny i soku żołądkowego. Zatem aktywność wydalona z kałem po podaniu żywicy niekoniecznie świadczy o rozkładzie w obrębie światła przewodu pokarmowego. Warto tu także zacytować spostrzeżenia Waldmanna (84) dokonane przy użyciu albuminy znakowanej ^{51}Cr . Autor ten wykazał, że uwolniony chrom nie ulega wybiórczemu wydalaniu ani wyraźnej resorpcji z przewodu pokarmowego, a po dożylnym wstrzyknięciu znakowanej albuminy aktywność wydalona z kałem przez zdrowych ludzi jest bardzo mała, rzędu 0,1% dawki w ciągu 96 godzin. Przemawia to przeciw koncepcji, że w normalnych warunkach większe ilości albuminy osocza człowieka rozkładane są w przewodzie pokarmowym. Miejsce rozkładu albuminy pozostaje więc nadal niewyjaśnione, chociaż prawdopodobnie główną rolę odgrywają narządy mięszone, układ siateczkowo-śródbłonkowy i przewód pokarmowy. Znaczenie przewodu pokarmowego zależy przypuszczalnie od gatunku zwierzęcia, ale u człowieka, a przynajmniej u zdrowych ludzi wydaje się on spełniać drugorzędną rolę w tym procesie.

VI. Przyspieszenie katabolizmu albuminy w stanach patologicznych

Wzmoczenie katabolizmu albuminy wywołane jest najczęściej pojawieniem się pewnych dodatkowych mechanizmów jej utraty lub rozkładu, np. przechodzenie białka do moczu lub znaczna ucieczka do przewodu pokarmowego. Albuminuria w przebiegu nerczycy czy zapalen nerek może wywoływać znaczną hypoproteinemię i przyspieszenie odnowy tego białka (5, 27, 46). Badanie metabolizmu albuminy w tych stanach przy użyciu znakowanego białka jest utrudnione, ponieważ wskutek utraty albuminy przez nerki powstaje znaczna różnica w aktywności właściwej między pulą naczyniową i pozanaczyniową.

Na podstawie prac Kimbela i wsp. (48), Gordona i wsp. (33, 81), Schwartz'a i Jarnum (79) oraz Holmana i wsp. (39) została wprowadzona nazwa gastroenteropatii wysiękowej dla określenia stanów gdy hypoalbuminemia rozwija się w następstwie przenikania znacznych ilości białek osocza przez uszkodzoną śluzówkę jelit. Uszko-

dzenia śluzówki mogą powstać wskutek chorób zakaźnych, spruce, nowotworu, utrudnienia krążenia żylnego lub limfatycznego, czy wreszcie z przyczyn bliżej niewyjaśnionych. Zagadnienia etiopatogenezy i leczenia zespołów gastroenteropatii wysiękowej omawiane są obszernie m. in. w pracach Waldmanna (84, 85), Gordona (33) i Holmana (39). W 1959 r. Gordon (33) zaproponował użycie poliwinylpirolidonu (PVP) znakowanego ^{131}J dla celów diagnostycznych przy wykrywaniu tego zespołu. Znakowany PVP o masie cząsteczkowej zbliżonej do albuminy wstrzykiwany jest dożylnie i u zdrowych ludzi wydalana się z kałem tylko w śladowych ilościach. Zaletą PVP jest to, że nie jest on rozkładany w jelitach nawet przez bakterie, a aktywność wydalona z kałem jest wprost wskaźnikiem przecieku wielkocząsteczkowych koloidów do światła jelit. Niestety PVP jest dość szybko wydalany przez nerki jako składnik нефизjologiczny i utożsamianie jego zachowania się w ustroju z albuminą jest uproszczeniem, a ponadto handlowe preparaty jodowanego PVP są bardzo drogie. Inna metoda diagnostyczna zaproponowana przez Waldmanna (84) polega na dożylnym wstrzyknięciu albuminy znakowanej ^{51}Cr i następnej zbiórce kału przez 96 godz. Na podstawie danych z piśmiennictwa (85) wydaje się, że ucieczka białka do jelit występuje w najrozmaitszych jednostkach chorobowych i może być istotną przyczyną hypoproteinemii.

Nasze doświadczenia wskazują (37, 38), że w pewnych przypadkach rozstrzeni oskrzelowych dochodzi do uszkodzenia śluzówki oskrzeli (analogicznie jak śluzówki jelit w zespole gastroenteropatii wysiękowej) w wyniku czego do płwociny przedostają się znaczne ilości albuminy osocza. Po wstrzyknięciu albuminy znakowanej ^{51}Cr chory wydalil z płwociną w okresie 96 godz. 3,34% podanej aktywności, co oznacza utratę na tej drodze około 1% puli ustrojowej tego białka w ciągu doby.

Davies i wsp. (12) zaobserwowali znaczny wzrost rozkładu albuminy osocza u chorych ciężko poparzonych lub też po rozległych zabiegach chirurgicznych. Przypuszczalnie rozkład lub utrata albuminy zachodziły w miejscu uszkodzenia jako część procesów naprawy tkankowej.

Przytoczone dane dotyczące proteinurii, gastroenteropatii, bronchopatii czy oparzeń i zranień ilustrują jak rozmaite mogą być patologiczne mechanizmy przyspieszające proces usuwania albuminy osocza z organizmu.

VII. Mechanizmy regulujące szybkość katabolizmu albuminy

Nie ulega wątpliwości, że szybkość rozkładu albuminy *in vivo* znajduje się pod kontrolą hormonalną. Ogólnie przyjmuje się, że hormony kory nadnercza wzmagają przemianę białkową i przyspieszają katabolizm, przy czym następuje przemieszczanie białka z tkanki łącznej i mięs-

ni do wątroby i narządów mięsnych (68). Rothschild i wsp. (75) zaobserwowali, że pod wpływem dużych dawek kortyzonu szybkość rozkładu albuminy wzrosła o około 27% przy jednoczesnym zwiększeniu syntezy o około 13%, tak, że w sumie ujemny bilans zaznaczył się tylko w niewielkim stopniu. Zbliżone wyniki uzyskali Grossman i wsp. (36), którzy stwierdzili, że podawanie ACTH lub hydrokortyzonu może doprowadzić do przyspieszenia rozkładu albuminy o 30-80%. Wzmożenie rozkładu białek osocza towarzyszy też ciężkim zakaźnym chorobom gorączkowym.

Podobnie jak hormony kory nadnercza działa tyroksyna, której podawanie wzmaga rozkład albuminy osocza (42). Natomiast hormony płciowe (testosteron) i hormon wzrostowy prawdopodobnie zwalniają szybkość przemiany albuminy osocza (68).

Miller i wsp. (34) zaobserwowali, że w wątrobie szczurów z cukrzycą alloxanową rozkład albuminy osocza był dwukrotnie szybszy niż u zwierząt kontrolnych. Ten sam autor (66) w innych doświadczeniach z perfundowaną wątrobą szczura doszedł do wniosku, że glukagon wywiera wybitne działanie kataboliczne. Śladowe ilości glukagonu (1 μ g podawany w ciągu 1 godz.) podwajały szybkość rozkładu albuminy. Hydrokortyzon dodany do układu perfuzyjnego nie wpływał na katabolizm białka, natomiast w obecności glukagonu działał synergistycznie. Miller jest zdania, że przypuszczalnie również działanie kortykosterydów *in vivo* związane jest z glukagonem. Kataboliczny wpływ glukagonu w układzie z perfundowaną wątrobą można było zahamować dodaniem insuliny. Te bardzo ciekawe spostrzeżenia Millera wymagają jednak dalszego potwierdzenia doświadczalnego.

Czynniki zewnętrzne wywierają znacznie mniejszy wpływ na szybkość katabolizmu. Friedberg (21) wstrzykiwał myszom znaczne ilości albuminy i wykazał, że względna szybkość rozkładu (część puli naczyniowej lub ustrojowej rozkładana na dobę) nie ulegała zmianie, choć bezwzględna ilość albuminy rozłożonej wyrażona w mg na dobę była zwiększona wobec wzrostu puli albuminy. Rothschild i wsp. zaobserwowali, że wstrzykiwanie dekstranu (76) lub indukowana hypergammaglobulinemia (77) nie wywierały większego wpływu na względną szybkość rozkładu albuminy osocza u królików. Matthews (56) usuwała u królików około 15% objętości osocza na dobę w ciągu 9 dni i pomimo wystąpienia ostrego niedoboru albuminy osocza obserwowała tylko niewielkie obniżenie względnej szybkości rozkładu.

Badania metabolizmu albuminy w przebiegu nerczycy (27, 46) wskazują, że nawet w przypadku stałej i znacznej utraty albuminy osocza przez nerkę nie zmniejsza się względna szybkość rozkładu tego białka w organizmie człowieka, co mogłoby stanowić prosty mechanizm kompensacyjny dla utrzymania stałego poziomu albuminy w osoczu.

Również wahania diety nie wywierają większego wpływu na względną szybkość rozkładu albuminy osocza. I b e r i w s p. (42) wykazali, że dopiero sześciokrotne zwiększenie zawartości białka w diecie wywołało pewien wzrost frakcji albuminy rozkładanej na dobę. G i t l i n i w s p. (28) badając w Meksyku niedożywione dzieci doszli do wniosku, że względna szybkość rozkładu nie ulegała zmianie po usunięciu niedoboru białka. Natomiast P i c o u i W a t e r l o w (69) mierząc bezpośrednio szybkość rozkładu znakowanej albuminy u dzieci z ciężkim niedoborem białkowym zaobserwowali, że w skrajnych stanach wyniszczenia względne szybkości były wyraźnie niższe. Można sobie wyobrazić, że po wyczerpaniu wszelkich rezerw białkowych ustroju maleje także ilość enzymów odpowiedzialnych za rozkład albuminy, co prowadzi do zmniejszenia rozkładu. Problem badań metabolizmu białek osocza w stanach niedoborów żywieniowych jest dość złożony, a szczegóły przedstawia m. in. M c F a r l a n e (63).

Obserwowana u człowieka stała względna szybkość rozkładu albuminy osocza sugeruje, że jest to proces pierwszego rzędu, tzn. ilość białka rozłożonego na dobę jest proporcjonalna do wielkości puli. Jedynie R e e v e i R o b e r t s (70) są zdania, że katabolizm albuminy odpowiada reakcji zerowego rzędu: w doświadczeniach na królikach zaobserwowali oni, że względna szybkość rozkładu zmienia się zależnie od wagi zwierzęcia, a ilość rozkładanego białka w gramach na dobę na kg wagi jest stała i niezależna od stężenia albuminy w osoczu. Oznaczałoby to, że system enzymatyczny hydrolizujący białko osocza jest w normalnych warunkach wysycony substratem, a regulacja poziomu białka w osoczu odbywa się wyłącznie na drodze zmiennej szybkości syntezy. Jednak wszystkie dotychczasowe dane przemawiają przeciw koncepcji R e e v e i R o b e r t s a. H u m p h r e y i M c F a r l a n e (40) badając usuwanie znakowanych przeciwciał przy różnym ich stężeniu we krwi stwierdzili, że jest to typowy proces pierwszego rzędu. G i t l i n (26) obserwował wykładniczy zanik gamma globuliny i fibrynogenu wstrzykniętych do krwi dziecka z wrodzoną niezdolnością do syntezy tych białek. Również ostatnie doświadczenia nad metabolizmem fibrynogenu u królików (71) i ludzi (64) wskazują na stałą względną szybkość rozkładu tego białka niezależną od jego stężenia w osoczu i rozmiaru puli. Stwierdzenie, że rozkład odpowiada reakcji pierwszego rzędu ma istotne znaczenie dla oceny mechanizmów regulujących homeostazę białek osocza. Oznacza to bowiem, że każda zmiana w rozmiarze puli albuminy, bez względu na przyczynę ją wywołującą, jest połączona z proporcjonalną zmianą absolutnych ilości rozkładanego białka. Zatem przy niezmienionej szybkości syntezy wielkość puli albuminy musi wrócić po pewnym czasie do pierwotnego rozmiaru.

VIII. Synteza albuminy osocza

Od dawna było wiadomo, że wątroba jest głównym miejscem syntezy wielu białek osocza, a doświadczenia Millera i wsp. (67) udowodniły, że albumina wytwarzana jest wyłącznie w tym narządzie. Dużą ilość informacji o roli wątroby uzyskano podczas perfuzji izolowanego narządu pełną krwią niekrzepnącą, przy czym w odpowiednich warunkach wątroba pozostaje w pełni aktywna metabolicznie przez okres co najmniej 6 godzin (31, 44, 67). Znakowane aminokwasy dodane do płynu perfuzyjnego są wychwytywane przez wątrobę, która po około 30 minutach zaczyna uwalniać znakowane białka. Jensen i Tarver (44) wyliczyli, że ilość albuminy wytwarzanej w tych warunkach przez wątrobę odpowiada średniej dobowej produkcji tego białka w organizmie.

Różne metody badania szybkości syntezy białek osocza *in vivo* zostały obszernie przedyskutowane w poprzednim artykule (49), tutaj więc ograniczę się do przedstawienia tylko podstawowych zagadnień. Krzywa I na rysunku 1 uzyskana przy użyciu ^{131}J -albuminy odzwierciedla głównie zjawiska odnowy, a zatem w stanie równowagi metabolicznej organizmu można, jak już wspomniano, wyliczyć stąd szybkość syntezy i rozkładu. Gdy rozkład nie jest równy syntezie, lub gdy zachodzi przeniesienie białka netto między pulami, sama metoda graficzna jest oczywiście niewystarczająca. Wiemy jednak, że proces rozkładu nie wpływa na aktualną aktywność właściwą krążącego białka, natomiast rozcieńczenie piętna izotopowego zależy od dopływu nowych nieznakowanych cząsteczek albuminy z wątroby, czyli od szybkości syntezy. Jeśli absolutny rozkład albuminy w gramach na dobę wyznaczony zostanie metodą bezpośrednią z ilości znakowanych jodków w moczu (wzór 4), wówczas zakładając, że spadek aktywności właściwej osocza odzwierciedla procesy syntezy, można się pokusić o wyznaczenie szybkości syntezy. Analizę matematyczną przeprowadzoną przez różnych autorów (36, 55, 56) komplikuje fakt, że w rzeczywistości przy zaburzonej równowadze puli osoczowej białek obserwuje się zawsze przeniesienie białka netto między obu pulami. Matthews (56) proponuje następujący wzór na wyliczenie sumy procesów syntezy i przeniesienia (transferu) albuminy z puli pozanaczyniowej do naczyniowej:

$$K_{01} + K_T = k_1 + \frac{X_3}{X_1} k_2 \quad (5)$$

gdzie K_{01} — względna szybkość syntezy, K_T — względna szybkość transferu, X_1 — aktywność całkowita puli naczyniowej, X_3 — aktywność całkowita puli pozanaczyniowej, a pozostałe oznaczenia (k_1 i k_2) jak na rysunku 1.

Inna metoda pomiaru szybkości syntezy albuminy polega na podaniu aminokwasów znakowanych ^{14}C i oznaczeniu radioaktywności wbudowanej w białka osocza w jednostce czasu. Do obliczeń niezbędna jest jednak

także znajomość aktywności właściwej aminokwasu-prekursora w komórce wątrobowej, gdzie zachodzi synteza białka. Kwas hipurowy powstający z glicyny lub mocznik z argininy są przykładami pozakomórkowych wskaźników aktywności właściwej prekursora w miejscu syntezy (49). W metodzie zaproponowanej przez McFarlane'a (62) wstrzykuje się węglan sodu znakowany ^{14}C , który w komórce wątrobowej zostaje wbudowany m. in. w grupę guanidynową argininy. Znakowana biologicznie arginina użytkowana jest natychmiast w miejscu syntezy do produkcji mocznika i białek osocza. Znając aktywność mocznika wydalonego do moczu oraz aktywność grupy guanidynowej argininy w albuminie osocza można znaleźć absolutną szybkość syntezy tego białka w gramach na dobę niezależnie od szybkości rozkładu czy zmienionej wielkości puli ustrojowej (49). Ostatnie nasze doświadczenia (50, 65, 72) wskazują, że w warunkach równowagi metabolicznej daje się uzyskać dostateczną zgodność między szybkością rozkładu mierzoną niezależnie przy użyciu ^{131}J -albuminy a szybkością syntezy mierzoną metodą węglanową, pod warunkiem uwzględnienia wszystkich czynników wpływających na metabolizm mocznika w organizmie.

IX. Adaptacyjna rola zmiennej szybkości syntezy albuminy

Wiele czynników hormonalnych czy zewnętrznych wpływających na szybkość rozkładu albuminy wywiera także działanie na procesy syntezy. Grossman i wsp. (36) zaobserwowali, że ACTH (ale nie kortyzon) zwiększa szybkość wytwarzania albuminy. Być może pod wpływem ACTH powstaje w nadnerczach jakiś czynnik anaboliczny. Natomiast Rothschild i wsp. (75) są zdania, że również kortyzon przyspiesza syntezę albuminy, choć nie kompensuje to całkowicie zwiększonego rozkładu. Swick (83) wykazał, że wycięcie tarczycy lub przysadki zmniejsza u szczurów szybkość syntezy albuminy o 20—60%. Podawanie preparatów tarczycy w diecie zwierzętom po tyreoidektomii przywracało stan sprzed operacji, natomiast u zwierząt bez przysadki podawanie hormonu wzrostowego pozostawało bez wpływu. Enerback i wsp. (16) są odmiennego zdania i uważają, że hormon wzrostowy może w tym wypadku skorygować brak przysadki. Green i Miller (34) zaobserwowali, że wątroba szczurów z cukrzycą alloxanową ma wyraźnie zmniejszoną zdolność wbudowywania znakowanych aminokwasów w białka osocza. Może to wynikać z upośledzenia gospodarki energetycznej komórki wątroby przy niedoborze insuliny.

Wahania zawartości białka w diecie powyżej pewnego minimum nie wydają się wpływać na szybkość syntezy białek osocza (83). Natomiast w przypadku niedoboru białek osocza wywołanego głodem (22) lub plazmaferezą (87) obserwuje się wzmożone wbudowywanie znakowanych aminokwasów w albuminę, co może przemawiać za przyspieszeniem syn-

tezy. Podobne zjawisko u poparzonych pacjentów zaobserwował Levenson i wsp. (52). Niestety te obserwacje mają tylko charakter jakościowy wobec niemożności wyznaczenia rzeczywistych szybkości syntezy białek osocza w tych badaniach. W doświadczeniach na szczurach Swick (83) wykazał, że jednorazowe usunięcie trzeciej części krążącej albuminy nie wywierało wpływu na syntezę białka w wątrobie w ciągu następnych 48 godzin. Matthews (56) prowadziła przez kilka dni plazmaferezę u królików i badała metabolizm albuminy znakowanej jodem dochodząc do wniosku, że zaburzenia w puli naczyniowej kompensowane są głównie przez wzrost syntezy i przeniesienie netto z puli pozanaczyniowej. Dokładny pomiar zmian szybkości wytwarzania albuminy pod wpływem infuzji lub plazmaferezy udało się nam przeprowadzić (51) przy użyciu metody węglanowej (Tablica 4).

Tablica 4

Wpływ infuzji osocza lub plazmaferezy na syntezę albuminy osocza u królików (51)

Nr dośw.	Warunki doświadczenia	Ilość albuminy wstrzyknięta lub usunięta w mg/dobę	Synteza albuminy w mg/dobę		Zmiana syntezy w %
			Okres kontrolny	Po infuzji lub plazmafer.	
1.	Codzienna infuzja osocza przez 4 dni	611	925	852	- 7,8
2.	Jednorazowa plazmafereza	850	900*)	998	+ 10,9
3.	Codzienna plazmafereza przez 3 dni	716	768	928	+ 20,8
4.	Codzienna plazmafereza przez 9 dni	812	768	1154	+ 50,2
5.	Codzienna plazmafereza przez 10 dni	851	925	1242	+ 34,4

*) Wartość średnia z innego doświadczenia.

Wydaje się, że zmiany zaobserwowane w doświadczeniach 1 i 2 mieszczą się w granicach błędu metody, natomiast w pozostałych przypadkach mamy do czynienia ze znamienym przyspieszeniem tworzenia albuminy. Wyniki te, a także dane z piśmiennictwa pozwalają przypuszczać, że jednorazowe lub krótkotrwałe zmniejszenie puli krążącej albuminy nie wywołuje zmiany w szybkości syntezy (patrz także (83)), a zaburzenie równowagi kompensowane jest głównie przez przeniesienie netto z puli pozanaczyniowej. Dopiero w miarę zubożenia tej puli obserwuje się wyrównawczy wzrost syntezy. Hipotezę tę potwierdziły również badania Rothschilda i wsp. (76, 77), którzy wykazali, że dożylna infuzja dekstranu lub wywołana sztucznie hypergammaglobulinemia powodują wzrost puli pozanaczyniowej albuminy i zmniejszenie syntezy tego białka. Autorzy ci są poza tym zdania, że stężenie albuminy w puli pozanaczyniowej wywiera bezpośrednie działanie na wątrobę: ubytek albuminy

z płynu śródmiąższowego wątroby wywołuje spadek ciśnienia onkotycznego, co stanowi bodziec dla komórek tego narządu do zwiększonego wytwarzania i wydzielania albuminy osocza (78). Hipoteza, że szybkość syntezy albuminy kontrolowana jest przez ciśnienie onkotyczne w miejscu syntezy, stanowi przykład prostego sprzężenia zwrotnego i wydaje się być bardzo obiecująca dla zrozumienia mechanizmów homeostazy białkowej, jakkolwiek wymaga jeszcze dalszych dowodów doświadczalnych.

Równie ciekawe są spostrzeżenia *Drabkina* i wsp. (7, 15, 53, 54) dotyczące zjawisk adaptacyjnych w przebiegu eksperymentalnej nerczycy u szczurów. Autorzy ci wykazali m. in., że podczas regeneracji wątroby znacznie szybciej wytwarzane są białka mięszkowe niż białka osocza, podczas gdy w nerczycy wątroba może produkować kilkakrotnie więcej białek osocza niż normalnie, co świadczy, że ustrój ma zdolność regulacji syntezy rozmaitych białek w wątrobie zależnie od aktualnych potrzeb. Potwierdzają to nasze badania wskazujące, że w następstwie plazmaferezy zmiany w szybkości syntezy albuminy i fibrynogenu zachodzą zupełnie niezależnie, mimo, iż oba białka są wytwarzane w tej samej komórce wątrobowej (51). Z drugiej strony wiadomo (53), że wątroba w nerczycy produkuje zwiększoną ilość nie tylko albuminy, ale także lipoproteidów, które nie są wydalane z moczem (nerczyca lipoproteidowa). W tym więc przypadku jako reakcja na utratę jednego białka zwiększa się produkcja innego. Trudno to zjawisko wyjaśnić jednoznacznie, ale przypuszczalnie w grę wchodzi tu problemy regulacji na poziomie mikrosomów związane z informacją genetyczną. Wiadomo zresztą, że adaptacyjny wzrost wątroby w nerczycy prowadzi nie tylko do zwiększenia wagi tego narządu i zawartości białka, ale także DNA i RNA (54). Zatem zjawiska kontroli szybkości syntezy białek osocza w wątrobie są na pewno bardziej złożone niż kontrola rozkładu, który odbywa się zgodnie z reakcją pierwszego rzędu proporcjonalnie do rozmiarów puli naczyniowej.

Jednym z czynników wpływających na szybkość syntezy białka jest niewątpliwie stężenie aminokwasów w miejscu syntezy, jak to już wykazał *Borsook* (6). Wpływ hormonów kory nadnerczy na przemieszczenie białek ze skóry i mięśni do narządów mięszkowych mogłyby polegać na zmianie dystrybucji aminokwasów. *Drabkin* i wsp. (15) zaobserwowali w ciężkiej nerczycy u szczurów zmniejszenie zawartości wolnych aminokwasów w mięśniach a zwiększenie w wątrobie, przy czym zmiany nie dotyczyły takich aminokwasów jak anseryna czy tauryna, które nie są związane z biosyntezą białka.

X. Uwagi końcowe

Przedstawione powyżej rozważania dotyczące mechanizmów utrzymujących stały poziom albuminy osocza w ustroju oparte są głównie na wynikach doświadczeń izotopowych, co ogranicza ich biologiczną spraw-

dzalność. Niemniej jednak wydaje się, jak to już przedstawił McFarlane (63), iż w granicach przeciętnych wahań w żywieniu i mniejszych urazów dnia codziennego homeostaza białek osocza utrzymuje się dzięki stałości tak względnej szybkości zamiany aminokwasów na białko, jak i względnej szybkości procesów katabolicznych. Przy większych zaburzeniach w rozmiarach naczyniowej puli albuminy ich skutki mogą być przez pewien okres czasu zmniejszone dzięki obecności puli pozanaczyniowej. Jeśli zaburzenia te przynoszą duże i trwałe zmiany w stężeniu białek osocza, to ulega zmianie szybkość syntezy, być może proporcjonalnie do zmian ciśnienia onkotycznego w przestrzeni śródmiąższowej wątroby i w zależności od odpowiedniej regulacji hormonalnej. Zmiana szybkości syntezy nie musi pozostawać w żadnej zależności z względną szybkością rozkładu, która jest stała (jako część puli naczyniowej białka usuwanego na dobę). Katabolizm osiąga wysokie wartości z reguły dopiero przy pojawieniu się dodatkowych miejsc rozkładu czy utraty białka, np. w albuminurii czy gastroenteropatii wysiękowej. Zmniejszenie względnej szybkości procesów katabolicznych obserwuje się wyjątkowo w stanach krańcowych niedoborów białkowych.

LITERATURA

1. Anker H. S. w *Plasma Proteins*, tom II, red. F. W. Putnam, Academic Press, New York 1960, str. 267-307.
2. Armstrong F. B., Margen S., Tarver H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **103**, 592 (1960).
3. Beeken W. L., Volwiler W., Goldsworthy P. D., Garby L. E., Reynolds W. E., Stogsdill R., Stemler R. S., *J. Clin. Investig.* **41**, 1313 (1962).
4. Beeken W. L., Norman M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **117**, 24 (1964).
5. Blahd W. H., Fields M., Goldman R., *J. Lab. Clin. Med.* **46**, 747 (1955).
6. Borsook H., *Nature* **182**, 1006 (1958).
7. Braun G. A., Marsh J. B., Drabkin D. L., *Metabolism* **11**, 957 (1962).
8. Campbell R. M., Cuthbertson D. P., Matthews C. M., McFarlane A. S., *Intern. J. Appl. Rad. Isotopes* **1**, 66 (1956).
9. Campbell R. M., Cuthbertson D. P., Mackie W., McFarlane A. S., Phillipson A. T., Sudsaneh S., *J. Physiol.* **158**, 113 (1961).
10. Cohen S., Gordon A. H., *Biochem. J.* **70**, 544 (1958).
11. Cohen S., Freeman T., McFarlane A. S., *Clin. Sci.* **20**, 161 (1961).
12. Davies J. W. L., Ricketts C. R., Bull J. P., *Lancet* **i**, 346 (1959).
13. Dixon E. J., Talmage D. W., Maurer P. H., Deichmiller M., *J. Exptl. Med.* **96**, 313 (1952).
14. Dixon F. J., Maurer P. H., Deichmiller M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **83**, 287 (1953).
15. Drabkin D. L., Marsh J. B., Braun G. A., *Metabolism* **11**, 967 (1962).
16. Enerback L., Lundin P. M., Mellgren J., *Acta Endocrinol.* **21**, 83 (1959).
17. Francis G. E., Mulligan W., Wormald A., *Isotopic Tracers*, The Althone Press, London 1959.

18. Franks J. J., Edwards K. W., Lackey W., Fitzgerald J. B., *J. Gen. Physiol.* **46**, 427 (1963).
19. Freeman T., *Clin. Chim. Acta* **4**, 788 (1959).
20. Freeman T., Matthews C. M. E., McFarlane A. S., Bennhold H., Kallee E., *Nature* **183**, 606 (1959).
21. Friedberg W., *Am. J. Physiol.* **204**, 501 (1963).
22. Garrow J. S., *J. Clin. Investig.* **38**, 1241 (1959).
23. Gergely J., Mitusova L., *Proteides of the Biological Fluids*, Proc. 7th Coll., Brugges 1959, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 160, str. 305—308.
24. Gibson J. G., Evans W. A., *J. Clin. Investig.* **16**, 317 (1937).
25. Gitlin D., Landing B. H., Whipple A., *J. Expl. Med.* **97**, 163 (1953).
26. Gitlin D., *Bull. N. Y. Acad. Sci.* **31**, 359 (1955).
27. Gitlin D., Janeway C. A., Farr L. E., *J. Clin. Investig.* **35**, 44 (1956).
28. Gitlin D., Craviotto I., Frenk S., Montano E. L., Galwan R. R., Gomez F., Janeway C. A., *J. Clin. Investig.* **37**, 682 (1958).
29. Gitlin D., Klinenberg J. R., Hughes W. L., *Nature* **181**, 1064 (1958).
30. Glenert J., Jarnum S., Riemer S., *Acta Chir. Scand.* **124**, 63 (1962).
31. Gordon A. H., *Biochem. J.* **66**, 255 (1957).
32. Gordon A. H., *Biochem. J.* **82**, 531 (1962).
33. Gordon R., *Lancet* **i**, 325 (1959).
34. Green M., Miller L. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 3202 (1960).
35. Gross P. A. M., Embree L. J., Bally P., Shipp J. C., Thorn G. W., *Am. J. Med.* **29**, 386 (1960).
36. Grossman J., Yalow A. A., Weston R. E., *Metabolism* **9**, 528 (1960).
37. Hanicki Z., Koj A., *Clin. Chim. Acta* **11**, 581 (1965).
38. Hanicki Z., Koj A., *Wien Klin. Wochschr.*, **44**, 66 (1966).
39. Holman H., Nickel W. F., Slesinger M. H., *Am. J. med.* **27**, 963 (1959).
40. Humphrey J. H., McFarlane A. S., *Biochem. J.* **57**, 186 (1954).
41. Humphrey J. H., Neuberger A., Perkins D. J., *Biochem. J.* **66**, 390 (1957).
42. Iber F. L., Nassua K., Plough I. C., Berger F. M., Meroney W. H., Fremont-Smith K., *J. Clin. Investig.* **37**, 1442 (1958).
43. Jeejeebhoy K. N., Coghill M. F., *Gut* **2**, 123 (1961).
44. Jensen D., Tarver H., *J. Gen. Physiol.* **39**, 567 (1956).
45. Jones J. H., Morgan D. B., *Lancet* **i**, 626 (1963).
46. Kaitz A. L., *J. Lab. Clin. Med.* **53**, 186 (1959).
47. Katz S., Rosenfeld S., Sellers A. L., *Am. J. Physiol.* **198**, 814 (1960).
48. Kimbel K. H., Heinkel K., Borner W., *Arztl. Wschr.* **11**, 602 (1956).
49. Koj A., *Post. Biochem.* **10**, 391 (1964).
50. Koj A., Regoeczi E., Irons L., McFarlane A. S., *Biochem. J.* **91**, 26P (1964).
51. Koj A., Regoeczi E., McFarlane A. S., w przygotowaniu do druku.
52. Levenson S. M., Crowley L. V., Horowitz R. E., Malm O. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 2063 (1959).
53. Marsh J. B., Drabkin D. L., *Metabolism* **11**, 946 (1962).
54. Marsh J. B., Drabkin D. L., *J. Biol. Chem.* **230**, 1063 (1958).
55. Matthews C. M. E., *Phys. Med. Biol.* **2**, 36 (1957).
56. Matthews C. M. E., *J. Clin. Investig.* **40**, 603 (1961).
57. Mayerson H. S., Wolfram C. G., Shirley H. H., Wasserman K., *Am. J. Physiol.* **198**, 155 (1960).
58. McFarlane A. S., *Biochem. J.* **62**, 135 (1956).
59. McFarlane A. S., *Progr. Biophys.* **7**, 115 (1957).

60. McFarlane A. S., *Lancet* i, 131 (1963).
61. McFarlane A. S., *J. Clin. Investig.* **42**, 346 (1963).
62. McFarlane A. S., *Biochem. J.* **89**, 277 (1963).
63. McFarlane A. S., w Mammalian Protein Metabolism, tom I, red. H. N. Munro i J. B. Allison, New York 1964, str. 297.
64. McFarlane A. S., Todd D., Cromwell S., *Clin. Sci.* **26**, 415 (1964).
65. McFarlane A. S., Irons L., Koj A., Regoeczi E., *Biochem. J.* **95**, 536 (1965).
66. Miller L. L., *Nature* **185**, 248 (1960).
67. Miller L. L., Bly C. G., Watson M. L., Bale W. F., *J. Expl. Med.* **94**, 431 (1951).
68. Munro H. N. w Mammalian Protein Metabolism, tom I, red. H. N. Munro i J. B. Allison, New York 1964, str. 381.
69. Picou D., Waterlow J. C., *Clin. Sci.* **22**, 459 (1962).
70. Reeve E. B., Roberts J. E., *J. Gen. Physiol.* **43**, 445 (1960).
71. Regoeczi E., Regoeczi G. E., McFarlane A. S., *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* **279**, 17 (1964).
72. Regoeczi E., Irons L., Koj A., McFarlane A. S., *Biochem. J.* **95**, 521 (1965).
73. Rodionov V. M., Uspenskaya V. D., Zamyatkina O. G., Grunt T. P., Polyakova V. P., *Wopr. Med. Chim.* **3**, 255 (1957).
74. Rothschild M. A., Bauman A., Yalow R. S., Berson S. A., *J. Clin. Investig.* **34**, 1354 (1955).
75. Rothschild M. A., Schreiber S. S., Oratz M., McGee H. L., *J. Clin. Investig.* **37**, 1229 (1958).
76. Rothschild M. A., Oratz M., Wimer E., Schreiber S. S., *J. Clin. Investig.* **40**, 545 (1961).
77. Rothschild M. A., Oratz M., Franklin E. C., Schreiber S. S., *J. Clin. Investig.* **41**, 1564 (1962).
78. Rothschild M. A., Oratz M., Schreiber S. S., Evans C. D., *J. Clin. Investig.* **42**, 973 (1963).
79. Schwartz M., Jarnum S., *Lancet* i, 327 (1959).
80. Sellers A. L., Katz J., Rosenfeld S., *Nature* **192**, 562 (1961).
81. Steinfeld J., Davidson J., Gordon R., *J. Clin. Investig.* **36**, 931 (1957).
82. Sterling K., *J. Clin. Investig.* **30**, 1228 (1951).
83. Swick R. W., *Proc 2nd U. N. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy*, **25**, 115 (1958).
84. Waldmann T. A., *Lancet* ii, 121 (1961).
85. Waldmann T. A., Laster L., *J. Clin. Investig.* **43**, 1025 (1964).
86. Wasserman K., Joseph J. D., Mayerson H. S., *Am. J. Physiol.* **184**, 175 (1956).
87. Yuile C. L., Lucas F. V., Neubecker R. D., Cochrane C. G., Whipple G. H., *J. Expl. Med.* **109**, 165 (1959).

JANINA H. ROGOZIŃSKA *

Nomenklatura kinin roślinnych

The Nomenclature of Plant Kinins

The term of phyto-kinins, cytokinins and cytominins is discussed for all kinins with kinetin-like activity, to avoid further confusion with animal physiology, who have priority for the term kinins, a class of local hormones.

W roku 1956 Miller i wsp. (8) zaproponowali nazwę „kinetyna” dla związku chemicznego stymulującego proces cytokinezy w tkankach roślinnych. Pod względem chemicznym jest to 6-furfuryloaminopuryna, która powstaje podczas starzenia się, lub autoklawowania DNA w środowisku kwaśnym. Dla klasy związków chemicznych, które „podobnie stymulują cytokinezę” autorzy wprowadzili nazwę kininy (8). Jednakże wkrótce zorientowano się, że nazwę tę wprowadził Schachter i wsp. (1) już w 1954 roku dla określonej grupy hormonów zwierzęcych. Wywodzi się ona od nazwy „bradykinina” (od greckich słów: *bradys* — wolno i *kinein* — poruszać), którą grupa z São Paulo w 1949 roku nadała odkrytemu przez siebie hormonowi powstającemu z białka krwi. Nazwa „kininy” stała się więc dwuznaczna, co w miarę rozwoju badań i częstości jej stosowania, prowadziło do coraz częstszych nieporozumień przy sporządzaniu indeksów itp.

Budowa chemiczna i funkcja fizjologiczna kinin zwierzęcych jest całkowicie różna od roślinnych. Jak obecnie wiadomo, kininy pochodzenia zwierzęcego stanowią grupę hormonów, wytwarzanych w zależności od potrzeby we krwi lub w tkankach, bez udziału specjalnych gruczołów. Są one polipeptydami, o niskim ciężarze cząsteczkowym i wywołują takie procesy jak kurczenie się i rozluźnianie mięśni gładkich, obniżanie względnie podwyższanie ciśnienia krwi, zwiększanie przepuszczalności kapilar, rozszerzanie naczyń krwionośnych, wywołują także uczucie bólu itp.

Natomiast kininy roślinne są pochodnymi 6-aminopuryny, w których do grupy aminowej dołączona jest niepolarna grupa arylova lub alkilowa. Do kinin roślinnych zaliczamy kinetynę (8), 6- γ , γ -dwumetyloallyloami-

* Dr, Adiunkt Zakładu Dendrologii PAN w Kórniku

no/purynę (11), benzyloadeninę (14) i inne aktywne syntetyczne pochodne puryn (3), jak również zeatynę (6- γ -metylo- γ -hydroksymetyloallyloamino/purynę), aktywną substancję z endospermu kukurydzy (7) oraz aktywne produkty naturalne o niecałkowicie oznaczonej strukturze chemicznej (12). Substancje takie jak triakantyna 3- γ , γ -dwumetyloallyloadenina (11), dezoksyadenozyna (2) lub adenina z podstawionymi grupami w pozycji 1 (4, 13), które nabywają podobnej do kinetyny aktywności wzrostowej na skutek zmian chemicznych, nie są uważane za kininy roślinne. Być może są one ich prekursorami lub metabolitami pozbawionymi aktywności.

Kininy roślinne, niezależnie od stymulacji cytokinezy (w komórkach różnych roślin), wpływają na wzrost objętości komórek, zmieniają szybkość metabolizmu, aktywność enzymatyczną, zawartość kwasów nukleinowych oraz indukują organogenezę. Ponadto, współdziałają z auksynami i giberelinami w kształtowaniu dominacji wierzchołkowej, wpływają na kierunek przemieszczania prostych składników organicznych i mineralnych, przerywają okres spoczynku pączków u niektórych roślin oraz zwiększają długowieczność tkanek i organów (10, 13).

Dwuznaczność nazwy „kininy” spowodowała, że niektóre ośrodki badawcze wystąpiły z propozycją zmian nomenklatury. Proponuje się pozostawienie bez zmian dotychczasowego pojęcia kinin stosowanego od kilkunastu lat w fizjologii i biochemii zwierząt (6, 9, 13). Na międzynarodowej konferencji w Gif-sur-Yvette w 1963, której tematem były naturalne regulatory wzrostu roślin, *Thimann* (5) zaproponował dla grupy substancji, zwanych dotąd kininami nazwę cytominy, a *Motthes* (9) sugerował nazwę fito- lub cytokininy. W tym samym roku, *Letham* (6) również proponuje nazwę cytokininy, podkreśla jednakże, że ma ona uzasadnienie tylko w odniesieniu do pewnych testów wzrostowych. W 1965 roku ukazał się artykuł *Skogai* i wsp. (13), odkrywców kinetyny, dotyczący terminologii kinin. Wymienieni autorzy uważają, że nazwa cytokininy jest właściwsza dla określenia wszystkich substancji o aktywności biologicznej podobnej do kinetyny. Nazwa ta wiąże się z najwcześniej poznaną właściwością tych substancji stymulowania cytokinezy w komórkach roślinnych a, być może, również w niektórych komórkach zwierzęcych. Jednakże substancje te, jak wspomniano wyżej, oddziałują na szereg innych procesów zachodzących w organizmie roślinnym. Fakt ten jest zasadniczą przyczyną polemicznego ustosunkowania się do nazwy „cytokininy”, która uwzględnia tylko jedną z jej właściwości. Nazwa „cytominy” ma najmniej szans na powszechne przyjęcie z racji swojej nowości oraz związania funkcji kinin również tylko z cytokinezą.

Z wymienionych propozycji nowych nazw dla kinin roślinnych najbardziej prawidłową wydaje się nazwa „fitokininy”. Za słusnością tej nazwy przemawia nawiązanie do nazwy stosowanej powszechnie już od dziesięciu lat przez botaników. Jednocześnie, swym przedrostkiem pod-

kreśla ona roślinny charakter związku i jego funkcji. Nazwa „fitokininy” byłaby w pewnym stopniu analogiczną do nazwy „auksyn”, która również obejmuje chemicznie heterogenną grupę naturalnych i syntetycznych substancji o aktywności biologicznej podobnej do kwasu 3-indoliloctowego, oraz do nazwy „gibereliny”, która odnosi się do jeszcze innej grupy chemicznie pokrewnych substancji, o wyraźnie różnych właściwościach fizjologicznych.

W chwili obecnej trudno przewidzieć, która z dwóch popularnych nazw, „cytokininy” czy „fitokininy” zostanie powszechnie przyjęta. Najwłaściwszym forum dla ustalenia ostatecznej nomenklatury kinin roślinnych byłoby ponowne przedyskutowanie terminu na międzynarodowym zjeździe botanicznym.

LITERATURA

1. Collier H. O. J., *Scientific American* **207**, Nr 2-str. 111 (1962).
2. Hall R. H., De Ropp R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6400 (1955).
3. Hamzi Q. H., Ph. D. thesis, University of Wisconsin 1965.
4. Hamzi Q. H., Skoog F., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **51**, 76 (1964).
5. Kefford N. P., *Science* **142**, 1495 (1963).
6. Letham D. S., *N. Z. J. Bot.* **1**, 336 (1963).
7. Letham D. S., Shannon J. S., McDonald I. R., *Proc. Chem. Soc.* str. 230 (1964).
8. Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375 (1956).
9. Mothes K., *Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale*, CNRS Paris 1964, str. 131.
10. Rogozińska J. H., *Acta Soc. Bot. Polon.* w druku.
11. Rogozińska J. H., Helgeson J. P., Skoog F., *Physiol. Plantarum* **17**, 165 (1964).
12. Rogozińska J. H., Helgeson J. P., Skoog F., Lipton S. H., Strong F. M., *Plant Physiol.* **40**, 469 (1965).
13. Skoog F., Strong F. M., Miller C. O., *Science* **148**, 532 (1965).
14. Strong F. M., *Topics in Microbial Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1958, rozdz. 3.



LUDMIŁA SZARKOWSKA

Ludmiła Szarkowska 1921 — 1965

Dnia 17 listopada 1965 r. zmarła w Madison (USA) Doc. Dr Ludmiła Szarkowska, kierownik Pracowni Oddychania Tkankowego w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Wykształcenie średnie odebrała w rodzinnym Pułtusk. W okresie okupacji kontynuowała naukę w Warszawie, początkowo w Liceum Chemicznym a następnie na Wydz. Chemii Wyższej Szkoły Technicznej. Opuściła to miasto po powstaniu, wraz z całą jego ludnością. Po wojnie, w 1945 roku rozpoczęła studia na II roku Wydz. Chemii Politechniki Gdańskiej, gdzie w 4 lata później uzyskała dyplom mgr inż. chemii.

Już w czasie studiów w 1948 roku rozpoczęła pracę naukową pod kierunkiem prof. E. Syma w pracowni biochemii Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku. Jej pierwsza publikacja naukowa ukazała się w rok później i dotyczyła metabolizmu prątko gruźlicy. W 1950 roku przeniosła się wraz z pracownią prof. Syma do Akademii Medycznej w Warszawie. Przez następne sześć lat kontynuowała badania nad metabolizmem *Mycobacterii*. Jako pracownik Zakładu Chemii Ogólnej a następnie Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej zajmowała się dydaktyką oraz brała udział w pracach organizacyjnych Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, powstającego pod kierunkiem prof. J. Hellera. W Instytucie tym pracowała od chwili jego utworzenia. W 1956 roku odbyła staż naukowy w Instytucie Biochemii Węgierskiej Akademii Nauk w Budapeszcie.

Kolejny okres działalności naukowej, rozpoczęty pod kierunkiem prof. J. Hellera, obejmuje badania nad oddychaniem chinonowym u owadów. W 1959 roku przedłożyła z tego zakresu rozprawę doktorską i uzyskała w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN stopień doktora nauk przyrodniczych.

Badania nad rolą i miejscem chinonów w łańcuchu oddechowym prowadziła do ostatnich chwil swego życia. W 1961 roku została zaproszona przez prof. T. Büchera do współpracy w tej dziedzinie w kierowanym przez niego Instytucie Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Phillipa w Marburgu (NRF). Spędziła tam rok współpracując ściśle z dr. M. Klinenbergiem. Po powrocie do kraju kontynuowała badania w swojej pracowni. W 1964 roku uzyskała w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego stopień docenta na podstawie rozprawy habilitacyjnej

pt. „Badania nad ubichinonem i jego funkcją biologiczną”. W 1965 roku na zaproszenie prof. D. Greena wyjechała na roczny pobyt do Instytutu Enzymologii w Madison (USA). W ciągu kilku miesięcy wykonała tam doskonałą pracę nad odtworzeniem aktywności DPNH oksydazy przez koenzym Q. Praca ta jest 45 i ostatnią publikacją naukową Doc. Szarkowskiej.

Doc. Szarkowska była jednym z czołowych biochemików polskich. Jej pozycja naukowa i uznanie jakim cieszyły się jej osiągnięcia zarówno w kraju, jak i zagranicą wynikały z niezwykłych zalet umysłu i charakteru. Była człowiekiem całkowicie oddanym nauce, wybitnym zdolnościom towarzyszyła bezprzykładna pracowitość. Jej skromność, krytyczny stosunek do własnych osiągnięć i wielka życzliwość dla ludzi budziły powszechny szacunek i sympatię. Ci, którzy mieli okazję poznać Ją bliżej, darzyli Ją szczerą przyjaźnią.

Jej śmierć jest niepowetowaną stratą dla polskiej biochemii.

Przyjaciele

LAUREACI NAGRODY NOBLA W 1965 R.

André Lwoff, Jacques Monod i Francois Jacob

laureaci nagrody Nobla z dziedziny medycyny w 1965 r

W roku 1965 trzech wybitnych biologów francuskich André Lwoff, Jacques Monod i Francois Jacob otrzymało nagrodę Nobla z dziedziny medycyny. André Lwoff jest profesorem mikrobiologii w Sorbonie, Jacques Monod — profesorem biochemii Sorbony a Francois Jacob — profesorem genetyki w Collège de France. Mimo dość różnych specjalności łączą ich długie lata bliskiej współpracy w słynnym paryskim Instytucie Pasteura, gdzie wykonane zostały wszystkie podstawowe ich prace tak zaszczytnie wyróżnione przez jury Fundacji Nobla.

Najstarszy z tej trójki A. Lwoff (ur. w r. 1902) od szeregu lat kieruje w Instytucie Pasteura pracownią fizjologii mikroorganizmów, J. Monod stoi na czele pracowni biochemii komórkowej a F. Jacob jest kierownikiem pracowni genetyki mikroorganizmów. Tam, przy bliskiej współpracy naukowej stworzyli jedną z podstawowych na świecie placówek biologicznych, w której rodzą się liczne koncepcje współczesnej biologii molekularnej będącej jakby syntezą fizjologii, genetyki i biochemii związków wielkocząsteczkowych przede wszystkim białek i kwasów nukleinowych. Pracownia ta już od lat była istną Mekką dla licznych mikrobiologów, genetyków i biochemików, którzy zjeżdżali się tu i wspólnie wykonywali prace.

A. Lwoff już od lat znany był jako wybitny protozoolog zajmujący się zjawiskami dziedziczenia cytoplazmatycznego u pierwotniaków. Wykazał on, iż u tych organizmów liczne organelle cytoplazmatyczne zdolne są do samoreprodukcji i że obok dziedziczenia jądrowego występują tu różne typy dziedziczenia pozajądrowego. Ten kierunek badań w ostatnim okresie coraz bardziej przyciąga uwagę biologów. Został on wspaniale rozwinięty nie tylko na pierwotniakach np. przez Sonneborna, Beale'a i innych, ale także na innych organizmach; coraz więcej danych wskazuje, iż u bakterii istnieją poza jądrem liczne systemy przekazywania informacji dziedzicznej. Dalsze badania Lwoffa oraz jego współpracowników Jacoba i Monoda doprowadziły do sformułowania koncepcji episomów, która, jak wiemy, w pewnym stopniu zaciera granicę między dziedziczeniem jądrowym i pozajądrowym. Lwoff prowadził poza tym przez szereg lat podstawowe badania nad fizjologią mikroorganizmów i przyczynił się w dużym stopniu do stwierdzenia u mikroorganizmów roli witamin jako koenzymów.

Dla powstania współczesnej koncepcji episomów jak i w ogóle dla bakterio-logii i wirusologii najistotniejsze może były prace Lwoffa nad lizogennością bakterii. Wykazał on po raz pierwszy, że bakterie lizogenne zawierają wirusa w postaci profaga włączonego do ich genomu. Na skutek indukcji profag oddziela się od genomu bakterii i namnaża się już niezależnie jako fag. W ten sposób właściwie zainicjowana została idea episomów, którą następnie rozwinęli Monod i Jacob. Poznanie natury bakterii lizogennych miało olbrzymie znaczenie dla dalszego rozwoju genetyki bakterii i mogło być następnie, między innymi, wykorzystane także

do transdukcji, która jest dziś jedną z podstawowych metod analizy genetycznej bakterii. Z drugiej strony, koncepcja profaga włączonego do genomu bakterii i wytwarzającego substancję represorową hamującą działalność jego genów i nadającego specyficzną odporność bakterii była jakby prekursorem idei regulacji funkcjonowania genów rozwiniętej w latach następnych przez Monoda i Jacoba.

J. Monod (ur. w r. 1910) rozpoczął pracę naukową również od badań nad pierwotniakami. Badania te jednak szybko przerwała wojna. W czasie wojny rozpoczęła on pod kierunkiem Lwoffa badania nad metodami ilościowej analizy wzrostu kultur bakteryjnych. W tym czasie zaczyna się interesować kinetyką nie tylko ogólnego wzrostu bakterii, ale także procesami indukowania syntezy poszczególnych enzymów bakteryjnych. Głównym obiektem jego badań na szereg lat stała się β -galaktozydaza, której wytwarzanie w komórce badanych przez niego szczepów jest indukowane przez obecność specyficznych substratów w pożywce — galaktozydów. Problem enzymów induktywnych był w owym czasie zupełnie nowy. Monod wykazał, że indukcja substratowa β -galaktozydazy polega na syntezie *de novo* cząsteczek enzymu a nie na przekształceniu poprzednio już istniejących białkowych prekursorów enzymu. Wyglądało więc, że w tym wypadku substrat indukuje aktywność genu produkującego enzym.

Kiedy jednak Monod otrzymał liczne mutanty *E. coli* produkujące galaktozydazę bez obecności induktora w pożywce, tak zwane mutanty konstytutywne, okazało się, że sprawa wygląda wręcz odwrotnie. Substrat (galaktozyd) nie indukuje aktywności genu, ale znosi działanie jakiejś substancji represorowej, która w szczepach induktywnych hamuje aktywność genu produkującego enzym. Szczepy konstytutywne byłyby więc mutantami jakiegoś genu-regulatora, nie wytwarzającymi represora, co powoduje, iż mogą wytwarzać enzym bez względu na obecność substratu w pożywce. Nadal jednak nie bardzo było jasne w jaki sposób i na jakie elementy genomu działa substancja represorowa.

Dalszy rozwój tych badań i ostateczne poznanie mechanizmu regulacji syntezy enzymu wymagały jednak posługiwania się metodami genetycznymi. Rozpoczyna się więc bliska współpraca między Monod i Jacobem, który w tym okresie wraz z E. Wollmanem znacznie już rozwinął metody analizy genetycznej u *E. coli*.

F. Jacob (ur. w r. 1920) najmłodszy z całej nagrodzonej trójki rozpoczął po wojnie w pracowni Lwoffa wraz z Wollmanem a następnie z całym zespołem współpracowników cykl prac nad koniugacją u *E. coli*. Zjawisko to zostało wykryte w r. 1946 przez Lederberga i Tatuma. Kiedy w następnych latach Cavalli-Sforza i Hayes wykryli szczepy Hfr w wysokim stopniu przekazujące materiał dziedziczny przy koniugacji oraz kiedy okazało się, iż u *E. coli* istnieje odpowiednik zróżnicowania płciowego i przekazywanie materiału genetycznego jest jednostronne od komórki dawcy F^+ czy Hfr do komórki biorcy F^- powstał cały olbrzymi kompleks zagadnień wymagających wyjaśnienia. Prace Jacoba i Wollmana z tego okresu ustaliły cały szereg podstawowych faktów. Wykazują oni w szeregu pięknych publikacji, że z komórek dawcy Hfr do komórek biorcy F^- przechodzi część chromosomu i powoduje liniowe, kolejne przekazywanie znajdujących się na nim genów. Proces ten można badać, jak wykazali Jacob i Wollman, bądź na podstawie procentu rekombinantów z różnymi genami wśród bakterii biorców, jak i z „zegarkiem w rękę” przerywając wstrząsaniem proces przekazywania chromosomu między koniugującymi bakteriami, w różnych odstępach czasu od rozpoczęcia koniugacji. Prace te nie tylko ugruntowały wiedzę o kinetyce procesu koniugacji u bakterii, ale także wykazały pośrednio kolistość chromosomów bakterii, co następnie, na drodze innych badań, zostało w pełni potwierdzone.

Poza tym, przejście typu F^+ w Hfr tak jak i lizogenność dały się wytłumaczyć integracją w chromosomie bakterii w określonym miejscu, w pierwszym wypadku

czynnika płciowego F w drugim zaś — profaga. Badając proces koniugacji wykryto zjawisko tzw. indukcji somatycznej polegające na tym, że w momencie gdy z komórki dawcy Hfr, lizogennej w stosunku do faga np. λ (jak na przykład szczep K12 badany przez Jacoba) odcinek chromosomu z profagiem wchodzi do komórki biorcy, profag ulega indukcji i jako wolny fag powoduje lizę komórek biorcy. W ten sposób można było wykazać, że różne profagi mają różne, dla siebie właściwe rejony w chromosomie bakterii, w które włączają się. Dalsze badania wykazały, że powstanie szczepów Hfr jest wynikiem integracji czynnika F, w określonym miejscu chromosomu bakterii, co powoduje dla każdego typu Hfr właściwą mu kolejność przekazywania genów przy koniugacji, w zależności od miejsca przyczepu czynnika F. Przenoszenie przez fagi czy czynnik F części genomu przyległego do jego punktu przyczepu i powstawanie specjalnych typów częściowych zygot stwarza nowe możliwości analizy genetycznej u bakterii.

Badania nad czynnikami F czy profagami, które mogą być bądź integrowane w genomie bakterii, bądź występować niezależnie od niego w komórce, doprowadziły do zdefiniowania nowego typu jednostek dziedzicznych nazwanych przez Jacoba i Monoda episomami, odgrywających tak istotną rolę we współczesnych koncepcjach biologii molekularnej.

Mając możliwość dokładnego zlokalizowania genów w chromosomie a także badania ich komplementacji czy też dominacji w częściowych zygotach, w których geny znajdują się bądź na chromosomie bądź na episomie, Monod i Jacob mogli dokładnie wyjaśnić mechanizm regulacji syntezy β -galaktozydazy. W ten sposób wykazali oni, że z genem, a właściwie z trzema genami strukturalnymi zawierającymi informację o syntezie β -galaktozydazy, permeazy i transacetylazy ściśle sprzężony jest gen operator, który reaguje na substancję represorową produkowaną przez gen regulator, znajdujący się w zupełnie innym miejscu genomu bakterii. Represor blokuje gen operator i wtedy geny strukturalne będące pod jego wpływem nie przejawiają swej aktywności. W szczepach induktywnych galaktozydazy inaktywują represor, dzięki czemu operator jest aktywny. Otrzymawszy mutacje zarówno w genie regulatorze jak i w samym operatorze można było wykazać, że mutacje w genie operatorze są recesywne i gdy niezmutowany gen operator znajduje się na episomie enzymy nie są wytwarzane. Inaczej jest z mutacjami genu regulatora, które są dominujące także wtedy gdy znajdują się na episomie.

W wyniku szeregu pięknych doświadczeń Jacob i Monod wykazali, że gen operatorowy i sąsiadujące z nim określone geny strukturalne stanowią ponadgenową jednostkę skoordynowanej transkrypcji informacji dziedzicznej, w której sąsiednie geny, kontrolujące zwykle kilka różnych enzymów związanych z jednym cyklem reakcji biochemicznych, są podporządkowane jednemu genowi operatorowi zdolnemu do odbierania bodźców, powodujących represję bądź derepresję procesu transkrypcji. Taką jednostkę Monod i Jacob nazwali operonem.

W roku 1961, kiedy idea ta została po raz pierwszy opublikowana, wzbudziła ona wielki entuzjazm wśród biologów i zainicjowała cały szereg prac w różnych ośrodkach, które w pełni, przynajmniej u bakterii, potwierdziły słuszność tej hipotezy. Aby wytłumaczyć działanie operatora na geny strukturalne polegające na ich włączaniu czy wyłączeniu Monod i Jacob założyli, że odbywa się to na drodze inicjowania lub hamowania procesu transkrypcji informacji o syntezie enzymów zawartej w DNA genów strukturalnych operonu na specjalny, krótkotrwały rodzaj RNA nazwany przez nich *messenger RNA* (mRNA) czyli tzw. RNA informacyjny.

W chwili publikacji tej pracy była to jeszcze tylko bardzo interesująca hipoteza. Jeszcze w tym samym roku ukazała się jednak praca Jacoba wykonana wspólnie z Brennerem i Meselsonem która potwierdziła realność postulowanego mRNA. W pracy tej wykonanej na układzie bakteria — fag, stosując pulsowe znakowanie

DNA, RNA i nowopowstających białek wykazano, że nowy RNA powstający po infekcji bakterii przez faga wchodzi w kontakt ze „starymi” rybosomami bakterii i następuje synteza białek według informacji zawartej w DNA faga przy użyciu aparatu rybosomalnego bakterii. Nowo powstająca drobna frakcja RNA była właśnie owym postulowanym mRNA, który przenosi informację o syntezie białek wprowadzoną przez DNA faga. Liczne badania nad mRNA prowadzone prawie jednocześnie i w następnych latach, w pełni potwierdziły słuszność pierwotnego założenia Monoda i Jacoba. Koncepcja mRNA jest jedną z najbardziej podstawowych w biologii molekularnej. Umożliwia ona w następnych latach Nirenbergowi i Ochoa rozpoczęcie prac nad rozszyfrowaniem kodu trójkowego dla aminokwasów przez użycie w układach bezkomórkowych syntetycznych poliribonukleotydów złożonych z jednej lub dwóch zasad. W układach tych spełniały one funkcje mRNA.

Prace „wielkiej trójcy” z Instytutu Pasteura stanowią punkty zwrotne w rozwoju współczesnej biologii molekularnej. Rzucają one w dużym stopniu także na dalsze perspektywy rozwoju biologii. Idea operonu regulującego przekazywanie informacji od DNA do układu produkującego białka przez inicjowanie lub hamowanie produkcji mRNA poprzez systemy represorów i efektorów dla całych zespołów genów może w przyszłości stać się podstawą wyjaśnienia procesów różnicowania się komórek i tkanek u organizmów wielokomórkowych. Monod i Jacob rozpatrują obecnie (na razie teoretycznie) możliwość istnienia całych układów operonów różnego rzędu, które, nawzajem się zazębiając, mogłyby powodować kolejne włączanie jednych a wyłączenie innych zespołów regulacyjnych. W ten sposób można będzie, być może, wytłumaczyć przyczynowo procesy embryo- i onto-genezы wyższych organizmów, gdzie niewątpliwie w różnych komórkach i tkankach tylko pewne fragmenty ogólnej informacji dziedzicznej są realizowane w postaci syntezy określonych typów białek.

Ostatnio, Jacob w bardzo interesujący sposób wykazuje, że regulowanie replikacji DNA, która jak wiadomo jest bodźcem do podziału komórkowego możnaby wyjaśnić koncepcją replikonu analogiczną do operonu. Jacob postuluje, że zarówno chromosom bakterii jak każda cząstka DNA epizomalnego (wirusa czy np. czynnika F) ma własny system replikonów czyli genów regulujących replikacje tych jednostek. Analogicznie do operonu w skład replikonu wchodzi gen replikator (analog operatora), który inicjuje replikację kołistego DNA w określonym miejscu i z określoną polarnością. Sygnałem, który inicjuje działalność replikatora jest substancja zwana inicjatorem, produkowana przez specjalny gen strukturalny inicjatora znajdujący się w innym miejscu na chromosomie. Podobny, własny, odrębny system regulacji replikacji posiadają episomy, dzięki czemu replikacja czy to czynnika F czy fagów w komórce nie jest zsynchronizowana z replikacją DNA i podziałami bakterii. Gdy jednak episomy zostaną włączone do chromosomu bakterii, zostają podporządkowane replikonowi bakterii i replikują synchronicznie z DNA bakterii.

Hipoteza ta zyskuje już pierwsze potwierdzenia doświadczalne i może się okazać w niedalekiej przyszłości bardzo płodna. Jacob przypuszcza, że integrowany w bakteriach Hfr czynnik F jest także ściśle związany z błoną komórkową, co tłumaczyłoby wybór miejsca kontaktu przy koniugacji z bakterią-biorcą. Dalej system ten zakłada, że proces przekazywania chromosomu z bakterii Hfr do bakterii biorecy jest związany z jednoczesną jego replikacją, tak iż do komórki biorecy przechodzi jedna z nowopowstających cząsteczek DNA. Te niezwykle oryginalne koncepcje mogą się okazać w niedalekiej przyszłości bardzo płodne i może wyjaśnią jakie są sygnały i ich receptory w komórkach, regulujące tempo i ilość podziałów komórkowych. Sugerowany przez Jacoba związek chromosomu bakterii z błoną komórkową poprzez czynnik F może być interesującym modelem nie tylko samej replikacji

DNA ale i następującego po niej rozdzieleniu dwóch kopii DNA oraz podziału komórkowego.

Nie ulega wątpliwości, że wielkość prac nagrodzonych w tym roku nagrodą Nobla polegała nie tylko na umiejętności przeprowadzenia świetnie pomyślanych eksperymentów, ale także na umiejętności budowania niezwykle interesujących hipotez roboczych, otwierających zupełnie nowe horyzonty. Większość z nich w krótkim bardzo czasie znalazła pełne potwierdzenie w dalszych pracach doświadczalnych, a inne otwierają zupełnie nowe perspektywy przed tak gwałtownie rozwijającą się dziś biologią molekularną.

W. Gajewski

Robert Burns Woodward

laureat nagrody Nobla z chemii w 1965 r.

Szwedzka Akademia Nauk przyznała tegoroczną nagrodę Nobla z dziedziny chemii organicznej, który całą swą działalność naukową poświęcił badaniu związków występujących w organizmach żywych. Badania struktury produktów naturalnych, a zwłaszcza ostateczne jej potwierdzenie na drodze syntezy, jest tematyką dominującą niemal 150 publikacji Woodwarda.

R. B. Woodward urodził się 10 kwietnia 1917 roku. Studia chemiczne ukończył w roku 1936 w Massachusetts Institute of Technology, gdzie w 1937 roku uzyskał doktorat. W tym samym roku rozpoczął staż na Uniwersytecie Harvarda, gdzie w 1941 roku otrzymał stanowisko asystenta, a w latach następnych przeszedł wszystkie szczeble kariery akademickiej uzyskując w roku 1950 stanowisko profesora chemii organicznej, której zajmuje do chwili obecnej.

Pierwsze prace poświęcił Woodward syntezom dienowym oraz badaniom zależności własności spektralnych od budowy chemicznej, wybierając jako obiekt badań — poliprenoidy. Ta grupa związków pozostaje dotychczas w centrum jego zainteresowań. Szczytowym osiągnięciem w tej dziedzinie była całkowita synteza szeregu naturalnych steroidów opracowana przez Woodwarda w roku 1951. W syntezie tej, wychodząc z 4-metoksy-toluchinonu-1,4 dobudowywał Woodward kolejno poszczególne pierścienie układu cyklopentanofenantrenowego. Związek wyjściowy, będący prekursorem pierścienia C szkieletu steroidowego poddano kondensacji z butadienem dobudowując pierścień D. Do tak powstałego związku dwucyklicznego dobudowano pierścień B na drodze formylowania, reakcji dienowej otrzymanego połączenia hydroksymetylenowego z etylo-winylo-keetonem i cyklizacji. Synteza pierścienia A polegała na dołączeniu reszty karboksymetylenowej do poprzednio otrzymanego związku, zablokowaniu jej i cyjanoetylowaniu pierścienia B, a następnie hydrolizie nitrylu, laktonizacji powstałego enolokwasu, reakcji z bromkiem metylomagnezowym i alkalicznej cyklizacji. Ostatnim etapem była kontrakcja sześciocząonowego pierścienia D przeprowadzona na drodze utlenienia nadjodanem otrzymanego poprzednio układu glikolowego i cyklizacji powstałego dwualdehydu, która doprowadziła bezpośrednio do DL^{Δ⁹/11/16} bizdehydro-20-norprogesteronu identycznego z naturalnym. Utlenienie grupy aldehydowej w pozycji 17 i estryfikacja pozwoliły na otrzymanie 3-keto-11β-17α-dwuhydroksy-Δ-etiocholenianu metylu, który został przekształcony poprzednio opisanymi metodami w cholesterol, progesteron, dezoksykortikosteron, testosteron, androsteron, cholesterol i kortizon. Innym świadectwem mistrzowskiego opanowania przez Woodwarda metodyki syntezy w tej grupie związków było otrzymanie w roku 1957 wszystkich czterech poliprenoidów wełny. Cholesterol został w wyniku szeregu przejść przekształcony w 14-metylo cholesterol, a ten w lanostenol, z którego otrzymano lanosterol, γ-lano-

stenol i agnosterol. Wyrazem zainteresowania Woodwarda poliprenoidami są również prowadzone w r. 1963 prace nad strukturą santoniny i jej pochodnych.

Grupą związków naturalnych, której badaniu R. B. Woodward poświęcił znaczną ilość prac są alkaloidy. Grupa ta, najbardziej zróżnicowana pod względem budowy chemicznej spośród wszystkich klas związków występujących w materiale biologicznym, jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Zarówno badania struktury jak i syntezy związków tej grupy natrafiają na niespotykane gdzie indziej trudności. W pracach Woodwarda nad tą grupą związków zająbiają się problemy wyjaśnienia struktury poszczególnych połączeń jak i ich syntezy. Już w roku 1944 dokonał Woodward całkowitej syntezy chininy wychodząc z 7-hydroksyzocholiny, którą przeprowadził w wyniku szeregu reakcji w DL-homomerochinie. Związek ten po kondensacji z estrem kwasu chinowego i po rozdzieleniu stereoizomerów poddano konwersji Rabego otrzymując chininę identyczną z produktem naturalnym. Syntezę strychniny (1954), jednego z alkaloidów o najbardziej skomplikowanej budowie, poprzedziły badania nad strukturą tego związku prowadzone od roku 1948. Cyklizacja fenylohydrazonu acetowatratronu doprowadziła do dwumetoksy-2-fenylo indolu. Układ indolowy w tym związku stanowił szkielet, do którego Woodward dobudowywał pozostałe elementy struktury strychniny, natomiast pierścień dwumetoksyfenylowy ulegał rozerwaniu, a powstały łańcuch węglowy posłużył do konstrukcji układu perhydrochinolinowego, znajdującego się w cząsteczce strychniny. W latach 1954-1956 prowadzi Woodward szeroko zakrojone prace nad strukturą alkaloidów *Veratrum*. Badania te, prowadzone wspólnie z uczonymi szwajcarskimi (Prelog, Jeger i inni) pozwoliły na ustalenie budowy cewiny i wyjaśnienie szeregu problemów strukturalnych związków tej grupy. Zakończeniem prac nad budową alkaloidów *Rauwolfia*, prowadzonych od 1956 r., była całkowita synteza rezerpiny dokonana przez Woodwarda w roku 1958. Z sześciu węgla asymetrycznych, znajdujących się w cząsteczce tego alkaloidu — pięć wbudowanych jest w jeden łańcuch węglowy. Reakcja *cis*-addycji kwasu winyloakrylowego do chinonu pozwoliła Woodwardowi już na pierwszym etapie syntezy uchwycić układ zawierający większość centrów asymetrii, poprowadzić tę reakcję w pożądanym kierunku, a następnie dobudować mniej złożone elementy strukturalne cząsteczki rezerpiny.

Trzecią grupą związków naturalnych, której badaniom Woodward poświęcił wiele uwagi są antybiotyki. Studia nad przekształceniami terramycyny i badania produktów degradacji tej grupy związków prowadzone przez Woodwarda doprowadzają do poznania w roku 1952 struktury aureomycyny i terramycyny. Pierwsza całkowita synteza związku należącego do tej grupy antybiotyków jest również dziełem zespołu Woodwarda. W 1960 roku publikuje on opis syntezy 6-demetylo-6-dezoksy-tetracykliny. Wychodząc w bursztynianu i metoksybenzoesanu konstruuje Woodward w wyniku szeregu przejść odpowiednio podstawiony łańcuch kwasu adypinowego, który następnie ulega reduktywnej cyklizacji z utworzeniem pochodnej tetralonowej. Układ ten stanowi szkielet, do którego Woodward dobudowuje kolejno pozostałe elementy strukturalne tetracykliny. W tym samym okresie, wspólnie z badaczami szwajcarskimi (Hochstein) prowadzi Woodward studia nad budową antybiotyków makrolidowych. W roku 1957 podaje strukturę magnamycyny A i B ustalając również konfigurację niektórych spośród 17 centrów asymetrii cząsteczek obu tych antybiotyków. W roku 1960 Woodward wspólnie z Hochsteinem ustala budowę innego związku z tej grupy — oleandomycyny. W ostatnich latach w pracowni Woodwarda ustalono budowę streptonigriny (1962) i tetrodotoksyny (1964).

Największe zainteresowania spośród prac Woodwarda wywołała jednak całkowita synteza chlorofilu opisana w roku 1960. Wychodząc z już opisanych, stosun-

kowo prostych pochodnych pirolu jak 2-(β,β -dwucyjanowinylo)-3,5-dwumetylo-4-etylopirol i 2,5-dwukarboksy-3-metylo-4-formylopirol, za pomocą niemal trzydziestu typowo „woodwardowskich”, jednoznacznych pod względem stereochemicznym przejść otrzymano chlorynę e_6 , którą następnie, opierając się na znanych reakcjach, przekształcono w feoforbid a, a następnie w feofitynę a i w chlorofil a, identyczny z naturalnym. Tak jak i w przypadku poprzednich wielkich syntez Woodward wniósł tutaj wiele nowego nie tylko rozwijając metody syntezy, lecz również wyjaśniając niektóre aspekty reaktywności porfiryn.

Woodward jest organikiem, który wszystkie możliwości tej dyscypliny oddał na usługi badania związków naturalnych. Nazwisko Woodwarda znajdujemy bez trudu wszędzie tam, gdzie wiedza organika była potrzebna dla pogłębienia znajomości składników przyrody ożywionej. Woodward atakuje problemy nie tylko interesujące chemika lecz przede wszystkim te, które są ważne dla biochemika, lekarza czy farmakologa. Podał on nowe hipotezy biosyntezy alkaloidów grupy strychniny (1948), cholesterolu (1953) i antybiotyków makrolidowych (1957) w oparciu o analogie strukturalne, reaktywność chemiczną i dotychczasowe dane o ich biogenezie.

Zaslugi naukowe Woodwarda zyskały uznanie wielu amerykańskich i zagranicznych instytucji naukowych. Robert Burns Woodward jest doktorem h. c. dziesięciu uczelni, honorowym członkiem brytyjskiego i niemieckiego towarzystwa chemicznego oraz Irlandzkiej Akademii Nauk. Ponadto został szesnastokrotnie odznaczony medalami i wyróżnieniami amerykańskimi. Nagroda Nobla jest kolejnym, najwyższym wyrazem uznania świata nauki dla osiągnięć Woodwarda.

S. Lewak

Konkurs naukowy

Komitet Mikrobiologiczny PAN zawiadamia uprzejmie o ogłoszeniu konkursu naukowego na prace doświadczalne z dziedziny metabolizmu drobnoustrojów z uwzględnieniem kierowanych procesów metabolicznych.

Regulamin konkursu przedstawia się następująco:

1. Wydział II PAN na wniosek Komitetu Mikrobiologicznego PAN ogłasza konkurs na doświadczalne prace naukowe z dziedziny metabolizmu drobnoustrojów z uwzględnieniem kierowanych procesów metabolicznych.
2. Do konkursu można zgłaszać prace:
 - 1) opublikowane po dniu 30 czerwca 1966 r. lub w ogóle nieopublikowane,
 - 2) indywidualne lub zespołowe.
3. Prace zgłaszane do konkursu powinny być wykonane w pracowniach krajowych.
4. Autorzy mogą zgłaszać dowolną ilość prac.
5. Prace należy nadsyłać w trzech egzemplarzach w terminie do dnia 30 czerwca 1968 r. pod adresem: Wydział II PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, przy czym prace nieopublikowane powinny być przygotowane w formie maszynopisu.
6. Wysokość nagrody wynosi:
 - I nagroda — 20.000 zł.
 - II nagroda — 15.000 zł.
 - III nagroda — 10.000 zł.
7. Wydział II PAN powoła do dnia 15 września 1968 r. na wniosek Komitetu Mikrobiologicznego PAN skład sądu konkursowego, który dokona analizy zgłoszonych prac i w terminie do dnia 1 grudnia 1968 r. dokona rozstrzygnięcia konkursu.
8. Sądowi konkursowemu przysługuje prawo:
 - 1) przyznania równorzędnych nagród,
 - 2) nie przyznania żadnej nagrody,
 - 3) zmniejszenia ilości nagród,
 - 4) podziału nagrody w przypadku pracy zespołowej.
9. Wyniki konkursu zostaną opublikowane w jednym z czasopism mikrobiologicznych.

Sekretarz Naukowy
Komitetu Mikrobiologicznego
Doc. Wł. T. Dobrzański

Z-ca Sekretarza Naukowego
Wydziału II PAN
Prof. Adam Drozdowicz

RECENZJE

Martin D. Kamen, Primary Processes in Photosynthesis. Academic Press, New York and London, 1963, str. 183.

Książka ta jest pierwszą pozycją z serii *Advanced Biochemistry*, której redaktorem jest Anthony San Pietro.

Jej autor, Martin D. Kamen, profesor chemii na Uniwersytecie w San Diego, współodkrywca izotopu węgla — ^{14}C zajmuje się badaniami nad fotosyntezą od około 30 lat. Szczególnie interesują go procesy energetyczne fotosyntezy i tym procesom poświęcił w recenzowanej książce najwięcej uwagi.

Rozdział pierwszy zapoznaje czytelnika z różnymi definicjami fotosyntezy oraz z niektórymi pojęciami z fizyki i chemii. W sposób bardzo przejrzysty przedstawiono ciąg procesów jakie odbywają się od momentu zaabsorbowania kwantu energii świetlnej do chwili wytworzenia końcowego produktu fotosyntezy. W rozdziale drugim opisany jest aparat asymilacyjny (skład oraz budowa chloroplastów i chromatoforów a także ich rozwój). Stosunkowo dużo uwagi poświęcił autor składnikom, które bezpośrednio nie absorbują światła, ale w taki czy inny sposób biorą udział w procesie fotosyntezy (niektóre lipidy, chinony, związki flawinowe, nukleotydy pirydynowe, cytochromy). W rozdziale tym omówiono także: liczby kwantowe, aktywne spektra w fotosyntezie, różne formy chlorofilów *in vivo*, rolę barwników towarzyszących.

Zasadnicza część tematu przedstawiona jest w rozdziałach III i IV. Rozdział trzeci poświęcony jest losom pochłoniętego fotonu w czasie od 10^{-15} sek. do 10^{-9} sek. tj. w okresie procesów czysto fizycznych. Autor rozpoczyna rozdział od omówienia stanów energetycznych na przykładzie prostego modelu, dalej zajmuje się zmianami w konfiguracji powłoki elektronowej w stanie pobudzenia, zasadą Francka-Conzona, podstawowymi prawami absorpcji i emisji światła, sprawą spinu, czasokresem trwania stanów wzbudzenia. Następnie omawia widma elektronowe drobin wieloatomowych i spektroskopię molekularną porfiryn i chlorofilów. Dużo uwagi poświęcił autor omówieniu fluorescencji. Stara się podać pewne uogólnienia na podstawie badania stopnia polaryzacji światła fluorescencyjnego, wydajności kwantowej, widm fluorescencyjnych chlorofilów, czasu trwania fluorescencji i stopnia jej depolaryzacji. W rozdziale tym autor zajmuje się także migracją energii, chlorofilem w stanie trypletu, rezonansem elektronowym, właściwościami chlorofilu w stanie „suchym” i „mokrym”, chemiluminescencją a kończy go przedstawienie ogólnego obrazu zjawisk wchodzących w zakres fizyki radiacyjnej.

W rozdziale czwartym Kamen zajmuje się okresem fotochemicznym, trwającym od 10^{-9} sek. do 10^{-4} sek. Dość szczegółowo opisuje fotochemię drobin chlorofilu a następnie omawia studia nad zjawiskami jakie zachodzą w okresie od 10^{-5} sek. do 10^{-2} sek. Autor przedstawia tu także pogląd o dwukwantowym procesie w fotosyntezie na podstawie prac Witta i jego współpracowników.

Recenzowana książka w doskonały sposób wprowadza czytelnika w rozumienie współczesnych badań nad energetyczną stroną fotosyntezy. Rolę tę będzie

jeszcze spełniać przez szereg lat, mimo, że literatura (340 pozycji) obejmuje okres do roku 1960. Aby jednak dobrze zrozumieć materiał w niej zawarty konieczna jest znajomość pewnych pojęć z fizyki światła i chemii fizycznej, jak również wyższej matematyki. Książka, jak zresztą cała seria przeznaczona jest głównie dla pracowników naukowych.

S. Więckowski

Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Praca zbiorowa
pod redakcją T. W. Goodwina. Academic Press, London, New York 1965, str. 583

W książce tej starano się zgromadzić współczesną wiedzę o chemii i biochemii prawie wszystkich barwników występujących w świecie roślinnym (pominięto jedynie cytochromy). Współautorami jest 19-stu specjalistów głównie z Wielkiej Brytanii i Stanów Zjednoczonych.

Materiał przedstawiono w czterech częściach. I część dotyczy natury, rozmieszczenia i biosyntezy różnych barwników roślinnych (rozd. 1—12); II część traktuje o funkcji poszczególnych barwników (rozd. 13—15); III część poświęcona jest metabolizmowi barwników w tkankach starzejących się i zapasowych (rozd. 16); wreszcie w IV części opisano metody badań poszczególnych barwników. Po każdym rozdziale podany jest wykaz literatury.

W pierwszej części książki A. S. Holt opisał występowanie oraz najważniejsze właściwości chemiczne i fizyczne chlorofilów. Biosyntezę chlorofilu przedstawił L. Bogorad omawiając dość dokładnie wszystkie etapy pośrednie począwszy od glicyny i kwasu bursztynowego. B. C. L. Weedon podał sposoby izolacji i ogólne właściwości karotenoidów, omówił strukturę i zachowanie się tych związków w różnych warunkach oraz ich stereochemię. Występowanie karotenoidów w świecie roślinnym przedstawił T. W. Goodwin, omawiając występowanie tych barwników w zdolnych do fotosyntezy tkankach roślin wyższych, mszaków, paprotników i glonów, oraz w niezdolnych do fotosyntezy tkankach roślin wyższych (owoce, kwiaty, korzenie), jak również występowanie karotenoidów u grzybów. T. W. Goodwin jest także autorem rozdziału traktującego o biosyntezie karotenoidów. Colm O'Herlihy opisał strukturę, właściwości i biosyntezę fikobilin. Rozdział dotyczący sposobów izolacji i oczyszczania oraz właściwości fitochromów opracowany został przez W. L. Butlera, S. B. Hendricksa i H. W. Siegelmana; zawiera także przypuszczenia autorów dotyczące struktury części chromatoforowej. T. Swain podał klasyfikację flawonoidów, opisał chemiczną budowę oraz właściwości flawonów, flawonoli, chalkanów, auronów antocyjanin i innych czerwonych barwników. Natomiast występowanie flawonoidów i ich udział w zabarwieniu roślin (kwiatów, owoców, liści) opisał J. B. Harborne, a biosyntezę flawonoidów, ich prekursorów, związki pośrednie, izoflawonoidy, wpływ światła i inhibitory—H. Grisebach. R. H. Thomson opracował rozdział o chinonach oraz rozdział omawiający inne barwniki występujące w świecie roślinnym, zawierające azot w cząsteczce (cykliczne diemony, γ -pyrony, sklerotioriny i barwniki pochodne kwasu wulpinowego) i nie zawierające azotu (fenażyny, fenoksazyny, melaniny).

Drugą część książki rozpoczyna artykuł C. P. Whittinghama zatytułowany: „Funkcja w fotosyntezie”. Autor przedstawił fotochemię barwników *in vivo*, efekty związane z równoczesnym oświetleniem dwiema różnymi długościami fali światła, formy barwników *in vivo*, reakcje fotochemiczne izolowanych chloroplastów, zmiany w absorpcji indukowane działaniem światła, studia nad elektro-

nowym rezonansem paramagnetycznym oraz fluorescencją barwników. Inne funkcje barwników jak udział w fototropizmie (u roślin wyższych i grzybów), w fototaksji (glony, wiciowce) i w rozmnażaniu (u *Phycomyces*) opisał J. H. Burnett. S. B. Hendricks i H. A. Borthwick są autorami rozdziału poświęconego fizjologicznej funkcji fitochromów. Rozważają oni udział tych barwników w kontrolowaniu kwitnienia, tworzeniu antocyjanów, kiełkowaniu nasion, kontrolowaniu etiolacji, jak również omawiają reakcje wysoko energetyczne i sposób działania fitochromów.

III część książki stanowi rozdział o zmianach barwników w starzejących i zapasowych tkankach roślin opracowany przez C. O. Chicheстера i T. O. M. Nakayama.

Wreszcie w IV części, poświęconej metodom, M. Holden opisała metody oznaczania chlorofilów. Autorka omówiła przygotowanie materiału, metody oznaczania, widma absorpcyjne tych barwników w liściu i w zawiesinach komórek glonów i bakterii, metody rozdziału barwników oraz metody oznaczania aktywności chlorofilazy. Metody służące do badania karotenoidów przedstawił B. H. Davies. Opisał on dokładnie sposoby izolowania, identyfikowania oraz ilościowego oznaczania karotenoidów. Oznaczanie flawonoidów opracował T. Swain.

Już z powyższego przeglądu treści wynika, że w omawianej książce barwniki roślinne zostały opracowane dość wszechstronnie. Zwłaszcza cenne są rozdziały poświęcone fitochromom i barwnikom mniej powszechnie znanym; nie często spotyka się bowiem ogólne opracowania tych związków. Bardzo cenna jest także część analityczna. Ostatnie zestawienie metod oznaczania chlorofilów i karotenoidów pochodzi z przed około 10-ciu lat (artykuły w „*Modern Methods of Plant Analysis*” pod red. K. Peacha i M. V. Tracey). Od tego czasu wiele metod ulepszono i wprowadzono szereg nowych; zmiany te są uwzględnione w omawianej książce.

Wydaje się, że będzie to cenna pozycja nie tylko dla specjalistów ale także dla wszystkich, którzy chcą pogłębić swoją wiedzę z chemii i biochemii barwników roślinnych.

S. Więckowski

Human Body Composition, Approaches and Applications, red. Josef Brožek, Pergamon Press 1965, str. x + 311.

Omawiana książka zawiera referaty wygłoszone w czasie siódmego sympozjum zorganizowanego przez *Society for the Study of Human Biology*, a poświęconego składowi ciała ludzkiego. Towarzystwo to, założone w 1957 roku stawia sobie za cel „popieranie badań nad biologią ludzkich populacji i człowieka jako gatunku we wszystkich jej dziedzinach, szczególnie nad zmiennością, genetyką i ewolucją człowieka oraz nad jego zdolnością adaptacji i ekologią”.

Artykuły zawarte w książce podzielono na trzy grupy: w pierwszej z nich omówiono sposoby podejścia do badania składu ciała ludzkiego, w drugiej ich zastosowania do badań zdrowego człowieka, a w trzeciej — zastosowania do badania schorzeń. Książkę kończy przypis zawierający dwa artykuły J. Brožka, z których jeden zatytułowany jest „Skład ciała a biologia człowieka — epilog”. Z tego epilogu dowiadujemy się, że literatura na temat składu ciała wzrasta bardzo szybko, możnaby nawet powiedzieć, że wzrasta „groźnie”. Kiedy autor zaczynał pracę w tej dziedzinie około dwudziestu lat temu, liczbę odsyłaczy dotyczących bezpośrednio tego zagadnienia można było wyliczyć na palcach jednej ręki. W przeglądzie, który napisał w roku 1953 cytował już 300 odsyłaczy, a liczba pozycji lite-

raturowych cytowanych na symposium poświęconym składowi ciała w Nowym Jorku w 1963 roku przekroczyła 1500 pozycji i to po dokonaniu pewnej selekcji. Jak pisze autor — w wąskiej tylko dziedzinie chemicznego składu ciała — cytowano w 1964 roku 800 pozycji piśmiennictwa.

Wobec tak wielkiej liczby prac poświęconych składowi (nie tylko chemicznemu) ciała człowieka, szczególnie uderzające jest, że — jak to wynika z całej omawianej książki — nasze wiadomości o składnikach ludzkiego organizmu są niekompletne i często niepewne lub sprzeczne. Wiadomo na przykład z referatu Elsie M. Widdowson, że w ciągu bieżącego stulecia przeprowadzono analizę chemiczną jedynie siedmiu zwłok ludzi dorosłych. Jest to jedyne bezpośrednie źródło naszych wiadomości o głównych składnikach organizmu człowieka. Wszystkie inne badania dokonywane są metodami pośrednimi, polegającymi np. na mierzeniu grubości fałdów skórnych dla obliczenia całkowitej ilości tłuszczu, oznaczaniu rozcieńczenia ciężkiej wody dla obliczenia całkowitej wody organizmu, czy też na określaniu rozcieńczenia wstrzykiwanego ^{40}K dla uzyskania wiadomości o całkowitej ilości potasu w ustroju człowieka. Do tej ostatniej metody redaktor książki zdaje się przywiązywać szczególną wagę, ponieważ pozwala ona na zdanie sobie sprawy z ogólnej masy komórek; interpretacji pomiarów całkowitej zawartości potasu w ciele jest zresztą poświęcony osobny referat napisany przez A. Pfa u.

Tematyka artykułów zamieszczonych w książce jest bardzo różnorodna i dotyczy nie tylko ogólnej ilości tłuszczu, wody, białek i jonów w organizmie ludzkim w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych, aczkolwiek te zagadnienia są głównym przedmiotem zainteresowania większości autorów. J. V. G. A. Drunin w artykule pt. „Somatyczne standardy odniesienia” przedstawia trudności na jakie napotyka każdy badacz poszukujący stałej wielkości odniesienia dla jakiegokolwiek wartości określającej liczbowo funkcję fizjologiczną; autor krytykuje np. stosowanie powierzchni ciała jako standardu odniesienia dla wielkości przemiany podstawowej. Podobnie wzrost i waga ciała nie są standardami odniesienia dającymi się często zastosować. Ciekawe zestawienie możliwych i dopuszczalnych strat poszczególnych składników ciała przedstawił R. Passmore w referacie o magazynach i zapasach ludzkiego ciała.

Wiele artykułów omawianej książki zawiera bardzo ogólne uwagi wykraczające daleko poza ramy tematu określonego tytułem. Nie zawsze można się z tymi uwagami zgodzić, warto jednak niektóre z nich zacytować. I tak R. W. Parnell w artykule „Rozmiary kształt i skład ciała człowieka” wskazuje na kilka „herezji” jakim jakoby ulegają przyrodnicy. Jedną z nich nazywa „herezją statystokratyczną”, a przyczynę jej upatruje w tym, że prestiż matematyki wzrósł obecnie tak znacznie, iż uzurpuje ona sobie prawo kontroli nad badaniami przyrodniczymi. Możliwość długo dyskutować na temat takiego sformułowania i jego słuszności, ale niewątpliwie wiele refleksji nasuwa końcowy fragment wypowiedzi autora: „... wierzę, że dopóki zmienność indywidualna nie zostanie uznana dla jej własnej wartości, studia nad zachowaniem czy, to z punktu widzenia socjologicznego, żywieniowego, ilościowo-biochemicznego, fizjologicznego, farmakologicznego lub psychiatrycznego, będą się opierały na fałszywym założeniu, że ludzie nie różnią się jedni od drugich i że wszystko można zrozumieć, rozpatrując tę smutną statystycznie abstrakcję — przeciętnego człowieka”.

Książka stanowić będzie zarówno dla biochemików, jak i dla specjalistów od żywienia i lekarzy interesującą lekturę i cenny zbiór danych potrzebnych w ich pracy.

M. Żydowo

AUTOREFERATY PRAC DOKTORSKICH

Badania nad aminoacydurią u szczurów w nerczycy doświadczalnej wywołanej aminonukleozydem (puromycyną) i chlorkiem rtęciowym

HALINA KOWALSKA-PYŁKA

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej w Lublinie

Promotor: prof. dr J. OPIEŃSKA-BLAUTH

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Lublinie nadająca stopień naukowy *doktora farmacji* z dnia 26 czerwca 1964 r.

Przeprowadzono badania porównawcze nad aminoacydurią u szczurów wywołaną podaniem aminonukleozydu i w zatruciu chlorkiem rtęciowym. W moczu szczurów doświadczalnych i kontrolnych karmionych dietą standardową mierzono diurezę, oznaczano azot aminowy, białko i aminokwasy techniką chromatografii dwukierunkowej i elektrochromatografii.

Aminonukleozyd wywoływał białkomocz u wszystkich szczurów, natomiast hyperaminoacyduria występowała tylko u części zwierząt. Rodzaj hyperaminoacydurii odpowiadał typom stwierdzanym w przypadkach nerczyc lipidowych u dzieci (J. Opieńska-Blauth, H. Kowalska: *Clin. Chim. Acta*, 6, 805 (1961)). Badania te pozwoliły określić szczegółowo zmiany składu aminokwasowego w moczu zwierząt doświadczalnych w porównaniu z kontrolnymi i ocenić te zmiany w różnych fazach uszkodzenia nerek, mianowicie w pierwszej fazie gdy uszkodzeniu ulegają kłębuszki, i w drugiej fazie — przy uszkodzeniu kanalików nerkowych.

Natomiast w grupie zwierząt zatrutowanych chlorkiem rtęciowym, hyperaminoacyduria występowała u wszystkich zwierząt już na drugi dzień po zatruciu (20-krotny wzrost azotu alfa-aminowego) i utrzymywała się 14 dni. Hyperaminoacydurii towarzyszył wzrost diurezy i białkomoczu. Przeprowadzono dyskusję nad mechanizmem obu rodzajów hyperaminoacydurii.

Wpływ niektórych antybiotyków na wbudowywanie kwasu glutaminowego-¹⁴C do błon komórkowych *Bacillus megatherium*

MARIA PIETRUSIEWICZ

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej w Lublinie

Promotor: doc. dr med. MAREK KAŃSKI

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Lublinie nadająca stopień naukowy *doktora farmacji* z dnia 26 czerwca 1964 r.

Park, Johnson i Strominger stwierdzili, że penicylina, bacytracyna i nowobiocyna powodują nagromadzenie się prekursorów błony komórkowej *Staphylococcus aureus*, co wskazuje na zahamowanie procesów jej syntezy. Spostrzeżenie to potwierdzono doświadczeniami izotopowymi, w których wykazano, że penicylina hamuje wbudowywanie aminokwasów do bakteryjnych błon komórkowych. Chloramfenikol w przeciwieństwie do penicyliny nie hamuje procesów syntezy błon komórkowych, chociaż jest inhibitorem syntezy białka.

Praca niniejsza miała na celu zbadanie wpływu niektórych antybiotyków a zwłaszcza bacytracyny i nowobiocyny na wbudowywanie kwasu glutaminowego do błony komórkowej *B. megatherium*.

Mukopeptydy błon komórkowych *B. megatherium* izolowano według metody Parka i Hancocka polegającej na kolejnej ekstrakcji zawartości komórek 5% kwasem trójchlorooctowym w temp. 0°, 75% etanolem w temp. pokojowej oraz 5% kwasem trójchlorooctowym w temp. 90°. Pozostałość stanowiły mukopeptydy błon komórkowych. W uzyskanym preparacie zidentyfikowano chromatograficznie następujące składniki: alaninę, kwas glutaminowy, kwas dwuaminopimelinowy, treoninę, glicynę, serynę, walinę, leucynę, izoleucynę, glukozoaminę, kwas muraminowy, glukozę i galaktozę. Galaktoza nie była wykrywana w badanych przez Saltona szczepach *B. megatherium*. W celu bliższego scharakteryzowania frakcji mukopeptydowej oznaczono ilościowo: cukry — metodą antronową Mokrascha, azot całkowity — metodą Burka i aminocukry — metodą Rondle'a i Morgana, rozdzielając kwas muraminowy od glukozoaminy na kolumnie celitowo-węglowej według Perkinsa i Rogersa. Wyniki oznaczeń, wyrażone jako % suchej masy preparatu mukopeptydów przedstawiają się następująco: azot całkowity 7,3%, cukry (glukoza + galaktoza) — 15,3%, glukozoamina — 10,2%, kwas muraminowy — 9,7%.

Następnie zbadano wpływ penicyliny, chloramfenikolu, bacytracyny, nowobiocyny i neomycyny na wbudowanie kwasu glutaminowego-¹⁴C do mukopeptydów błon komórkowych *B. megatherium*.

Oznaczenie wrażliwości badanego szczepu na stosowane antybiotyki przeprowadzono przy pomocy metody krążków bibułowych. Do doświadczeń izotopowych masę bakteryjną z 14-godzinnej hodowli *B. megatherium* na podłożu agarowym zawieszano w podłożu płynnym o następującym składzie: bufor fosforanowy o pH 7,0, alanina, glicyna, glukoza, kwas glutaminowy-¹⁴C (8 μC), sole mineralne oraz antybiotyk w stężeniu 1-100 μg/ml. Gęstość zawiesiny bakteryjnej wynosiła 0,5mg suchej masy na ml. Zawiesinę wytrząsano przez 2 godziny w temp. 37°. Po skończeniu inkubacji w próbie kontrolnej i w próbie z antybiotykiem oznaczano zawartość izotopu (w przeliczeniu na 1 mg suchej masy) w całych komórkach oraz we frakcji mukopeptydowej.

Z badanych antybiotyków jedynie penicylina hamowała wbudowywanie kwasu glutaminowego do błon komórkowych *B. megatherium*. Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć wniosek, że bacytracyna i nowobiocyna działają w odmienny sposób na *B. megatherium* niż na *S. aureus*. Możliwe, że hamują one procesy syntezy błony komórkowej ale na innym etapie niż penicylina.

Praca ukaże się w druku w *Acta Microbiologica Polonica* w 1965 r.

Wpływ aminokwasów i ich pochodnych na zawartość glicyny radioaktywnej w komórkach raka Ehrlicha

MARIA SZWAJ

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Promotor: Prof. dr J. OPIEŃSKA-BLAUTH

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 10.VI.1964 r.

Badano wpływ aminokwasów o różnej budowie chemicznej na przepuszczalność glicyny przez błony komórkowe. Do badań zastosowano 8-dniowe komórki raka Ehrlicha, transplantowane na myszach białych szczepu A-Strong. Komórki zawieszano w płynie Krebsa-Ringera o *pH* 7,4, inkubowano z dodatkiem $L-^{14}C$ -glicyny przez 90 minut i co 30 minut oznaczano radioaktywność frakcji komórkowej rozpuszczalnej w etanolu i nierozpuszczalnej. Analogiczne doświadczenia przeprowadzono kontynuując inkubację z dodatkiem różnych aminokwasów. Obniżenie zawartości glicyny „rozpuszczalnej” i „związanej” spowodowane obecnością aminokwasu konkurencyjnego obliczano w procentach w odniesieniu do próby kontrolnej (100%).

Przy doborze różnych aminokwasów dodawanych do prób uwzględniano możliwości wpływu długości łańcucha alifatycznego aminokwasu, rozgałęzienia łańcucha, ilości grup aminowych (aminokwasy zasadowe) i karboksylowych (aminokwasy kwaśne), niektórych grup jak -OH, -SH i -S-CH₃, pierścienia aromatycznego i heterocyklicznego.

Z przeprowadzonych badań wynika, że największy wpływ na obniżenie zawartości glicyny w komórce mają aminokwasy obojętne, jak np. alanina, seryna, metionina (od 26 do 50%).

W miarę wzrostu długości łańcucha konkurencyjnego aminokwasu od 3 do 6 węgli jego wpływ na zawartość glicyny w komórce maleje (np. dla alaniny 40%, norleucyny — 70%). Natomiast rozgałęzienie łańcucha alifatycznego aminokwasu konkurencyjnego nie miało większego wpływu na zawartość glicyny w komórce. Z aminokwasów zawierających inne grupy oprócz aminowej i karboksylowej cysteina (-SH) najbardziej obniżała zawartość glicyny (około 26%).

Aminokwasy aromatyczne i heterocykliczne wywierały tylko nieznaczny wpływ. Podobnie nie miały też większego wpływu aminokwasy kwaśne (kwas glutaminowy czy też asparaginowy) i zasadowe (lizyna).

Interesujące wyniki otrzymano z aminami. O ile cysteamina nie miała większego wpływu na zawartość glicyny w komórce, to tryptamina dawała obniżenie dochodzące do 31%.

Otrzymywanie ceruloplazminy i badanie jej własności

ZBIGNIEW PRASAŁ

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Promotor: Prof. dr J. OPIEŃSKA-BLAUTH

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 19 maja 1965 r.

Ceruloplazmina, niebieski miedzioproteid o własnościach oksydazowych występuje w osoczu krwi, w stężeniu 15—30mg⁰/_o, płynie mózgowo-rdzeniowym — 3mg⁰/_o, w wątrobie i nerkach około 50μg/g świeżej tkanki; jej własności biologiczne i fizykochemiczne nie są jeszcze dokładnie zbadane. W oparciu o klasyczną metodę Holmberga i Laurella (1948) opracowano własną modyfikację preparatyki i oczyszczania ceruloplazminy według schematu:

- a) wyodrębnienie z surowicy wieprzowej α₂-globulin przy nasyceniu siarczanu amonu 36—55⁰/_o,
- b) frakcjonowanie α₂-globulin za pomocą etanolu (stęż. końcowe 15⁰/_o) przy pH 5,5 i temp. od 0° do -5°,
- c) denaturacja białek balastowych mieszaniem etanolu i chloroformu (9:1) w temp. 0° i pH 6,5,
- d) oczyszczenie niejednorodnej frakcji ceruloplazminy przy pomocy wysokonapięciowej elektroforezy kolumnowej (nośnik celulozowy, bufor weronalowy o pH 8,6, napięcie 1500 V, temp. 10°).

Istotną różnicę własnej modyfikacji od metody Holmberga i Laurella stanowi omińnięcie izoelektrycznego frakcjonowania przy pH 6,2 i frakcjonowania mieszaniną etanolu i chloroformu (9:1) przy pH 5,5 oraz dodatkowe oczyszczenie w ostatniej fazie przy pomocy wysokonapięciowej elektroforezy kolumnowej w aparacie LKB 3340. Frakcja końcowa, otrzymana według postępowania Holmberga i Laurella, jest elektroforetycznie niejednorodna, a według własnej modyfikacji — jednorodna.

W toku preparatyki i oczyszczania oznaczano azot, białko, miedź i aktywność oksydazową ceruloplazminy. Iloraz Cu:N w aktywnym preparacie ceruloplazminy wynosił 0,0225 i był zbliżony do danych innych autorów. Stałe Michaelisa dla substratów ceruloplazminy: *p*-fenylenodwuaminy i kwasu askorbinowego 1,5·10⁻³M i 9,5·10⁻⁴M wyznaczano metodą manometryczną z szybkości początkowych reakcji w warunkach nasycenia enzymu substratem, temp. 37° i pH 5,2. W pomiarach kinetycznych stwierdzono, że cytrynian jest naturalnym kompetycyjnym inhibitorem ceruloplazminy, co pokrywa się z wynikami badań Friedena i wsp. (1964).

W oczyszczonym preparacie ceruloplazminy zidentyfikowano za pomocą trzech technik chromatograficznych 18 aminokwasów (alanina, arginina, kwas asparaginowy, cysteina, fenyloalanina, glicyna, kwas glutaminowy, histydyna, izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, prolina, seryna, treonina, tryptofan, tyrozyna i walina). Według Kaspera i wsp. (1963) skład aminokwasowy ceruloplazminy ludzkiej jest taki sam.

Przedłużona proteoliza α-chymotrypsyną w 0,05M buforze fosforanowym o pH 7,5 powodowała całkowitą utratę aktywności enzymatycznej ceruloplazminy, zanik niebieskiej barwy i odszczepienie miedzi blisko w 50⁰/_o. Wyniki te są zgodne z danymi Curzona (1958) dla ceruloplazminy ludzkiej. Częściowe odszczepienie miedzi podczas proteolizy potwierdza poglądy o nierównocенności 8 atomów miedzi w cząsteczce ceruloplazminy.

Badając zachowanie się ceruloplazminy w obecności serotoniny (inkubacja obu substancji w stosunku molowym 1:100 w 0,1M buforze octanowym o pH 5,6 w temp. 37° i w czasie 2 godzin) wykazano za pomocą techniki manometrycznej Warburga i chromatografii cienkowarstwowej, że serotonina rozkłada się z zachowaniem pierścienia indolowego, natomiast ceruloplazmina nie traci aktywności.

Zawartość i biosynteza aminoheksosz w łożysku ludzkim

MICHAŁ JÓZWIK

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Białymstoku

Promotor: doc. dr med. JULIUSZ POPOWICZ

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Białymstoku nadająca stopień naukowy *doktora medycyny* z dnia 9 marca 1965 r.

We wstępie pracy omówiono aktywność metaboliczną łożyska oraz różne proponowane mechanizmy przechodzenia substancji przez barierę łożyskową.

Omówiono następnie udział węglowodanów w rozwoju łożyska, oraz udział łożyska w przemianach aminocukrów, a zwłaszcza badania:

Starka, dotyczące zawartości glukozoaminy we frakcjach podkomórkowych łożyska ludzkiego,

Kalicińskiego, dotyczące zawartości glukozoaminy we krwi żyłnej matki w czasie porodu i krwi pępowinowej płodu,

oraz Boasa, który stwierdził zwiększone wydalanie aminoheksosz z moczem od trzeciego do ósmego miesiąca ciąży.

Spośród znanych aminoheksosz największe znaczenie biologiczne mają glukozoamina i galaktozoamina. Ponieważ badania Starka dotyczyły tylko glukozoaminy, uzupełniono je oznaczając zawartość glukozoaminy i galaktozoaminy w tkance łożyska ludzkiego.

Aminoheksozy te, wchodzące w skład związków złożonych syntetyzowanych przez łożysko, bądź to mogą być syntetyzowane w samym łożysku, bądź też są uwalniane ze związków złożonych występujących we krwi. Bardziej biologiczną drogą wydaje się biosynteza aminoheksosz w łożysku, dlatego też przeprowadzono badania nad zdolnością łożyska do ich syntezy z glukozy.

Do doświadczeń używano łożysk ludzkich po klinicznie prawidłowej ciąży i porodzie. Łožysko wyplukiwano z zalegającej krwi, rozdrabniano i hydrolizowano w 4n kwasie solnym. Hydrolizaty po oznaczeniu w nich zawartości azotu oczyszczano na kolumnach z wymienniczem jonowym *Dowex-50*. W oczyszczonych hydrolizatach oznaczano ogólną zawartość aminoheksosz, a następnie ilości glukozoaminy i galaktozoaminy po rozdzieleniu ich na kolumnie wypełnionej *Dowex-50*.

Biosyntezę aminoheksosz badano w skrawkach i homogenatach ludzkiej tkanki łożyskowej, które inkubowano w odpowiednim środowisku z glukozą jednolicie znakowaną ¹⁴C, a następnie hydrolizowano w 4n kwasie solnym. Hydrolizaty oczyszczano na kolumnach z *Dowex-50* i oznaczano w nich zawartość glukozoaminy. Radioaktywność glukozoaminy oznaczano po wyodrębnieniu fenyloosazonów. Ponieważ fenyloosazon glukozy i glukozoaminy są identyczne używano glukozy jako nośnika. Radioaktywność fenyloosazonów była wskaźnikiem biosyntezy amino-

heksoz z glukozy ^{14}C w tkance łożyskowej. W przeliczeniu na 1mg azotu tkanki łożyskowej ogólna zawartość aminoheksoz wynosiła 55,9 μg , glukozoaminy — 45,8 μg , a galaktozoaminy — 7,8 μg .

Skrawki i homogenaty tkanki łożyska ludzkiego syntetyzowały glukozoaminę z glukozy- ^{14}C . Ilość powstającej radioaktywnej glukozoaminy (w imp/min. na 1mg azotu tkanki) wynosiła odpowiednio po 30, 45 i 60 min. inkubacji w skrawkach: 17,8, 38,4, 40,0 i w homogenatach — 45,9, 62,7 i 73,4.

Prawdopodobnie droga biosyntezy glukozoaminy w łożysku ludzkim jest podobna do schematu biosyntezy glukozoaminy w wątrobie, podanego przez Comba i Rosemana. Zdolność syntetyzowania glukozoaminy przez łożysko ludzkie, pozwala przypuszczać, że może ono również syntetyzować glikoproteidy, mukoproteidy i glikoaminooglukany.

Badania nad wiązaniem ATP i Ca oraz innych kationów dwuwartościowych przez G-aktynę

HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Promotor: doc. dr WITOLD DRABIKOWSKI

Uchwała Rady Naukowej Instytutu nadająca stopień naukowy *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 30 października 1965 roku.

Preparaty G-aktyny zawierają ekwimolarne ilości związanego ATP i Ca, znajdujące się w równowadze z wolnym ATP i Ca konieczne dla zachowania zdolności G-aktyny do polimeryzacji i do łączenia się z miozyną. W związku z sugerowanym ostatnio w literaturze udziałem Ca w wiązaniu ATP przez G-aktynę zbadano współzależność między wiązaniem Ca i ATP przez to białko. W tym celu śledzono uwalnianie Ca i ATP z ich połączenia z G-aktyną w różnych warunkach inkubacji. We wszystkich przypadkach stwierdzono, że szybkości uwalniania związanego Ca i związanego ATP były sobie równe. Obecność wolnych jonów Ca w roztworze zwiększała trwałość połączenia Ca i ATP z G-aktyną w jednakowym stopniu, a obecność wolnego ATP chroniła G-aktynę przed utratą zarówno związanego ATP jak i związanego Ca. Podczas inkubacji z *Dowexem-50*, który w sposób ciągły usuwał z roztworu wolne jony Ca, znacznie zwiększała się szybkość spontanicznego uwalniania zarówno Ca jak i ATP z ich kompleksu z G-aktyną. Podobnie, w obecności *Dowexu 1*, tj. w warunkach stałego selektywnego usuwania wolnego ATP z roztworu, znacznemu przyspieszeniu ulegało uwalnianie nie tylko związanego ATP, ale i związanego Ca. Wyniki te świadczą, że zarówno Ca stabilizuje wiązanie ATP przez G-aktynę, jak i ATP stabilizuje wiązanie Ca. Wysłunięto zatem przypuszczenie, że inaktywacja G-aktyny może zachodzić dwiema różnymi drogami: 1) poprzez uwolnienie związanego Ca, co pociąga za sobą równoczesną dysocjację połączenia G-aktyny z ATP, 2) poprzez uwolnienie związanego ATP, pociągające za sobą dysocjację kompleksu G-aktyny z Ca.

Badając specyficzność wiązania Ca przez G-aktynę stwierdzono, że szereg innych kationów dwuwartościowych może zastępować Ca w jego połączeniu

z G-aktyną, w stopniu zależnym zarówno od rodzaju kationu jak i od jego stężenia. Powinowactwo różnych kationów dwuwartościowych do G-aktyny wzrasta w następującym porządku: Ni, Zn < Co < Mg < Cd < Ca < Mn. Kolejność ta, a także brak wymiany związanego z G-aktyną Ca z jonami Sr i Ba, wskazują że powinowactwo poszczególnych kationów do G-aktyny zależy od wielkości ich promienia jonowego. Częściowe zastąpienie Ca związanego z G-aktyną przez wymienione wyżej kationy nie zmienia takich właściwości G-aktyny, jak wiązanie ATP w ilości 1 mola na mol białka i zdolność do polimeryzacji w 0,1M KCl. Pewne właściwości aktywy zależą jednak od rodzaju związanego kationu. Opracowanie procedury otrzymywania preparatów G-aktyny zawierających Mg lub Mn jako jedyny związany kation dwuwartościowy pozwoliło stwierdzić obniżenie trwałości wiązania ATP w porównaniu z preparatami kontrolnymi, zawierającymi związany Ca. Wydaje się, że obecność związanego Ca stwarza najkorzystniejsze warunki dla wiązania ATP przez G-aktynę.

Część pracy została opublikowana w *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 486 (1963) oraz przedstawiona w postaci komunikatów na zjazdach biochemicznych (VI Internat. Congress of Biochemistry, New York 1964, Abstracts of Communications, VIII-28, str. 649; Prace I-go Krajowego Kongresu Biochemii, Łódź, 1963, str. 15; IV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 1965, str. 73).

K o m u n i k a t
Zarządu Głównego PTBioch.

Zarząd zawiadamia, że przeznaczone do druku w *Monografiach Biochemicznych* teksty prac habilitacyjnych nie mogą przekraczać 3 arkuszy druku. W uzasadnionych, wyjątkowych wypadkach autorzy mogą ubiegać się o powiększenie tego limitu. Wnioski w tej sprawie jak również teksty prac przeznaczone do druku należy kierować na ręce *doc. dr J. Trojanowskiego*, Lublin, Akademicka 12.

Pełnomocnik Zarządu Głównego PTBioch.
do spraw wydawniczych
Doc. dr Jerzy Trojanowski

SPRAWOZDANIA

Symposium poświęcone porównawczej fitochemii

Cambridge 29.III. — 1.IV.1965 r.

Symposium to zostało zorganizowane przez Phytochemical Group. Brało w nim udział około 60 specjalistów—chemików, taksonomów roślin i farmaceutów. Głównym celem spotkania było przedyskutowanie w jakim stopniu wyniki badań fitochemii mogą być wykorzystane w klasyfikowaniu roślin. Zajmowano się przede wszystkim tzw. wtórnymi produktami roślin, to znaczy związkami chemicznymi, których występowanie w świecie roślinnym nie jest powszechne, lecz ogranicza się tylko do pewnej określonej grupy systematycznej (w rzędzie, rodzinie, lub tylko w niektórych gatunkach określonej rodziny). Związki te są pomocne dla taksonomii szczególnie w tych przypadkach, w których cechy morfologiczne i anatomiczne nie wystarczają do określenia przynależności systematycznej jakiegoś osobnika. Studia nad strukturą, biosyntezą i występowaniem tego typu związków mogą przyczynić się także do wyjaśnienia ewolucji określonej grupy roślin.

Referat wprowadzający wygłosił taksonom prof. V. H. Heywood z Liverpool. Nakreślił on główne podstawy systemów stosowanych w klasyfikowaniu roślin, omówił warunki jakim powinien odpowiadać każdy system klasyfikacji oraz wspomniał o trudnościach na jakie napotyka taksonom. Referat prof. C. R. Mentzera z Paryża dotyczył biogenetycznej klasyfikacji składników roślin. Autor zaproponował, aby wtórne składniki występujące w roślinie dzielić na podstawie ilości atomów węgla w drobinie — podobnie jak Ruzicka podzielił terpenoidy. Wystąpienie to wywołało ożywioną dyskusję. Pozostałe referaty były bardziej specjalistyczne i zajmowały się budową, biosyntezą i rozmieszczeniem określonych grup związków chemicznych.

Dr F. A. Bell z Londynu omówił występowanie niebiałkowych aminokwasów w różnych gatunkach *Lathyrus* i *Vicia*. Analizując występowanie, budowę i przypuszczalne drogi biosyntezy takich aminokwasów jak kanawaniny, neoargininy, 8-hydroksyargininy i in. w 53 gatunkach *Lathyrus* i 47 gatunkach *Vicia* starał się on wykazać bliższe i dalsze pokrewieństwa pomiędzy gatunkami w obrębie tych dwóch rodzajów.

Prof. R. Hegnauer z Leiden omówił występowanie alkaloidów w świecie roślin. Referat dr T. Mabry z Teksasu poświęcony był betacyjaninom i betaksantynom — barwniki te występują w niektórych rodzinach należących do *Centrospermae*. Autor zaproponował, aby rząd *Centrospermae* zarezerwować tylko dla rodzin zawierających te barwniki. Występowanie hydroksychinonów w świecie roślin omówił dr C. Mathis ze Strasbourga. Wykazał on, że ten typ związków rzadko występuje u nagozależkowych i jednoliściennych. Spośród dwuliściennych względnie duże ilości hydroksychinonów (antro-, nafto-, i benzochinonów) zawierają niektóre rodziny (np. *Rubiaceae*), lub rodzaje (np. *Rheum*, *Rumex*, *Rhamnus*, *Juglans*, *Drosera*, *Hypericum*). Dr A. H. Williams z Bristolu omówił rozmieszczenie dwuhydroksychalkanów w owocach kilku gatunków i odmian jabłoni. Gliko-

flawonom poświęcony był referat prof. H. Wagnera z Monachium, a barwnikom flawonowym referat J. B. Horborne z Hertfordu.

Ponadto omawiano jeszcze następujące grupy związków chemicznych: alkany (dr G. Eglinton, Glasgow), acetyleny (dr J. D. Bullock, Manchester), terpeny (dr G. Weissman, Hamburg), karotenoidy (prof. T. W. Goodwin, Aberystwyth), niektóre polisacharydy, szczególnie stanowiące materiał zapasowy w różnych grupach roślin (dr E. Percival, Londyn), związki siarki — aminokwasy zawierające siarkę, tioglikozydy, proste sulfidy i polisulfidy (prof. A. Kjaer, Kopenhaga), asperulozydy i aukubizydy (dr E. C. Beta-Smith, Cambridge), oraz ranunkulin i związki cyjanogenetyczne w obrębie 22 gatunków z rodziny *Ranunculaceae* (dr Ruijgrok, Leiden).

Niektórzy prelegenci podkreślali trudności na jakie napotyka często chemotaksonom, np. glikoflawony zostały wyizolowane dotychczas z około 25 różnych grup roślin a trudno się dopatrzeć jakiegoś pokrewieństwa pomiędzy tymi grupami. W liściach roślin wyższych występuje zawsze ten sam kompleks barwników karotenoidowych (mogą wystąpić jedynie niewielkie różnice ilościowe). Większe różnice w składzie karotenoidów stwierdzono w kwiatach i owocach. Owoce mogą być podzielone na cztery kategorie w zależności od składu barwników żółtych: 1. zawierające karotenoidy charakterystyczne dla chloroplastów, 2. zawierające karotenoidy ze znaczną przewagą karotenów, np. β -karotenu, likopenu, 3. zawierające barwniki ze znaczną przewagą ksantofilów często bardzo specyficznych np. kapsantyny, 4. zawierające karotenoidy w postaci izomeru *cis*, np. pro- γ -karoten.

Materiały z omawianego sympozjum zostaną opublikowane w postaci książki.

S. Więckowski

III Sympozjum na temat biochemii i fizjologii alkaloidów

W dniach 24—27 czerwca 1965 roku odbyło się w Instytucie Biochemii Roślin Niemieckiej Akademii Nauk w Halle/Saale w NRD III Sympozjum na temat „Biochemia i fizjologia alkaloidów” zorganizowane staraniem i pod przewodnictwem Prof. dr Kurta Mothesa.

W Sympozjum wzięło udział ponad 250 naukowców z 21 krajów (w tym 8 z Polski), reprezentujących praktycznie wszystkie dziedziny badań nad alkaloidami i zagadnieniami pokrewnymi.

Obrazy były bardzo bogate tematycznie. Ogółem wygłoszono 9 referatów: referat wprowadzający (K. Mothes) stanowiący ogólny przegląd zagadnień dotyczących badań nad alkaloidami i 8 referatów ramowych traktujących o badaniach w dziedzinie poszczególnych grup alkaloidów w okresie między II i III Sympozjum. Były to referaty dotyczące alkaloidów steroidowych (Schreiber—NRD), alkaloidów pirydynowych i piperydynowych (Rapoport—USA), chinolizydynowych (Hasse—NRF), izochinolinowych (Battersby—W. Brytania), indolowych sporyszu (Pleninger—NRF), innych indolowych (Leete—USA), alkaloidów *Vinca rosea* (Svoboda—USA) i tropanowych (Evans—W. Brytania). Ponadto z zaplanowanych 80 wygłoszono około 70 doniesień dyskusyjnych, dotyczących wymienionych grup alkaloidów, a także alkaloidów chinolinowych, pirolizydynowych, chinazolinowych, muskaryny, kofeiny, damasceniny, alkaloidów *Delphinium*, protoalkaloidów *Capsicum* oraz związków guanidynowych czynnych farmakologicznie. Przeważały doniesienia na temat badań nad biosyntezą, kilka wystąpień dotyczyło struktury nowo izolowanych związków, a ponadto poruszano zagadnienia chemo-

taksonomii roślin alkaloidowych, składu alkaloidowego roślin i problemów genetycznych z nim związanych, mikrobiologicznego rozkładu alkaloidów, ich odbudowy w organizmach zwierzęcych, a kilka doniesień miało charakter metodyczny.

Najwięcej uwagi w referatach, jak również dyskusjach oficjalnych i nieoficjalnych poświęcono zagadnieniom biosyntezy. O ile przed pięciu laty problem ten jedynie sporadycznie badano przy pomocy związków znakowanych, obecnie w każdej grupie alkaloidów prowadzone są tego typu badania, przy czym zastosowano po raz pierwszy ^{15}N do badania biosyntezy damasceniny (Munsc he — NRD). Wśród badań z zastosowaniem ^{14}C na uwagę zasługują zwłaszcza pomysłowe prace Lee t e'a (USA) nad asymetrycznym wbudowywaniem ornityny w cząsteczkę tropiny, fenyloalaniny w cząsteczkę kwasu tropowego i tryptofanu w pierścień indolowy. Również interesujące były badania Schrö t e r a (NRD) nad włączaniem N-metylowych pochodnych aminokwasów w cząsteczki alkaloidów tytoniowych i tropanowych, badania nad rolą tyrozyny w biosyntezie alkaloidów maku (Neubauer — NRD) i szereg innych tego typu prac.

Stosunkowo wiele doniesień dotyczyło badań o charakterze enzymatycznym, jak np. badania nad enzymami biorącymi udział w biosyntezie alkaloidów chinolizydynowych (Hasse — NRF), nad enzymami biosyntezy alkaloidów tytoniowych (Schrö t e r — NRD), nad powstawaniem berberyny przez enzymatyczne utlenianie prekursorów (Skur s k y — ČSRS) i szereg innych.

Należy podkreślić, że coraz bardziej krytycznie ocenia się doświadczenia z karmieniem radioaktywnymi prekursorami, zwłaszcza wprowadzanymi w większych, w porównaniu z fizjologicznymi, stężeniach. Uważa się, że takie karmienie zmienia bieg przemian w organizmie i wbudowanie wprowadzonego związku nie musi świadczyć o jego prekursorowym charakterze. Hasse reprezentuje pogląd, że jedynie stwierdzenie aktywności enzymów katalizujących poszczególne reakcje biosyntezy może prowadzić do ustalenia jej drogi. Pogląd ten przy niewątpliwiej częściowej słuszności spotkał się jednak z szeregiem głosów krytycznych z uwagi na niską specyficzność niektórych enzymów (np. esterazy hyoscyjaminy), jak i trudności w wykryciu enzymów katalizujących przemiany wykazane uprzednio na drodze chemicznej. Niewątpliwie jest faktem, że coraz więcej naukowców ujmuje badania nad alkaloidami bardziej od strony fizjologicznej, niż chemicznej. Przewaga ujęcia fizjologicznego wydaje się być jednym z najbardziej istotnych zjawisk w obradach III Sympozjum.

Z naukowców polskich w obradach wzięli udział: w dziedzinie alkaloidów chinolizydynowych H. Po d k o w i Ń s k a i E. Nowacki (Poznań), B. Borkowski, E. Nalborczyk, i H. Rybicka (Warszawa), w dziedzinie alkaloidów tropanowych J. Kączkowski i R. Zielińska-Sowicka (Warszawa) i w dziedzinie alkaloidów *Delphinium* H. Strzelecka (Warszawa). Wszyscy wymienieni wygłosili w czasie obrad doniesienia, a E. Nowacki, E. Nalborczyk i J. Kączkowski zabierali ponadto głos w dyskusjach.

Uczestnicy Sympozjum otrzymali maszynopisy referatów ramowych, a do końca 1965 roku ma się ukazać pełny tekst obrad.

J. Kączkowski

Sympozjum na temat biochemii chloroplastów

W sierpniu 1965 r. odbyło się w Aberysthwyth (Wielka Brytania) sympozjum dotyczące biochemii chloroplastów. Konferencja zorganizowana pod auspicjami NATO zgromadziła około 150 naukowców głównie z Europy Zachodniej i Stanów Zjednoczonych. Problematyka sympozjum dotyczyła biochemii chloroplastów w sze-

rokiem ujęciu nawiązując do ultrastruktury i związków między mechanizmem biosyntezy a morfogenezą.

Obrazy nad strukturą chloroplastów otworzył referat przeglądowy Menkego (NRF) przedstawiający zarys metodyki badań i dzisiejszy stan wiedzy o strukturze submikroskopowej tych organelli komórkowych. Szereg nowych danych dotyczących struktur lamell chloroplastów wniosły komunikaty Mühlehalera (Szwajcaria), Krentza (NRF), von Wettsteina (Dania). Badacze ci operując bądź to klasycznymi metodami mikroskopii elektronowej, bądź to nową techniką unikającą utrwalania obiektu (Mühlehaler) dochodzą do dość zbliżonego obrazu ultrastruktury membran chloroplastu. Zasadniczą jego cechą jest obecność globularnych komponent białkowych zlokalizowanych w regularnym układzie na zewnętrznej lub zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni warstw lipidowych. Zespół kilku takich kompleksów wraz z odpowiednim obszarem warstwy lipidowej byłby morfologicznie odpowiednikiem kwantosomu.

Referat pani Mantona (Anglia) ilustrowany świetnymi zdjęciami z mikroskopu elektronowego dał przegląd różnorodności struktur chloroplastów w różnych grupach systematycznych świata roślinnego i związku tych struktur z innymi komponentami komórki.

Zagadnienie techniki izolowania chloroplastów będące ważnym elementem metodycznym dla większości badań biochemicznych zostało poruszone w kilku referatach. Większość badaczy stosuje klasyczną technikę izolowania wg Arnona. Okazuje się jednak, że metoda ta nie daje jednorodnej frakcji chloroplastowej, ale mieszaninę składającą się z całych chloroplastów, chloroplastów pozbawionych błony zewnętrznej i warstwy białkowej czyli tzw. systemów lamelarnych oraz fragmentów gran i lameli. Przedstawione zostały próby rozdzielania poszczególnych składników frakcji chloroplastowej przy zastosowaniu gradientu sacharozowego ciągłego (Steer—Anglia), nieciągłego (Leech—Anglia) lub pola elektrycznego (Packer—USA).

Sesję poświęconą lipidom chloroplastów otworzyły referaty: Bensaona (USA)—dotyczący charakterystyki chemicznej frakcji lipidowej oraz Blocha (USA) i Stumpfa (USA) omawiające biosyntezę i metabolizm lipidów u glonów i roślin wyższych. Szereg komunikatów przedstawionych w tym dziale dotyczyło bliższego scharakteryzowania komponent frakcji lipidowej i ich roli jako elementów strukturalnych membran chloroplastu oraz jako komponent aparatu fotosyntetycznego.

Rezultaty swych badań nad białkami chloroplastów przedstawił Criddle (USA) charakteryzując własności i skład aminokwasowy poszczególnych frakcji białkowych uzyskanych po rozbiciu chloroplastów detergentami. Dochodzi on do wniosku, że około 40% białek to białka strukturalne, wchodzące w skład membran chloroplastowych. Packer (USA) dał przegląd danych o białkach kurczliwych i przedstawił ich rolę w procesach zmiany kształtu chloroplastów. Około 6% ogólnej ilości białek wykazuje własności kurczliwe.

Z komunikatów dotyczących kwasów nukleinowych większość traktowała o występowaniu i roli DNA w chloroplastach. Przedstawiono szereg nowych danych potwierdzających obecność kwasów dezoksyrybonukleinowych w chloroplastach (Brawerman—USA, Kirk—Anglia, Schiff—USA, Kisler—Izrael). DNA chloroplastu różni się od DNA jądrowego szeregiem własności jak np. wielkością cząsteczek, stałą sedimentacji, wrażliwością na DN-azę itp. Ilość DNA jakkolwiek mała (np. w szpinaku $3-5 \times 10^{-13}$ g/chloroplast) jest jednak wystarczająca aby składnik ten mógł mieć znaczenie genetyczne. Studia przeprowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego i odpowiednich metod enzymatycznych (Kisler, Bogorad) zdają się wskazywać na lokalizację DNA w stromie chloroplastu.

Rolę RNA w syntezie białek chloroplastu naświetlił wykład Wildmana (USA). Rolę centrów syntezy przypisuje on rybosomom chloroplastu różniącym się wielkością i niektórymi własnościami (np. wrażliwością na jony Mg) od rybosomów cytoplazmatycznych.

Zagadnieniu barwników fotosyntetycznych poświęcono dość dużo uwagi. Odczyt Frencha (USA) dał przegląd poszczególnych form chlorofilów, ich własności optycznych oraz przynależność do I lub II systemu absorpcyjnego w aparacie fotosyntetycznym. Podobny przegląd dotyczący karotenoidów przedstawił Strain (USA). Pozostałe komunikaty tego działu dotyczyły trzech kierunków: struktury chemicznej nowych lub mniej znanych barwników (Jensen — karotenoidy, O'h Eocha — biliproteiny), ochronnej roli karotenoidów w aparacie fotosyntetycznym (Krinsky — USA, Friend — Anglia) oraz zagadnień strukturalnych jak własności kompleksów chlorofilu z białkiem lub kierunkowość układu drobin chlorofilów w strukturach chloroplastowych (Thomas, Goedheer — Holandia). Osobna sesja zainaugurowana wprowadzającym referatem Granicka (USA) poświęcona była biosyntezie barwników oraz związkom między biosyntezą a procesami morfogenezy. Odnośnie tego ostatniego zagadnienia kilka interesujących referatów zostało przedstawionych przez współpracowników von Wettsteina.

Zagadnieniu wiązania CO₂ poświęcono mniej uwagi. Kilka komunikatów z tego działu dotyczyło asymilacji CO₂ przez izolowane chloroplasty lub poszczególne frakcje preparatów chloroplastowych (Gibbs — USA, Kandler — NRF, Waker — Anglia).

Natomiast jednym z centralnych problemów na sympozjum były zagadnienia fosforylacji fotosyntetycznej. Obrady zainaugurował świetny odczyt Arnona (USA) pt. „Fosforylacja fotosyntetyczna 1954—1964” dający przegląd historii odkrycia fosforylacji cyklicznej i niecyklicznej oraz dzisiejszy stan badań uwzględniający rolę ferredoksyny jako pośrednika w transporcie elektronu i ogólnie dziś przyjęty mechanizm dwu reakcji świetlnych w fotosyntezie.

Liczne pozostałe referaty tej sesji dotyczyły między innymi mechanizmu transportu elektronu i sekwencji pośredników biorących udział w tym transporcie (Forti — Włochy, Hill — Anglia, Baltscheffsky — Szwecja), kinetyki procesu fosforylacji (Amesz — Holandia, Caswell — Anglia), a także transportu oraz rozmieszczenia ATP w obrębie komórki (Heber — NRF).

Przedstawione na konferencji komunikaty, których tylko część została wymieniona w powyższym sprawozdaniu zostaną opublikowane w formie książki wydanej przez Academic Press Inc. pod redakcją T. W. Goodwina.

J. Zurzycki

Sprawozdanie Redakcji „Postępów Biochemii” za okres 1964—1965

Sprawozdanie obejmuje okres lat 1964—1965, tj. tomy X i XI „*Postępów Biochemii*”, ponieważ w poprzednim sprawozdaniu (*Postępy Biochemii* 10, 163 (1964)) uwzględniono materiały do końca rocznika 1963. W 1964 r. wydany został tom X, a w 1965 r. tom XI. Wraz z zakończeniem prac związanych z ukazaniem się tomu XI upływa również okres pracy dotychczasowego Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ireny Chmielewskiej (redaktora) i doc. dr Witolda Brzeskiego (sekretarza).

Wydany w 1964 r. tom X liczył 40 arkuszy, wydany w 1965 roku tom XI — 42 arkusze. W dalszym ciągu około 90% objętości przeznaczano na artykuły monograficzne, a tylko około 10% na recenzje i materiały kronikarskie.

W tomie X opublikowano 27 artykułów, a w tomie XI 29 artykułów. Wśród autorów artykułów w tomie X było 8 profesorów i docentów oraz 19 innych pracowników nauki, a odpowiednio liczby w tomie XI wynoszą 11 i 18.

Udział poszczególnych ośrodków, łącznie w obu latach sprawozdawczych, był następujący: najwięcej artykułów dostarczyła Warszawa — 34, następnie Lublin — 6, Kraków — 4, Gdańsk i Poznań — po 3, Śląsk — 2, Białystok, Łódź, Szczecin i Wrocław — po 1. Znaczna przewaga artykułów z ośrodka warszawskiego tłumaczy się z jednej strony liczebnością tego ośrodka, z drugiej — łatwiejszym kontaktem redakcji z autorami.

W tematyce wydrukowanych prac reprezentowane były głównie: enzymologia — 19 artykułów, biosynteza i metabolizm — 10, białka i kwasy nukleinowe — 11. Pozostałe 16 artykułów obejmowało różnorodną tematykę. Zeszyt 1 tomu X wykorzystano na opublikowanie dostępnych materiałów z I Krajowego Kongresu Biochemii (Łódź, wrzesień 1963), mianowicie 5 referatów z sympozjum na temat utleniania biologicznego oraz dyskusji nad referatami. W zeszycie 1 tomu XI znalazły miejsce 2 z 3 referatów z III Krajowego Sympozjum Biochemicznego (Kazimierz, wrzesień 1964), na temat budowy i własności enzymów.

Poza artykułami monograficznymi na treść tomów X i XI złożyły się recenzje 13 książek, autoreferaty prac habilitacyjnych i doktorskich oraz sprawozdania i komunikaty. W zeszycie 3 tomu X opublikowane zostały „Reguły terminologiczne polskiego słownictwa biochemicznego” W zeszycie 4 tomu X Redakcja zamieściła opracowany w układzie problemowym wykaz około 230 prac, które ukazały się w „*Postęпах Biochemii*” w okresie dziesięciolecia istnienia czasopisma, tj. w latach 1955—1964.

Obserwuje się stały wzrost nakładu „*Postępów Biochemii*” od 890 egzemplarzy w 1959 r. do 1330 egzemplarzy w 1965 roku, z czego niemal 200 egzemplarzy to prenumerata zagraniczna. Innym wskaźnikiem zainteresowania czasopismem jest wymiana między „*Postępami Biochemii*” a innymi czasopismami lub ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą, takimi jak „*Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*”, „*Senckenbergiana Biologica*” (Frankfurt am Main), Göteborgs Universitet — Medicinska Fakultetens Bibliotek, Institute of Scientific and Technical Information of China. W 1965 roku z ośrodka informacji naukowej Międzynarodowej Rady Unii Naukowych (ICSU, *International Council of Scientific Unions*) wpłynęło pismo zawiadamiające o włączeniu „*Postępów Biochemii*” na listę wybranych czasopism z dziedziny biologii, chemii i fizyki, z których tytuły i streszczenia prac są stale zamieszczane w czasopismach referatowych podlegających temu ośrodkowi.

„*Postępy Biochemii*” są jednym z 10 czasopism polskich (na 1057 czasopism z całego świata) zaliczanych w 1965 roku do tzw. *Automatic Subject Citation Alert*, ASCA, redagowanego przez *Biological Sciences Information Services of Biological Abstracts*.

I. Chmielewska,
W. Brzeski

KRONIKA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Odczyty wygłoszone w 1965 r.:

Oddział w Krakowie:

- 28.I. Reakcje fotochemiczne w fotosyntezie (Doc. dr Z. Kasprzyk).
- 25.II. Niektóre problemy przemiany fosforanowej w bulwie ziemniaka (Doc. dr B. Samotus).
- 18.III. Zastosowanie hodowli tkankowych w badaniach biochemicznych i wirusologicznych (Dr Z. Porwit-Bóbr, Dr J. Kosiorowski, Dr M. Gumińska, Doc. dr Z. Zielińska).
- 13.V. Sprawozdanie z obrad II Zjazdu F.E.B.S. w Wiedniu (Doc. dr W. Ostrowski, Dr A. Koj).
- 10.VI. Entropia wzrostu heterotrofów roślinnych (Prof. dr F. Górski).
- 24.VI. Biochemiczne podstawy procesów psychicznych (Doc. dr T. W. Szczepkowski).
- 28.X. Metabolizm oddechowy tkanek roślinnych zakażonych wirusem (Dr Dwurząd).
- 20.XI. Genetyczna kontrola syntezy enzymów — operon histydyny u *Salmonella typhimurium* (Dr T. Kłopotowski).
- 9.XII. Zależność między wrażliwością roślin na drugorzędowy butylo-4,6-dwinitrofenol a ich zdolnością do generacji ATP (Dr T. Wojtaszek).
- 17.XII. Transport, dynamika usuwania z krwi i odkładania w tkankach trójglicerydów limfy szczura badane przy użyciu oliwy znakowanej ^{131}J (Dr Z. Szybiński, Doc. dr T. Horzela i Mgr H. Wanat).

Oddział w Gdańsku:

- 10.XI. Komunikaty o działalności Towarzystwa i referat „Wpływ wielkocząsteczkowych anionów i kationów na procesy oksydoredukcyjne mitochondriów (Lek. Marian Hillar).

Oddział w Szczecinie:

- 22.XI. Aminooksydazy i ich znaczenie biologiczne (Dr B. Różycki).

Oddział w Łodzi:

- 18.XI. Badania nad wpływem hormonu wzrostu (STH) na metabolizm kwasów nukleinowych w wątrobie szczura (Dr J. Baranowicz, Dr M. Gross i mgr W. Turcki).

Oddział we Wrocławiu:

- 29.IX. Inhibitory proteolizy (Prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen).
27.X. Heterogenność transpeptydazy gama-glutamylowej w surowicy i jej zastosowanie kliniczne (Doc. dr M. Orłowski, Dr A. Szczeklik, Prof. dr E. Szczeklik).

Staże naukowe zagranicą:

Oddział w Krakowie:

- Dr Pałasiński (Katedra Technologii Rolnej WSR) półroczny staż w Institut für Ernährung, Deutsche Akademie der Wissenschaften, Potsdam.
Dr L. Konieczny (Zakł. Chemii Fizjologicznej AM) półroczny staż w National Institute for Medical Research w Londynie.
Doc. dr T. W. Szczepkowski (Zakł. Chemii Fizjologicznej AM) roczny pobyt w Department of Biochemistry, University of Tennessee, Memphis, USA.

STATUT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO*

Rozdział I.

Nazwa, teren działalności i siedziba

- § 1. Stowarzyszenie nosi nazwę Polskie Towarzystwo Biochemiczne (w dalszym ciągu oznaczane skrótem PTBioch.).
- § 2. Terenem działalności PTBioch. jest Polska Rzeczpospolita Ludowa.
- § 3. Siedzibą PTBioch. jest m. st. Warszawa.

Rozdział II.

Cele i środki działania

- § 4. Celem PTBioch. jest popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja.
- § 5. Dla osiągnięcia swych celów PTBioch.:
- a) organizuje zjazdy, sympozja, zebrania naukowe, odczyty, wykłady i kursy,
 - b) wydaje i popiera czasopisma naukowe, książki i publikacje z zakresu biochemii,
 - c) opiniuje o stanie i potrzebach biochemii polskiej i występuje w jej sprawach wobec władz,
 - d) utrzymuje łączność z pokrewnymi stowarzyszeniami w kraju i zagranicą,
 - e) korzysta z subwencji władz i instytucji publicznych na poszczególne cele PTBioch.,
 - f) powołuje komisje do wykonywania poszczególnych zadań,
 - g) towarzystwo opiera swą działalność statutową na społecznej pracy członków,
- § 6. PTBioch. posiada osobowość prawną i może nabywać majątki ruchome i nieruchome.
- § 7. PTBioch. posiada własne pieczęcie podłużną i okrągłą z napisem Polskie Towarzystwo Biochemiczne.

Rozdział III.

Prawa i obowiązki członków.

- § 8. Członkowie PTBioch. dzielą się na zwyczajnych, honorowych i wspierających.
- § 9. Członkiem zwyczajnym może zostać każda osoba, posiadająca dorobek naukowy z biochemii lub dziedzin pokrewnych.

* Uchwalony przez IV Walne Zebranie Członków PTBioch. w dniu 11.VI.1965 r. Zatwierdzony przez Urząd Spraw Wewnętrznych Prezydium Stołecznej Rady Narodowej w Warszawie pismem z dn. 23.X.1965 r. nr SW-III-3/46/65.

- § 10. Osoba pragnąca zostać członkiem zwyczajnym PTBioch. składa podanie do Zarządu Oddziału, załączając informacje o studiach, stopniach naukowych oraz o swych pracach naukowych; w Oddziałach nie mających Zarządu osoba kandydująca składa podanie, kierowane do Zarządu Głównego na ręce Przewodniczącego Oddziału. Z miejscowości, w której nie ma Oddziału podanie może być złożone bezpośrednio do Zarządu Głównego. O przyjęciu do Towarzystwa decyduje Zarząd Oddziału; w przypadku zgłoszeń z Oddziału nie mającego Zarządu o przyjęciu do Towarzystwa decyduje Zarząd Główny. Decyzja o przyjęciu na członka zwyczajnego PTBioch. zapada zwykłą większością głosów.
- § 11. Członkiem wspierającym może być każda osoba prawna wpłacająca roczną składkę na rzecz PTBioch.
- § 12. Członków honorowych wybiera Walne Zebranie PTBioch. większością głosów w tajnym głosowaniu na wniosek Zarządu Głównego.
- § 13. Każdy członek zwyczajny i honorowy ma prawo udziału w obradach Walnego Zebrania, prawo wyboru i wybieralności, prawo stawiania wniosków i głosowania w sprawach PTBioch. Członkowie wykonywują swe funkcje w ramach Towarzystwa społecznie.
- § 14. Członkowie zwyczajni i honorowi mogą otrzymywać wydawnictwa poprzez PTBioch. w ramach ustalonych składek.
- § 15. Wysokość składek członkowskich członków zwyczajnych ustala Walne Zebranie.
- § 16. W razie nieopłacenia przez członka składek w ciągu dwóch lat Zarząd Oddziału, lub, w przypadku członka z Oddziału nie mającego Zarządu, Zarząd Główny może podjąć uchwałę o skreśleniu członka.
- § 17. Członek zwyczajny może być wykluczony z listy członków Towarzystwa za czyny nie liczące z godnością członka lub za działalność na jego szkodę. Wykluczenie następuje na mocy uchwały Zarządu Głównego większością 2/3 głosów, przy czym, na żądanie wykluczonego, motywy powinny być zakomunikowane na piśmie. Wykluczonemu przysługuje prawo odwołania się do Walnego Zebrania.
- § 18. Każdy członek ma prawo wystąpienia z PTBioch., obowiązany jest jednak powiadomić o tym na piśmie Zarząd Główny oraz uregulować zaległe składki.

Rozdział IV.

Władze stowarzyszenia.

- § 19. Władzami stowarzyszenia są:
Walne Zebranie, Zarząd Główny, Komisja Rewizyjna,
Sąd Koleżeński i Zarządy Oddziałów.
- § 20. Naczelną władzą PTBioch. jest Walne Zebranie. Wytacza ono kierunki działania Towarzystwa, przeprowadza wybory Zarządu Głównego i Komisji Rewizyjnej, udziela lub odmawia absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu i rozstrzyga — jako ostateczna instancja — odwołania członków w sprawach o skreślenie z Towarzystwa.
- § 21. Walne Zebrania dzielą się na zwyczajne i nadzwyczajne. Zwyczajne Walne Zebranie PTBioch. zwołuje Zarząd Główny przynajmniej co dwa lata w związku z zakończeniem kadencji Zarządu Głównego. Nadzwyczajne Walne Zebrania zwołuje Zarząd Główny z własnej inicjatywy, na pisemne żądanie Komisji Rewizyjnej lub na żądanie nie mniej niż 1/3 członków zwyczajnych.
- §22a. Zarząd Główny zobowiązany jest rozesłać zawiadomienia o zwołaniu Walnego Zebrania wraz z porządkiem dziennym wszystkim członkom Towarzystwa przynajmniej na dwa tygodnie przed wyznaczonym terminem zebrania.
- §22b. Porządek dzienny zwyczajnego Walnego Zebrania ustala Zarząd Główny.

- § 23. Walne Zebranie wybiera przewodniczącego Walnego Zebrania Członków Towarzystwa zwykłą większością głosów. Z przebiegu obrad prowadzi się protokół, za który odpowiedzialny jest przewodniczący zebrania i sekretarz powołany przez przewodniczącego.
- § 24. Wyznacza się dwa terminy Walnego Zebrania. Uchwały Walnego Zebrania są prawomocne w pierwszym terminie, jeżeli powzięte zostały w obecności nie mniej niż połowy ogólnej ilości członków zwyczajnych PTBioch. O ile w pierwszym terminie Zebranie nie odbyło się na skutek braku quorum, Walne Zebranie zwołane w terminie drugim, określonym przez Zarząd Główny, jest prawomocne bez względu na ilość zebranych członków. Uchwały zapadają zwykłą większością głosów z wyjątkiem uchwał, dotyczących zmian statutu, wyboru członków honorowych i wykluczenia członków, którzy odwołali się do Walnego Zebrania. Uchwały te wymagają większości 2/3 głosów obecnych na walnym Zebraniu.
- § 25. Działalnością PTBioch. kieruje Zarząd Główny zgodnie z postanowieniami niniejszego statutu i dyrektywami Walnego Zebrania. Kadencja Zarządu Głównego trwa dwa lata. Członkowie Zarządu Głównego nie mogą pozostawać na tym samym stanowisku dłużej niż przez dwie kolejne kadencje.
- § 26. Zarząd Główny PTBioch. składa się z: prezesa, wiceprezesa i dziewięciu członków Zarządu Głównego w tej liczbie sekretarza i skarbnika oraz czterech pełnomocników Zarządu Głównego do spraw współpracy z innymi towarzystwami naukowymi, do spraw zebrań i zjazdów naukowych, do spraw szkolenia oraz do spraw wydawniczych.
- § 27. Walne Zebranie wybiera w tajnym głosowaniu oddzielnie: a) prezesa, b) wiceprezesa, c) pozostałych dziewięciu członków Zarządu Głównego oraz d) trzy osobową Komisję Rewizyjną. Walne Zebranie wybiera ponadto pięciu zastępców, którzy wchodzi do Zarządu Głównego na miejsce ustępujących w czasie trwania kadencji członków Zarządu Głównego.
- § 28. W razie ustąpienia prezesa w czasie trwania kadencji funkcje jego do najbliższego Walnego Zebrania obejmuje wiceprezes.
- § 29. Zarząd Główny organizuje przynajmniej raz na dwa lata sympozja lub zjazdy naukowe.
- § 30. Posiedzenie Zarządu Głównego zwołuje, nie rzadziej niż raz na kwartał, prezes lub w jego zastępstwie wiceprezes. Posiedzenie Zarządu Głównego powinno być zwołane, jeżeli zażąda tego na piśmie przynajmniej trzech członków Zarządu Głównego lub na wniosek Komisji Rewizyjnej. Wszyscy członkowie Zarządu Głównego powinni otrzymać zawiadomienie o posiedzeniu przynajmniej na tydzień przed terminem wraz z proponowanym porządkiem dziennym.
- § 31. Posiedzenia Zarządu Głównego są prowadzone w obecności przynajmniej pięciu członków Zarządu Głównego, w tym Prezesa lub Wiceprezesa. Uchwały zapadają zwykłą większością głosów z wyjątkiem spraw zastrzeżonych w § 17. W razie równej liczby głosów rozstrzyga głos przewodniczącego. Przebieg obrad jest protokołowany.
- § 32. Zarząd Główny zobowiązany jest co najmniej raz w roku zwołać, wspólne z przewodniczącymi Oddziałów, zebranie Zarządu Głównego. Powiadomienie o terminie zebrania wraz z porządkiem dziennym powinno być rozesłane do wszystkich Oddziałów przynajmniej na tydzień wcześniej.
- § 33. Prezes Zarządu Głównego przewodniczy z urzędu na posiedzeniach Zarządu, reprezentuje PTBioch. we wszystkich jego stosunkach z władzami państwowymi i instytucjami naukowymi w kraju i zagranicą, podpisuje razem ze skarbnikiem czeki, umowy i wszelkie zobowiązania materialne, inne pisma podpisuje z drugim członkiem Zarządu.

- § 34. Wiceprezes zastępuje prezesa w czynnościach wymienionych w § 33, gdy prezes z ważnych powodów obowiązków spełniać nie może.
- § 35. Sekretarz prowadzi biuro Zarządu Głównego, sporządza protokoły z obrad Zarządu Głównego i sprawozdania z działalności Towarzystwa.
- § 36. Skarbnik prowadzi księgowość Zarządu Głównego, sporządza zestawienia i sprawozdania finansowe dla władz, Walnego Zebrania oraz Komisji Rewizyjnej, prowadzi i podpisuje korespondencję dotyczącą zobowiązań materialnych.
- § 37. Komisja Rewizyjna składa się z trzech osób wybranych przez Walne Zebranie na okres kadencji Zarządu Głównego. Komisja Rewizyjna konstituując się wybiera spośród siebie przewodniczącego.
- § 38. Komisja Rewizyjna przeprowadza ogólną kontrolę działalności stowarzyszenia i jest obowiązana przynajmniej raz w okresie kadencji przed Walnym Zebraniem dokonać rewizji ksiąg, dokumentów kasowych, sprawdzić stan majątku i prawidłowość ściągania składek członkowskich oraz złożyć na piśmie sprawozdanie i wnioski Walnemu Zebraniu. Wśród tych wniosków Komisja stawia również wniosek o udzielenie lub odmówienie absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu.
- § 39. Spory między członkami, dotyczące Towarzystwa rozstrzyga bez odwołania Sąd Koleżeński. W tym celu każda strona wybiera z grona członków zwyczajnych lub honorowych Towarzystwa jednego arbitra, ci zaś wybierają trzeciego na superarbitra.

Rozdział V.

Oddziały PTBioch.

- § 40. W celu realizacji zadań PTBioch. mogą powstać w poszczególnych miejscowościach Oddziały PTBioch. z inicjatywy Zarządu Głównego, albo z inicjatywy terenowej. Do powołania Oddziału wymagany jest udział przynajmniej piętnastu osób.
- § 41. Głównym zadaniem Oddziałów jest odbywanie posiedzeń i konferencji naukowych na terenie swojej działalności.
- § 42. Nowo powstający Oddział wybiera przewodniczącego, wiceprzewodniczącego i sekretarza. Gdy liczba członków Oddziału wzrośnie do sześćdziesięciu, Zarząd Główny upoważnia przewodniczącego Oddziału do zwołania nadzwyczajnego Walnego Zebrania członków Oddziału celem dokonania wyboru Zarządu Oddziału w składzie: przewodniczący, wiceprzewodniczący i trzech członków, w tej liczbie sekretarz i skarbnik oraz trzyosobowej Komisji Rewizyjnej: Tryb powołania Zarządu Oddziału oraz czas trwania kadencji jest taki sam jak Zarządu Głównego.
- § 43. Na pokrycie kosztów związanych z działalnością Oddziały otrzymują fundusze, których wysokość ustala Zarząd Główny.
- § 44. Oddziały obowiązane są składać raz do roku Zarządowi Głównemu sprawozdania z działalności naukowej, organizacyjnej i finansowej.

Rozdział VI.

Majątek Towarzystwa.

- § 45. Majątek PTBioch. stanowią roczne składki, subwencje, dobrowolne ofiary składane na cele PTBioch., dochód z odczytów i wydawnictw oraz majątek ruchomy i nieruchomy. Wszelkie decyzje władz PTBioch. uszczuplenia w części lub całości majątku nieruchomego wymagają zgody władzy rejestracyjnej.

Rozdział VII.

Postanowienia końcowe.

- § 46. Zmiany statutu PTBioch. zapadają na mocy Uchwały Walnego Zebrania większością 2/3 głosów. Projekt zmiany statutu powinien być rozesłany członkom PTBioch. co najmniej na trzy tygodnie przed Walnym Zebraniem.
- § 47. Rozwiązanie się PTBioch. może nastąpić jedynie na Walnym Zebraniu PTBioch., jeżeli za rozwiązaniem wypowie się nie mniej niż 3/4 wszystkich członków zwyczajnych i honorowych.
- § 48. Likwidację PTBioch. przeprowadza komisja złożona przynajmniej z trzech członków, wybranych przez Walne Zebranie.
- § 49. W razie rozwiązania się PTBioch. ostatnie Walne Zebranie określi w drodze uchwały, która podlega zatwierdzeniu władzy rejestracyjnej, przeznaczenie majątku PTBioch.

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1966

ARTICLES IN POLISH

Volume 12

Number 2

E. Bańkowska, W. T. Dobrzański, H. Osowiecki — Bacterial Transformations (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa, and Dep. Microbiol. School Med., Warszawa)	189
W. Leyko — ATP contents of Erythrocytes in Pathology (Dep. Anal. Biochem. Univ., Łódź)	225
E. Wojtecka-Łukasik — The Hydroxylation of Proline in the Synthesis of Collagen (Dep. Biochem. Inst. Rheumatol., Warszawa)	235
A. Koj — Metabolism of Plasma Albumin in the Light of Isotopic Investigations (Dep. Physiol. Chem. School Med., Kraków)	243
J. H. Rogozińska — The Nomenclature of Plant Kinins (Dep. Dendrol. Pol. Acad. Sci., Kórnik)	265
Chronicle	271

SPIS TREŚCI

E. Bańkowska, W. T. Dobrzański, H. Osowiecki — Transformacje bakteryjne	189
W. Leyko — Zawartość kwasu adenozynotrójfosforowego (ATP) w erytrocytach w przypadkach patologicznych	225
E. Wojtecka-Łukasik — Hydroksylacja proliny a biosynteza kolagenu	235
A. Koj — Metabolizm albuminy osocza w świetle badań izotopowych	243
J. H. Rogozińska — Nomenklatura kinin roślinnych	265
Ludmiła Szarkowska — Wspomnienie pośmiertne	269
Laureaci nagrody Nobla w 1965 r. (W. Gajewski, S. Lewak)	271
Recenzje książek (S. Więckowski, M. Żydowo)	279
Autoreferaty prac doktorskich (H. Kowalska-Pyłka, M. Pietrusiewicz, Z. Prasał, M. Jóźwik, H. Strzelecka-Gołaszewska)	283
Symposium poświęcone porównawczej fitochemii (S. Więckowski)	291
Symposium na temat biochemii i fizjologii alkaloidów (J. Kączkowski)	292
Symposium na temat biochemii chloroplastów (J. Zurzycki)	293
Sprawozdanie Redakcji „Postępów Biochemii” za okres 1964—1965 (I. Chmielewska, W. Brzeski)	295
Kronika PTBioch.	297
Statut PTBioch.	299

W zeszycie 3 tego tomu ukaza się

1. Metabolizm hormonów sterydowych, R. Dąbrowska, B. Szukalski
2. Przemiany trójterpenów i steroli w roślinach wyższych, M. Fonberg-Broczek
3. Przemiana kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego, T. Laskowska-Klita
4. Zaburzenia biochemiczne w fenylketonurii, K. Bełżecka
5. Lipoproteidy surowicy, H. Wehr
6. Chemiczne i fizyczne własności rybosomów, J. Passent
7. Powstawanie i rozwój rybosomów, T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.*, 7, 601 (1961) Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora (ów), tytuł, miejsce i rok wydania; np.: Przyłęcki S. J., *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, Łódź, 1947. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York, 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

E. Bańkowska, W. T. Dobrzański, H. Osowiecki — Transformacje bakteryjne	189
W. Leyko — Zawartość kwasu adenozyntrójfosforowego (ATP) w erytrocytach w przypadkach patologicznych	225
E. Wojtecka-Łukasik — Hydroksylacja proliny a biosynteza kolagenu	235
A. Koj — Metabolizm albuminy osocza w świetle badań izotopowych . .	243
J. H. Rogozińska — Nomenklatura kinin roślinnych	265
Ludmiła Szarkowska — Wspomnienie pośmiertne	269
Laureaci nagrody Nobla w 1965 r. (W. Gajewski S. Lewak)	271
Recenzje książek (S. Więckowski, M. Zydowo)	279
Autoreferaty prac doktorskich (H. Kowalska-Pyłka, M. Pietrusiewicz, Z. Prasał, M. Jóźwik, H. Strzelecka-Gołaszewska)	283
Symposium poświęcone porównawczej fitochemii, (S. Więckowski)	291
Symposium na temat biochemii i fizjologii alkaloidów (J. Kączkowski) . .	292
Symposium na temat biochemii chloroplastów (J. Zurzycki)	293
Sprawozdanie Redakcji „Postępów Biochemii” za okres 1964—1965 (I. Chmielewska, W. Brzeski)	295
Kronika PTBioch.	297
Statut PTBioch.	299