

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1967
tom 13
nr 4

KWARTALNIK

Wolski

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postępkach 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 możliwość 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 oznaczyć 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, opatrzonej 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 rubryki powinny być zaopatrzone 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 „górze” 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

1967
tom XIII
zeszyt 4

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. 506

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1967

Nakład 1510 (1372+138)	Oddano do składania 5.VII.1967
Ark. wyd. 9,0; ark. druk. 8+2 kol.	Podpisano do druku we wrześniu 1967
Papier druk. sat. kl. V, 70×10d	Druk ukończono w październiku 1967
Cena zł 20.—	Zam. nr 1142/67. T-73

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JEREMI ŚWIĘCKI*, BARBARA LUBAS-LIBRANT**

Pamięci Marii Skłodowskiej-Curie, w setną rocznicę Jej urodzin

In Memory of Maria Skłodowska-Curie, on the hundredth Anniversary of Her Birth

The work and scientific achievements of Maria Skłodowska-Curie are presented. The influence of her work on the development of radiotherapy of cancer is emphasized.

W czasach obecnych, cechujących się dużą poczytnością licznych pamiętników i opracowań biograficznych należałoby oczekiwać pewnego stopienia wrażliwości na to, co charakteryzuje geniuszy i ludzi wybitnych. Tym bardziej zdumiewającym zjawiskiem w dziejach kultury ludzkiej jest Maria Skłodowska-Curie, której setną rocznicę urodzin obchodzimy 7 listopada bieżącego roku. A że uroczystości związane są z nazwiskiem najwybitniejszej kobiety — naukowca naszego narodu, często osobisty stosunek żyjących jeszcze świadków jej sukcesów ubarwia pewnym subiektywizmem nastrój tegorocznych obchodów. Aż dziw bierze, jak bliska jest nam postać Marii Curie we wspomnieniach żyjących osób, które jeszcze miały szczęście z nią współpracować, z jej umysłowością współczesnego nam naukowca, a jak bardzo jednocześnie na przód poszła od jej śmierci nauka i jak bardzo zmienił się cały świat. W tym postępie olbrzymi udział ma Maria Skłodowska-Curie, której fundamentalne odkrycia, związane z wyodrębnieniem i zbadaniem własności pierwiastków promieniotwórczych spowodowały burzliwy rozwój nie tylko fizyki i energetyki jądrowej, lecz także miały olbrzymi wpływ na postęp całej wiedzy przyrodniczej.

Maria Skłodowska urodziła się w Warszawie. Ojciec jej, Władysław Skłodowski był nauczycielem gimnazjalnym przedmiotów ścisłych, a matka prowadziła pensję. Po ukończeniu gimnazjum ze złotym medalem, przez kilka lat pracowała Maria jako korepetytorka i nauczycielka domowa na prowincji, pomagając finansowo licznej rodzinie, a zwłaszcza siostrze Bronisławie, studiującej w Paryżu medycynę. Równocześnie sama uczy się, czyta, przerabia zadania i uczęszcza na wykłady z dziedziny nauk przyrodniczych, prowadzone w tak zwanym Uniwersytecie Lata-

* Dr med., dyrektor Instytutu Onkologii, Gliwice.

** Mgr, Instytut Onkologii, Gliwice.

jącym. Słuchacze tego tajnego w okresie carskim Uniwersytetu, patrioci i społecznicy, szerzyli naukę i rozbudzali patriotyzm wśród młodzieży. Maria pisze, wspominając ten okres: „...każdy z nas winien pracować nad udoskonaleniem się własnym, jednocześnie zdając sobie sprawę ze swej osobistej odpowiedzialności za całokształt tego, co się dzieje w świecie, i z tego, że obowiązkiem każdego z nas jest pomagać tym, którym możemy stać się najbardziej użyteczni”. Całym swoim życiem udowodniła, że pozostała wierna tym ideom.

Pierwsze prace laboratoryjne wykonywała Maria w Laboratorium Fizycznym Muzeum Przemysłu i Rolnictwa, przerabiając samodzielnie doświadczenia z zakresu fizyki i chemii.

Dopiero w 1891 roku mogła wyjechać do Paryża, by studiować na Sorbonie równocześnie fizykę, matematykę i chemię, uzyskując po dwóch latach licencjat z fizyki, a po trzech — z matematyki. Równocześnie rozpoczyna pracę laboratoryjną — najpierw w Laboratorium prof. Lippmana, a potem w Szkole Fizyki i Chemii, gdzie równocześnie pracował Piotr Curie, jej przyszły mąż i towarzysz prac naukowych.

Starania Marii o zapewnienie sobie po ukończeniu studiów możliwości pracy naukowej w kraju spełzły na niczym. Wychodzi za mąż za Piotra Curie, decyduje się pozostać we Francji i wspólnie z Piotrem pracować naukowo. Zdaje w owym czasie konkursowy egzamin nauczycielski i pisze rozprawę o magnetyzmie hartowanej stali.

W roku 1897 Maria Curie wybiera sobie temat pracy doktorskiej. Chce zbadać charakter i źródło wykrytego przez Henryka Becquerela promieniowania wysyłanego samorzutnie przez sole radu. Zagadnienie to jest ciekawe i nowe, a jedyne doniesienia na ten temat — to kilka komunikatów Becquerela, przedstawionych francuskiej Akademii Umiejętności w roku 1896.

W wilgotnej i ciasnej pracowni Szkoły Fizycznej Maria Curie rozpoczyna swe wiekopomne badania nad promieniotwórczością uranu. Montuje aparaturę elektrometryczną i ocenia zdolność jonizacyjną wysyłanych promieni. Stwierdza, że ich natężenie jest proporcjonalne do ilości uranu zawartego w badanych związkach i że promieniotwórczość stanowi atomową właściwość uranu, niezależną od czynników fizycznych. Przypuszcza, że własności promieniotwórcze mogą charakteryzować również inne pierwiastki i w sposób metodyczny bada je po kolei; oprócz tego bada również liczne minerały i surowce skalne. Wkrótce odkrywa samorzutną promieniotwórczość związków toru oraz kilku minerałów (smółka uranowa, chalkolit, autunit, toryt), których aktywność przewyższa czasem kilkakrotnie aktywność uranu. Maria Curie założyła, że smółka uranu, chalkolit i autunit zawierają niewielkie domieszki nieznanego jeszcze pierwiastka, znacznie bardziej radioaktywnego od uranu i toru, i postanowiła wyodrębnić ten pierwiastek z rud metodami chemicznymi.

Wobec tak zdumiewającego wyniku prac żony Piotr Curie rzuca swoje ówczesne prace dotyczące badań kryształów i przyłącza się do badań Marii. Odtąd przez szereg lat pracują wspólnie nad wyodrębnieniem i zbadaniem własności pierwiastków promieniotwórczych. Prace te były realizowane w wyjątkowo ciężkich i szkodliwych dla zdrowia warunkach.

Odkryty w lipcu 1898 roku pierwiastek, metal zbliżony pod względem właściwości chemicznych do bizmutu, Maria Curie nazwała — na cześć swojej ojczyzny — polonem. Doniesienie o odkryciu drugiego radioaktywnego pierwiastka, który małżonkowie Curie zaproponowali nazwać radem, ukazało się w sprawozdaniach Akademii Paryskiej w grudniu 1898 roku. Częściowo za własne pieniądze, w szopie z przeciekającym dachem, wśród straszliwych niewygód, Piotr i Maria Curie przeprowadzają gigantyczną pracę wyodrębnienia z blendy uranowej pierwiastków, których zawartość nie przekracza milionowej części procentu przerabianej rudy. Pierwszy rok pracują wspólnie nad chemicznym wydzieleniem radu i polonu oraz badaniem promieniotwórczości otrzymanywanych stopniowo, coraz aktywniejszych związków. Potem rozdzielają prace — Piotr bada własności fizyczne radu i istotę promieniotwórczości, a Maria zajmuje się preparatyką chemiczną mającą na celu otrzymanie czystych soli radu. W latach 1899—1900 Maria i Piotr Curie ogłaszają komunikat dotyczący elektrycznych własności wysyłanych promieni i elektryczności indukowanej.

Na Kongres Fizyków w roku 1900 redagują sprawozdanie ogólne o pierwiastkach promieniotwórczych, które spotyka się z niezwykle zainteresowaniem, choć interpretacja zjawisk podana przez autorów była krytykowana przez niektórych ówczesnych uczonych o światowej sławie.

W roku 1902 Maria Curie wyodrębnia wreszcie kilkadziesiąt gramów czystej soli radu i określa ciężar atomowy radu równy 225 zapełniając puste miejsce 88 w układzie okresowym Mendelejewa. Sama określa to jako „najważniejszą część pracy osobistej”, gdyż według ówczesnych poglądów, dopiero określenie ciężaru atomowego upoważniało autorkę do nadania radowi miana pierwiastka chemicznego. Następnie Maria bada szczegółowo własności chemiczne radu oraz radonu — promieniotwórczej emanacji, będącej produktem rozpadu radu.

W jednej z prac już z roku 1900 Maria Curie formułuje śmiałą, genialną hipotezę dotyczącą teorii przemian promieniotwórczych, którą rozbudowują następnie w Anglii Rutherford i Soddy. Stwierdzają oni, że przy rozpadzie radu wydziela się również hel. Teoria rozpadów promieniotwórczych podważyła jedną z podstaw fizyki ówczesnej — przekonanie o niezmienności pierwiastków i niepodzielności atomu.

W szeregu krajów uczeni odkrywają dalsze pierwiastki promieniotwórcze: mezotor, radiotor, jon, protaktyn, ołów promieniotwórczy.

Zidentyfikowane zostają całe rodziny promieniotwórcze: rodzina uranu, toru i aktynu oraz oznaczone stałe i półokresy rozpadu pierwiastków.

Maria Curie stwierdziła, że oprócz własności wysyłania światła, stymulowania przewodnictwa elektrycznego powietrza, fluorescencji szkieł i kryształów, rad posiada również właściwość wytwarzania dużej ilości energii, która powoduje topnienie lodu oraz niszczenie substancji umieszczonych w pobliżu. Nasuwa to Marii Curie przypuszczenie, że rad może mieć pewne działanie fizjologiczne.

Zastosowanie radu do celów leczniczych stworzyło konieczność przemysłowego wydobywania radu. Powstają fabryki produkujące rad. Małżonkowie Curie korespondencyjnie udzielali bezinteresownie producentom wskazówek odnośnie produkcji radu. Wynalezione i ulepszone przez małżonków Curie metody techniczne przemysłu radowego są stosowane zresztą prawie bez zmian do dzisiejszego dnia.

Dopiero w roku 1903 zdobywa Maria Curie tytuł doktora za pracę pt. „Badania nad ciałami promieniotwórczymi”. W parę miesięcy później, 10 grudnia 1903 roku, za te same badania nad ciałami promieniotwórczymi szwedzka Akademia Nauk przyznaje Marii Curie, wspólnie z Piotrem Curie i Henrykiem Becquerelem, doroczną nagrodę Nobla z dziedziny fizyki.

W listopadzie 1903 roku Królewskie Towarzystwo Naukowe w Londynie przyznało im jedno z najwyższych odznaczeń: Medal Davy’ego.

W roku 1904 Piotr Curie objął specjalnie dla niego utworzoną Katedrę Fizyki Sorbony oraz został członkiem Akademii Nauk. Z tą chwilą zaistniała również dla Marii możliwość uzyskania po raz pierwszy w życiu płatnego i oficjalnego stanowiska naukowego adiunkta przy katedrze fizyki. Wszystkie dotychczasowe badania, uwieńczone odkryciem radu i polonu i uhonorowane nagrodą Nobla, wykonywała ona bezpłatnie, a jej obecność w laboratorium była zupełnie nieoficjalna.

Pięknie rozwijającą się pracę przecięła tragiczna śmierć Piotra Curie wiosną 1906 roku. Jedyńm fizykiem, który mógł objąć katedrę po Piotrze Curie była właśnie Maria Curie. Została ona pierwszą kobietą — profesorem we Francji.

Prowadzi wykłady w Sorbonie, prowadzi badania, radzi i wydaje polecenia swoim uczniom i asystentom oraz kieruje swe wysiłki na zdobycie dotacji i zorganizowanie dużego, wygodnego i dobrze zaopatrzonego laboratorium przeznaczonego do badań promieniotwórczości, którego otwarcia nie doczekał Piotr Curie. Maria Curie wychowuje oprócz tego dwie córki: Irenę, która w wiele lat później zostanie również wielkim fizykiem, i Ewę.

Profesorem zwyczajnym Sorbony została Maria Curie w roku 1908. Ogłasza w roku 1910 swe słynne, prawie 1000-stronicowe dzieło o promieniotwórczości. Wydaje również poprawione i uporządkowane „Dzieła

Piotra Curie” oraz „Tabele stałych promieniotwórczych” i „Rodziny pierwiastków promieniotwórczych”.

Prace Marii Curie koncentrują się w tym okresie na oczyszczaniu i wydzieleniu chlorku radu, powtórnej ocenie ciężaru atomowego radu oraz na wydzieleniu radu w stanie metalicznym, którego dokonuje wraz z Andrzejem Debierné bardzo subtelną metodą chemiczną, przygotowując amalgamat radu przez elektrolizę roztworu zawierającego 1 decygram chlorku radu, za pomocą katody rtęciowej. Uczona bada ponadto promieniowanie wysyłane przez polon oraz odkrywa i opracowuje metodę dozowania radu przez pomiar aktywności wydzielającej się z niego emanacji.

W grudniu 1911 roku szwedzka Akademia Nauk przyznaje Marii Curie indywidualną nagrodę Nobla — tym razem w dziedzinie chemii. Maria Curie pozostała po dziś dzień jedynym uczonym odznaczonym tą zaszczytną nagrodą dwukrotnie za prace naukowe.

W roku 1909 postanowiono zbudować w Paryżu laboratorium radowe — marzenie Marii i Piotra z okresu ich wspólnej pracy.

W roku 1913 Maria uczestniczyła osobiście w uroczystym otwarciu w Warszawie laboratorium do badań nad promieniotwórczością. Wyraziła zgodę na kierowanie jego pracami z Paryża, a bezpośrednio kierownictwo powierzyła dwom swoim najzdolniejszym uczniom — Polakom: Janowi Danyszowi i Ludwikowi Wertensteinowi.

Instytut Radowy zbudowano w Paryżu wspólnym kosztem Sorbony i Instytutu Pasteura przy ulicy Piotra Curie.

W czasie pierwszej wojny światowej uczona organizuje ruchome punkty rentgenodiagnostyczne. Swoje doświadczenia z okresu wojny przedstawia Maria w książce. Píše w niej: „Historia rentgenologii wojennej jest przejmującym przykładem, jak wielki i nieprzewidziany zakres praktycznych zastosowań może mieć w pewnych warunkach odkrycie czysto naukowe... Odkrycie naukowe zdobywa w ten sposób ostateczny zakres, który mu się z natury rzeczy należał. Podobny rozwój widzimy w odniesieniu do leczenia radem to jest do zastosowania w medycynie promieni, wysyłanych przez ciała promieniotwórcze... Wydaje się, że musi ono natchnąć nas większym zaufaniem do bezinteresownych badań, wzmóc naszą cześć i uwielbienie dla nich”.

Po zakończeniu wojny Maria Curie z całą energią podejmuje przerwane badania naukowe. W okresie od roku 1919 do 1934 w jej laboratorium fizycznym w Instytucie wykonano 483 prace naukowe, w tym kilkadziesiąt prac doktorskich i dyplomowych. Maria Curie wyszkoliła w swym Instytucie również wielu fizyków polskich. Pod jej kierunkiem wykonywali swe pierwsze prace oraz prace doktorskie jej córka — Irena Jolliot-Curie oraz zięć — Fryderyk Joliot, przyszli odkrywcy sztucznej promieniotwórczości (1934).

Ostatnie prace Marii Curie związane były z badaniem rodziny aktywnu i pomiarami widmowymi promieniowania alfa, oraz redagowaniem uzupełnionej i obszernej wersji dzieła o promieniotwórczości, które ukażało się już po jej śmierci.

Głęboki humanizm, jaki cechował zawsze Jej podejście do ludzi, sprawił, że jako jedna z pierwszych poruszyła odpowiedzialność uczonych za konsekwencje ich odkryć. Również jako członek Międzynarodowej Komisji Współpracy Intelktualnej przy Lidze Narodów była rzecznikiem współpracy międzynarodowej w zakresie nauki.

Dalszą rozbudowę Instytutu Radowego w Paryżu prowadzi dzięki utworzeniu w roku 1920 Fundacji imienia Curie gromadzącej subwencje i dary przeznaczone na naukową i leczniczą działalność Instytutu Radowego. W roku 1922 Maria Curie zostaje przyjęta jako pierwsza i jedyna kobieta w poczet członków Akademii Nauk Medycznych.

Gorącym pragnieniem Marii Curie było utworzenie Instytutu Radowego również i w Polsce. Wysiłki i zapał zarówno samej Marii jak i jej siostry, Bronisławy Dłuskiej, doprowadziły do realizacji tego projektu; w roku 1925 Maria przyjechała do Warszawy położyć kamień węgielny pod gmachy Instytutu. Pierwszy rad do celów leczniczych uzyskała Maria jako dar Stanów Zjednoczonych. Poświęcenie części leczniczej Instytutu Radowego w Warszawie odbyło się w roku 1932.

Wielka uczona zmarła 4 lipca 1934 roku w Sancellemoz w Szwajcarii na złośliwą anemię anaplastyczną, powstałą wskutek długotrwałej pracy ze szkodliwymi dla zdrowia substancjami promieniotwórczymi.

Wielkość Marii Skłodowskiej-Curie uwidacznia się w całej jej sylwetce naukowca, patriotki, żony i matki. Ani zdolności (dochowały się ustne relacje o jej wspaniałej pamięci), ani rola przypadku nie mogą wytłumaczyć jej sukcesów. Cechowały ją logiczność i jasność myślenia naukowego, a nadto niezmierna konsekwencja i pracowitość. Wystarczy — dla ilustracji — przypomnieć, że dla osiągnięcia sukcesów, z których korzysta współczesna nauka i cywilizacja, musiała opracować wspólnie z Piotrem Curie nową metodę, zdolną wykrywać śladowe ilości radu i innych pierwiastków promieniotwórczych, że analiza elektrometryczna powstała w oparciu o założenie, iż promieniotwórczość jest właściwością atomową badanej materii i że w wyniku tego powstała, jak to określiła sama, „specjalna chemia, której narzędziem stosowanym rutynowo jest nie waga, lecz elektrometr”. Oto są początki nowej nauki — chemii atomowej, nauki zajmującej się budową materii.

Przypomnijmy sobie wreszcie, że wypowiadając w początkach badań nad promieniotwórczością uranu hipotezę atomowego jego przekształcania się, była w swoich przypuszczeniach dość osamotniona. Nawet ówczesne zapatrywania Piotra Curie na promieniotwórczość, jak to określiła Maria, miały „dużo wspólnego z poglądem na zjawiska cieplne”.

Stworzona przez małżonków Curie metoda elektrometrycznego ba-

dania promieniowania dziś jeszcze ma zastosowanie w medycynie, gdzie służy jako najbardziej rozpowszechniona metoda dawkowania promieni. Użycie promieni jonizujących w medycynie sięga przełomu XIX i XX wieku, gdy Stevens, Daniel, Walkhoff, Piotr Curie, Becquerel stwierdzili, że działają one na tkanki.

Bardzo wczesnie Maria Curie starała się pomóc w rozwoju praktycznego zastosowania pierwiastków promieniotwórczych w medycynie. Uważała jednak, że nie można dopuścić, aby rozwój radioterapii opierał się wyłącznie na empirii, bez kontroli naukowej istoty zjawisk będących wynikiem działania radiopierwiastków. Wyrazem jej najgłębszych przekonań było stworzenie w Instytucie Radowym w Paryżu dwóch części badawczych: laboratorium fizycznego oraz laboratorium biologii i Curie-terapii, aby wspólnie rozwijać naukę o radzie.

Prędko przekonano się, że głównym zastosowaniem radu w medycynie będzie leczenie nowotworów złośliwych. Okazało się, że wyzyskując w tym celu przede wszystkim komponentę elektromagnetyczną jego promieniowania, można doprowadzić do całkowitego zniszczenia tkanki nowotworów złośliwych. Nastąpił szybki rozwój nowej specjalności lekarskiej — radioterapii. Później, wprowadzenie izotopów promieniotwórczych, będących wynikiem przekształcania zwykłych pierwiastków, zgodnego z przesłankami teoretycznymi Marii Skłodowskiej-Curie, wzbogaciło znacznie współczesne możliwości doboru energii i rodzaju stosowanych źródeł promieni. Rad jest obecnie tylko jednym z licznych radiopierwiastków używanych w lecznictwie. Ale zasadnicze ustalenia dokonane w radioterapii na początku XX wieku, z przemożnym udziałem Instytutu Radowego w Paryżu, obowiązują w praktyce do dziś. Promienie jonizujące, niezależnie od ich pochodzenia oddziałują na każdą żywą materię. Efekt ostateczny napromienienia żywych struktur biologicznych zależy od ilości pochłoniętej energii. W warunkach promieniolecznictwa, zdolność oddziaływania tkanek na promienie czyli ich promienioczułość jest różna, mimo, że teoretycznie wszystkie rodzaje żywych komórek i tkanek są wrażliwe. Ogólnie biorąc, napromienianie dawkami, stosowanymi w lecznictwie działa uszkadzająco. Jeżeli uszkodzenie napromienionej tkanki jest dostatecznie małe, zachodzą procesy naprawy, które mogą doprowadzić do zlikwidowania w tkance popromiennych efektów niszczących drogą „uprzątania” komórek nieżywych, wzrostu przetrwałej części populacji komórkowej i drogą procesów bliznowacenia. Podstawową zasadą umożliwiającą wyleczenie znacznej części guzów nowotworowych przez napromienianie jest wyzyskanie różnic, jakie istnieją w zakresie promienioczułości i zdolności do naprawy pomiędzy tkanką nowotworową a normalnymi tkankami podłoża i otoczenia, z konieczności napromienianymi we wspólnym bloku.

Zasługą głównie szkoły Instytutu Radowego w Paryżu było wykazanie (Regaud) roli, jaką z punktu widzenia efektu leczniczego spełnia

czynnik czasu: przyjęto na ogół metodę dzielenia zamierzonej dawki promieni na mniejsze frakcje podawane w ciągu przeważnie kilku tygodni. Dzieląc dawkę promieni na frakcje, możemy dobrać długość przerw między naświetlaniami i wielkość frakcji tak, aby istniały najlepsze warunki naprawy dla tkanek zdrowych, obciążając jednocześnie optymalną krytyczną dawką promieni guz nowotworowy. Omawiane zagadnienia, jak również zespół cech, które zwiemy wrażliwością nowotworu na promienie, są do dziś niezupełnie wyjaśnione. Wiadomo, że ogromne znaczenie ma w tym budowa morfologiczna naświetlanych tkanek (nowotworu i jego podłoża z tkanek prawidłowych) oraz warunki tlenowe. Tkanki w warunkach niedotlenienia wykazują zmniejszoną wrażliwość na promienie.

Stosowane w radioterapii nowotworów promienie objęte są nazwą promieni jonizujących dla podkreślenia, że jonizacja w naświetlanych tkankach jest podstawowym mechanizmem fizycznym ich działania, mimo, że promienie elektromagnetyczne (X, γ) wytwarzają jonizację prawie całkowicie drogą wytwarzania elektronów wtórnych. Najczęściej w leczeniu używa się promieni X, γ , elektronów, rzadziej promieni α . Różnią się one od siebie ilością energii traconej na jednostkę przebytej drogi, z czym łączy się wielkość wywołanego efektu biologicznego. Gęstość jonizacji jest wprost proporcjonalna do kwadratu ładunku cząstki jonizującej i odwrotnie proporcjonalna do kwadratu szybkości. Na przykład cząstki α , cechujące się bardzo dużą gęstością jonizacji, wywołują silne ale ograniczone działanie uszkodzające na tkankę.

Gdy gęstość jonów jest mała, na przykład w przypadku promieniowania γ o dużej przenikliwości, efekty miejscowe są stosunkowo mniej nasilone. Energia wtórnych elektronów uwalnianych na dłuższej przestrzeni w przebiegu tego promieniowania w tkance ma znaczny rozrzut.

Według teorii, które zostały opracowane na podstawie badań na prostych modelach biologicznych, jonizacje mogą działać dwoma sposobami.

W pierwszym efekt dochodzi do skutku drogą działania bezpośredniego, uszkodzającego ważne, z punktu widzenia funkcji biologicznych, struktury wewnątrz żywej komórki. Istnienie takich ważnych struktur komórkowych wykazała Maria Curie jeszcze w 1929 roku. Śmierć lub uszkodzenie ważnej funkcji komórkowej występuje w tym przypadku według praw prawdopodobieństwa „trafienia w cel”. Jak wynika z „teorii trafienia w cel” ustanie ważnej czynności komórki może być wynikiem pojedynczej jonizacji; wykazano, że pojedyncza cząsteczka α może wywołać mutację genu.

Drugi sposób, w jaki oddziałują produkty jonizacji na funkcje biologiczne przedstawia teoria działania pośredniego. Zakłada ona, że w warunkach żywych organizmów złożonych dużą rolę odgrywa jonizacja wody, znajdującej się w komórkach i tkankach. Pierwsze stwierdzenia, dotyczące tego tematu, biorą początek w pracach z pracowni Marii Curie

nad działaniem cząstek α na wodę. Stwierdzono, że produkty radiolizy wody ($H\cdot$, $OH\cdot$, $HO_2\cdot$) silnie utleniające, zmieniają składniki chemiczne i prowadzą do zmian w strukturze komórek i zaburzeń jej funkcji. Pod wpływem wymienionych czynników istniejące równowagi chemiczne ulegają zwichnięciu, a procesy chemiczne mogą przebiegać w zmienionym kierunku. Efektem tego może być inaktywacja enzymów, denaturacja białek, zmiany właściwości koloidalnych lub lepkości protoplazmy, zmiany w błonach komórkowych, w gospodarce wodnej komórki, zmiany w zawartości wapnia i potasu. Wrażliwość komórki na promienie największa jest w fazie spoczynkowej i we wczesnej profazie. Morfologicznie stwierdza się po naświetlaniu uszkodzenia chromosomów, co prowadzić może do śmierci komórki, do uniemożliwienia podziału komórkowego lub do mutacji genetycznych.

Maria Curie wraz z Piotrem Curie odkryła promieniotwórczość, ale Jej zasługi dla nauki światowej wykraczają daleko poza to odkrycie.

W jubileuszowym setnym roku upływającym od urodzin Marii Skłodowskiej-Curie, istnieją szczególne powody, aby w pierwszym rzędzie lekarze, biolodzy i przyrodnicy wraz z całym światem nauki pod patronatem licznych organizacji międzynarodowych oddali hołd Jej geniuszowi.

W październiku br. odbędzie się w Warszawie międzynarodowe Sympozjum, poświęcone perspektywom fizyki jądrowej i fizyki cząstek elementarnych oraz chemii jądrowej. Pod patronatem UNESCO odbędzie się również w Warszawie zjazd popularyzatorów nauki, a w domu urodzin Marii Curie zostanie otwarte muzeum Jej imienia. Specjalne sympozja odbędą się też w Sorbonie, a w wielu uniwersytetach świata będą miały miejsce uroczyste sesje.

Jej działalność społeczna z lat młodości w kraju i z lat sławy w okresie wojny światowej i pracy w Lidze Narodów, świadczy o Jej wielkiej szlachetności, humanizmie i zaangażowaniu po stronie słusznych spraw. Działalność patriotyczna Marii — niestrudzona walka o realizację budowy Instytutu Radowego w Warszawie, szkolenie polskich fizyków i utrzymywanie stałego kontaktu z krajem przez całe życie — jest dla nas Polaków powodem do prawdziwej dumy.

Szlachetną i piękną postać Marii Skłodowskiej Curie, kobiety, która naukę ukochała nade wszystko, trafnie można określić słowami Ludwika Natansona: „Twórcze myślenie, samotne pasowanie się z nierozwiązaną, często nie przeczuwaną przez nikogo zagadką, jest jedną z wielkich i czystych radości, które są duchowi ludzkiemu dostępne. Ale tę radość trzeba przeplacić. Okupić ją trzeba zmęczeniem dni pracowitych, trzeba ją zdobyć brnąc przez zniechęcenie i gorycz, trzeba ją osiąść wytrwałością i hartem. Do naukowego badania powołani są tylko nieliczni, szczęśliwi i nieszczęśliwi zarazem”.

IRENA SZUMIEL*

Hormonalna regulacja czynności genów

Hormonal Control of Gene Function

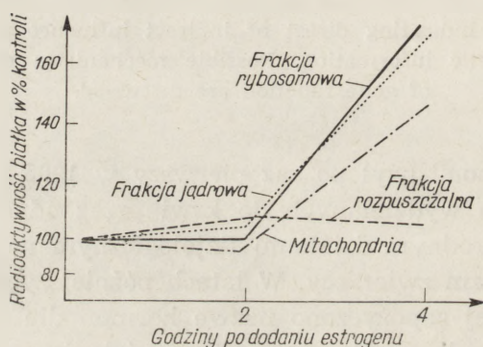
The results of several biochemical, cytogenetical and cytochemical experiments are reviewed, indicating direct or indirect influence of hormones on the transcription of genetic information. Possible mechanisms of hormonal control of gene function are discussed.

Terminu „hormon” użył po raz pierwszy w 1905 roku Starling (21) dla określenia wydzielanych do krwi przez odpowiednie gruczoły substancji o różnorodnym działaniu fizjologicznym na określone narządy lub cały organizm zwierzęcy. W latach późniejszych z tej ścisłej definicji fizjologicznej zapożyczono nazwę hormon dla szeregu związków endogennych, których wspólną cechą jest działanie na organizm w bardzo małym stężeniu i powodowanie w następstwie znacznych zmian morfologicznych i metabolicznych. Wprowadzono pojęcie hormonu tkankowego i roślinnego, poszerzając w ten sposób zakres, ale zmniejszając precyzję pierwotnego terminu. Ze względu na niezwykle różnorodność budowy i czynności biologicznej hormonów trudno jest przyjąć jednolity mechanizm ich działania. Przypuszcza się ponadto, że czynność poszczególnych hormonów jest wielostronna: są one — jak to określił van Overbeek (49) — jak klucze otwierające wiele drzwi. Szereg doświadczeń przeprowadzonych nad hormonami zwierzęcymi świadczy o tym, że działanie ich może polegać na zmienianiu przepuszczalności ścian komórkowych (37, 39), aktywacji białek enzymatycznych (19, 20, 65) i wreszcie bezpośrednim udziale w przemianach metabolicznych w charakterze koenzymów (75). Niemniej jednak można się spodziewać, że oprócz tych różnych właściwości większość hormonów posiada jedną wspólną cechę — mianowicie zdolność regulacji biosyntezy białek komórkowych. Przypuszczenie to jest logicznie uzasadnione: działanie hormonów powoduje zmiany cech morfologicznych i metabolicznych realizowanych poprzez syntezę i następstwa działania białek komórkowych.

* Dr, st. asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

I. Wpływ hormonów na biosyntezę białka

Pierwsze prace nad wpływem hormonów na biosyntezę białka polegały na badaniu włączania radioaktywnych aminokwasów do białek komórkowych ssaków w następstwie podania hormonu wzrostowego (34), insuliny (43), estrogenów (46), androgenów (13, 14), kortyzonu (10, 25, 35, 38) i hormonów tarczycy (47, 52, 69). We wszystkich tych przypadkach stwierdzano zwiększone włączanie aminokwasów do białek. Noteboom i Gorski (48) badając biosyntezę białka w macicy szczurzej w 2 i 4 godziny po podaniu estrogenu wykazali, że najbardziej intensywne jest włączanie aminokwasów do białek frakcji rybosomowej i jądrowej, nieco słabsze do białek mitochondrialnych; nie następuje nato-



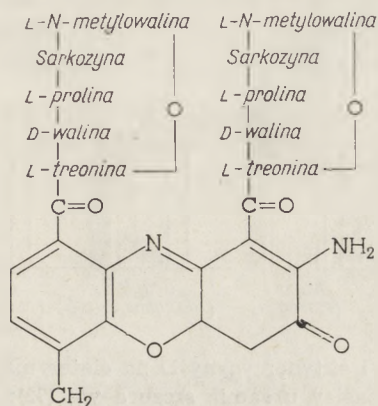
Rys. 1. Wpływ estrogenu na biosyntezę białka w różnych frakcjach komórkowych macicy samicy szczura (wg 48).

miast zwiększenie biosyntezy białek frakcji rozpuszczalnej. Wyniki badań nad wpływem estrogenów na biosyntezę białka w macicy szczura przedstawia rysunek 1.

Na podstawie tych danych można było sądzić, że w pierwszym stadium działania estrogen powoduje zmiany w organellach komórkowych związanych z biosyntezą białek, to jest w jądrze i rybosomach, nie można było jednak określić mechanizmu jego działania. Teoretycznie wzrost biosyntezy białka mógł być spowodowany działaniem hormonu na: 1) pulę aminokwasową, 2) proces aktywacji aminokwasów, 3) pulę nukleotydową, 4) proces transkrypcji genu, to jest syntezę mRNA, 5) proces translacji, to jest syntezę łańcucha peptydowego na rybosomie. Wyniki pracy Notebooma i Gorskiego sugerowały wpływ hormonów na dwa ostatnie procesy, zaś szczególną uwagę zwrócono na proces transkrypcji kiedy w licznych pracach (8, 30, 36, 40, 51, 70, 76, 77, 78) udało się stwierdzić, po podaniu zwierzętom hormonów, wzrost syntezy RNA, oceniany na podstawie zwiększonego włączania znakowanego uracylu. To samo spostrzeżenie uczynił na materiale roślinnym kilka lat

wcześniej Skoog (60) wykazując wpływ kwasu indoloocetowego na syntezę RNA w hodowlach tkankowych; wyniki Skooga potwierdziły następnie prace Clelanda (5) i Key'a (31, 32).

Wzrost syntezy RNA — jak się okazało — dotyczył przede wszystkim frakcji mRNA i można go było zahamować przez podanie aktynomycyny D (I), antybiotyku wytwarzanego przez *Streptomyces antibioticus*. Stwierdzono, że zarówno *in vivo* jak *in vitro* hamuje on syntezę mRNA

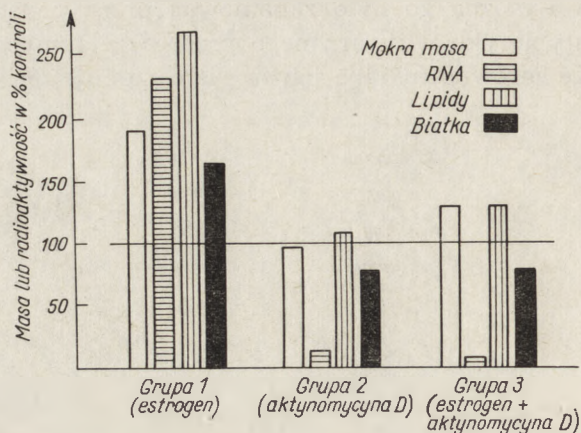


I

oraz RNA rybosomów (18, 26, 55, 67) jak również transport RNA z jądra do cytoplazmy (56). Właściwości i działanie aktynomycyny D omawiali niedawno w artykułach przeglądowych Reich i Goldberg (56) oraz Gałasiński (15).

Zatrzymanie procesu transkrypcji genu (to jest syntezy mRNA) przez aktynomycynę D w wyniku zablokowania matrycy DNA, a w następstwie zahamowanie syntezy białek całkowicie znosiło skutki działania gonadotropiny (66), hormonów przytarczyc (54, 68) oraz niektórych hormonów sterydowych (66, 72). Przykładem ilustrującym to zjawisko mogą być wyniki doświadczenia U i Müllera (72), przeprowadzone na samicach szczura. W 3 tygodnie po usunięciu jajników zwierzętom wstrzykiwano roztwór soli fizjologicznej (grupa 1 i kontrolna) lub aktynomycyny D (grupa 2 i 3) i zaraz potem roztwór estradiolu (grupa 1 i 3) lub soli fizjologicznej (grupa 2 i kontrolna). Następnie wszystkim grupom zwierząt podawano dwukrotnie (w 2 i 3 godziny po pierwszych zastrzykach) urydynę znakowaną trytem i glicynę znakowaną ^{14}C . W godzinę po ostatnim zastrzyku, to jest w czwartej godzinie doświadczenia, zwierzęta zabijano i oznaczano ciężar macicy oraz radioaktywność frakcji RNA, białek i lipidów. W wynikach doświadczenia przedstawionych na rysunku 2 wartości uzyskane dla zwierząt grupy kontrolnej przyjęto jako 100% i oznaczono poziomą kreską. W grupie 1, a więc u samic, które otrzymały estrogen, widoczny jest znaczny wzrost zarówno ciężaru macicy (spowodowany pobraniem wody) jak i syntezy RNA, białek i lipidów w porównaniu z grupą kontrolną. Podanie aktynomycyny D (gru-

pa 2) powodowało znaczny spadek syntezy RNA przy utrzymywaniu się ciężaru macicy oraz syntezy lipidów i białek na poziomie zbliżonym do poziomu w grupie kontrolnej. Podanie estrogeny po aktynomycynie D (grupa 3) dało wyniki zbliżone do wyników w grupie 2, a zatem aktyno-



Rys. 2. Wpływ estrogeny i aktynomycyny D na ciężar macicy oraz biosyntezę RNA, lipidów i białek w macicy u samic szczura wg (72); omówienie w tekście.

mycyna D znosi wpływ estrogeny zarówno na syntezę RNA, lipidów i białek, jak również na wzrost ciężaru macicy.

Przedstawione wyniki sugerują, że istotą oddziaływania estrogeny na komórki jest pobudzenie syntezy mRNA, co powoduje z kolei wzrost syntezy odpowiednich białek i dalsze zmiany, jak wzmożoną syntezę lipidów i wzrost ciężaru macicy w wyniku jej nawodnienia. Podobny wniosek wydaje się słuszny dla wszystkich hormonów, wobec których stwierdzono antagonistyczne działanie aktynomycyny D.

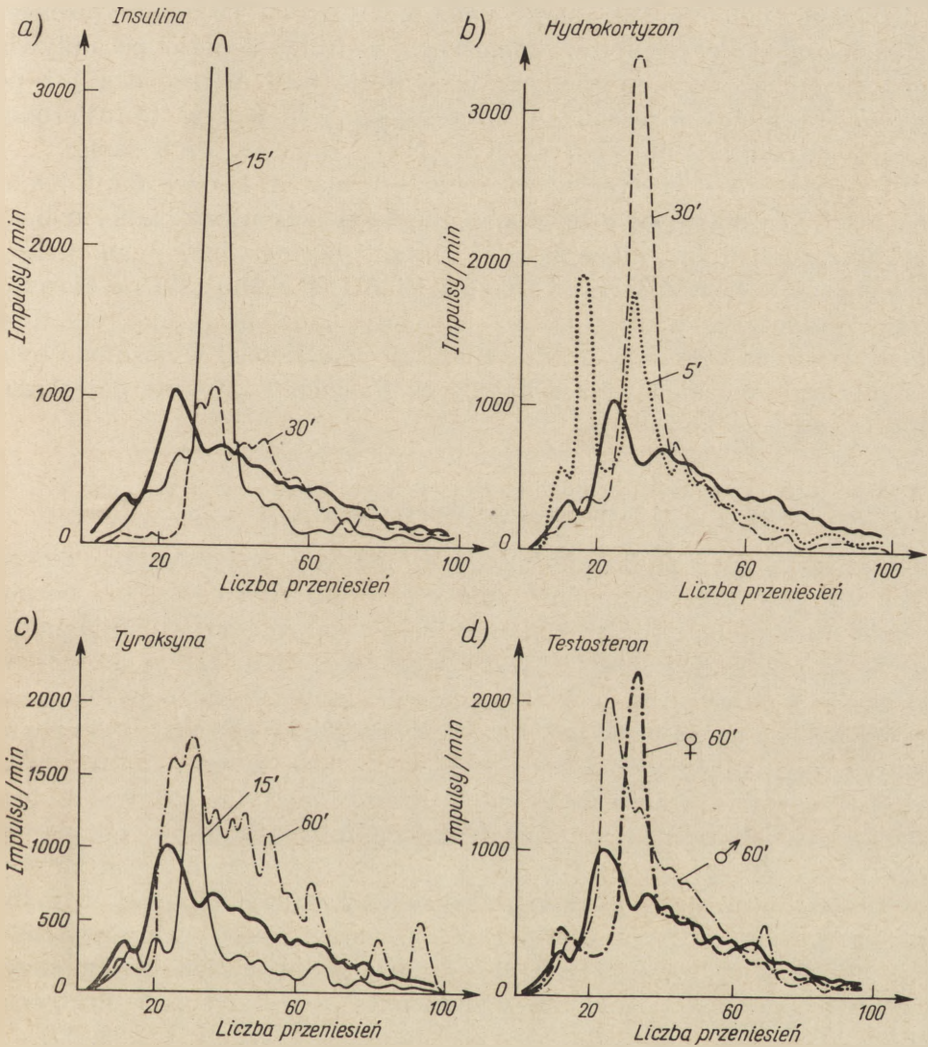
1. Indukowana hormonalnie synteza mRNA

W 1964 roku Kidson i Kirby (33) opublikowali wyniki badań dostarczających szeregu nowych danych o wpływie hormonów na syntezę mRNA. Badacze ci opracowali metodę rozdzielania przeciwwądrowego mRNA z wątroby szczura, dającą lepsze wyniki niż rozdział przy użyciu kolumny z metylowaną albuminy lub wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy. Metodę tę zastosowali następnie w badaniach nad biosyntezą mRNA indukowaną działaniem hormonów.

Do doświadczeń używano dorosłych szczurów żywionych jednakową, zawierającą 20% białka dietą. Zwierzętom podawano odpowiednie hormony i po upływie różnych okresów czasu — znakowany trytem kwas rotowy. W 20 minut potem szczury zabijano, a wątrobę natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Wypreparowany następnie mRNA podda-

wano rozdzielowi przeciwwąadowemu i mierzono radioaktywność poszczególnejch frakcji.

Rysunek 3 przedstawia wykresy rozdzielu radioaktywności we frakcjach mRNA wątroby szczurów, które otrzymały insulinę (a), hy-



Rys. 3. Wpływ hormonów na biosyntezę mRNA w komórkach wątroby szczura wg. (33)

a) insulina, b) hydrokortyzon, c) tyroksyna, d) testosteron;
znakowany kwas orotowy podawany w 5 minut ..., 15 minut —, 30 minut ----, 60 minut - - - - po zastrzyknięciu hormonu; krzywa kontrolna —

drokortyzon (b), tyroksynę (c) lub testosteron (d). Jak widać z wykresów, badane hormony w różnym czasie od chwili ich podania wywołują selektywny wzrost lub spadek syntezy poszczególnejch frakcji mRNA. Na przykład wpływ insuliny zaznacza się bardzo silnie w 15 minut po

podaniu, a po upływie pół godziny zanika i poziom syntezy prawie wszystkich frakcji mRNA jest bliski kontrolnego. Hydrokortyzon powoduje znaczne pobudzenie syntezy dwóch frakcji mRNA już po 5 minutach; po 30 minutach synteza jednej z tych frakcji powraca do poziomu kontrolnego, natomiast drugiej — znacznie wzrasta. Działanie tyroksyny zaznacza się najsilniej w komórkach wątroby dopiero po upływie 1 godziny, choć widoczne zmiany w syntezie mRNA zachodzą już po upływie 15 minut. Szczególnie interesujący jest wpływ testosteronu: pobudza on syntezę innych frakcji mRNA u samców niż u samic.

Skojarzenie omówionych wyników ze schematem *Monoda, Chana-geux'a i Jacoba* (45) genetycznej regulacji biosyntezy białka u bakterii oraz ze znanymi już wcześniej faktami hormonalnej indukcji szeregu enzymów pozwoliło *Kidsonowi i Kirby'emu* (33) na sformułowanie hipotezy, według której hormony oddziałują jako efekторы allosteryczne na represory genetyczne. Pojęcie allosterii wyjaśnione było w zamieszczonym niedawno w *Postęпах Biochemii* artykule przeglądowym *Pużyńskie j* (53).

2. Hormonalna indukcja enzymów

Rozważając mechanizm hormonalnej indukcji enzymów nie można wykluczyć działania hormonów jako efektorów allosterycznych bezpośrednio na istniejące już w komórce białko enzymatyczne (53). Istnieje jednak szereg faktów wskazujących wyraźnie, że działanie hormonów polega nie na aktywacji, lecz na pobudzeniu syntezy enzymów *de novo*. Dowodem tego są na przykład wyniki badań *Feigelsona i Green-garda* (11) nad wpływem kortyzonu na syntezę oksygenazy tryptofanowej w wątrobie szczura. Autorzy ci oznaczali nie tylko aktywność, lecz także ilość białka enzymatycznego metodą miareczkowania roztworem przeciwciała przygotowanego dla oksygenazy. Stwierdzili, że blisko pięciokrotnemu wzrostowi aktywności oksygenazy tryptofanowej w 4 godziny po podaniu kortyzonu (1 mg na 100 g wagi ciała) towarzyszy również pięciokrotny wzrost ilości antygenowo jednakowego białka enzymatycznego (tablica 1). Podobne wyniki uzyskano u szczurów dla transaminazy tyrozyna: α -ketoglutaran po podaniu kortyzonu (28, 29, 57).

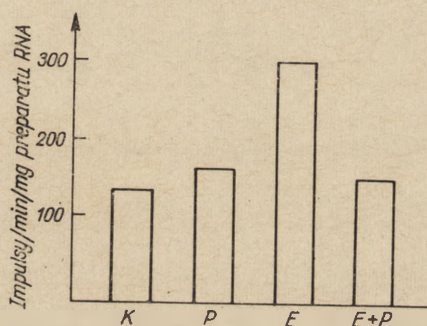
Wzrost syntezy *de novo* polimerazy RNA w jądrach komórek macicy samic szczura pod wpływem estrogeny wykazali *Nóteboom i Gorski* (48) oznaczając aktywność tego enzymu u zwierząt kontrolnych (K), poddanych działaniu puromycyny (P) hamującej biosyntezę białka na poziomie translacji, estradiolu (E) oraz estradiolu i puromycyny łącznie (E+P). Miarą aktywności polimerazy RNA była radioaktywność kwasu rybonukleinowego strącanego 5% kwasem nadchlorowym po inkubacji jąder komórkowych w roztworze CTP znakowanego trytem. Wyniki przedstawione na rysunku 4 wskazują, że wzrost aktywności po-

Tablica 1

Indukowana synteza oksygenazy tryptofanowej w wątrobie szczura (wg 11)

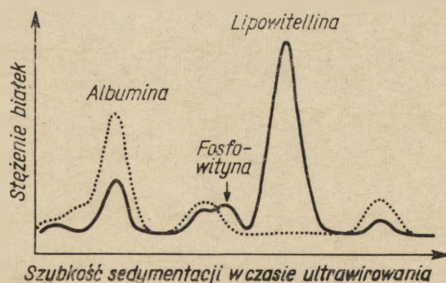
Doświadczenie	Aktywność oksygenazy tryptofanowej		Miareczkowanie roztworem przeciwciała	
	aktywność 1 ml wyciągu z wątroby	% kontroli	ml roztworu na 1 ml wyciągu	% kontroli
Kontrola	5,5	100	0,28	100
Podanie kortyzonu	25,3	460	1,41	500

limerazy RNA po podaniu estrogenu hamowany jest jednoczesnym podaniem puromycyny, a zatem pod wpływem hormonu następuje synteza *de novo* białka enzymatycznego.



Rys. 4. Indukcja estrogenem polimerazy RNA w jądrach komórek macicy szczurzej wg (48).

Wstrzyknięcie estrogenu kogutom powoduje w ich wątrobie syntezę dwóch białek żółtka jaja kurzego — fosfowityny i lipowitelliny (58), powstających normalnie tylko w wątrobie niosących się kur. Białka te przechodzą do osocza krwi i można je oddzielić od innych białek w wyniku ultrawierowania (rysunek 5).



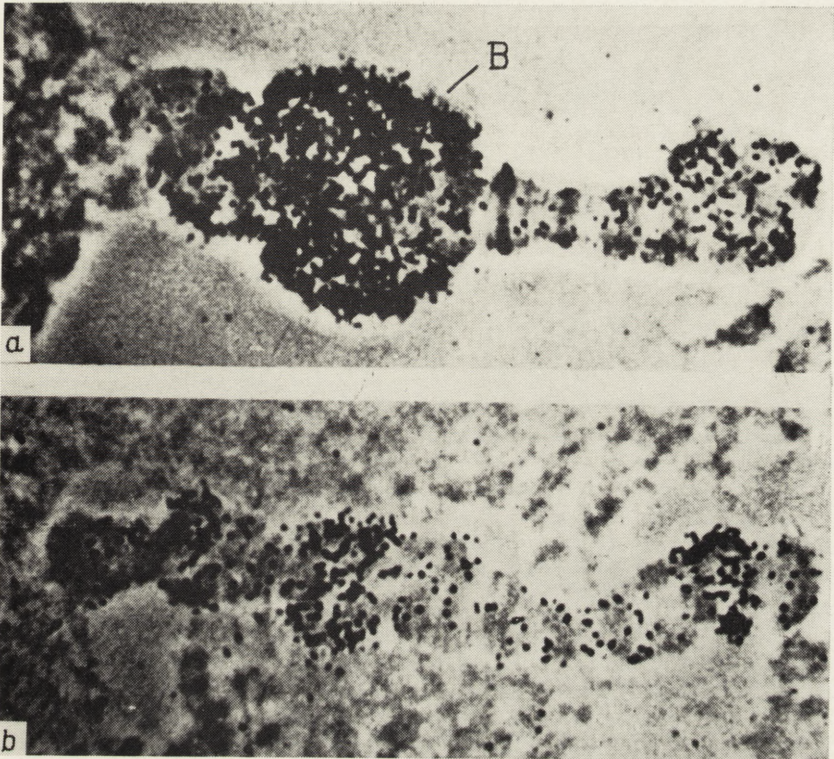
Rys. 5. Indukcja estrogenem fosfowityny i lipowitelliny u kogutów wg (7) i (58) białka osocza kogutów kontrolnych
białka osocza kogutów, którym podano estrogen —

Przykładem hormonalnej indukcji enzymu u roślin jest tworzenie α -amylazy w kiełkujących ziarnach jęczmienia pod wpływem kwasu gibberelowego wydzielanego przez zarodek (73, 74). Okazało się, że można spowodować syntezę α -amylazy w nasionach pozbawionych zarodka umieszczając na wewnętrznej ich powierzchni kroplę bardzo rozcieńczonego roztworu kwasu gibberelowego. Wytworzona w komórkach aleuronowych α -amylaza wywoływała hydrolizę skrobi w sąsiadujących z nimi komórkach endospermy, powodując ich przezroczystość. Stwierdzono, że indukcja α -amylazy za pomocą kwasu gibberelowego zachodzi poprzez syntezę odpowiedniego mRNA, działanie kwasu gibberelowego można bowiem znieść za pomocą aktynomycyny D. Można zatem przypuścić istnienie daleko idących analogii między mechanizmami działania przynajmniej niektórych hormonów roślinnych i zwierzęcych. Potwierdziłoby to przypuszczenie o wpływie kwasu indoloactowego i cytokinin na różnicowanie komórek roślinnych w hodowlach tkankowych (61), a więc na proces zależny od regulacji funkcji genów.

II. Miejsce działania hormonów regulujących czynność genów

Omówione poprzednio wyniki badań Kidsona i Kirby'ego zdają się wskazywać, że pod wpływem szeregu hormonów następuje kolejna transkrypcja pewnych genów w ściśle określonym następstwie czasowym i jednocześnie hamowanie transkrypcji innych genów. Bezpośrednim na to dowodem są obserwacje chromosomów politenicznych z komórek śliniankowych muchówek (*Diptera*), między innymi larwy ochotka *Chironomus tentans*. Autoradiografia oraz wybiórcze wybarwienie białek, DNA i RNA wchodzących w skład chromosomów pozwalają stwierdzić, że tak zwane pierścienie Balbianiego — to jest miejsca w których następuje rozluźnienie struktury i wytworzenie większych lub mniejszych nabrzmiń, zawierają duże ilości RNA i białka różnego od histonów. Natomiast histony występują na terenie chromosomów poza pierścieniami Balbianiego. Metodą autoradiografii można było stwierdzić, że do RNA w „pierścieniach” szybko włącza się podawany larwom ochotka uracyl znakowany trytem. Podanie aktynomycyny D powoduje zanik pierścieni Balbianiego i zahamowanie syntezy RNA. Na rysunku 6a i 6b przedstawiono autoradiogramy chromosomu IV ze ślinianek larwy ochotka, której podano radioaktywny uracyl lub radioaktywny uracyl i aktynomycynę D. Z rysunku 6a widać, że pierścienie Balbianiego można określić jako miejsca, w których zachodzi transkrypcja informacji genetycznej zawartej w DNA — to jest synteza mRNA.

Pogląd ten potwierdza praca Edströma i Beermanna (9), którym udało się wyizolować ze ślinianek larw ochotka kilkadziesiąt chromosomów IV zawierających w badanym stadium rozwoju po 3 pierś-



Rys. 6. Autoradiogram chromosomu IV z komórek śliniankowych larwy ohotka
a) po podaniu radioaktywnego uracylu, b) po podaniu radioaktywnego uracylu i aktynowy-
cyny D wg (7) B — pierścień Balbianiego.

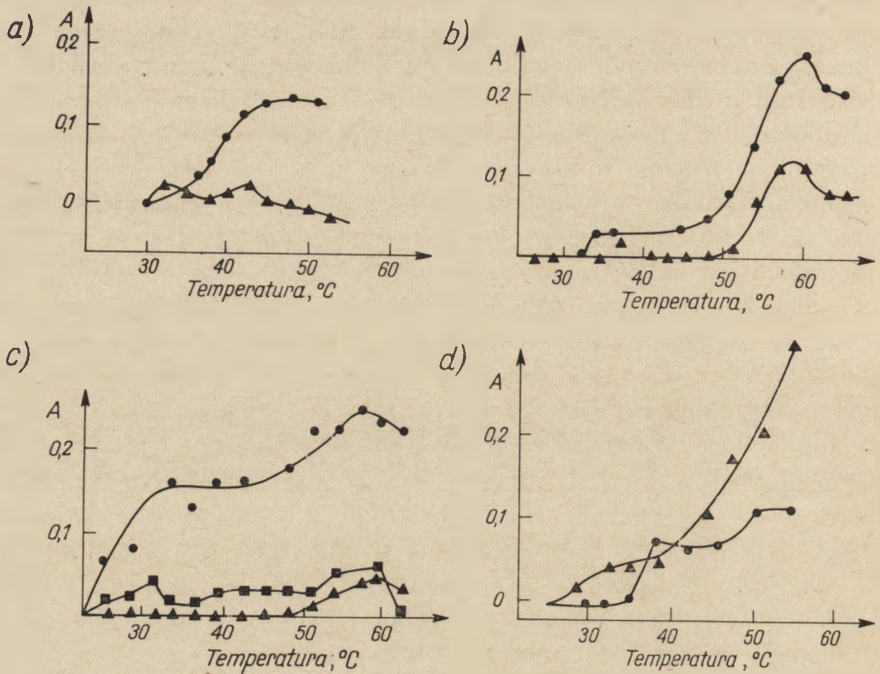
enie Balbianiego rozmieszczone na obu końcach i w środkowym odcinku chromosomu. Każdy chromosom rozdzielono za pomocą mikromanipulatora na części odpowiadające pierścieniom dolnemu, środkowemu i górnemu; z każdej frakcji, otrzymanej przez połączenie homologicznych odcinków chromosomów IV, ekstrahowano RNA, hydrolizowano i rozdzielone metodą mikroelektroforezy zasady oznaczano spektrofotometrycznie. Analizy wykazały, że RNA z każdego pierścienia Balbianiego ma inny skład zasad, co jest zgodne z założeniem, że w każdym z pierścieni zachodzi transkrypcja innego genu.

Obserwacja chromosomów śliniankowych muchówek w okresie przepoczwarczenia się wskazuje na pojawienie się pierścieni Balbianiego kolejno w różnych miejscach chromosomów w ściśle określonych odstępach czasu i kolejności. Przyspieszenie rozpoczęcia tego procesu i odpowiadające mu zmiany w wyglądzie chromosomów można wywołać sztucznie, zastrzykując larwom hormon ekdyson, powodujący linkę (42, 59, 63). Można zatem wysunąć przypuszczenie, że pod wpływem wytworzonego w organizmie lub wprowadzonego z zewnątrz hormonu następuje kolejne uaktywnienie genów oraz synteza odpowiadających im białek; wskutek zmian czynności genów zachodzi metamorfoza postaci larwalnej w poczwarkę, a następnie w postać dojrzałą.

Jedną z wczesnych zmian morfologicznych następujących pod wpływem ekdysonu jest sklerotyzacja — przekształcenie miękkiego naskórka larwy w twardą okrywą poczwarki. Proces ten badano między innymi u larw muchy plujki *Calliphora erythrocephala* i stwierdzono, że w naskórku zachodzi biosynteza N-acetylo-DOPA przy udziale dekarboksylazy DOPA. Enzymu tego brak we wcześniejszych stadiach rozwojowych larw *Calliphora* i — jak się okazało — jest on indukowany przez ekdyson. Sekeris i Lang (59) wydzielili mRNA z jąder naskórka larw *Calliphora* tuż przed przepoczwarczeniem, w stadium kiedy już nastąpiło wydzielenie wewnętrzne ekdysonu oraz z larw 7-dniowych, kontrolnych. Wydzielony mRNA zastosowano w układzie syntetyzującym białko *in vitro*, zawierającym mikrosomy z wątroby szczura. Uzyskano syntezę dekarboksylazy DOPA tylko w przypadku mRNA z naskórka larw bezpośrednio przed przepoczwarczeniem. Nie stwierdzono natomiast syntezy tego enzymu w układzie zawierającym mikrosomy szczura wątroby bez dodatku mRNA lub po dodaniu RNA z larw kontrolnych.

Doświadczenie to stanowi bezpośredni dowód wpływu ekdysonu na derepresję genu, przejawiającą się jako synteza odpowiedniego mRNA, a w następstwie — białka enzymatycznego, którego działanie wywołuje określoną zmianę morfologiczną.

Zarówno prace nad chromosomami olbrzymimi ślinianek muchówek jak doświadczenia Allfrey'a i wsp. (12, 27, 41) przeprowadzone na chromosomach oocytów płazów wskazują na to, że aktywność genów objawia się w częściach chromosomów o rozluźnionej strukturze, nato-



Rys. 7. Wpływ niektórych hormonów na zmianę absorpcji DNA w czasie ogrzewania w roztworze buforowym wg (17)

A — różnica między absorpcją przy 260 m μ preparatu DNA z dodatkiem i bez dodatku hormonu
 a) ● β -estradiol $1,25 \times 10^{-5}M$, ▲ α -estradiol $1,27 \times 10^{-5}M$, DNA — 13,6 $\mu g/ml$ ogrzewany w buforze o pH 7,6

b) ● insulina $6,9 \times 10^{-10}M$, ▲ insulina $3,5 \times 10^{-10}M$, DNA — 17 $\mu g/ml$, ogrzewane w buforze o pH 6,9

c) ● somatotropina $4,3 \times 10^{-13}M$, ▲ somatotropina zdenaturowana termicznie $4,3 \times 10^{-13}M$, ■ insulina $6,9 \times 10^{-10}M$ + somatotropina $4,3 \times 10^{-13}M$, DNA — 17 $\mu g/ml$ ogrzewany w buforze o pH 6,9

d) ● L-adrenalina $0,27 \times 10^{-10}M$, ▲ L-adrenalina $0,54 \times 10^{-10}M$, DNA — 17 $\mu g/ml$ w buforze o pH 6,9.

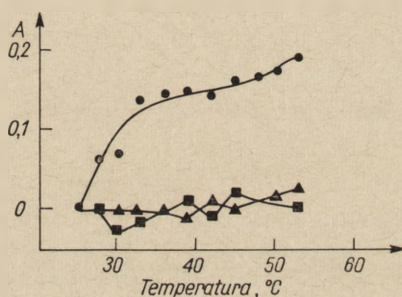
miast we fragmentach gęsto upakowanych synteza mRNA nie następuje.

Rozluźnienie struktury wydaje się być spowodowane rozerwaniem wiązań wodorowych między łańcuchami podwójnej spirali DNA. Stopień tego rozerwania można określić mierząc absorpcję roztworu DNA przy 260 m μ . Goldberg i Atchley (17) zbadali wpływ fizjologicznych stężeń hormonów na stan wiązań wodorowych między łańcuchami DNA, oznaczając zależność między przyrostem absorpcji przy 260 m μ , a temperaturą dla roztworów DNA, pochodzącego z łożyska ludzkiego, w buforze z dodatkiem i bez dodatku hormonów. Rysunek 7 przedstawia wykresy tej zależności w przypadku 17- β - i 17- α -estradiolu (a), insuliny (b), somatotropiny (c) i L-adrenaliny (d). Okazało się, że wszystkie badane substancje wywierały wpływ na zmiany absorpcji DNA z wyjątkiem 17- α -estradiolu — nieczynnego biologicznie izomeru aktywnego

hormonu 17- β - i zdenaturowanej termicznie somatotropiny. Dowodzi to istnienia ścisłych wymogów przestrzennych budowy dla zachowania aktywności. Równoczesne dodanie somatotropiny i insuliny — hormonów działających antagonistycznie w testach biologicznych nie wywołało zmiany absorpcji DNA. Dalsze badania wykazały, że hormony aktywne w stosunku do DNA łożyska były również czynne wobec preparatu dezosyrybonukleoproteidów łożyska.

Na specyficzność zbadanych przez Goldberga i Atchleya oddziaływań hormonów na DNA wskazuje brak ich aktywności wobec zdenaturowanego termicznie lub mechanicznie DNA łożyska (rysunek 8). DNA faga i *B.subtilis* oraz syntetycznych polimerów poli dAT i poli dG:dC; stężenie roztworów hormonów potrzebne do wywołania zmian absorpcji były bardzo niskie, natomiast nieczynne biologicznie związki organiczne powodowały podobne zmiany dopiero w nieporównywalnie większych stężeniach.

Powstaje zatem pytanie, czy wymienione hormony istotnie działają bezpośrednio na określone receptory w chromosomie, czy też mają inne pierwotne miejsce działania w komórce, a dopiero jednym z wczesnych



Rys. 8. Wpływ estradiolu ($1,3 \times 10^{-5}$ M) na zmianę absorpcji DNA ($17 \mu\text{g/ml}$) podczas ogrzewania w pH 6,9 w zależności od stanu fizycznego DNA wg (17)

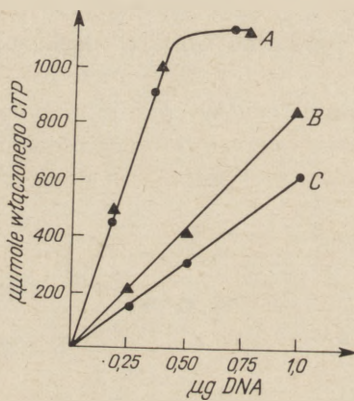
A — różnica między absorpcją przy 260 m μ preparatu DNA z dodatkiem i bez dodatku hormonu
 ● natywny DNA, ▲ DNA zdenaturowany termicznie, ■ DNA zdenaturowany mechanicznie.

skutków tego działania jest pobudzenie lub hamowanie procesu transkrypcji. Wydaje się, że hormony mogą działać bądź bezpośrednio, bądź też pośrednio, gdyż na przykład metodą autoradiografii udało się stwierdzić ścisłą lokalizację aldosteronu (50) i testosteronu (42) w jądrach komórkowych, natomiast progesteron (70) gromadził się wyłącznie w cytoplazmie. Najprawdopodobniej pośredni jest również sposób działania estrogenu; niedawno Toft i Gorski (71) wykryli w cytoplazmie komórek macicy specyficzny receptor białkowy tego enzymu.

Doświadczenie Kima i Cohena (34) wskazuje na pośredni wpływ tyroksyny na materiał genetyczny. Jak wiadomo, hormon ten wywołuje przyspieszenie metamorfozy u kijanek, przyczym jego podanie powoduje wzrost syntezy szeregu typów RNA w wątrobie kijanki (23, 64),

jak również indukcję syntetazy karbamylofosforanu (22), hamowaną przez aktynomycynę D (16). Stwierdzenie to sugerowało wpływ bezpośredni, toteż badania Kima i Cohena miały za zadanie sprawdzenie wpływu tyroksyny na oczyszczone preparaty chromatyny z wątroby kijanek. Do badań użyto gatunku *Rana catesbeiana*. Otrzymana chromatyna stanowiła matrycę dla polimerazy RNA, a ilość powstałego RNA oceniano na podstawie włączania do niego cytozyny ze znakowanego trytem CTP.

Stwierdzono, że chromatyna z wątroby kijanek poddanych działaniu tyroksyny jest 20—50% wydajniejszą matrycą dla polimerazy RNA niż chromatyna z wątroby kijanek kontrolnych (rysunek 9). Dla porównania



Rys. 9. Synteza DNA *in vitro* przy zastosowaniu jako matrycy dla polimerazy DNA: A — preparatu odbiałzonego DNA, B i C — preparatu chromatyny z wątroby kijanek wg (34)

● kijanki kontrolne, ▲ kijanki poddane działaniu tyroksyny.

podano wyniki uzyskane dla odbiałzonego — a więc pozbawionego histonów — preparatu DNA; były one jednakowe dla DNA z kijanek kontrolnych i otrzymujących tyroksynę. Natomiast inkubacja jąder komórkowych wątroby lub preparatu chromatyny z kijanek kontrolnych w roztworze tyroksyny nie spowodowała wzrostu syntezy DNA; uzyskane przez Kima i Cohena wyniki można zatem interpretować jako dowód, że tyroksyna działa na chromatynę w sposób pośredni. Oddziaływanie to powodowałoby w następstwie uwalnianie histonów z kompleksów z DNA, wskutek czego nowe odcinki DNA mogłyby stanowić matrycę w procesie transkrypcji.

Wyniki prac Bonnera i wsp. z lat 1962—63 (4, 24) sugerowały, że histony są czynnikami blokującymi matrycę DNA. Ostatnie wyniki prac Bonnera i Huanga (3) oraz Benjamina i wsp. (2) zdają się jednak wskazywać, że właściwym czynnikiem blokującym jest kompleks histon-RNA. Kompleks taki spełnia oba warunki stawiane repre-

sorowi genetycznemu: 1) może być specyficzny w stosunku do danego genu dzięki komplementarnej strukturze składowego RNA (44) (same histony mimo pewnej heterogenności — warunku tego nie spełniają); 2) może podlegać działaniu efektorów allosterycznych dzięki zawartości składnika histonowego; zmiana konformacji histonu wpływałaby wtedy na oddzielenie RNA kompleksu od DNA blokowanego genu.

Hormony mogłyby zatem działać bądź na histonowe składniki represorów — jak przypuszczają Kim i Cohen — bądź jak postulują Goldberg i Atchley — mogłyby rozluźnić podwójną spiralę DNA genu, co wpływałoby z kolei na rozerwanie wiązania między DNA, a RNA wchodzącym w skład represora. Wpływ na strukturę genu mógłby być wywierany przez hormony bezpośrednio lub za pośrednictwem receptorów hormonalnych.

Taki mechanizm działania nie może być uogólniony dla wszystkich związków biologicznie czynnych obejmowanych nazwą hormonów, wydaje się jednak słuszny dla znacznej ich liczby. Można przypuszczać, że poznanie istoty wpływu hormonów na czynność genów mogłoby rzucić wiele światła na jeden z kluczowych problemów współczesnej biologii — problem różnicowania komórek.

LITERATURA

1. Beermann W., Clever U., *Sci. Am.* **210**, 50 (1964).
2. Benjamin W., Levander O. A., Gellhorn A., De Bellis R. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 588 (1966).
3. Bonner J., Huang R. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 960 (1965).
4. Bonner J., Huang R. C., Gilden R. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 893 (1963).
5. Cleland R., *Plant Physiol.* **40**, 595 (1965).
6. Clever U., *Develop. Biol.* **6**, 73 (1963).
7. Davidson E. H., *Sci. Am.* **212**, 36 (1965).
8. Eboué-Bonis D., Champan A. M., Volfin P., Clauser H., *Nature* **199**, 1183 (1963).
9. Edström J. E., Beermann W., *J. Cell. Biol.* **14**, 371 (1962).
10. Feigelson P., Feigelson M., Greengard O., *Rec. Progr. Hormone Res.* **18**, 491 (1962).
11. Feigelson P., Greengard O., *J. Biol. Chem.* **237**, 3714 (1962).
12. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 1026 (1963).
13. Frieden E. H., w *Action of Hormones on Molecular Processes*, wyd. H. Litwack, D. Kritchevsky, New York 1964, str. 509.
14. Frieden E. H., Cohen E. H., Harper A. A., *Endocrinology* **68**, 862 (1961).
15. Gałasiński W., *Post. Biochem.* **12**, 127 (1966).
16. Gesteland R. F., *Federation Proc.* **24**, 293 (1965).
17. Goldberg M. L., Atchley W. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 989 (1966).
18. Goldberg I. H., Rabinowitz M., *Science* **136**, 315 (1962).
19. Hagerman D. D., Villee C. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 481 (1952).

20. Hagermann D. D., Vिलlee C. A., *J. Biol. Chem.* **229**, 589 (1957) i **234**, 2031 (1959).
21. Hanč O., *Hormone*, Jena 1959, str. 34.
22. Haruna I., Nozu K., Ohtaka Y., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 579 (1965).
23. Haruna I., Spiegelman S., *Science* **150**, 884 (1965).
24. Huang R. C., Bonner I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1216 (1962).
25. Hultin T., von der Decken A., Arrhenius E., Morgan W. S., w *Biological Structure and Function*, wyd. T. W. Goodwin i O. Lindberg, New York 1961, tom 1, str. 221.
26. Hurwitz J., Furth J. J., Malamy M., Alexander M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1222 (1962).
27. Izawa M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 544 (1963).
28. Kenney F. T., *J. Biol. Chem.* **237**, 1610 (1962).
29. Kenney F. T., *J. Biol. Chem.* **237**, 3495 (1962).
30. Kenney F. T., Kull F. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 493 (1963).
31. Key J. L., *Plant Physiol.* **39**, 365 (1964).
32. Key J. L., Ingle J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1382 (1964).
33. Kidson C., Kirby K. S., *Nature* **203**, 598 (1964).
34. Kim K. H., Cohen P. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1251 (1966).
35. Korner A., *J. Endocrinol.* **21**, 177 (1960).
36. Korner A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 386 (1963).
37. Krahl M. E., *Perspectives Biol. Med.* **1**, 69 (1957).
38. Leon M. A., Arrhenius E., Hultin T., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 423 (1962).
39. Levine R., Goldstein M. S., *Rec. Progr. Hormone Res.* **11**, 343 (1955).
40. Liao S., Williams-Ashman H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1956 (1962).
41. Littau V. C., Allfrey V. G., Frenster I. H., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 93 (1964).
42. Loob P. M., Wilson J. D., *Clin. Res.* **13**, 45 (1965).
43. Manchester K. L., Young F. G., *Biochem. J.* **70**, 353 (1958).
44. Miller J. M., Sobell H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1201 (1966).
45. Monod J., Changeux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* **6**, 306 (1963).
46. Müller G. C., *J. Biol. Chem.* **204**, 77 (1953).
47. Necheles T. F., *Am. J. Physiol.* **203**, 693 (1862).
48. Noteboom W. D., Gorski J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 250 (1963).
49. Overbeek van J., *Science* **152**, 721 (1966).
50. Porter S. A., Bogoroch K., Edelman I. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1326 (1964).
51. Potter V. R., *J. Cellular Comp. Physiol.* **66**, 175 (1965).
52. Price S., w *Action of Hormones on Molecular Processes*, wyd. G. Litwack, D. Kritchevsky, New York 1964, str. 154.
53. Pużyńska L., *Post. Biochem.* **11**, 307 (1965).
54. Rasmussen H., Arnaud C., Hawker C., *Science* **144**, 1019 (1964).
55. Reich E., Franklin R. M., Shatkin A. J., Tatum E. L., *Science* **134**, 556 (1961).
56. Reich E., Goldberg I. H., *Progr. Nucleic Acid. Res.* **3**, 183 (1964).
57. Schimke R. T., Sweeney E. W., Berlin C. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 214 (1964).
58. Schjeide O. A., Urist M. R., *Science* **124**, 1242 (1956).

59. Sekeris C. E., Lang N., *Life Sciences* **3**, 625 (1964).
60. Skoog F., *Brookhaven Symp. Biol.* **6**, 1 (1954).
61. Skoog F., Strong F. M., Miller C. O., *Science* **148**, 432 (1965).
62. Sonneborn T. M., *J. Protozool.* **10** (Suppl.) 25 (1963).
63. Sonneborn T. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 915 (1964).
64. Spiegelman S., Haruna I., Holland B., Beaudreau G., Mills D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 919 (1965).
65. Sutherland E. W., Rall T. W., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3608 (1957).
66. Talwar S. P., Segal S. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 226 (1963).
67. Tamaoki T., Müller G. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 451 (1962).
68. Tashijan A. H. jr., Ontjes D. A., Goodfriend T. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 209 (1964).
69. Tata J. R., *Rec. Progr. Hormone Res.* **18**, 221 (1962).
70. Tata J. R., *Nature* **197**, 1167 (1963).
71. Toft D., Gorski J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1574 (1966).
72. Ui H., Müller G. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 256 (1963).
73. Varner J. E., *Plant Physiol.* **39**, 413 (1964).
74. Varner J. E., Chandra G. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 100 (1964).
75. Vilee C. A. w *The Molecular Control of Cellular Activity*, wyd. J. M. Allen, New York 1962, str. 297.
76. Wilson J. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 175 (1962).
77. Wool I. G., *Am. J. Physiol.* **199**, 719 (1960).
78. Wool I. G., Munro A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 918 (1963).

STEFAN POZNAŃSKI*, JERZY JAKUBOWSKI**,
JERZY RYMASZEWSKI***, ARNOLD REPS****

Niektóre właściwości kazeiny i jej genetycznych odmian

Some Properties of Caseins and their genetic Variants

The genetic polymorphism in caseins of cows milk as well as biophysical and biochemical properties of α -casein in complex, β , γ and κ -caseins are reviewed.

Wstęp

Od pewnego czasu nomenklatura i klasyfikacja białek mleka krowiego, a szczególnie kazeiny, stawała się coraz bardziej skomplikowana i chaotyczna. Opracowanie nowego systemu klasyfikacji białek mleka pozwala na stopniowe włączanie do tego systemu następných składników lub frakcji, które w przyszłości mogą być wyizolowane i scharakteryzowane (68).

Do uporządkowania nomenklatury i klasyfikacji białek mleka w dużym stopniu przyczyniły się: rozwój nowoczesnej techniki laboratoryjnej, odkrycia genetycznych odmian białek serwatkowych, wyizolowanie białek mleka zbliżonych do kazeiny i odkrycie genetycznych odmian α_s , β i κ -kazeiny.

I. Kazeina jako kompleks i nomenklatura poszczególnych jej frakcji

Kazeina występuje w mleku jako niejednorodny fosfoproteid, dający się wytrącić przez doprowadzenie stężenia jonów wodorowych do pH 4,6 w temperaturze 20°C.

W obrębie tak zwanej kazeiny całkowitej rozróżnia się kompleks α -kazeiny oraz β , γ i κ -kazeinę. Zarówno kompleks jak i poszczególne

* Doc. dr, kierownik Katedry Technologii Mleczarskiej Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie.

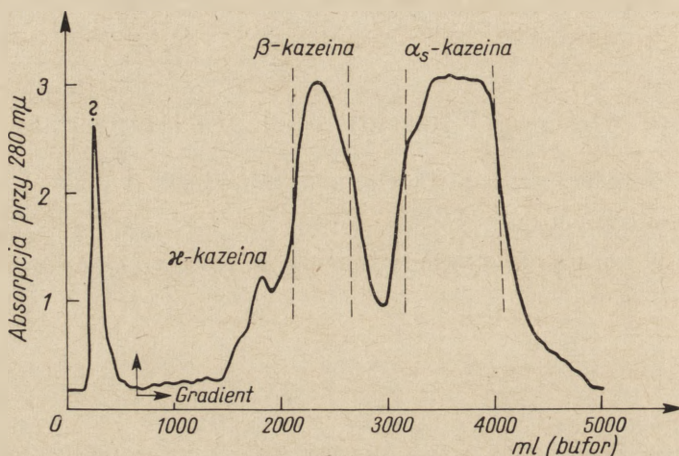
** Dr, adiunkt Katedry Technologii Mleczarskiej Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie.

*** Mgr inż., st. asystent Katedry Technologii Mleczarskiej Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie.

**** Mgr inż., st. asystent Katedry Technologii Mleczarskiej Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie.

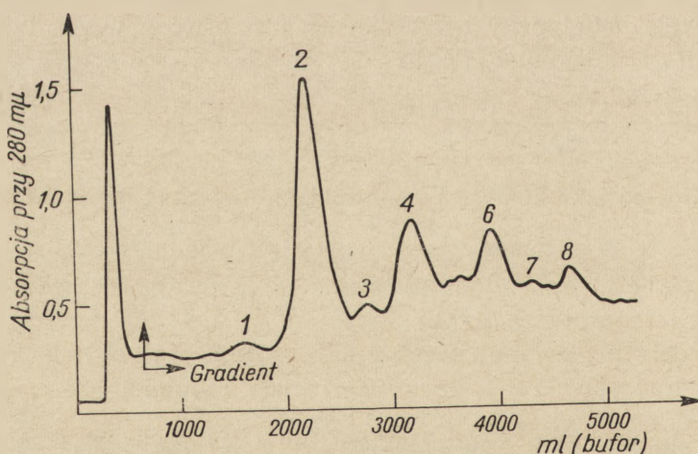
frakcje kazeiny wzajemnie na siebie oddziałują. Charakteryzują się one odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi. Kazeina całkowita zawiera najwięcej α -kazeiny, która składa się z trzech podstawowych frakcji.

W kompleksie α -kazeiny wyróżniono frakcję wrażliwą na obecność



Rys. 1. Rozdział kazeiny całkowitej (chromatografia kolumnowa z DEAE-celulozą) Nanoszono 10 g kazeiny, bufor: 3,3M mocznik, 0,02M imidazol, 0,02M merkaptotanol doprowadzony do pH 7 za pomocą HCl. Gradient od 0 do 0,35M NaCl. Szybkość elucji 220 ml/godz., czas analizy 23 godz., objętość frakcji 20 ml (kolumna preparatywna) Szczyty zakreskowane zawierały frakcje kazein elektroforetycznie jednorodnej (elektroforeza na żelu skrobiowym w pH 8,6).

Według S. Poznańskiego (nie publikowana)



Rys. 2. Rozdział κ -kazeiny B (chromatografia kolumnowa z DEAE-celulozą) Naniesiono 2,7 g κ -kazeiny otrzymanej według Zittle i Custer, bufor: 3,3M mocznik, 0,02M imidazol, 0,03M merkaptotanol doprowadzony za pomocą HCl do pH 7. Gradient od 0,02 do 0,18M NaCl. Szybkość elucji 200ml/godz., czas analizy 26 godz., objętość frakcji 20ml (kolumna preparatywna)

Szczyt 2 reprezentuje frakcję podstawową κ -kazeiny
Według S. Poznańskiego (nie publikowana)

jonów wapniowych, jest nią α_s -kazeina, nierozpuszczalna w 0,4M roztworze CaCl_2 o pH 7 w temperaturze 0 do 4°C . Nieco później stwierdzono, że α_s -kazeina zawiera frakcje $\alpha_{s1,2}$ -kazeiny z ich genetycznymi odmianami (69, 70) oraz pewne inne frakcje, które umownie nazwano frakcjami podobnymi do α_s -kazeiny. Te inne frakcje występują bądź jako odmiany niestabilne wobec jonów wapniowych, bądź też jako odmiany stabilizowane wobec tychże jonów przez κ -kazeinę. κ -Kazeina jest fosfoglikoproteidem rozpuszczalnym w 0,4M roztworze CaCl_2 o pH 7 w temperaturze 0 do 4°C i ma zdolność stabilizowania $\alpha_{s1,2}$ -kazeiny wobec jonów wapniowych. λ -Kazeina, mało jeszcze zbadana frakcja kompleksu α -kazeiny, jest również rozpuszczalna w 0,4M roztworze CaCl_2 , ale nie ma zdolności stabilizowania α_s -kazeiny wobec jonów wapniowych.

Oddzielną frakcję kazeiny całkowitej stanowi β -kazeina, rozpuszczalna w roztworze mocznika 4,6M, a nierozpuszczalna w 3,3M o pH 4,6. β -Kazeina wytrąca się w obecności jonów wapniowych w temperaturze 35°C , natomiast w temperaturze 4°C jest stabilna wobec tych jonów.

Frakcja, nazwana γ -kazeiną, jest rozpuszczalna w 3,3M roztworze mocznika o pH 4,7, a nierozpuszczalna w 1,7M po dodaniu siarczanu amonowego.

Znanych jest kilka metod otrzymywania poszczególnych frakcji lub kompleksów białkowych kazeiny (19, 55, 70). Czyste frakcje otrzymywano metodą chromatografii kolumnowej przy użyciu *DEAE*-celulozy (57). Rysunek 1 przedstawia chromatograficzny rozdział kazeiny całkowitej, a rysunek 2 rozdział κ -kazeiny.

II. Genetyczna niejednorodność poszczególnych frakcji kazeiny

Aschaffenburg i Drewry (4) w 1957 roku pierwsi zwrócili uwagę na genetyczną niejednorodność białek mleka krowiego, demonstrując genetyczne postacie β -laktoglobuliny A i B, a nieco później Bell (11) odkrył postać C. W 1961 roku Aschaffenburg (5) stwierdził za pomocą elektroforezy na żelu skrobiowym obecność trzech genetycznych postaci β -kazeiny, które występowały w mleku indywidualnych krów, bądź pojedynczo: A, B lub C, bądź też parami: AB, AC lub BC. W 1964 roku obserwacje te potwierdzili Thompson i wsp. (71), którzy przeanalizowali też częstotliwość występowania pojedynczych postaci lub par tych odmian u niektórych ras krów bądź ich krzyżówek. W tym samym czasie Kiddy i Johnson (32) stwierdzili w mleku od tych samych ras krów występowanie genetycznych odmian α_s -kazeiny.

Grosclaude (22) nie wykrył β -kazeiny C w mleku krów niektórych ras francuskich (normandzkiej, flamandzkiej i *Francaise-Fri-*

sonne-Pie-Noire), jak również nie stwierdził $\alpha_{s1,2}$ -kazeiny A, zamiast której występowały na ogół $\alpha_{s1,2}$ -kazeina B i C, a tylko w przypadku jednej rasy $\alpha_{s1,2}$ -kazeina D. Występowanie $\alpha_{s1,2}$ -kazeiny D stwierdził też K o n i n g (10).

Ciekawe wydają się ostatnie doniesienia A s c h a f f e n b u r g a (6), że w mleku krów wyhodowanych w Europie w przewodzie występują: β -kazeina A, κ -kazeina A i $\alpha_{s1,2}$ -kazeina B, natomiast w mleku indyjskiego bydła zebu oraz afrykańskiego Boran (Kenia) stwierdzono występowanie $\alpha_{s1,2}$ -kazeiny głównie pod postacią genetycznej odmiany C.

Stosowanie elektroforezy na żelu skrobiowym lub na żelu poliakrylamidowym do rozdzielenia κ -kazeiny nie dało tak zadawalających wyników jak w przypadku rozdzielenia β i α_s -kazeiny. N e e l i n (40), wprowadzając niskie stężenia cysteiny lub 2-merkaptotetanolu do buforu mocznikowego przy strefowej elektroforezie, stwierdził obecność tylko dwu genetycznych odmian κ -kazeiny: A i B. Wyniki te potwierdzili W o y c h l i k (78, 79) i S c h m i d t (58).

Z doświadczeń G r o s c l a u d e (23) wynika, że występowanie poszczególnych odmian genetycznych kazeiny zależy od struktury genetycznej poszczególnych osobników. Na przykład w mleku od krów rasy francuskiej *Montbéliarde* G r o s c l a u d e (22) stwierdził następującą częstotliwość kombinacji występowania poszczególnych odmian kazein:

$$\begin{array}{ll} \alpha_s^B \beta^A \kappa^A = 41,30\% & \alpha_s^B \beta^A \kappa^B = 29,30\% \\ \alpha_s^C \beta^A \kappa^A = 6,10\% & \alpha_s^C \beta^A \kappa^B = 2,80\% \\ \alpha_s^B \beta^B \kappa^A = 15,80\% & \alpha_s^B \beta^B \kappa^B = 2,90\% \\ \alpha_s^B \beta^C \kappa^A = 0,40\% & \alpha_s^B \beta^C \kappa^B = 1,40\% \end{array}$$

oraz $\alpha_s^C \beta^B \kappa^B$ mniej niż 0,10%.

Ciekawe są informacje o przenoszeniu u bydła z ojca na córki genów, warunkujących wytwarzanie odpowiednich odmian kazeiny (23, 32).

III. Niektóre właściwości fizyko-chemiczne poszczególnych frakcji kazein i ich odmian

1. Ruchliwość elektroforetyczna

Genetyczne odmiany poszczególnych frakcji kazeiny i innych białek mleka zidentyfikowano w oparciu o różnice ruchliwości elektroforetycznej. Jak podają T h o m p s o n i w s p. (68), zajmujący się nomenklaturą i klasyfikacją białek mleka komitet zalecił do identyfikacji frakcji kazeiny elektroforezę strefową na żelu skrobiowym w buforze o pH 8,6 według W a k e ' a i B a l d w i n a (86) lub według M c K e n z i e ' g o i W a k e ' a (30), bądź też na żelu poliakrylamidowym według P e t e r s o n a (47) lub A s c h a f f e n b u r g a (7). Według T h o m p s o n a (73) z doś-

wiadczeń sześciu poważnych ośrodków naukowych wynika, że zachowanie możliwie identycznych warunków elektroforezy ma szczególne znaczenie przy identyfikacji genetycznych odmian poszczególnych frakcji. Dla informacji podajemy względną ruchliwość elektroforetyczną niektórych frakcji kazeiny i ich odmian genetycznych (tablica 1).

Tablica 1

Względna ruchliwość elektroforetyczna $\alpha_{s1,2}$ i β -kazeiny

(72, 74)

Frakcje i ich odmiany genetyczne	Na żelu skrobiowym	Na żelu poliakrylamidowym
β -A	0,89	0,65
β -B	0,76	0,61
β -C	0,70	0,54
α_s -A	1,18	1,12
α_s -B	1,10	1,13
α_s -C	1,07	1,10

Ostatnio sygnalizuje się występowanie w mleku niektórych ras bydła α_s -D i β -D kazeiny. Nie określono jednak jeszcze dokładnie ich ruchliwości elektroforetycznej. Peterson i Kopfler (48) donieśli, że przy zastosowaniu elektroforezy w buforze o pH 3 można wykryć więcej genetycznych odmian β -kazeiny niż dotychczas oraz że ruchliwość elektroforetyczna, a tym samym i nomenklatura A, B, C, ustalone w środowisku zasadowym, nie pokrywają się z ruchliwością elektroforetyczną w środowisku kwaśnym. β -Kazeina A ma reprezentować 5 do 6 fenotypów (A, A', B, C, D, E).

2. Ciężar cząsteczkowy

Ciężary cząsteczkowe poszczególnych odmian kazeiny zestawiono w tablicy 2.

Różnice w ciężarze cząsteczkowym κ -kazeiny wynikają z faktu, że w pH około 7 występuje ona w postaci polimeru (63). Sweisgood i Brunner (63) uważają, że polimer κ -kazeiny zawiera w tych warunkach dwa lub więcej polipeptydowych łańcuchów, które są połączone mostkami dwusiarczkowymi. W obecności czynnika redukującego (2-merkaptoetanol) połączenia dwusiarczkowe rozpadają się i powstają 3 cząsteczki, każda o ciężarze cząsteczkowym około 20 000.

Poszczególne frakcje kazeiny charakteryzują się również różnymi punktami izoelektrycznymi i izojonowymi. Zittle i Custer (87) zaobserwowali, że punkt izoelektryczny κ -kazeiny odpowiada pH 3,7, a wartość punktu izojonowego sięga pH 5,1. W przypadku α_s -kazeiny punkt izoelektryczny przypada przy pH 4,4, punkt izojonowy natomiast przy pH 4,7.

Tablica 2

Ciężar cząsteczkowy α_s , β i κ -kazeiny oraz ich odmian genetycznych

	Ciężar cząsteczkowy	Pozycje literatury
Kompleks α -kazeiny	27 000	41
α_s -kazeiny mleka zbiorowego	27 000	83
α_s -kazeina A	30 020	36
	30 000	20, 26
	28 000	21
α_s -kazeina B	30 023	36
	30 000	20, 26
	28 000	21
α_s -kazeina C	29 926	36
	30 000	20 26
	28 600	21
β -kazeina mleka zbiorowego	25 000	45, 25, 41
	24 000	64
β -kazeina A	24 185—24 282	50
β -kazeina B	24 198—24 294	50
β -kazeina C	24 184—24 218	50
κ -kazeina	16 300	82
	19 000	58, 80, 81
	19 500	85
	24 000	62
	55 000	16
	60 000	63

Z doświadczeń Payena i Markwijk (45, 46, 51) oraz von Hippel i Waugh (25) wynika, że β -kazeina w miarę wzrostu temperatury ulega dysocjacji. W 4°C jest monomerem, w 8,5°C przy wyższych stężeniach białka asocjuje częściowo, a w 20°C występuje jako polimer. Według Garniera (16) β -kazeina w miarę wzrostu temperatury od 25° do 40° ulega przekształceniu z tak zwanej postaci I do postaci II. Przejście to jest procesem endotermicznym, całkowicie odwracalnym ($\Delta H = +30 \pm 3$ kcal/mol), przebiega szybko i jest analogiczne dla trzech genetycznych odmian β -kazeiny A, B i C. Tylko postać II ulega polimeryzacji i jest nierozpuszczalna w obecności małych stężeń jonów Ca^{2+} . Ma ona według Garniera (16) bardziej pofałdowaną strukturę niż forma I.

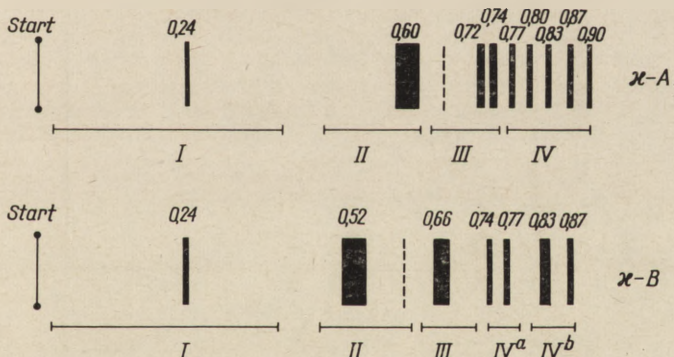
Payens (46) zakomunikował, że również α_{s1} -kazeina w środowisku o pH bliskim 6,5 ma zdolność do asocjacji, przy czym jej genetyczne odmiany B i C wykazują pewne zróżnicowanie. α_{s1} -kazeina C ulega w pH 6,5 szybkiej polimeryzacji. W miarę wzrostu temperatury (z 2,9° do 14°C) wzrasta liniowo ciężar cząsteczkowy tej odmiany genetycznej. Ciężar cząsteczkowy polimeru wynosi $113\,000 \pm 3000$ i Payens sugeruje, że w tych warunkach α_{s1} -kazeina C występuje jako pentomer. α_{s1} -Kaze-

ina B jest mniej podatna do polimeryzacji. Ciężar cząsteczkowy polimeru α_{s1} -kazeiny B wynosi 90 000. W 1% buforze fosforanowym o pH 7 w temperaturze 5°C α_s -kazeina otrzymana według Hippel'a (25) daje tylko jeden szczyt sedymentacji ($S_{20} = 5,2$), w temperaturze 85°C zaś otrzymuje się jeszcze dwa szczyty sedymentacji ($S_{20} = 4,9$ i 2,1), przy czym termicznie zmiany są łatwo odwracalne (31).

3. Właściwości fizyko-chemiczne κ -kazeiny

W 1956 roku Waugh i Hippel (82) otrzymali z mleka frakcję kazeiny o niskiej zawartości fosforu, rozpuszczalną w obecności jonów Ca^{2+} i zdolną do stabilizacji α_{s1} -kazeiny w obecności tych jonów i nazwali ją κ -kazeiną. Właściwości fizyko-chemiczne tej frakcji są jeszcze prawie nie znane. Ribadeau-Dumas i Veaux (56) wykazali, że kolostrum (siara) zawiera znacznie więcej κ -kazeiny niż mleko normalne (około 35% ogólnej zawartości białek) oraz, że κ -kazeina siary charakteryzuje się wyższą zawartością kwasu siałowego.

W środowisku o pH 7 κ -kazeina poddana ultrawiroowaniu sedymentuje jako polimer ($S_{20} \sim 13$), natomiast w środowisku kwaśnym występuje jako monomer. Natywne κ -kazeina bardzo trudno ulega rozdzielaniu elektroforetycznemu. Redukcja obecnych w κ -kazeinie grup dwusiarczkowych polepsza jej rozdział elektroforetyczny. Neelin (40)



Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny κ -kazeiny A i B według (58)

0,6 i 0,52 odpowiadają frakcjom podstawowym κ -kazeiny. Cyfry rzymskie odpowiadają szczytom otrzymanym na drodze chromatografii kolumnowej z DEAE-celulozą

i równocześnie Schmidt (59), wprowadzając niskie stężenia 2-merkaptoetanolu do roztworu mocznika, wykazali, że κ -kazeina jest też niejednorodna oraz, że w obrębie odmian genetycznych tej frakcji występuje różna ilość podfrakcji. Schmidt (64) wykazał, że dodatek 2-merkaptoetanolu do buforów pozwala na zadowalający rozdział κ -kazeiny na kolumnie z DEAE-celulozą (rysunek 3).

Woychik i Kalan (79) otrzymali trwale preparaty karboksy-

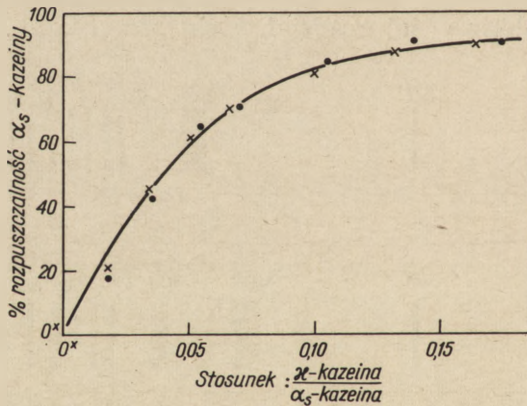
amidoetylo- κ -kazeiny (CAM- κ) poprzez alkilowanie za pomocą jodoacetamidu uprzednio zredukowanej 2-merkaptoetanolem κ -kazeiny. CAM- κ -kazeina okazała się w tym samym stopniu podatna na działanie podpuszczki co natywna κ -kazeina. W a k e (85) otrzymał trwały preparat S-karboksymetylo- κ -kazeiny o własnościach podobnych do CAM- κ -kazeiny.

4. Rola κ -kazeiny w tworzeniu kompleksów

α_s -Kazeina nietrwała w obecności jonów wapnia i ulegająca całkowitemu wytrąceniu już przy stężeniu 0,01 M CaCl_2 jest stabilizowana przez κ -kazeinę (72, 87). Stopień trwałości α_s -kazeiny w roztworze zależy także od stężenia jonów wodorowych.

Według Thompsona i Kiddy (72) α_{s1} -kazeiny B i C są jednako stabilizowane przez κ -kazeinę przy tym samym stosunku ilościowym κ/α_{s1} , natomiast α_{s1} -kazeina A wykazuje raczej większą stabilność. α_{s1} -Kazeina A prawdopodobnie silniej reaguje z κ -kazeiną, tworząc bardziej stabilną micellę wobec Ca^{2+} niż κ -kazeina z α_{s1} -B lub α_{s1} -C.

Ciekawe są obserwacje (14), że ochronne działanie κ -kazeiny w stosunku do α_{s1} -kazeiny wobec jonów wapniowych zależy od kombinacji jonów Ca^{2+} z innymi związkami i od sposobu chłodzenia roztworu. Na



Rys. 4. Zdolność rozpuszczania α_s -kazeiny

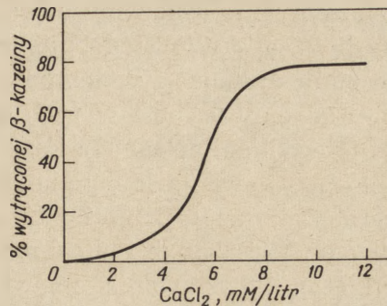
● — przez natywną κ -kazeinę —X— — przez cyjanometylo- κ -kazeinę
Według (81)

uwagę zasługuje też fakt, że κ -kazeina strącona alkoholem wykazuje słabe zdolności stabilizowania α_s -kazeiny (87). Z drugiej strony CAM κ -kazeina (79) stabilizuje α_{s1} -kazeinę w takim samym stopniu jak natywna κ -kazeina (rysunek 4).

Nakai i wsp. (44) wykazali, że łagodnie przeprowadzone utlenianie reszt tryptofanu w κ -kazeinie powoduje tylko nieznaczne zmiany w cząsteczkach tej frakcji kazeiny i nie zmienia zdolności do stabilizowania α_{s1} -kazeiny wobec Ca^{2+} .

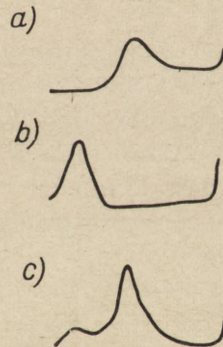
W wyższej temperaturze również i β -kazeina potrzebuje do swej stabilizacji obecności κ -kazeiny (88). W temperaturze 0—5°C β -kazeina jest całkowicie rozpuszczalna w obecności jonów Ca^{2+} , natomiast w temperaturze 35—37° rozpuszcza się tylko 0,2 g/l w 0,03 M CaCl_2 (rysunek 5).

Wiadomo również, że α_{s1} i β -kazeiny ulegają asocjacji z κ -kazeiną, dając kompleks zdolny do polimeryzacji i tworzenia micelli w obecności



Rys. 5. Strącanie β -kazeiny (0,15% roztwór) przez CaCl_2 w pH 6,7 i 30°C
Według (88)

jonów wapniowych. Zdolność do asocjacji α_{s1} -kazeiny z κ -kazeiną (rysunek 6) pierwsi zaobserwowali Gilbert i Jenkins (19), co następnie potwierdzili inni autorzy (15, 82).



Rys. 6. Diagramy z ultrawiwrowania kazeiny κ i α_s i ich mieszaniny
Według (15)

a. κ -kazeina (3,8 mg/ml). Fotografowano po 60 min. (kąąt 45°) b. α -kazeina (3,2 mg/ml). Fotografowano po 64 min. (kąąt 55°) c. Mieszanina κ -kazeiny z α -kazeiną. Fotografowano po 60 min. (kąąt 45°). κ -kazeina 3,8 mg/ml, α -kazeina 3,2 mg/ml. Szybkość 39 460 obr/min, temperatura 25,5°C (dla b — 25,5°C, 0,1M NaCl, pH 6,95)

Garnier (16) doniósł, że w miarę asocjacji α_{s1} lub β -kazeiny z κ -kazeiną absorbcja światła dla tyrozyny ulega tłumieniu. Zaobserwowano również przesunięcie barwy w kierunku czerwieni (ang. *bathochromic shift*) i wzrost intensywności absorbcji podczas mieszania κ -kazeiny z α_{s1} lub β -kazeiną, nie stwierdzono natomiast zmian w skręcalności optycznej roztworów tych białek. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie,

że κ -kazeina jest wiązana mostkami wodorowymi poprzez reszty tyrozyny z grupami karboksylowymi α_{s1} lub β -kazeiny.

Nakai i wsp. (44) przychylają się jednak do hipotezy Hill i Laing (83), że stabilizujące oddziaływanie κ -kazeiny wobec α_{s1} -kazeiny warunkują histydyna lub hydroksy aminokwasy.

W 0,1 M roztworze NaCl o pH 7 powstaje pojedynczy kompleks między jedną cząsteczką α_{s1} -kazeiny lub β -kazeiny a jedną cząsteczką κ -kazeiny. Wiązania z α_s -kazeiną są prawdopodobnie bardziej trwałe niż z β -kazeiną. Ustalono, że stała dysocjacji w temperaturze 35°C dla pojedynczego kompleksu α_s - κ -kazeiny wynosi w tych warunkach $0,3 \cdot 10^{-5}$ g/l. W przypadku pojedynczego kompleksu β - κ -kazeiny stała dysocjacji wynosi $0,7 \cdot 10^{-5}$ g/l. Ciepło powstawania kompleksów α_2 - κ i β - κ -kazeiny praktycznie równa się zeru. Całkowita przemiana wolnej energii $\Delta F_{35^\circ\text{C}}$ dla kompleksu α_s - κ -kazeiny wynosi 6350 ± 150 cal/mol (15), a dla β - κ -kazeiny 5500 ± 300 cal/mol (18). Powstawanie omawianych kompleksów jest zatem związane z przemianami wewnątrzcząsteczkowymi.

Zainteresowanych szczegółami, dotyczącymi zdolności stabilizowania α_{s1} -kazeiny przez κ -kazeinę oraz mechanizmem powstawania micelli kazeinowych i ich struktury, odsyłamy do ostatnio opublikowanych prac Waugh i Noble (43, 84).

5. Stabilność termiczna niektórych frakcji kazeiny

Tessier i Rose (67) zaobserwowali dwa typy mleka różniące się odpornością na ogrzewanie w 140°C: typ A charakteryzujący się najmniejszą stabilnością w tej temperaturze w zakresie pH 6,4 do 7,1 oraz typ B, którego stabilność stopniowo rosła w tym zakresie pH. Mniej więcej 2/3 przebadanych krów dawało mleko typu A, chociaż w trzech przypadkach stwierdzono również występowanie mleka typu pośredniego. Dodatek κ -kazeiny do mleka typu A obniżał lub całkowicie znosił labilność cieplną w zakresie pH 6,4—7,1, przy czym dodatni wpływ κ -kazeiny był wyraźnie zależny od początkowej jej zawartości w badanym mleku. Analizowane próby mleka typu A i B nie różniły się między sobą pod względem zawartości β i α_s -kazeiny, jak również dodatek β i α_s -kazeiny do obydwu typów mleka nie zmieniał pierwotnych jego właściwości. Tessier i Rose są zdania, że stabilność termiczna mleka zależy od stosunku κ -kazeiny, występującej na powierzchni micelli kompleksu kazeiny, do rozpuszczalnej β -laktoglobuliny. Po usunięciu części κ -kazeiny z powierzchni micelli mleko typu B upodobało się pod względem termicznej stabilności do mleka typu A. Jednak również wielkość micelli fosfokazeinianu wapnia wywiera wyraźny wpływ na termiczną stabilność mleka (67). Mleko, którego micelle trudniej ulegają sedymentacji podczas wirowania (30 000 obr./min, rotor Nr 30, Spinco L), wykazuje termiczną stabilność zbliżoną do mleka typu B.

Tarassuk i Nury (66) wykazali, że lekkie „zestarczenie” się κ -kazeiny lub nieznaczny jej rozkład, wywołany przez enzymy (prawdopodobnie przez neuramidazę) (75), w dużym stopniu decyduje o termicznej stabilności białek mleka.

Ostatnio Schmidt i Koops (60) sugerują, że mleko zawierające κ -kazeinę B wykazuje przy przerobieniu na mleko zgęszczone maksimum stabilności termicznej w niższym zakresie pH niż mleko zawierające κ -kazeinę A.

Kirchmeier (33) dowodzi, że na stabilność termiczną mleka znacznie wpływają kwas glutaminowy i fosforowy zawarte w kazeinie. Wyższe zawartości obu tych związków w cząsteczce kazeiny obniżają termiczną stabilność mleka. Autor ten zaobserwował znaczne wahania sezonowe zarówno w zawartości kwasu glutaminowego jak i fosforu w kazeinie mleka krowiego (34).

IV. Biochemiczne właściwości frakcji kazein

1. Chemiczna charakterystyka α_s , β i κ -kazeiny

Dociekliwe badania Thompsona i wsp. (72, 76) oraz Koninga i Rooijena (36) ujawniły, że frakcje $\alpha_{s1,2}$ i β -kazeiny różnią się w niewielkim tylko stopniu zawartością azotu, natomiast w dużym — zawartością fosforu. Bardziej jeszcze interesujące są obserwacje tychże autorów świadczące, że w obrębie genetycznych odmian tak α_s jak i β -kazeiny istnieją różnice w zawartości azotu, a genetyczne odmiany β -kazeiny różnią się z kolei tylko w niewielkim stopniu zawartością fosforu (tablica 3).

Stwierdzono też w przypadku poszczególnych frakcji różnice w ilości reszt aminokwasowych w cząsteczce oraz w N i C końcowych aminokwasów. Według Thompsona i Kiddy (72) w $\alpha_{s1,2}$ -kazeinie i jej genetycznych odmianach arginina występuje jako N-końcowy, a tryptofan jako C-końcowy aminokwas. Mellon i wsp. (38) podają dla β -kazeiny argininę i lizynę jako końcowe aminokwasy, chociaż opublikowane ostatnio przez Kalana i wsp. (28) dane stwierdzają, że w przypadku β -kazeiny tylko arginina występuje jako N-końcowy aminokwas. Ci sami autorzy sugerują, że w β -kazeinie występuje Ileu-Ileu-Wal lub Ileu-Wal-Ileu jako C-końcowa sekwencja aminokwasów. Traktując oddzielnie karboksypeptydazą A poszczególne odmiany genetyczne β -kazeiny, stwierdzili oni wyraźne różnice w ilości uwalnianej izoleucyny i waliny z tym, że z β -kazeiny C otrzymali najmniejsze ilości tych aminokwasów.

W tablicy 4 przedstawiono całkowitą zawartość reszt aminokwasowych, jak również indywidualne różnice w składzie aminokwasowym poszczególnych odmian genetycznych kazeiny.

Tablica 3

Zawartość azotu i fosforu w poszczególnych odmianach genetycznych $\alpha_{s,1,2}$ i β -kazeiny wg różnych autorów ^{a b c d e}

Odmiana genetyczna	Azot (%)	Fosfor (%)	Stosunek P/N	Atomów P w drobinie kazeiny
α_s -A	15,10 ^a , 14,36 ^b	1,01 ^a ; 1,12 ^c	0,067 ^a	9 ^a (ciężar cząsteczkowy 27500)
α_s -B	15,34; 14,30	1,01; 1,12	0,066	9
α_s -C	15,40; 15,01	1,01; 1,12	0,065	9
β -A	15,18 ^a ,	0,59 ^a ; 4,5 ^d	0,039 ^a	4,8 ^a (ciężar cząsteczkowy 25 000)
β -B	15, 3;	0,57; 4,4	0,037	4,6
β -C	15,45;	0,50; 4,3	0,032	4,0
κ -kazeina* całkowita	15,4 ^e ;	0,30 ^e	0,019 ^e	

* κ -kazeina zawiera dodatkowo 1,94 kwasu siarowego (94).

^a-76, ^b-36, ^c-61, ^d-50, ^e-87

Rozpatrując całkowitą ilość reszt aminokwasowych dla poszczególnych frakcji kazein, dochodzi się do wniosku, że mimo wyraźnych różnic między α_s , β i κ -kazeiną ich genetyczne odmiany nie różnią się w sposób istotny między sobą. Analizując jednak ilość reszt aminokwasów w obrębie genetycznych odmian danej frakcji stwierdza się nieco ciekawsze fakty. K o n i n g i v o n R o o i j e n (36) podają, że α_s -kazeina C zawiera o jedną resztę kwasu glutaminowego więcej, natomiast o jedną resztę glicyny mniej niż α_s -kazeina B. Autorzy ci nie zaobserwowali różnic w występowaniu tych aminokwasów w β -kazeinie D, chociaż K o n i n g (35) wysuwa przypuszczenie, że między tymi odmianami występują różnice w resztach kwasu glutaminowego i asparaginowego. Bardziej szczegółowe dane dotyczące składu aminokwasowego frakcji kazein znajdzie czytelnik w literaturze podanej w tablicy 4.

Na podstawie różnic w składzie aminokwasów poszczególnych odmian genetycznych kazeiny wymienieni autorzy zgodnie przypuszczają, że różnice te są zdeterminowane genetycznie swoistą sekwencją nukleotydów w spirali kwasu rybonukleinowego (tak zwanym kodem genetycznym). Dla β -kazeiny proponuje się następujący układ (40):

β -kazeina	aminokwasy	kod genetyczny
A	-Glu—Arg—Glu(NH ₂)-	..GAA..CGA..CAA..
B	-Glu—Arg—Arg-	..GAA..CGA..CGA..
C	-Liz—Arg—Glu(NH ₂)	..AAA..CGA..CAA

Mutację aminokwasów Glu/Gli w α_s -kazeinie mają warunkować trójki nukleotydów AAG/GAG (35).

K o n i n g (35) trawiąc β -kazeinę typu A i B trypsyną, otrzymał z genetycznej odmiany B — bogatszej o jedną resztę argininy — o jeden peptyd więcej i zaproponował dla niego następującą budowę: Ser (Leu. 2.Glu.Liz.Tre.Glu.2.Gli.Ser.3) Arg.

Jak wiadomo κ -kazeina zawiera w swej drobinie również glukozę (glikopeptyd), która, jak wykazano (55), związana jest tylko z jednym składnikiem tejże kazeiny. Składnik ten wędruje w pierwszej kolejności podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w buforze Tris-EDTA-boraks-8M mocznik o pH 9,2. Również glikomakropeptyd otrzymany przez potraktowanie κ -kazeiny podpuszczką wykazał na elektroforogramie obecność glukozy w tym samym położeniu w jakim wykazuje ją natywna κ -kazeina. Potraktowanie κ -kazeiny neuramidazą stopniowo obniża ruchliwość elektroforetyczną składnika zawierającego cukry, a w końcu prowadzi do jego całkowitego zaniku na elektroforogramie (brak zabarwienia z czernią amidową). Działanie neuramidazy podczas dłuższego składowania mleka przeznaczonego do produkcji mleka zagęszczonego obniża już wspomnianą termiczną stabilność kazeiny.

Tablica 4

Ilość reszt aminokwasowych w drobinie poszczególnych frakcji kazein i ich genetycznych odmian

Frakcje kazeiny	Liczba aminokwasów w cząsteczce	Reszty amionokwasów w cząsteczce	Obliczono według ciężaru cząsteczkowego	Pozycje literatury
α_s -kazeina A	17	231; —	28 000; —	21
α_s -kazeina B	17	236; 246	28 600; 30 020	21, 36
α_s -kazeina C	17	238; 246	28 600; 30 013	21, 36
α_s -kazeina BC	17	— 245	— 29 296	36
β -kazeina A	17	209—210	24 185—24 292	50, 51
β -kazeina B	17	209—210	24 194—24 292	50, 51
β -kazeina C	17	209—210	24 184—24 281	50, 51
κ -kazeina A	18 ^{xxx}	165—168; 161—166	19 000	29, 80, 58
κ -kazeina B	18	166—137; 163—167	19 000	29, 80, 58
S-cyjanometylo- κ -kazeina ^x	16 ^{xx}	152	?	79
S-karboksyamido- metylo- κ -kazeina	16 ^{xx}	158,6	17 800 κ -kazeina A	79
parakazeina ^x	17	116—117	18 400 κ -kazeina B	79
glikomakropeptyd ^x	12	44—46	13 500	39
			5 000	29

^x — z wyjątkiem tryptofanu; ^{xx} — zawartość cystyny = 0
^{xxx} — obecność cystyny stwierdzono tylko w κ -kazeinie

2. Fizykochemiczne i biochemiczne zmiany w kazeinie pod wpływem podpuszczki

Po potraktowaniu kazeiny podpuszczką wydziela się z roztworu kazeiny lub z mleka tak zwana parakazeina. Wydzielanie z roztworu kazeiny całkowitej względnie α_s lub β -kazein w formie parakazeiny wymaga obecności jonów wapniowych, natomiast κ -parakazeina może się wydzielić również bez udziału tych jonów.

κ -Kazeina atakowana jest przez podpuszczkę już w tak zwanej enzymatycznej (utajonej) fazie podpuszczkowego krzepnięcia mleka. W czasie trwania tej fazy w środowisku o pH 6,8 do 7 uwalnia się z każdego grama kazeiny całkowitej $1,5 \cdot 10^{-6}$ mola H^+ , podczas działania enzymu na samą κ -kazeinę stwierdzono natomiast uwolnienie $1,8 \pm 0,35 \cdot 10^{-5}$ mola H^+ na 1 g κ -kazeiny. Zaobserwowano jednak, że w zakresie pH 5,4 do 7,4 ilości uwalnianego H^+ jest stała w obu przypadkach, a różnice mieszczą się w granicach błędu metody (17).

Bez względu na ilość podpuszczki dodanej do roztworu κ -kazeiny powstaje w fazie krzepnięcia nierozpuszczalna frakcja białka, zawierająca wszystkie aminokwasy siarkowe i aromatyczne oraz całą ilość histydyny i argininy, jakie były obecne w rodzimej κ -kazeinie. Równocześnie powstaje frakcja rozpuszczalna w 12% kwasie trójchlorooctowym, κ -kazeinoglikopeptyd, nazywany również glikomakropeptydem o ciężarze cząsteczkowym około 8000 (27).

κ -Kazeinoglikopeptyd zawiera prawie całą ilość cukrów występujących w rodzimej κ -kazeinie (27) i całą ilość kwasu siałowego (9, 10). Pewne dane wskazują, że κ -kazeina zawiera wiązania specjalnie wrażliwe na działanie podpuszczki, prawdopodobnie wiązanie estrowe między grupą karboksylową C-końcowej reszty fenyloalaniny a grupą hydroksylową cukru. Autorzy przedstawili nawet schemat struktury κ -kazeiny, wskazując ewentualne miejsce wrażliwego wiązania estrowego.

Garnier i wsp. (17) uważają również, że podpuszczka rozkłada w κ -kazeinie wiązania typu estrowego. Przypuszczają jednak, że podpuszczka rozluźnia wiązania estrowe, w których grupa karboksylowa jest zjonizowana. Określili oni również energię aktywacji potrzebną dla rozerwania tego wiązania estrowego jako równą 6500 ± 700 cal/mol, to jest bliską wartości energii potrzebnej do hydrolizy wiązania estrowego przez esterazę.

Z niedawno opublikowanego doniesienia Delfour i wsp. (13) wynika, że κ -kazeinoglikopeptyd zawiera bardzo nietrwałe reszty metioniny, łatwo utleniające się w czasie hydrolizy kwasowej do sulfotlenku metioniny. Autorzy przypuszczają, że reszty metioniny występują jako końcowe w cząsteczce glikomakropeptydu i są poprzedzane przez alaninę. Zastrzegają jednak, że konieczne są dalsze badania w celu ustalenia czy grupy karboksylowe fenyloalaniny i reszty metioniny są ze sobą powiązane, czy też nie. Jedno, co, jak się wydaje, zostało ostatecznie

stwierdzone, to fakt, że jedynie κ -kazeina ulega degradacji podczas wstępnej fazy działania podpuszczki na kazeinę. Produkty degradacji κ -kazeiny nie mają już właściwości koloidu ochronnego wobec działania jonów Ca^{2+} . Po destrukcji κ -kazeiny spolimeryzowany kompleks α , β i κ -kazeiny koaguluje w postaci spolimeryzowanego kompleksu parakazeiny (fosforoparakazeinian wapniowy (15,1). Biorąc pod uwagę obserwacje o koagulowaniu κ -kazeiny w nieobecności jonów wapniowych (42, 82) i stwierdzenie, że z chwilą dodania podpuszczki do roztworu α_s i κ -kazeiny bardzo szybko powstaje odpowiedni kompleks (15) należy przypuszczać, że rola jonów wapniowych sprowadza się najprawdopodobniej do wytrącenia tegoż kompleksu z roztworu.

Kompleks α_s i κ -kazeiny powstaje znacznie szybciej niż kompleks enzym-substrat. W temperaturze 35°C jedna gramocząsteczka podpuszczki hydrolizuje jedną gramocząsteczkę κ -kazeiny w czasie około 0,01 sekundy. Obserwacja ta wyjaśnia dobrze znany w praktyce fakt, że drobne ilości enzymu są całkowicie wystarczające do uzyskania skrzepu. Tak szybkie powstawanie kompleksu α_s - κ lub β - κ -kazeiny zabezpiecza przed wytrąceniem samej para- κ -kazeiny i może być tłumaczone tym, że uwolnione z wiązania estrowego grupy karboksylowe lub rozluźnione wiązania imidowe grają rolę w powstawaniu nitek para- κ -kazeiny.

3. Oddziaływanie niektórych enzymów proteolitycznych na kazeinę

Pewne enzymy pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego oprócz katalizowania procesów proteolizy wykazują właściwości koagulowania kazeiny. Jedne z nich koagulują kazeinę, wykazując ograniczone działanie proteolityczne, inne natomiast, dokonując obu przemian równocześnie, doprowadzają w krótkim stosunkowo czasie do bardzo daleko posuniętej degradacji białek kazeiny. Dla przykładu przytaczamy w tabelicy 5 ciekawe doświadczenia Tsugo i Yamauchi (77), w których mleko o pH 6,85 traktowano różnymi enzymami zdolnymi do koagulacji kazeiny.

Z wymienionych w tabelicy 5 enzymów tylko krystaliczna podpuszczka i pepsyna mają w tym zakresie pH selektywną zdolność proteolizy kazeiny, to znaczy, że w procesie krzepnięcia mleka wywołanego ich działaniem tylko κ -kazeina ulega proteolizie, pozostałe zaś frakcje kazeiny pozostają nienaruszone (1, 36, 38).

Oczywiście w przypadku zanieczyszczenia handlowej podpuszczki innymi enzymami proteolitycznymi degradacja w czasie koagulacji kazeiny bywa dalej posunięta (65). W miarę spadku pH środowiska zarówno podpuszczka jak i pepsyna coraz wyraźniej trawią pozostałe frakcje kazeiny, przy czym podpuszczka najintensywniej rozkłada kazeinę w pH 4,9—5,5 (2). Najbardziej oporną na działanie podpuszczki okazała się

Tablica 5

Koagulacja białek mleka przez niektóre enzymy pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego (77)

Enzym i pochodzenie	% skoagulowanych białek mleka	
	po 15 min.	po 2 godz.
Podpuszczka krystaliczna	69,8	69,7
Pepsyna krystaliczna	69,8	69,8
Chymotrypsyna krystaliczna	54,7	32,8
Ficyna (wyciąg roślinny)	66,6	64,3
Proteaza krystaliczna z <i>Aspergillus oryzae</i>	60,6	41,0
Proteaza krystaliczna ze <i>Streptomyces griseus</i>	62,9	44,7
Proteaza krystaliczna z <i>Bacillus subtilis</i>	57,9	35,5
Proteaza z <i>Pseudomonas myxogenes</i>	67,1	62,2

β -kazeina, podczas gdy w takich samych warunkach α -parakazeina najwcześniej ulega degradacji (37, 52).

W odmienny sposób działają na kazeinę enzymy proteolityczne pochodzenia bakteryjnego. Jak wynika z doświadczeń Annibaldi (3) enzymy bakterii nie wytwarzających kwasu mlekowego (jak np. *Alkaligenes* i *Bacillus subtilis*) intensywniej trawią kazeinę. Według V a n d e r Z a n t a (89) zewnątrzkomórkowe enzymy *Pseudomonas putrefaciens* wykazuje optimum proteolizy α i β -kazeiny oraz laktoalbuminy w pH 7—7,5. Potwierdzili to P e t e r s o n i G u n d e r s o n (49), którzy przeprowadzili proteolizę kazeiny za pomocą zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych układów proteolitycznych *Pseudomonas fluorescens*. A m u n s t a d (1) poprzez macerację gliceryną suchej masy komórek bakterii wytwarzających kwas mlekowy otrzymał aktywne preparaty enzymatyczne. Oznaczając po inkubacji kazeiny z tymi preparatami N-rozpuszczalny w wodzie i N-aminowy stwierdził on (2) dla *Streptococcus diacetilactis* i *Lactobacillus casei* maksimum aktywności proteolitycznej w granicach pH 6 do 6,8. Wykazał też, że słabą zdolność proteolizy posiadały preparaty uzyskane ze *Streptococcus lactis* i *Streptococcus diacetilactis*, a stosunkowo wysoką aktywność preparaty z jednego szczepu *Bacterium cremoris*. B o t t a z z i (12), P o z n a ń s k i i w s p. (53, 54) również uzyskali dane świadczące, że układy enzymatyczne *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* wykazują ograniczoną zdolność trawienia kazeiny. Ostatnio podobne wyniki uzyskali też H a m m o n d i w s p. (24), zadając wyjałowione mleko zawiesiną komórek różnych bakterii.

Zant i Nelson (90), śledząc trawienie kazeiny przez wewnątrzkomórkowy enzym *Streptococcus lactis*, stwierdzili dwa optima: pierwsze główne w pH 7,0, a drugie mniej wyraźne w pH 5,5. W tym samym zakresie pH drugie optimum aktywności enzymu *Streptococcus lactis* stwierdzili też Baribo i Foster (8). Doświadczenia własne (53, 54), przeprowadzone na kazeinie w zakresie pH odpowiadającego drugiemu optimum (pH 5,6) wykazały, że w porównaniu do krystalicznej podpuszczki wewnątrzkomórkowe enzymy *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus* mają słabą zdolność degradacji białek kazeiny. Śledząc stopień degradacji poszczególnych frakcji kazeiny pod wpływem tych preparatów enzymatycznych stwierdzono, że najintensywniejszej proteolizie w pH 5,6 uległa κ -kazeina (52, 53, 54).

LITERATURA

1. Alais Ch., Science du Lait et Principes des Techniques Laitières, Editions (sep) Publicité Paris, 1961.
2. Amunstad O., Meddelande Nr 28 Från Statens Mejeriforsok, Malmo, 1950.
3. Annibaldi S., XVI Int. Dairy Congr. IV—I, Copenhagen, 545, 1962.
4. Aschaffenburg R., Drewry N., *Nature* **180**, 376 (1957).
5. Aschaffenburg R., *Nature* **192**, 431 (1961).
6. Aschaffenburg R., Casein Polymorphisms. Réunion sur les Caséines; C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965, Wydanie specjalne.
7. Aschaffenburg R., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 188 (1964).
8. Baribo L. E., Foster E. N., *J. Dairy Sci.* **35**, 149 (1952).
9. Beeby R., Study of the κ -casein complex. Réunion sur les Caséines, C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
10. Beeby R., *J. Dairy Res.* **32**, 57 (1965).
11. Bell K., *Nature* **195**, 705 (1962).
12. Bottazzi V., XVI Int. Dairy Congr. IV—I, Copenhagen, 522, 1962.
13. Delfour A., Jolles J., Alais Ch., Jolles P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 452 (1965).
14. El-Negoumy, *J. Dairy Sci.* **48**, 780 (1965).
15. Garnier J., Yon J., Mocquot G., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 481 (1964).
16. Garnier J., α_s , β and κ -casein associations and some transconformations in β -caseins. Réunion sur les Caséines C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22. X.1965.
17. Garnier J., Mocquot G., Brignon G., *Extrait des Comptes Rendus des Séances de l'Académie de Science* **254**, 372 (1962). L'Académie de Science, Paris.
18. Garnier J., Ribadeau-Dumas B., Brignon G., Abstracts Sixth Inter. Congress of Bioch., New York City (1964).
19. Gilbert G. A., Jenkins R. C., *Nature* **177**, 853 (1956).
20. Gordon W. G., Basch J. J., *Federation Proc.* **22**, 657 (1963).
21. Gordon W. G., Basch J. J., Thompson M. G., *J. Dairy Sci.* **48**, 1010 (1965).
22. Grosclaude F., Recherches sur les variations héréditaires des caséines dans les races bovines françaises. Réunion sur les caseines; C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.

23. Grosclaude F., *C. R. Acad. Sci. Paris* **259**, 1569 (1964).
24. Hammond E. G., Scals R. G., Reinhold G. W., *J. Dairy Sci.* **49**, 504 (1966).
25. Hippel von P. H., Waugh D. F., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 4311 (1955).
26. Hipp N. J., Groves M. L., Luster J. H., Mc Meekin T. L., *J. Dairy Sci.* **35**, 272 (1952).
27. Jolles R., Alais Ch., Jolles J., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 511 (1963).
28. Kalan E. B., Thompson M. P., Greenberg R., Pepper L., *J. Dairy Sci.* **48**, 884 (1965).
29. Kalan E. B., Woychik J. H., *J. Dairy Sci.* **48**, 1423 (1965).
30. Kenzie Mc H. A., Wake R. G., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 240 (1961).
31. Kenkore D. B., Hansen P. M. T., Gould J. A., *Dairy Sci. Abstr.* **27**, 11 (1965).
32. Kiddy C. A., Johnston J. O., Thompson M. P., *J. Dairy Sci.* **47**, 147 (1964).
33. Kirchmeier O., *Milchwiss.* **20**, 448 (1965).
34. Kirchmeier O., Chemische Zusammensetzung und physikochemische Eigenschaften des Caseins. Réunion sur les Caseines; C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
35. Koning P. J., Amino Acid Composition of the Genetic Variants of α_{s1} -caseine B, C, BC and D. Réunion sur les Caseines C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
36. Koning P. J., von Rooijen P. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 241 (1965).
37. Lindquist B., Storgårds T., XVI Int. Dairy Congress, Copenhagen, IV.1, 665 (1962).
38. Mellon E. F., Korn A. H., Hoover S. R., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1675 (1953).
39. Mocquot G., Garnier J., *Agricul. Food Chem.* **13**, (5), 414 (1965).
40. Neelin J. M., *J. Dairy Sci.* **47**, 506 (1964).
41. Nielsen H. C., Cillevik H. A., *J. Dairy Sci.* **40**, 598 (1957).
42. Nitschmann H., Beeby R., *Chimia* **14**, 318 (1960).
43. Noble R. W., Waugh D. F., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2236 (1965).
44. Nakai S., Wilson H. K., Herreid E. O., *J. Dairy Sci.* **49**, 469 (1966).
45. Payens T. A. J., Van Markwijk B. W., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 517 (1963).
46. Payens T. A. J., Association studies of α_{s1} -casein A and B. Réunion sur les Caseines; C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
47. Peterson R. F., *J. Dairy Sci.* **46**, 1136 (1963).
48. Peterson R. F., Kopfler F. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, (4), 388 (1966).
49. Peterson A. C., Gunderson M. P., *Appl. Microbiol.* **8**, (2), 98 (1960).
50. Pion R., Garnier J., Ribaeau-Dumas B., Koning P. J., Van Rooijen P. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20** (30), 246 (1965).
51. Pion R., Composition on Acides Amines des Variants Genetiques de la Caséine β . Réunion sur les Caseines; C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
52. Poznański S., *Milchwiss.* **19**, 425 (1964).
53. Poznański S., Lenoir J., Mocquot G., *Le Lait* **441—442**, 3 (1965).
54. Poznański S., Studia nad proteolizą kazeiny przez proteiny. WSR Olstyn, 1965. Wydanie specjalne.
55. Purkayasthe R., Rose O., *Dairy Sci.* **3**, 1419 (1966).

56. Ribadeau-Dumas B., Veaux M., *J. Dairy Res.* **31**, 189 (1964).
57. Ribadeau-Dumas B., Maubois J. L., Mocquot G., Garnier J., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 494 (1964).
58. Schmidt D. G., Purification of genetic variants of α -casein. Réunion sur les Caseines; C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
59. Schmidt D. G., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 411 (1964).
60. Schmidt D. G., Koops J., *Neth. Milk Dairy J.* **19**, 63 (1965).
61. Schmidt D. G., Payens T. A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 492 (1963).
62. Swaisgood H. E., Brunner J. R., *J. Dairy Sci.* **45**, 1 (1962).
63. Swaisgood H. E., Brunner J. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 148 (1963).
64. Sullivan R. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **55**, 455 (1955).
65. Świątek A., Poznański S., Cesul J., *Prace Inst. Przem. Mlecz.* **8**, (20), 11 (1961).
66. Tarassuk N. P., Nury M. S., *J. Dairy Sci.* **35**, 857 (1952).
67. Tessier H., Rose D., *J. Dairy Sci.* **47**, 1047 (1964).
68. Thompson M. P., Tarassuk N. P., Jenness R., Lillevik H. A., Ashworth C. S., Rose D., *J. Dairy Sci.* **48**, 159 (1965).
69. Thompson M. P., Kiddy C. A., Pepper L., Zittle C. A., *J. Dairy Sci.* **45**, 650 (1962).
70. Thompson M. P., Kiddy C. A., Pepper L., Zittle C. A., *Nature* **195**, 1001 (1962).
71. Thompson M. P., Kiddy C. A., Johnston J. O., Weinberg R. M., *J. Dairy Sci.* **47**, 378 (1964).
72. Thompson M. P., Kiddy C. A., *J. Dairy Sci.* **47**, 626 (1964).
73. Thompson M. P., *J. Dairy Sci.* **47**, 1261 (1964).
74. Thompson M. P., Pepper L., *J. Dairy Sci.* **47**, 633 (1964).
75. Thompson M. P., Pepper L., *J. Dairy Sci.* **45**, 794 (1962).
76. Thompson M. P., Pepper L., *J. Dairy Sci.* **47**, 293 (1964).
77. Tsugo T., Yamauchi K., XV Int. Dairy Congress, London, v. 2, s. 3, 644 (1959).
78. Woychik J. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 267 (1964).
79. Woychik J. H., Kalan E. B., *J. Dairy Sci.* **48**, 1113 (1965).
80. Woychik J. H., Investigation of reduced and alkylated α -casein. Réunion sur les caseines C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
81. Woychik J. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 542 (1965).
82. Waugh D. E., von Hippel P. H., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4576 (1956).
83. Waugh D. E., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4929 (1962).
84. Waugh D. E., Noble R. W., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2246 (1965).
85. Wake R. G., The fractionation of S-carboxymethyl- α -casein and characterisation of the components. Réunion sur les Caseines C.N.R.Z. (I.N.R.A.) Jouy-en-Josas 19—22.X.1965.
86. Wake R. G., Baldwin R. L., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 225 (1961).
87. Zittle C. A., Custer J. H., *J. Dairy Sci.* **46**, 1183 (1963).
88. Zittle C. A., Walter W., *J. Dairy Sci.* **46**, 1189 (1963).
89. Zant van der W. C., *Food Res.* **22**, 151 (1957).
90. Zant van der W. C., Nelson F. E., *J. Dairy Sci.* **36**, 1212 (1953).

MIECZYŚLAW TRENKNER*, TADEUSZ J. OTTO**

Biologia przeszczepów narządowych

Biology of Organ Transplantation

Basic concepts of immunological reaction on the transplanted tissue and its modification are discussed. Biology and clinical application of transplantation of organs are presented.

Osiągnięcia ostatnich lat w zakresie techniki i aparatury chirurgicznej obudziły na nowo od dawna nurtujące ludzkość nadzieje związane z przeszczepianiem tkanek i narządów jako jedną z metod chirurgii odtwórczej. Sztuczne narządy jako sztuczna nerka, proteza serca czy aparaty wspomagające oddychanie, jakkolwiek reprezentują najwyższy współcześnie poziom techniczny, mają ograniczone zastosowanie i ograniczony czas pracy. W wielu przypadkach jedynym rozwiązaniem byłoby zastąpienie zniszczonego narządu przez przeszczepiony zdrowy narząd pobrany od innego osobnika. Obecny stan techniki chirurgicznej pozwala na wykonanie nawet bardzo skomplikowanych zabiegów, nie zapewnia jednak długotrwałej czynności przeszczepionego narządu, wyjąwszy przypadki przeszczepów między bliźniętami jednojajowymi. Natomiast w dziedzinie przeszczepów tkankowych uzyskano znaczne osiągnięcia czego przykładem są: przetaczanie krwi oraz przeszczepy kości i skóry szeroko stosowane już w klinice.

Zależnie od stosunku pokrewieństwa pomiędzy dawcą a biorcą różniamy autoprzeszczepy to jest takie w których dawca jest biorcą, izoprzeszczepy — między osobnikami identycznymi pod względem struktury antygenów tkankowych, alloprzeszczepy, zwane dawniej homoprzeszczepami — między genetycznie różnymi osobnikami tego samego gatunku i ksenoprzeszczepy, zwane dawniej heteroprzeszczepami — między osobnikami różnych gatunków (53, 101).

Zależnie od miejsca, w które zostaje przeszczepiony narząd rozróżnia się przeszczepy ortotopowe, gdy przeszczep umiejscowiony zostaje w swym prawidłowym anatomicznie położeniu i heterotopowe, gdy

* Dr med., asystent Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

** Doc. dr med., Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

przeszczep zajmuje miejsce nienaturalne na przykład nerka pod skórą szyi z unaczynieniem od tętnicy szyjnej i wyprowadzeniem moczowodu na skórę szyi. Longmire (87) wprowadził określenie „statyczny” dla przeszczepu spełniającego jedynie rolę podporową bez zdolności do życia i „witalny”, gdy zamierzona jest jego pełna funkcja metaboliczna.

Autoprzeszczepy narządowe nie mają znaczenia w praktyce klinicznej, izoprzeszczepy mogą mieć tylko zastosowanie ograniczone ze względu na małą liczbę bliźniąt jednojajowych. Szersze zastosowanie znaleźć mogą jedynie alloprzeszczepy i ewentualnie ksenoprzeszczepy, jednak do pełnego powodzenia tych zabiegów konieczne jest opanowanie procesów wynikających z różnic immunologicznych między przeszczepem a biorcą. Immunologia przeszczepów tkankowych jest dzisiaj dość dobrze opracowana. Wyniki tych badań mogą w znacznej mierze być przeniesione na przeszczepy narządowe, jednak badania nad tymi ostatnimi postawiły cały szereg nowych pytań.

I. Reakcja immunologiczna

Punktem wyjścia do badań nad reakcją immunologiczną było spostrzeżenie, że alloprzeszczepy tkankowe zachowują się w ciągu pierwszych dni po zabiegu identycznie jak autoprzeszczepy. Badania histopatologiczne wykazały, że w okresie tym dochodzi do unaczynienia przeszczepu co klinicznie wyraża się jego zaróżowieniem. Jednakże piątego — szóstego dnia pojawiają się nacieki komórek jednojądrzastych wokół żył włosowatych, powstają zakrzepy w naczyniach i przeszczep obumiera. Najogólniej proces odrzucania przeszczepu określić można jako odwrócenie procesu gojenia. Zjawisko przyspieszonego odrzucania (ang. *second set reaction*), w którym ponowny przeszczep od tego samego dawcy jest odrzucany znacznie szybciej i gwałtowniej niż przeszczep pierwotny, wskazuje wyraźnie na immunologiczną istotę procesu odrzucania (99). Wykazano, że uczulenie gospodarza na antygeny przeszczepu występuje w około 48 godzin po wytworzeniu odpływu krwionośnego i chłonnego. Jednocześnie stwierdzono, że pełny obraz odczynu immunologicznego powstać może w przeszczepach tkankowych wielokrotnie wszczepianych to jest w warunkach wielokrotnego niszczenia powstającego unaczynienia przeszczepu.

1. Czynniki komórkowe i humoralne

Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie czy reakcja immunologiczna biorcy ma charakter komórkowy czy humoralny. Obecnie wydaje się, że natura procesu jest dwoista z przewagą odczynu komórkowego. Przed 40 laty Murphy (114) wykazał, że obec-

ność leukocytów biocy w okolicy przeszczepu jest dowodem jego odrzucania. Naciek leukocytarny składa się z różnych komórek, w pewnym okresie nawet z komórek wielojądrzastych, przeważają jednak komórki jednojądrzaste, a wśród nich małe limfocyty. W mikroskopie elektronowym stanowią one populację zróżnicowaną pod względem kształtu jądra i zawierają niewiele mitochondriów (165). W późnym okresie w nacieku pojawiają się komórki plazmatyczne. Niedokrwienie przeszczepu w wyniku zmian w naczyniach i wokół nich występuje znacznie szybciej i gwałtowniej w zespole przyspieszonego odrzucania doprowadzając w skrajnych przypadkach do tak zwanego odczynu białego przeszczepu, w którym nie otrzymuje on ukrwienia i obumiera szybko bez objawów zapalnych (42).

Opisane zjawiska wskazują na komórkowy charakter procesu odrzucania przeszczepu. Dalszych dowodów stwierdzających udział elementów komórkowych dostarczyły doświadczenia Mitchisona i Dube (110, 111) oraz Lawrence'a (84). Autorzy ci uzyskiwali przyspieszone odrzucanie przeszczepu u zwierząt, którym uprzednio podano komórki układu chłonnego pochodzące od zwierzęcia z objawami reakcji immunologicznej na przeszczep. Zjawisko to nie występowało po podaniu surowicy biocy o wysokim mianie przeciwciał przeciw przeszczepowi. Weaver, Algire i Prehn (164) umieszczając przeszczepy w komorach Millipore, w których wielkość porów nie pozwala na przechodzenie elementów komórkowych, osiągnęli długotrwałe przeżycie przeszczepu mimo wystawienia go na działanie przeciwciał, także w przypadkach poprzedniego odrzucenia tkanek tego samego dawcy.

Jakkolwiek udział elementów komórkowych w procesie odrzucania nie ulega wątpliwości to nierozwiązana pozostaje kwestia co warunkuje swoistość ich działania.

Udział przeciwciał humoralnych w procesie odrzucania przeszczepu nie jest łatwy do wykazania, co wynika w dużej mierze z niedostatecznej techniki doświadczeń i niejednorodności ich metodyki. Wydaje się, że stosowane obecnie metody są zbyt mało czułe dla wykrycia przeciwciał po pojedynczych alloprzeszczepach tkankowych, na których wykonano większość doświadczeń, a różny czas występowania szczytu reakcji immunologicznej utrudnia ocenę wyników uzyskanych przez różnych autorów (10,11). Przeciwciała humoralne we wczesnym okresie należą do 19S γ -globulin, w późnym — do 7S γ -globulin i te różnice mogą tłumaczyć trudności w ich oznaczaniu. Nie znaleziono również pewnych dowodów udziału dopełniacza, dotychczas stwierdzono tylko podwyższenie dopełniacza C 2 w zagrażającym odrzuceniu nerki u człowieka (58). Doniesienia o pozytywnych próbach biernego przeniesienia wrażliwości na przeszczep są jak dotąd nieliczne (156, 157). Ten brak jednolitości wyników badań nad przeciwciałami humoralnymi doprowadził do koncepcji przeciwciał związanych z komórką (18, 80). Inną koncepcję wysunęli

Starzl i wsp. (151) na podstawie wyników badań przeszczepów wątroby z użyciem leków immunopresyjnych, zmniejszających odczyn komórkowy. Autorzy ci uważają, że pierwotny mechanizm jest humoralny, jednak w przeszczepach prowadzonych bez leków immunopresyjnych odczyn komórkowy występuje tak szybko, że przysłania obraz pierwotny. Dopiero zastosowanie leków immunopresyjnych zwalnia proces odrzucania i umożliwia obserwację zarówno fazy humoralnej jak i komórkowej. W przypadku ksenoprzeszczepów przeciwciała występują w większych stężeniach i są łatwiejsze do wykrycia. Wysuwane są hipotezy, że w tych przypadkach przeciwciała zdolne jest do zniszczenia przeszczepu bez udziału elementów komórkowych (2).

2. Modyfikacja reakcji immunologicznej

Dążenie do przedłużenia czasu przeżycia alloprzeszczepów wywołało konieczność znalezienia sposobów wpłynięcia na reakcję immunologiczną zarówno od strony biocy jak i dawcy. Obecnie główny kierunek badań zmierza do ograniczenia procesu odrzucania przez wpływ na ośrodki odpowiedzialne za powstawanie reakcji immunologicznej u biocy.

Działanie na układ chłonny. Wykazanie udziału całego układu siateczkowo-śródbłonkowego, a w szczególności układu chłonnego w reakcji immunologicznej doprowadziło w konsekwencji do badań nad możliwością jego zahamowania. Stosowane metody podzielić można na mechaniczne (chirurgiczne) i biologiczne, wpływające na same komórki układu chłonnego, lub na cały układ siateczkowo-śródbłonkowy. Nadzieje pokładane w splenektomii i usunięciu regionalnych węzłów chłonnych biocy z okolicy przeszczepu nie zostały spełnione (10, 143). Nieco lepsze wyniki uzyskano stosując blokadę układu siateczkowo-śródbłonkowego błękitem trypanu (20, 103). Brak pełnego powodzenia tłumaczyć można tym, że pobudzenie układu siateczkowo-śródbłonkowego przez alloprzeszczep jest tak silne, że zdolne jest do przełamania blokady (48). Drenaż chłonki z przewodu piersiowego, zmniejszający liczbę małych limfocytów, ale nie usuwający ich całkowicie, przedłużał czas przeżycia dla przeszczepów skóry; wpływ ten ustawał jednak w 18 dni po zamknięciu przetoki (45, 54, 55). Liczbę limfocytów zmniejszono również stosując surowicę antylimfocytarną (167) oraz napromienianie Ytrium 90 lub źródłem promieni β , umieszczonym w prawym przedsionku serca, uzyskując przedłużenie czasu przeżycia przeszczepów skóry u zwierząt (166). Wszystkie te metody ze względu na krótkotrwałość efektu nie znalazły zastosowania praktycznego.

Wywołanie tolerancji immunologicznej. Medawar (102) określa w następujący sposób warunki nabycia tolerancji immunologicznej — „jeśli zwierzę jest wystawione na działanie antygeny nim rozwinię się zdolność reagowania przeciw niemu, wtedy zdolność ta jest upośledzona

i przy stałej obecności antygeny może się nie ujawniać nieskończenie długo". Punktem wyjścia prac Medawara było stwierdzenie przez Owena istnienia chimer erytrocytarnych u cieląt (128) i hipoteza Burneta, według której istnieje znacznik (*marker*), pozwalający na odróżnienie komórek własnych od komórek dawcy, a zdolność do tego różnicowania nie istnieje w życiu płodowym i wkrótce po urodzeniu (22, 23). Medawar w wielu pracach, które przyniosły mu w 1960 roku nagrodę Nobla wykazał, że wstrzyknięcie śródmacicznie, lub wkrótce po urodzeniu myszom żywych komórek (na przykład śledziony) z myszy niespokrewnionej prowadzi do przyjęcia się przeszczepów skóry pochodzących od dawcy komórek. Tolerancję podtrzymuje powolne uwalnianie antygeny z przeszczepu. Medawar (103) podkreśla, że ma to szczególnie znaczenie w przypadku przeszczepów narządowych, gdyż są one bezpośrednio włączone w układ krążenia biorcy. Ilość komórek, która konieczna jest do wywołania tolerancji, jest tym większa im większe są różnice genetyczne pomiędzy dawcą a biorcą. Najkorzystniejsze w okresie pozapłodowym okazało się dożylnie podanie komórek przyszłego dawcy. Tolerancję przerywało podanie komórek układu chłonnego dorosłych zwierząt tego samego typu genetycznego co biorca (12). Wykazano, że zwierzęta u których wywołano tolerancję, są chimerami pod względem komórek układu chłonnego. Przyjmuje się, że tolerancja jest wynikiem zahamowania czynności komórek odpornościowych, zaś jej wygaszenie jest wynikiem rozplemu nowych komórek pochodzących albo z grasicy, albo rozwijających się obwodowo pod jej wpływem (33). Dotychczasowe próby wywołania tolerancji na ksenoprzeszczepy kończyły się niepowodzeniem.

Aust i Guttman (5) podają następujący wzór przydatny dla oceny tolerancji: Tolerancja = dawka antygeny—(wydolność immunologiczna \times niezgodność genetyczna). Niezgodność genetyczną można jednak ustalić obecnie tylko dla małej liczby gatunków ssaków (myszy, chomiki).

Z pojęciem tolerancji wiąże się pojęcie odczynu przeszczepu przeciw biorcy (ang. *graft-versus-host reaction*, *GVH reaction*). Termin ten wprowadził w 1957 r. Simonsen (146), który jednocześnie z Billinghamem i Brentem (14) stwierdził swoisty zespół chorobowy u myszy, u których wywołano tolerancję na przeszczep. Zespół ten wynikający z niemożności odrzucenia przeszczepu przez biorcę nazwano karłowatością (ang. *runt disease*). Powstaje on u zwierząt, u których wywołano tolerancję w życiu płodowym lub zaraz po urodzeniu, a także w przeszczepach od homozygotycznego dawcy (AA) do biorcy będącego mieszańcem F_1 pomiędzy szczepem dawcy (AA) a homozygotą (BB). W ostatnim przypadku biorca nie może odrzucić przeszczepu ponieważ nie ma w nim obcych antygenów, ale przeszczep może działać przeciw biorcy, gdyż ten zawiera obce dla niego antygeny pochodzące od jed-

nego z rodziców (BB) mieszańca. Szybkość wystąpienia objawów klinicznych i ciężkość przebiegu karłowatości zależy od kombinacji typów szczepów. W najmniej korzystnych kombinacjach już po tygodniu występuje biegunka, łysienie, wyniszczenie i często zgon. Zmiany histopatologiczne polegają na zmniejszeniu się liczby limfocytów i zastąpieniu ich przez komórki plazmatyczne. W przypadkach przewlekłych dochodzi do powiększenia wątroby i śledziony, zaniku grasicy, węzłów chłonnych i kępek Peyera, a nieraz i do zwłóknienia tkanki chłonnej. Podanie izogennych komórek osobnika dorosłego lub komórek osobnika wrażliwego na tkanki dawcy, albo surowicy zawierającej przeciwciała na antygeny dawcy łagodzi objawy, ale przerywa tolerancję.

Wzmocnienie. W przypadku gdy następuje wygojenie się przeszczepu lub opóźnienie jego odrzucenia w wyniku obecności swoistej surowicy odpornościowej u gospodarza mamy do czynienia ze zjawiskiem wzmocnienia. Obecność surowicy odpornościowej przeciw przeszczepowi odróżnia to zjawisko od innych rodzajów bezodczynowości immunologicznej. Najpewniejsze wyniki daje uodpornienie bierne izo- lub heterosurowicą odpornościową przeciw przeszczepowi. Jeśli jako pierwotnego materiału immunizującego używa się tkanki liofilizowanej, dochodzi najczęściej do wzmocnienia, a nie do uczulenia gospodarza. Tkanka liofilizowana nie ma, jak się wydaje zdolności wywoływania znacznego odczynu komórkowego, ale wywołuje odczyn humoralny. Często stwierdza się jednoczesne istnienie uczulenia i wzmocnienia u badanych zwierząt (76). Moore (113) stwierdził, że wzmocnienie występuje przy bardzo wysokim mianie przeciwciał (1:8192 — 1:16384) i uważa, że warunkiem wystąpienia tego zjawiska jest duży nadmiar przeciwciał po związaniu całej ilości antygeny. Wzmocnienie obserwowano również przy ponownym przeszczepie od tego samego dawcy, dokonanym po okresie przyspieszonego odrzucania. Zagadnienie wzmocnienia przebadano głównie na nowotworach myszy. W odniesieniu do tkanek prawidłowych Halasz i Orloff (60, 61) wykazali, że podskórne podanie krwi dawcy przed przeszczepem nerki u psa znacznie przedłuża czas przeżycia przeszczepu, nie udało się jednak uzyskać podobnych wyników u innych zwierząt i u człowieka.

Napromieniowanie. Obserwacje wykazujące hamujący wpływ naświetlania promieniami Röntgena na wytwarzanie przeciwciał (42, 159) były punktem wyjścia do badań nad wpływem napromieniania na długość przeżycia alloprzeszczepów skóry u królików (39, 79), szpiku u myszy, a nawet ksenoprzeszczepów szpiku od szczurów do myszy (49), co prowadzi do powstania chimer. Nie zostały uwieńczone powodzeniem próby alloprzeszczepów szpiku u królików, psów i małp, gdyż konieczna dawka promieniowania prowadziła do zgonu w wyniku uszkodzenia układu nerwowego i przewodu pokarmowego. Przeszczepione komórki szpiku rozwijają się ortotopowo bez względu na sposób ich podania.

Określono to jako instynkt mieszkalny (ang. *homing instinct*) (124), dotyczy on wszystkich komórek układu krwiotwórczego. Po upływie pewnego czasu komórki dawcy zastępowane są komórkami gospodarza, a szybkość procesu rewersji zależy w dużej mierze od dawki promieniowania (50). Alloprzeszczepy szpiku zmniejszają znacznie bezpośrednią śmiertelność popromienną jednak najczęściej między 21-y a 70-y m dniem po napromienianiu i przeszczepie dochodzi do powstania choroby wyniszczeniowej, podobnej do karłowatości. Wielu autorów uważa, że istotą sprawy jest odczyn przeszczepu przeciw biorcy (35, 148). Istnieją jednak opinie, że ma tu miejsce zarówno odczyn przeszczepu przeciw biorcy, jak i biorcy przeciw przeszczepowi (147). Badania nad chimera-
mi popromiennymi stworzyły podstawy do ratujących życie przeszczepów szpiku u człowieka (znany przypadek atomistów jugosłowiańskich). Różnego rodzaju napromienianie stosuje się często w przygotowaniu do zabiegu i prowadzeniu przeszczepów narządowych u człowieka.

Wycięcie grasicy. W dziedzinie biologii przeszczepów na rolę grasicy wskazał w 1961 roku Miller (105), uzyskując znaczne zmniejszenie nasilenia zjawisk odpornościowych po tymektomii wykonanej tuż po urodzeniu. Zabieg ten prowadzi jednak do głębokich zaburzeń rozwojowych, polegających na wyniszczeniu, a nawet powodujących zgon zwierzęcia (106). Podobieństwo tego zespołu do choroby wyniszczeniowej u chimer popromiennych i karłowatości jest uderzające (108, 163). Wykonanie zabiegu w kilka dni po urodzeniu zmniejsza nasilenie objawów ubocznych przy zachowanym wpływie na procesy immunologiczne (104). Na niewydolność układu chłonnego po usunięciu grasicy wskazuje obok zmniejszenia liczby limfocytów fakt, że do wywołania odczynu przeszczepu przeciw biorcy konieczna jest czterokrotnie większa liczba komórek układu chłonnego pochodzących od zwierząt po tymektomii, niż od zwierząt nieoperowanych. Tymektomia u zwierząt dorosłych ogranicza zdolność do regeneracji układu chłonnego, co sprzyja dłuższemu przeżyciu przeszczepów (4).

Istnieją dwie hipotezy mechanizmu działania grasicy w procesie dojrzewania układu chłonnego, które zresztą wzajemnie się nie wykluczają. Według jednej działa ona na drodze humoralnej, według drugiej jako środowisko, w którym następuje dojrzewanie komórek kolonizujących potem obwodową tkankę chłonną, gdzie działają one już jako komórki odpornościowe. Pierwsza koncepcja znajduje obecnie więcej zwolenników, gdyż dowody migracji komórkowej z grasicy nie są przekonujące (108). Za hipotezą humoralną przemawiają także wyniki doświadczeń z zamkniętymi w komorach *Millipore* skrawkami grasicy, które przeszczepiano zwierzętom po tymektomii. Podobnie jak wolne przeszczepy grasicy zapobiegały one wystąpieniu objawów wyniszczenia (85, 107), powodowały odrzucanie przeszczepów skóry (125) oraz restytu-

wały zdolność do wytwarzania przeciwciał (82), mimo, że komora *Millipore* nie pozwala na przechodzenie elementów komórkowych.

Wpływ leków. Doświadczenie kliniczne, które wykazało korzystny wpływ niektórych leków na przeżycie przeszczepów nerkowych u ludzi wzmogło w ciągu ostatnich lat zainteresowanie lekami immunopresyjnymi. Sterydy i ACTH przedłużające czas przeżycia alloprzeszczepów tkankowych u królików, świnek morskich, kurcząt i myszy, ale nie u małąp (9, 31, 100, 149) użyte w dużych dawkach przerywają proces odrzucania nerki u człowieka (115, 138). Są nieskuteczne w przeszczepach nerek u psów ale wykazano ich korzystne działanie w przeszczepach płuc u tych zwierząt (62, 122). Działanie sterydów polega prawdopodobnie na wywieranym przez nie działaniu przeciwzapalnym co nie pozwala na gromadzenie się leukocytów w okolicy przeszczepu i hamuje czynność fibroblastyczną. Wchodzić może także w grę wpływ na uwalnianie antygeny z przeszczepu i jego następowe przenoszenie od ośrodków odpowiedzialnych za powstawanie odczynu immunologicznego (142).

Z grupy antymetabolitów pierwszym badanym związkiem była 6-merkaptopuryna powodująca upośledzenie czynności immunologicznych przez wpływ na odczyn komórkowy (141). Przedłuża ona przeżycie przeszczepów skóry u różnych gatunków (98, 140), a także alloprzeszczepów nerkowych (26, 28, 133, 169). Toksyczność tego leku dla szpiku utrudnia w dużym stopniu jego stosowanie (27). Inne leki jak 8-azaguanina, 6-azauracyl, azaseryna i 5-fluorouracyl nie wykazywały wpływu na przeszczepy nerkowe (170). Azatiopiryna (*Imuran* firmy *Burroughs Wellcome*) działająca podobnie do 6-merkaptopuryny, przy mniejszej toksyczności dla szpiku jest obecnie najpowszechniej stosowanym lekiem immunopresyjnym (27). Korzystne okazało się łączne stosowanie *Imuranu* i azaseryny (30, 115). A-metopteryna (*Methotrexate*), będąca antagonistą kwasu foliowego hamuje wprawdzie powstawanie przeciwciał humoralnych u zwierząt i odrzucanie alloprzeszczepów tkankowych (52, 162), nie ma jednak znaczenia w przeszczepach nerek (30, 170). Cechuje ją także znaczna toksyczność dla dużych zwierząt.

Czynniki alkilujące (iperyty i etyloaminy) obniżają również reakcję immunologiczną, ich działanie jest wyraźniejsze, gdy podawanie ich rozpoczyna się jednocześnie z podawaniem antygeny, natomiast zastosowane po podaniu antygeny działają słabo. Wyjątek stanowią *Myleran* (*Busulfan*) i L-p-(dwu-2-chloroetylamino)-fenylnanina (*Melphalan*) (8). Wszystkie te leki przedłużają czas przeżycia alloprzeszczepów nerkowych tylko wtedy, gdy stosowane są łącznie ze splenektomią i kortykoterapią i nie mają obecnie większego znaczenia (6, 30).

Z antybiotyków działanie immunopresyjne wykazują aktynomycyny C i D, które upośledzają metabolizm kwasów nukleinowych i syntezę białka w wyniku blokowania tworzenia nowego mRNA (57, 73). Aktynomycyna C stosowana łącznie z *Imuranem* działa skutecznie w zagraża-

jącym odrzucaniu przeszczepów nerkowych u zwierząt (29, 30), a u ludzi w takich przypadkach daje nieraz wybitną poprawę kliniczną (115). Innym obiecującym antybiotykiem, niewypróbowanym jeszcze w przeszczepach nerkowych wydaje się być mitomycyna (57).

Alkaloidy indolo-indolinowe: winkrystyna i winblastyna — związki nietoksyczne, stosowane w leczeniu nowotworów układu chłonnego u ludzi — przedłużają czas przeżycia przeszczepów skóry u zwierząt (1) i mogą okazać się pomocne w przeszczepach narządowych. Ostatnio stwierdzono, że kwas ϵ -aminokapronowy przedłuża czas przeżycia przeszczepów nerkowych prawdopodobnie na drodze hamowania dopełniacza (171). Wykazano również działanie immunopresyjne *Thalidomidu* (*Contergan*) szczególnie podanego zarówno dawcy jak i biorcy (7) oraz 3-metylocholantrenu (158).

Adaptacja przeszczepu. Jest to zjawisko polegające na zmniejszeniu wrażliwości przeszczepu na zagrożenie ze strony biorcy utrzymujące się mimo przytłumienia procesu odrzucania. Zjawisko to znane było od dawna w odniesieniu do nowotworów. W przeszczepach tkanek prawidłowych stwierdził je *Woodruff* w r. 1950 (168). Przeszczepy tarczycy szczura po kilkumiesięcznym ich pobycie w przedniej komorze oka przenoszono do tkanki podskórnej, gdzie wgajały się całkowicie i ulegały unaczynieniu. *Murray* (116) stwierdził, że pies z przeszczepioną nerką otrzymując leki immunopresyjne odrzucał szybko przeszczep skóry od dawcy nerki lub innego dawcy, a także drugą nerkę dawcy podczas gdy pierwsza zachowywała swą czynność. Z kolei nerka ta powtórnie przeszczepiona psu nie otrzymującemu leków immunopresyjnych było szybko odrzucana. *Murray* określa adaptację jako „delikatne zrównoważenie, swoiste dla antygeny obecnego w czasie podawania leków immunopresyjnych lub zwiększenia ich dawki”. Fakt, że odrzucany jest wtórny przeszczep tego samego genotypu i że w pewnej liczbie przypadków żyje i zachowuje całkowicie swą funkcję przeszczep pierwotny, tłumaczyć można jedynie zmianami w strukturze immunologicznej samego przeszczepu (133).

3. Lokalizacja komórkowa i budowa antygenów zgodności tkankowej

Ostatnie lata ugruntowały pogląd, że wywołanie zjawisk odpornościowych przez żywe komórki zachodzi na drodze przekazania komórkom układu siateczkowo-śródbłonkowego biorecy jakiegoś czynnika subkomórkowego. *Lawrence* (83) wykazał u człowieka możliwość przenoszenia za pomocą wyciągu z leukocytów odczynu tuberkulinowego, a inni autorzy — odczynu na antygeny bakteryjne i antygeny alloprzeszczepów (51, 97). Proces nie miał ani charakteru uodpornienia czynnego ze względu na zbyt szybkie występowanie, ani biernego ze względu na trwałość zjawiska i małą ilość czynnika potrzebną do jego wywołania

(0,1 ml). Czynniki przenoszący wytrzymały 10 cykli zamrażania i rozmrażania, przechowywane przez trzy miesiące w stanie zamrożonym i lizę wodą destylowaną.

Wykazano również możliwość przenoszenia wrażliwości na alloprzeszczepy skóry u myszy, królików i świnek morskich za pomocą leukocytów zamkniętych w komorach *Millipore*, jak również bezkomórkowych wyciągów węzłów chłonnych biorcy, który odrzucił przeszczep (81, 118, 119, 134).

Budowa czynnika przenoszącego nie została dotychczas ustalona. Według *Najarjana* i *Feldmana* (120) jest on γ -globuliną a więc przeciwciałem działającym na zasadzie przenoszenia informacji immunologicznej. *Mannick* (92, 93) doniósł, że RNA ekstrahowany z węzłów chłonnych uczulonego biorcy przyspieszał odrzucanie przeszczepów skóry. Z kolei *Trakattellis* i wsp. (160) wywoływali tolerancję na izoprzeszczepy przez podanie mikrosomów, rybosomów lub wyciągów RNA przygotowanych ze śledziony. Według tych autorów mRNA zawarty w tych preparatach powodował u gospodarza ciągłą biosyntezę antygenów typu dawcy i w ten sposób prowadził do wytworzenia tolerancji. Nie można jednak wykluczyć, że podawane preparaty zawierały w wystarczającej ilości antygen zdolny do wywołania tolerancji przy małych różnicach genetycznych.

Prace sprzed kilkunastu lat wskazywały na jądro jako na miejsce lokalizacji antygenów zgodności tkankowej (13), jednak przeciw temu pogładowi przemawia stwierdzenie obecności tych antygenów w płytkach krwi, które są elementami bezjądrzastymi (44). *Herzenberg* i *Herzenberg* (68) lokalizują antygeny w błonie komórkowej, inni autorzy we frakcji mitochondrialnej lekkiej i ciężkiej (7) lub we frakcji mikrosomalnej (127). Większość prac wskazuje na obecność antygenów w błonie zewnętrznej komórek lub błonach różnych organelli komórkowych, jednak sprawa ta daleka jest od pełnego wyjaśnienia. Pierwsze próby wydzielenia antygenów zgodności tkankowej podjęte zostały przez *Medawara* i wsp. (19). Rozbite komórki węzłów chłonnych zawieszono w wodzie destylowanej poddawane był działaniu ultradźwięków. Do otrzymanego preparatu dodawano chlorek sodowy do stężenia 0,15M i całość poddawano wirowaniu przy 5 000 g w ciągu 10 min. W ten sposób usuwano białka i DNA otrzymując supernatant nazwany przez *Medawara* „surowym preparatem antygenowym”. Poddanie go wirowaniu przy 30 000 g dawało „osad antygenowy”. Skład osadu był następujący: 60% białka, 35% lipidów, małe ilości DNA, RNA, różnych cukrów i aminocukrów. Nie ustalono, która frakcja jest odpowiedzialna za aktywność antygenową. Utrzymywała się ona po poddaniu preparatu działaniu RN-azy, DN-azy i amylazy, lizozymu, neuraminidazy i była w różnym stopniu wrażliwa na działanie enzymów proteolitycznych (10, 13, 16). Zasadnicza trudność polega na niemożności otrzymywania rozpuszczalnego

w wodzie preparatu o zachowanych własnościach antygenowych, co sugerowało ich lokalizację we frakcji lipidowej. Jednakże ekstrakcja rozpuszczalnikami tłuszczowymi dawała frakcję lipidową niezdolną do wywołania wrażliwości na antygen, a pozostałość wykazywała tylko ślady tej aktywności i nie wiązała przeciwciał humoralnych. Połączenie obu frakcji nie przywracało aktywności. Poddanie preparatu 10-minutowemu działaniu temperatury 100° powodowało całkowity zanik zdolności wiązania przeciwciał humoralnych jednak pozostawiało częściowo zdolność do wywoływania wrażliwości.

Manson (95), a następnie Monaco (112) uzyskali z frakcji mikrosomalnej komórek śledziony myszy i z hodowli komórek chłoniaka antygen zdolny do wywołania wrażliwości. Frakcja ta została poddana dekompresji w bombie azotowej, zhomogenizowana w 1,5M sacharozie i poddana ultrawirowaniu. Prawie całą aktywność znaleziono w błonie zebranej na powierzchni supernatantu, co wskazywało, że aktywna substancja jest lipoproteidem. Zawiesina tego materiału zachowywała aktywność w czasie przechowywania w ciągu 7 dni w temperaturze 5°C , a jego własności podobne były do własności osadu antygenowego Medawara. Mannick (91) otrzymał antygen o podobnych własnościach z płynu z hodowli komórek śledziony królika, a Davies (37) i inni (75, 77, 78) z płynu z otrzewnej myszy ze swoistymi nowotworami. Niepowodzenia w otrzymaniu antygenów z innych narządów na przykład z wątroby mogą być związane z unieczynnieniem ich w procesie ekstrakcji (90).

II. Przeszczepy narządów doświadczalne i kliniczne

Mija obecnie 60 lat od wykonania przez Carrela pierwszych przeszczepów nerek u psa. Przez wiele lat jednak nie uzyskiwano korzystniejszych wyników w allo- i ksenoprzeszczepach u ludzi i zwierząt, głównie z powodu niedoskonałości szwu naczyniowego, braku leków obniżających krzepnięcie krwi i leków immunopresyjnych. Nerka ze względu na stosunkowo prostą technikę operacyjną, swą parzystość, a przede wszystkim na potrzeby kliniczne jest i obecnie najczęściej przeszczepianym narządem. Duży materiał kliniczny pozwala już na wyciąganie pewnych bardziej ogólnych wniosków dotyczących przeszczepów narządowych.

Jednym z podstawowych zagadnień jest sprawa doboru dawcy. Przeszczepy izogeniczne nie zaspokajają potrzeb klinicznych, a w przypadkach przeszczepów allogenicznych pobieranie ich od żywych dawców jest obciążone problemami natury moralnej i prawnej szczególnie wobec niewielkich szans na długotrwałe przeżycie przeszczepu. Stąd obowiązuje obecnie pogląd, że należy dążyć do pobierania narządów jedynie ze zwłok.

Ze względu na to, że przeszczep musi być pobrany możliwie szybko po zgonie wyłania się z kolei problem co należy uznać za objaw zgonu, gdyż wobec postępów reanimacji zatrzymanie czynności serca nie wystarczy do jego stwierdzenia.

Następnym zagadnieniem jest ustalenie podobieństwa antygenów zgodności tkankowej biorcy i potencjalnego dawcy. *Newth* (123) podał matematyczną analizę podobieństwa genetycznego u ludzi przyjmując jako punkt wyjścia podobieństwo pomiędzy bliźniętami jednojajowymi, jak również podobieństwo między rodzicami a potomstwem. Nieznajomość mocnych antygenów zgodności tkankowej u człowieka nie pozwalała na szersze zastosowanie tych obliczeń w praktyce. *Rappaport* i *wsp.* (136) zaproponowali empiryczną metodę oceny zgodności tkankowej między dwoma osobnikami polegającą na przeszczepieniu obojętnemu osobnikowi skóry zamierzonego biorcy, a następnie skóry zamierzonych dawców narządu. Zamierzony dawca, którego skóra zostaje najszybciej odrzucona wykazuje największą zgodność tkankową z przyszłym biorcą. Zasadą tej metody jest opisany uprzednio proces przyspieszonego odrzucania. *Brent* i *Medawar* (21) opracowali u świńek morskich test, w którym różnica antygenów zgodności tkankowej ocenia się na podstawie rozmiarów odczynu po śródskórnym wstrzyknięciu limfocytów biorecy potencjalnym dawcom (ang. *normal lymphocyte transfer test*, *NLT test*). Test ten zastosowano następnie z dość dobrymi wynikami w doborze dawców nerek u człowieka (43, 64). Według *Simonsena* test *NLT* może służyć do wykrycia niezgodności w zakresie mocnych antygenów u człowieka (144, 145). Jeśli przypuszczenie to okaże się słuszne to eliminacje dawców o niezgodnych z biorcą mocnych antygenach nawet przy pozostawieniu niezgodności słabych antygenów pozwoli na zmniejszenie dawek leków immunopresyjnych. Test *NLT* nadaje się jednak tylko do wyboru żywych dawców, do oceny zgodności tkankowej dla zwłok pozostają metody serologiczne. Obszerny przegląd obecnego stanu możliwości sprawdzania zgodności tkankowej znajduje się w monografii pod redakcją *Russella*, *Winn* i *Amosa* (139).

1. Przeszczy nerek

Międzynarodowy Rejestr Ludzkich Przeszczepów Nerkowych podaje, że do 1.X.1964 r. wykonano 522 przeszczepy u 408 chorych, z których żyje 106. Przeszczepianie nerki wykonywane jest w przypadkach całkowitego zniszczenia obu nerek przez różne procesy chorobowe, najczęściej u chorych z ciężką mocznicą. Obecnie jako zasadę przyjmuje się wyprowadzanie chorego z azotemii za pomocą hemodializy i wykonanie wycięcia nerek chorego równocześnie z przeszczepem, lub w krótki czas po przeszczepie. Szybkie wycięcie zmienionych nerek ma na celu: 1. usunięcie narządu odpowiedzialnego za istnienie nadciśnienia, które uszko-

dzień może przeszczepioną nerkę, 2. usunięcie ewentualnego źródła antygenów paciorkowcowych, które mogą wywołać kłębuszkowe zapalenie przeszczepionej nerki, 3. usunięcie źródła zakażenia pochodzącego z procesu o charakterze *pyelonephritis* często istniejącego w zmienionej nerce.

Mocznica wywołuje stan zmniejszonej odczynowości ustroju i sprzyja mniejszemu nasileniu procesu odrzucania, a w każdym razie opóźnia jego wystąpienie, stwarza jednak duże ryzyko operacyjne. Z tego względu konieczna jest poprawa stanu chorego za pomocą hemodializy. Mimo, że w większości przypadków przeszczepiona nerka podejmuje natychmiast swą funkcję, a ilość wydzielonego moczu może być w pierwszych dobach olbrzymia, długotrwałe powodzenie w przypadkach izoprzeszczepów nie przekracza 75% operowanych, a w alloprzeszczepach jest w większości przypadków krótkotrwałe. Przepływ krwi przez przeszczepioną nerkę (34) mierzony elektromagnetycznie jest zmniejszony o około 40—60%, co ma być wynikiem obrzęku będącego następstwem przecięcia odpływu chłonki. Po jego rekonstrukcji obrzęk zmniejsza się i przepływ krwi zbliża się do prawidłowego.

Niepowodzenie przeszczepu i proces odrzucania nerki tłumaczy się (34, 41, 71, 121, 131, 132) w sposób następujący: Małe krążące limfocyty biocyty zostają pobudzone przez antygen szybko uwalniany z przeszczepu, wnikają do tkanki chłonnej i przemieniają się w duże komórki pyroninofilne. Komórki te opuszczają tkankę chłonną, wnikają do przeszczepu i umieszczając się w kapilarach okołokanalikowych niszczą ich ściany. Przyczyną martwicy włóknikowatej tętnic i tętniczek ma być przeciwciała humoralne zapewne w kompleksie z antygenem. Wszystkie te zmiany naczyniowe doprowadzają do zatrzymania krążenia w przeszczepie i jego obumarcie. Reakcja przeszczepu przeciw biocyty jest u ludzi z przeszczepami nerkowymi rzadko obserwowana, choć E i k i n s (46) obserwował ją u szczurów.

Próby ksenoprzeszczepów nerek u człowieka znane są od roku 1910, ostatnio H i t c h c o c k i wsp. (69) użyli nerek pawiana, a R e e m t s m a i wsp. (137) nerek szympansa uzasadniając swe postępowanie podobieństwem genetycznym tych naczelnych do człowieka. Najdłuższe przeżycie ksenoprzeszczepu wynosiło 6 miesięcy, a częstszą niż odrzucanie przyczyną zgonu była posocznica, co w dużej mierze wynikało ze stosowania wielkich dawek leków immunopresyjnych. Z punktu widzenia immunologii zabiegi te nie miały szans trwałego powodzenia, ich usprawiedliwieniem były dramatyczne okoliczności kliniczne i nie możliwość uzyskania nerek od żywych dawców lub ze zwłok. Należy podkreślić, że wbrew przewidywaniom wyniki w ksenoprzeszczepach nie były o wiele gorsze od wyników w alloprzeszczepach, co dowodzi jak mało poznane są procesy immunologiczne i wskazuje na potrzebę dalszych badań podstawowych.

W przeszczepach nerkowych stosowano samodzielnie lub łącznie wszystkie dostępne obecnie środki immunopresyjne; wykonano jednocześnie z przeszczepem splenektomię i tymektomię (153) napromienianie całego ciała i napromienianie miejscowe przeszczepu, napromienianie śledziony i grasicy, jak również stosowano różne leki immunopresyjne (72, 109, 117).

Systemy stosowania leków immunopresyjnych są różne. W większości ośrodków podaje się stale antymetabolity i kortykoidy rezerwując aktywność C i naświetlania promieniami Röntgena na okres zagrażającego odrzucania przeszczepu. Do połowy 1967 roku liczba wykonanych przeszczepów przekroczyła 1000.

2. Przeszczepy wątroby

Pierwsze alloprzeszczepy wątroby u ludzi wykonał w roku 1963 Starzl (150, 151, 152, 153) używając narządów zwłok. Stosowano perfuzję zwłok, a następnie samej wątroby i hipotermię, co pozwalało na lepsze zachowanie czynności narządu.

Zabiegi te poprzedziły rozległe badania doświadczalne na zwierzętach, w których nie uzyskano jednak przeżyć sięgających ponad 30 dni. W pięciu przeszczepach ludzkich uzyskano 6, 7, 22 i 23 dni przeżycia, a jeden chory zmarł bezpośrednio po zabiegu. Po zabiegu poziom transaminazy szczawiooctowej, transaminazy pirogronowej i dehydrogenazy mleczanowej był podwyższony, ale szybko wracał do normy. Poziom alkalicznej fosfatazy podniesiony u wszystkich chorych przed zabiegiem obniżał się. Wykazano podwyższenie poziomu lizyny, histydyny, glicyny, alaniny, seryny, waliny, glutaminy i tauryny w surowicy. Obserwowano zastępowanie haptoglobulin typu biorcy haptoglobulinami typu dawcy, co stanowi jeszcze jeden dowód, że wątroba jest ich źródłem. W zakresie immunoglobulin zaobserwowano wzrost 1 M globulin. Wzmoczenie aktywności fibrynolitycznej po opanowaniu kwasem ϵ -aminokapronowym przechodziło w stan wzmoczonej krzepliwości. Poziom protrombiny był zazwyczaj niski i wynosił około 25%. Niedomoga wątroby była bezpośrednią przyczyną zgonu tylko w jednym przypadku, w pozostałych obserwowano masywne zatory płucne nierzadko zakażone. Podobnie jak w allo i ksenoprzeszczepach nerkowych prowadzonych przy użyciu leków immunopresyjnych często nie występował komórkowy mechanizm odrzucania przeszczepu; zmiany w obrębie komórek wątrobowych, nabłonka kanalików żółciowych i tętniczek odnoszą autorzy do działania przeciwciał humoralnych. U psów z długim przeżyciem nasilenie zmian było mniejsze. Tworzyły się pasma kolagenowe wokół żył centralnych i następowała regeneracja komórek wątrobowych (152). Przebieg procesu odrzucania obserwowany u zwierząt ma być według Paronetto (129) następujący: 1. uwalnianie antygeny, 2. tworzenie

przeciwciała, 3. tworzenie kompleksu antygen-przeciwciała, 4. jego lokalizacja w komórkach wątrobowych, 5. niszczenie tych komórek w wyniku reakcji cytotoksycznych.

3. Przeszczepy śledziony

Starzyl wykonał 5 przeszczepów śledziony. W jednym z nich u chorego z agammaglobulinemią śledziona wykazywała czynność przez 6 tygodni na co wskazywało podniesienie poziomu γ -globulin, inne nie przyniosły korzystnych rezultatów.

4. Przeszczepy serca

Dokonano wielu auto- i alloprzeszczepów serca u psów przy użyciu krążenia pozaustrojowego (40, 59, 88, 161). Za wczesne kryterium odrzucania uchodzi obniżenie woltażu załamków w EKG. Zastosowanie środków immunopresyjnych w tym okresie pozwala na uzyskanie długotrwałych przeżyć (88) rzędu kilkudziesięciu dni. W tych przypadkach stopniowe nasilające się zwyrodnienie tętniczek i włókien mięśniowych doprowadza do upośledzenia czynności serca i zgonu. Doniesiono o jednej próbie ksenoprzeszczepu serca u człowieka (65). Serce pochodziło od szympansa i utrzymywało czynność przez godzinę. Zabieg miał charakter heroiczny i nie należy się spodziewać — mimo opanowania podstawowych problemów technicznych większych postępów w tej dziedzinie do czasu rozwiązania zagadnień immunologii przeszczepów.

5. Przeszczepy płuc

Istnieje cały szereg doniesień o doświadczalnych przeszczepach płuc u psów (32, 38, 62, 64, 66, 74, 89, 122, 126). Uzyskiwano kilkunastodniowe przeżycia nawet w przypadkach przeszczepu obu płuc. U człowieka wykonano przeszczep płuca w czterech przypadkach. Zabiegi te przeprowadzono u chorych z rakiem płuca, u których mała rezerwa oddechowa nie pozwalała na wykonanie zwykłego zabiegu pneumonektomii oraz u 2 chorych z rozlanymi zmianami obustronnymi płuc jako ostatnią próbę poprawy ich czynności. Uzyskano kilkunastodniowe przeżycia po zabiegu. W pracach doświadczalnych i w przeszczepach u ludzi przeszczepione płuco zachowywało początkowo swą czynność pomimo odnerwienia i odcięcia odpływu chłonki (3, 25, 47, 63). Przeszczep płuca jest szczególnie trudny. Zabieg wymaga doskonałej techniki chirurgicznej ze względu na conajmniej dwa zespolenia naczyniowe i zespolenie oskrzela. Zakrzepy żyłne w linii szwu naczyniowego są najczęstszym powikłaniem zabiegu. Przebieg pooperacyjny ze względu na torakotomię jest w wielu wypadkach ciężki. Istnieje duża trudność oceny nasilenia pro-

cesu odrzucania, a co za tym idzie dawkowania środków immunopresyjnych (24, 130). Zabieg wykonuje się w terenie zakażonym, stale połączonym ze światem zewnętrznym, co bardzo znacznie zwiększa liczbę i rozmiary powikłań zakaźnych, szczególnie wobec stosowania środków immunopresyjnych (70). Mimo tych wszystkich trudności wydaje się, że płuco jest narządem, którego przeszczepianie może mieć w przyszłości znaczenie w klinice ludzkiej.

Jako dawcy w przeszczepach u ludzi wchodzi w grę jedynie zwłoka. wydaje się możliwe utworzenie w przyszłości banku przeszczepów płucnych, bowiem jak wykazały badania Blumenstocka (17) na psach płuca przeszczepione po 24-godzinnym przechowywaniu w komorze hiperbarycznej zachowywały się podobnie jak płuca przeszczepione bezpośrednio.

6. Przeszczepy żołądka i jelit

Przeszczepy żołądka i jelit wykonał u psa Lillehei (86). Stwierdzono, że izolowany żołądek znosi dwugodzinne niedokrwienie w temperaturze pokojowej i co najmniej trzygodzinne w temp. 5°C, a po przeszczepieniu zachowuje się czynnościowo podobnie jak żołądeczek Heidenhaina. Przeszczepione jelita zachowywały swą czynność perystaltyczną, a w kilka dni po zabiegu obserwowano połączenie dróg chłonnych przeszczepu i biorcy. Mimo to przeżycie przeszczepu nie przekraczało kilkudziesięciu dni.

III. Uwagi końcowe

Przeszczepy narządowe w klinice ludzkiej mają dopiero 12-letnią tradycję i stosunkowo nieliczne sukcesy. Badania w tej dziedzinie prowadzone są bardzo intensywnie, w wielu ośrodkach przy współpracy badaczy różnych specjalności. Wydaje się, że powodzenie zależy głównie od rozwiązania szeregu zagadnień immunologicznych. Już obecnie poznanie możliwości sprawdzenia zgodności tkankowej i możliwość stosowania leków immunopresyjnych pozwala na przedłużenie przeżycia przeszczepów. Doskonali się również technika operacyjna i to zarówno wszczepiania jak i pobierania narządów, głównie dzięki zakrojonym na szeroką skalę badaniom nad przeszczepami doświadczalnymi. Dalszym warunkiem będzie poznanie możliwości przechowywania narządów przez długi okres czasu tak, jak jest to już możliwe w stosunku do niektórych tkanek. Niewiadomych jest jeszcze bardzo wiele, jednakże osiągnięte już wyniki upoważniają do przypuszczenia, że pełne powodzenie przeszczepów przynajmniej niektórych narządów jest sprawą do rozwiązania w ciągu następnych lat kilkunastu.

LITERATURA

1. Aisenber A. C., *Nature* **200**, 484 (1963).
2. Algire G. H., Weaver J. M., Prehn R. T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **64**, 1009 (1957).
3. Alican P., Hardy J. D., *JAMA* **183**, 849 (1963).
4. Auerbach R., *Science* **139**, 1061 (1963).
5. Aust J. B., Guttman R. D., *JAMA* **183**, 857 (1963).
6. Baker R., Gordon R., Ruffer J., Miller G. H. J., *Arch. Surg.* **65**, 702 (1952).
7. Basch R. S., Stetson C. A., *Transpl.* **1**, 469 (1963).
8. Berenbaum M. C., *Path. Biol.* **9**, 963 (1961).
9. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B., *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **143**, 58 (1954).
10. Billingham R. E., Krohn P. L., Medawar P. B., *Brit. Med. J.* **1**, 1157 (1951).
11. Billingham R. E., Brent L., *Brit. J. Exptl. Path.* **37**, 566 (1956).
12. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B., *Phil. Trans. Roy. Soc. London* **239**, 357 (1956).
13. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B., *Nature* **178**, 514 (1956).
14. Billingham R. E., Brent L., *Transplantation Bull.* **4**, 67 (1957).
15. Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B., *Transplantation Bull.* **5**, 377 (1958).
16. Billingham R. E., Brent L., *Phil. Trans. Roy. Soc. London* **242**, 439 (1959).
17. Blumenstock D. A., Lempert M., Morgado F., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **50**, 769 (1965).
18. Boyden S. V., Sorokin E., *Immunology* **3**, 272 (1960).
19. Brent L., Medawar P. B., Ruszkiewicz M., Ciba Foundation Symposium on Transplantation, red. G. E. W. Wolstenholme i M. P. Cameron, Little, Brown, Boston, 1962, str. 6—20.
20. Brent L., Medawar P. B., *Proc. Roy. Soc. London Ser. B*, **155**, 392 (1962).
21. Brent L., Medawar P. B., *Brit. Med. J.* **2**, 269 (1963).
22. Burnet F. M., Fenner F., *Heredity* **2**, 289 (1964).
23. Burnet F. M., Fenner F., Melbourne, Macmillan 1949.
24. Bücherl E. S., Nasserli M., *Lang. Arch. Klin. Chir.* **305**, 282 (1964).
25. Bücherl E. S., Nasserli M., Prondzyński B., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **47**, 455 (1964).
26. Calne R. Y., *Lancet* **1**, 41 (1960).
27. Calne R. Y., *Transplantation Bull.* **28**, 65 (1961).
28. Calne R. Y., *Brit. J. Surg.* **48**, 384 (1961).
29. Calne R. Y., Murray J. E., *Surg. Forum* **12**, 118 (1961).
30. Calne R. Y., Alexandre G. P. J., Murray J. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **99**, 743 (1962).
31. Cannon J. A., Longmire W. P., *Ann. Surg.* **135**, 60 (1952).
32. Chiba C., *J. Exptl. Med.* **115**, 853 (1962).
33. Claman H. N., Talmage D. W., *Science* **141**, 1193 (1963).
34. Cohn R., Countz S. L., *Am. J. Surg.* **108**, 245 (1964).
35. Congdon C. C., Urso I. S., *Am. J. Pathol.* **33**, 749 (1957).
36. Darmady E. M., Offer J. M., Stranack F., *Brit. Med. J.* **2** (5415), 976 (1964).
37. Davies D. A., *Biochem. J.* **84**, 307 (1962).
38. Davies L. G., Rosser T. H., West L. R., *Thorax* **20**, 481 (1965).

39. Dempster W. J., Lennox B., Boag J. W., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **31**, 670 (1950).
40. Demichow W. P., Die experimentelle Transplantation lebenswichtiger Organe. Volk u. Gesundheit, Berlin 1963.
41. Dempster W. J., Harrison C. V., Shackman R., *Brit. J. Med.* **2** (5415), 969 (1964).
42. Dixon F. J., Talmage W., Maurer P.H., *J. Immunol.* **68**, 693 (1952).
43. Dousset J., Rapaport F. T., Colombani J., Feingold N., *Transplantation* **3**, 701 (1965).
44. Dousset J., Rappaport F. T., Machado-Cactano I. A., Soto R., Legrand L., *Nouvelle Rev. Franc. Hematol.* **5**, 807 (1965).
45. Dumont A. E., Mayer D. J., Mulholland J. H., *Ann. Surg.* **160**, 373 (1964).
46. Eikins W. L., *J. Exptl. Med.* **120**, 329 (1964).
47. Faber L. P., Persner P. H., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **50**, 761 (1965).
48. Fischer B., Fischer E. R., *Transplantation* **2**, 228 (1964).
49. Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D.W.H., Loutit J. F., *Nature* **177**, 452 (1956).
50. Ford C. E., Advances in radiobiology, red. G. de Hevesy, A. Forsberg i J.D. Abbott, Olivier, London, 1957, str. 197—203.
51. Freedman S. O., Fischer J., Cooke R. A., *J. Allergy* **28**, 501 (1957).
52. Friedman R. M., Buckler C. E., Baron S., *J. Exptl. Med.* **114**, 173 (1961).
53. Gorer P. A., Loutit J.F., Micklem H. S., *Nature* **189**, 1024 (1961).
54. Gowans J. L., Mc Gregor D. D., Cowen D. M., *Nature* **196**, 651 (1962).
55. Gowans J. L., Knight E. J., *Proc. Roy. Soc. Landon Ser. B* **159**, 257 (1964).
56. Gray J. G., Russell P. S., Proceedings of Conference and Workshop in Tissue Histocompatibility testing, red. P.S. Russel, H. Winn, D.B. Amos, Washington 1964.
57. Giudice G., Novelli G. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 383 (1963).
58. Guiney E. J., Austen K. F., Russell P. S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **115**, 1113 (1964).
59. Hairston P., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **50**, 1 (1965).
60. Halasz N. A., *J. Surg. Res.* **3**, 503 (1963).
61. Halasz N. A., Orloff M. J., *Surg. Forum* **14**, 206 (1963).
62. Hardin C. A., Kittle C. F., *Science* **119**, 97 (1964).
63. Hardy J. D., Webb W. R., Dalton M. L., Walker G. R., *Ann. Surg.* **157**, 707 (1963).
64. Hardy J. D., Webb W. R., Dalton M. L., Walker G. R., *JAMA* **186**, 1065 (1963).
65. Hardy J. D., Kurrus F. D., Charez C.M., *JAMA* **188**, 1132 (1964).
66. Hardy J.D., Eraslan S., Webb W.R., *Ann. Surg.* **160**, 140 (1964).
67. Hellman R., Duke D. I., Tucker D. F., *Brit. Med. J.* **2** (5463), 687 (1965).
68. Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 762 (1961).
69. Hitchcock C.R., Kiser T.R., Telander R.L., Seljeskog E. L., *JAMA* **189**, 934 (1964).
70. Hill B.B., Rowlands D.T., Rifkind D., *New Engl. J. Med.* **271**, 1021 (1965).
71. Horowitz R.E., Burrows L., Paronetto F., Dreiling D., Kark A. E., *Transplantation* **3**, 318 (1965).
72. Hume D. M., Megee J.H., Kauffmann H.M., Rittenbury M. S., Prout G. R., *Ann. Surg.* **158**, 608 (1963).

73. Hurwitz J., August J. T., w *Progress in Nucleic Acid Research*, red. J. N. Davidson, W. E. Cohn t. 1 Academic Press, New York, 1963, str. 59—92.
74. Juvenelle A. A., Citret C., Wiles C. E., Steward J. D., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **21**, 111 (1951).
75. Kaliss N., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **64**, 977 (1957).
76. Kaliss N., w *Mechanisms of Immunological Tolerance*, red. M. Hasek, Acad. Press, New York, 1962, str. 413—29.
77. Kandutsch A. A., Stimpfling J. H., Ciba Foundation Symposium on Transplantation, red. G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron, Little Brown, Boston, 1962, str. 72—86.
78. Kandutsch A. A., Stimpfling J. H., *Transplantation* **1**, 201 (1963).
79. Kent M., w *Radiation Biology*, red. J. H. Martin, Academic Press, New York 1959, str. 68—71.
80. Koprowski H., Fernandes M. V., *J. Exptl. Med.* **116**, 467 (1962).
81. Kretschmer R. R., Perez-Tamayo R., *J. Exptl. Med.* **116**, 879 (1962).
82. Law L. W., Trainin N., Levy R. H., Barth W. F., *Science* **143**, 1049 (1964).
83. Lawrence H. S., w Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, red. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor, Boston 1960, str. 243—71.
84. Lawrence H. S., Rappaport F. T., Converse J. M., Tillet W. S. w Ciba Foundation Symposium on Transplantation, red. G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron, Boston 1962, str. 271—81.
85. Levey L. H., Trainin N., Law L. W., *J. Nat. Cancer Inst.* **31**, 199 (1963).
86. Lillehei R. C., *JAMA* **183**, 861 (1963).
87. Langmire W. P., Cannon J. A., Weber R. A., w Ciba Foundation Symposium on Preservation and Transplantation of Normal Tissues, red. G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron, J. Etherington, Little Brown, Boston 1954, str. 23—40.
88. Lower R. R., Dong E., Shumway N. E., *Surgery* **58**, 110 (1965).
89. Magovern G. J., Yates A. J., *Ann. N.Y. Ac. Sci.* **102**, 676 (1964).
90. Mandel M. A., Monaco A. P., Russell P. S., *J. Immunol.* **95**, 673 (1965).
91. Mannick J. A., Graziani J. T., Egdahl R. H., *Transplantation* **3**, 321 (1964).
92. Mannick J. A., Egdahl R. H., *Dis. Chest.* **46**, 327 (1964).
93. Mannick J. A., *Surgery* **56** (1), 249 (1964).
94. Manox W. G., *Surgery* **56**, 279 (1964).
95. Manson L. A., Foschi G. V., Pelm J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1816 (1962).
96. Marchioro T. L., *Surgery* **54** (6), 900 (1963).
97. Maurer P. H. J., *Exper. Med.*, **113**, 1029 (1961).
98. McLaren A., *Transplantation Bull.* **28**, 99 (1961).
99. Medawar P. B., *J. Anat.* **79**, 157 (1945).
100. Medawar P. B., Sparrow E. M., *J. Endocrinol* **14**, 250 (1956).
101. Medawar P. B. w Ciba Foundation Symposium on Transplantation, red. G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron, Boston 1962, str. 1—5.
102. Medawar P. B., *Mechanisms of Immunological Tolerance*, red. M. Hašek, Acad. Press, New York 1963, str. 17—20.
103. Medawar P. B., *Transplantation* **1**, 21 (1963).
104. Miller J. F., *Adv. Canc. Res.* **6**, 219 (1961).
105. Miller J. F. A., *Lancet* **2**, 748 (1961).
106. Miller J. F. w Ciba Foundation Symposium on Transplantation, red. G. E. W. Wolstenholme, M. P. Cameron, Little Brown, Boston, 1962.
107. Miller J. F., Osoba D., Dukor P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **124**, 95 (1965).

108. Miller J.F.A., Marshall A.H.E., White R.G., *Adv. Immunol.* **2**, 111 (1962).
109. Murray J.E., Merrill J.P., Harrison J.H., Wilson R.E., Dammin G.J., *New. Engl. J. Med.* **268**, 1315 (1963).
110. Mitchison N.A., *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **142**, 72 (1954).
111. Mitchison N.A., Dube O.L., *J. Exptl. Med.* **102**, 179 (1965).
112. Monaco A.P., Wood M.L., Russel P.S., *Transplantation* **3**, 542 (1965).
113. Moore D.B., Pareira M.D., *Transplantation* **3**, 627 (1965).
114. Murphy J.B., *Lymphocyte in Resistance to Tissue Grafting, Malignant Disease, and Tuberculous Infection*, New York 1926.
115. Morray J.E., *Transplantation* **2**, 147 (1964).
116. Murray J.E., *Ann. Surg.* **156**, 337 (1962).
117. Murray J.E., Sheil A.G.R., Moseley R., Knight P., Mc Gavic J.D., Dammin G.J., *Ann. Surg.* **160**, 449 (1964).
118. Najjarjan J. S., Feldman J. D., *J. Exptl. Med.* **115**, 1083 (1962).
119. Najjarjan J.S., Feldman J.D., *J. Exptl. Med.* **117**, 449 (1963).
120. Najjarjan J. S., Feldman J. D., *Transplantation* **1**, 495 (1963).
121. Nathan P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **120** (1), II, 458 (1964).
122. Neptune W. B., Welker R., Bailey C. P., *J. Thorac. Cardiovasc Surg.* **26**, 275 (1953).
123. Newth D.R., *Transplantation* **27**, 452 (1961).
124. Nowell P.C., Cole L.J., Roan P.L., Habermeyer J.G., *J. Nat. Canc. Inst.* **18**, 127 (1957).
125. Osoba D., Miller J.F., *J. Exptl. Med.* **119**, 177 (1964).
126. Otto T. J., Trenkner M., *Thorax* **21**, 564 (1966).
127. Oth A., Castermans A., *Transplantation Bull.* **6**, 418 (1959).
128. Owen R.D., *Science* **102**, 400 (1945).
129. Paronetto F., Horowitz R.E., Sicular A., Burrows L., Kark A.E., Popper H., *Transplantation* **3**, 303 (1965).
130. Parsa B., Faber P., Staub W.E., Beattie E. J., *Dis. Chest.* **45**, 365 (1964).
131. Porter L.A., Calne R.Y., Zukoski C.F., *Lab. Invest.* **13**, 809 (1964).
132. Porter K.A., Joseph N.H., Rendall J.M., Staliński C., Hoehn R.J., Calne R.Y., *Lab. Invest.* **13**, 1080 (1964).
133. Pierce J.C., Varco R.L., Good R.A., *Surgery* **50**, 186 (1961).
134. Powell A.E., Ray O., Whitenack D., Hubay C.A., Holden W., *Nature* **193**, 1198 (1962).
135. Rappaport F.T., Converse J.M., *Ann. Surg.* **147**, 273 (1958).
136. Rappaport F.T., Thomas L., Converse J.M., Lawrence H.S., *Federation Proc.* **20**, 36 (1960).
137. Reemtsma K., Mc Cracken D.B., Schlegel J.U., Pearl M.A., Pearce C.W., De Witt C.W., Smith P.E., Hewitt R.L., Flinner R. L., Creech O., *Ann. Surg.* **160**, 384 (1964).
138. Rhea W.G., *Transplantation* **3**, 380 (1965).
139. Russell P.S., Winn H.J., Amos D. B. (red.), *Histocompatibility Testing*, Washington 1965.
140. Schwartz R., Dameshek W., *J. Clin. Invest.* **39**, 952 (1960).
141. Schwartz R., Stack J., Dameshek W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **99**, 164 (1958).
142. Scothorne R.J., *Transplantation Bull.* **3**, 13 (1956).
143. Scothorne R.J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **73**, 673 (1958).
144. Simonsen M., *Lancet* **1**, 1332 (1965).

145. Simonsen M., *Lancet* **1**, 415 (1965).
146. Simonsen M., *Path. Microbiol. Scand.* **40**, 480 (1957).
147. Simonsen M., Jensen E. w *Biological Problems of Grafting*, red. F. Albert, P. B. Medawar, Blackwell, Oxford, 1959, str. 214—36.
148. Smith L.H., Congdon C.C. w *Radiation Protection and Recovery*, red. A. Hollaender, Pergamon Press, New York 1960, str. 242—302.
149. Sparrow E.M., *J. Endocrinol.* **9**, 101 (1953).
150. Starzl T.E., Marchioro T.L., Waddell W.R., *Surg. Gynecol. Obstet.* **117**, 659 (1963).
151. Starzl T.E., Marchioro T.L., Rowlands D.T., Kirkpatrick C.H., Wilson W., Rifkind D., Waddell W.R., *Ann. Surg.* **160**, 411 (1964).
152. Starzl T.E., Marchioro T.L., Porter K., Taylor P.D., Faris T.D., Herrmann T.J., Hlad C.J., Waddell W.R., *Surgery* **58**, 131 (1965).
153. Starzl T.E., *Ann. Surg.* **162**, 749 (1965).
154. Starzl T.E., *Surgery* **56**, 296 (1964).
155. Starzl T.E., Marchioro T.L., Waddell W.R., *Radiology* **85**, 369 (1965).
156. Stetson C.A., Jensen E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **87**, 249 (1960).
157. Steimuller D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **99**, 629 (1962).
158. Stjernswärd J., *J. Nat. Cancer. Inst.* **35**, 885 (1965).
159. Taliaferro W.H., *Ann. N.Y. Ac. Sci.* **69**, 745 (1957).
160. Traketellis A.C., Axelrod A.E., Montjar M., Lamy F., *Nature* **202**, 154 (1964).
161. Turski Cz., Homologiczne doświadczalne przeszczepy serca u psów. Warszawa 1963.
162. Ophoff D.E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **99**, 651 (1958).
163. Waksman B.H., Arnason B.G., Janković B.D., *J. Exptl. Med.* **116**, 187 (1962).
164. Weaver J.M., Algire G.H., Prehn R.T., *J. Nat. Canc. Inst.* **15**, 1737 (1955).
165. Weiner J., Spiro D., Russell P.S., *Am. J. Pathol.* **44**, 319 (1964).
166. Winchell H.S., Pollycove M., Anderson A.C., Lawrence J.H., *Blood* **23**, 321 (1964).
167. Woodruff M.F.A., *Nature* **168**, 35 (1951).
168. Woodruff M.F.A., *Transplantation of Tissues and Organs*, Springfield, Illinois 1960.
169. Zukoski C.F., *Surg. Gynecol. Obstet.* **112**, 707 (1963).
170. Zukoski C.F., Lee H.M., Hume D.M., *J. Surg. Res.* **2**, 44 (1962).
171. Zukoski C.F., Sachiatello C.R., Turley E.A., *Surgery* **58**, 167 (1965).

BOGUMIŁ BARTOSIŃSKI*, BOLESŁAW ZAGALAK**

Koenzymatyczne funkcje biotyny

Coenzymatic Functions of Biotin

The role and the mechanism of biotin action in the carboxylation reactions of acetyl-CoA, propionyl-CoA, β -methylcrotonyl-CoA and pyruvate, as well as chemical synthesis and biosynthesis of biotin and biotin enzymes are reviewed.

Biotynę jako jeden ze składników tak zwanych „bios II” wyizolował w 1935 roku Kögl (98, 99). Mianem bios określano wówczas nieznaną substancję, które dodane w małych ilościach do pożywki stymulowały wzrost drożdży. Z drożdży wyodrębniono czynnik, nazwany witaminą H (niem. *Haut* — skóra), który usuwał objawy łysienia u szczurów, wywołane przez karmienie surowym białkiem kurzym (11). W 1940 roku okazało się że witamina H jest identyczna z biotyną (64) a następnie stwierdzono, że przyczyną choroby skórnej u szczurów jest zawarta w surowym białku kurzym awidyna — białko, które silnie wiąże się z biotyną (40). Strukturę biotyny określono w pracowni Du Vigneaud (137), a zespół Folkersa (69, 70) z laboratorium Mercka potwierdził na drodze syntezy chemicznej.

I. Synteza

1. Synteza chemiczna

Syntezy chemiczne biotyny są trudne, ponieważ zawiera ona trzy asymetryczne atomy węgla C_2 , C_3 i C_4 , wskutek czego może się tworzyć osiem stereoizomerów lub cztery racematy. W syntezie biotyny dokonanej przez zespół Folkersa (69, 71, 206) wychodząc z S-karboksymetylocysteiny otrzymano trzy z tych racematów, a z jednego z nich, DL-biotyny, wydzielono D-biotynę drogą krystalizacji jej soli z L(+)-argininą. Do rozdzielania racematu używano też estrów kwasu D(—)-migdałowego. W innych syntezach biotyny produktem wyjściowym były pochodne tiofanu (8, 9, 167). Przemysłową metodę otrzymywania biotyny opracowano w laboratoriach koncernu Hoffmann-La Roche. Większość etapów tej syntezy jest stereo-

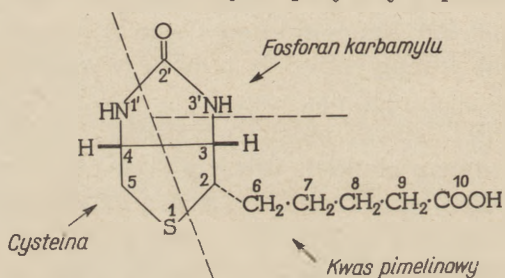
* Dr, Laboratorium Organopreparatów, Jeleniogórskie Zakłady Farmaceutyczne, Jelenia Góra.

** Dr, adiunkt Katedry Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu.

specyficzna i tym znacznie różni się ona od pozostałych metod (60). Szczegółowe opisy metod syntezy D-biotyny można znaleźć między innymi w referatowej pracy *Sternbacha* (179).

2. Biosynteza biotyny

Biotynę jako czynnik wzrostowy może zastępować u niektórych bakterii kwas pimelinowy (39, 41, 56, 185, 216, 218). Dodany do pożywki promieniotwórczy kwas pimelinowy wbudowuje się w biotynę (43, 44, 45). Grupa *Lynena* (120, 123) zbadała biosyntezę biotyny u *Achromobacter sp.*, hodując go na pożywce zawierającej 3-¹⁴C-cysteinę, albo ¹⁴CO₂ i oznaczając zawartość izotopu w produktach chemicznego rozpadu biotyny. Wbudowywanie izotopowego węgla z 3-¹⁴C-cysteiny w C₅ biotyny, a węgla z ¹⁴CO₂ w mocznikową grupę karbonylową C_{2'} i w grupę karboksylową C₁₀ biotyny sugerowało, że biotyna może być syntetyzowana z cysteiny, pimelilo-CoA i fosforanu karbamyłu, przy czym pimelilo-CoA może po-



Rys. 1. Metaboliczne pochodzenie różnych atomów biotyny

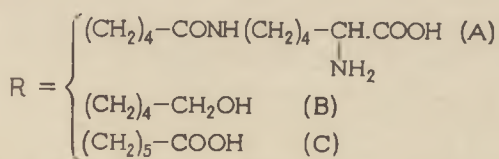
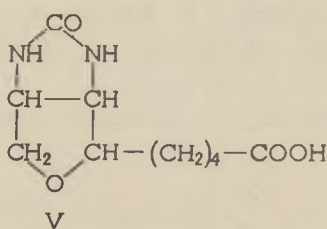
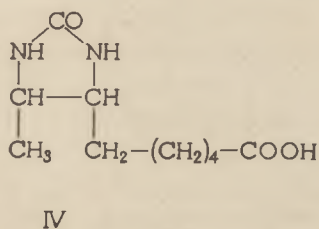
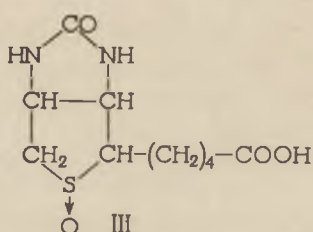
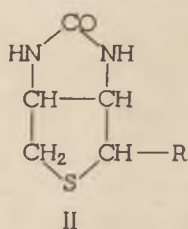
wstać z trzech cząsteczek malonylo-CoA w sposób analogiczny do syntezy kwasów tłuszczowych. Metaboliczne pochodzenie różnych atomów biotyny ilustruje rysunek 1.

Traub (187, 188) na podstawie analizy rentgenograficznej oznaczył względną konfigurację biotyny (wzór I), jednak dopiero ostatnie badania rentgenograficzne *bis-p*-bromoanilidu *N*₁-karboksybiotyny pozwoliły ustalić absolutną jej konfigurację (rysunek 1) (189).



II. Analogi biotyny

W kilka lat po odkryciu biotyny wyodrębniono lub otrzymano syntetycznie szereg związków pokrewnych biotynie, które bądź zastępują ją będąc czynnikami wzrostowymi dla drobnoustrojów lub zwierząt, bądź też są kompetycyjnymi inhibitorami biotyny. Z autolizatów drożdżowych wyodrębniono biocytynę (II A) (ϵ -N-biotynylolizynę) (214, 215), której strukturę potwierdzono drogą syntezy chemicznej a także chemicznej degradacji (207). Biocytynę można otrzymać również w wyniku hydrolizy enzymów biotynowych przez proteolityczny enzym ze *Streptomyces griseus* zwany pronazą (102). Warto tutaj wspomnieć o biotynolu (II B), ana-



logu biotyny powstającym przez redukcję estru metylowego biotyny za pomocą LiAlH_4 (34); nie jest on czynnikiem wzrostowym stwierdzono jednak, że ulega enzymatycznemu utlenieniu do biotyny. Do związków pokrewnych biotynie zalicza się też jej homologi o większej liczbie atomów węgla w łańcuchu bocznym; są one silnymi kompetycyjnymi analogami biotyny, a najsilniejszym z nich jest D-homobiotyna (II C) (61, 164). Analogami biotyny są też sulfotlenki biotyny, powstające w wyniku utlenienia biotyny równomolarnymi ilościami wody utlenionej. Proces ten prowadzi do powstania dwóch izomerów: prawo i lewoskrętnego, co jest wynikiem asymetrii grupy sulfotlenkowej. L-sulfotlenek D-biotyny (III), czynnik wzrostowy dla *Neurospora crassa*, wyodrębniono z *Asper-*

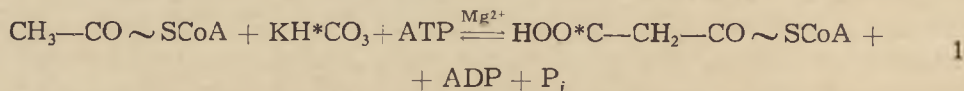
gilus niger (217, 218) oraz z *Phycomyces blakesleanus* (43, 44). Sulfotlenek biotyny występuje także w mleku. Poszczególne sulfotlenki mają różną aktywność jako czynniki wzrostowe dla drożdży (138, 139, 140). Inny analog, deztiotiotynę (IV) (38, 141) otrzymano przez katalityczną redukcję D-biotyny a także syntetycznie (20, 36, 208). Dalszymi poznanymi związkami są analogi biotyny, które w miejsce siarki zawierają tlen. Jeden z nich, DL-oksybiotyna (V) ma własności zbliżone do biotyny i jest czynnikiem wzrostowym dla drożdżyc (37, 38).

III. Funkcje biotyny

Biotyna jest koenzymem następujących enzymów: karboksylazy acetylo-CoA, karboksylazy propionilo-CoA, karboksytransferazy metylomalonylo-CoA:pirogronian, karboksylazy β -metylokrotonilo-CoA oraz karboksylazy pirogronianowej.

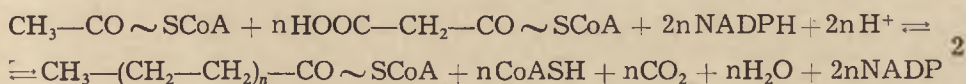
1. Karboksylaza acetylo-CoA (ligaza acetylo-CoA: CO₂(ADP)) (E.C.6.4.1.2.)

Stosunkowo dawno stwierdzono, że jony HCO₃⁻ silnie stymulują syntezę kwasów tłuszczowych w układach enzymatycznych pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego (21, 89, 122, 178). Ponieważ jednak ¹⁴CO₂ nie był wbudowywany w łańcuchy kwasów tłuszczowych przez układy enzymatyczne z drożdży lub z wątroby gołębia (57, 89), przypuszczano, że gra on w syntezie kwasów tłuszczowych rolę katalityczną. W 1958 roku W a k i l (198) stwierdził, że do syntezy kwasu palmitynowego w układach enzymatycznych z wątroby gołębia potrzebne były dwie frakcje białkowe. Jedna z acetylo-CoA, kwaśnego węgla i ATP w obecności jonów Mn²⁺ syntetyzowała malonylo-CoA, druga zaś w obecności NADPH przeprowadzała malonylo-CoA w kwas palmitynowy. Również grupa Lynena (42, 115, 116, 117) badając syntezę kwasów tłuszczowych u drożdży stwierdziła, że układy enzymatyczne syntetyzują promieniotwórczy 3-¹⁴C-malonylo-CoA z KH¹⁴CO₃ i acetylo-CoA w obecności jonów Mg²⁺ zgodnie z równaniem

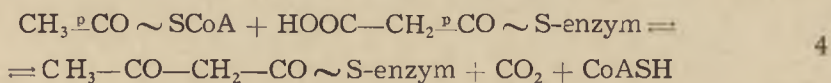
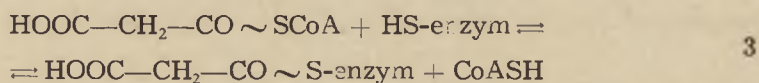


Takie same wyniki otrzymał G a n g u l y (55) badając preparaty zwierzęce. Enzym katalizujący reakcję 1 nazwano karboksylazą acetylo-CoA (72, 129, 143, 198). Wbudowywanie octanu lub malonylo-CoA w wyższe kwasy tłuszczowe było silnie hamowane przez awidynę (117, 199, 201, 202) co wskazywało na udział biotyny w syntezie kwasów tłuszczowych. Druga frakcja białkowa nazwana syntetazą kwasów tłuszczowych (116, 118,

119, 163) katalizowała syntezę kwasów tłuszczowych z acetylo-CoA, który jest starterem syntezy kwasów tłuszczowych (22, 200) i malonylo-CoA w obecności NADPH zgodnie z reakcją 2:

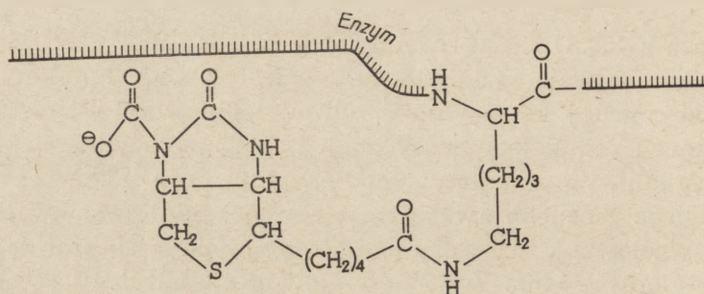


Syntetaza kwasów tłuszczowych zawiera jeden mol FMN. Enzym ten katalizuje kondensację malonylo-CoA z acetylo-CoA lub innym acylo-CoA, redukcję grupy ketoacylowej, odwodnienie grupy β -hydroksyacylowej i w końcu redukcję nienasyconej α , β -grupy acylowej, przy czym związki pośrednie nie są odłączane od enzymu aż do zakończenia syntezy całego długiego łańcucha kwasu tłuszczowego. Syntetaza kwasów tłuszczowych wyizolowana z drożdży i oczyszczona około 80-krotnie, syntetyzuje z acetylo-CoA i malonylo-CoA głównie palmitylo- i stearylo-CoA. Zapotrzebowanie energetyczne na endoergiczną reakcję kondensacji kwasu karbonowego z kwasem octowym wynoszące według Lipmanna (112) 16 000 cal/mol jest pokrywane nie tylko z egzoergicznego rozbitcia tioestru, lecz także z egzoergicznego procesu dekarboksylacji (119). Opisana kondensacja malonylo-CoA z acetylo-CoA połączona z dekarboksylacją jest analogiczna do biosyntezy kwasu δ -aminolewulinowego z sukcynylo-CoA i glicyny, przebiegającej również w połączeniu z dekarboksylacją (58, 91, 151). Właściwy partner kondensacji z sukeynylo-CoA — połączenie fosforanu pirydoksalu i glicyny ma taką konfigurację elektro-nową jak β -ketokwasy z dużą tendencją do tworzenia karbanionu i pod tym względem przypomina monotioester kwasu malonowego (82, 115). Według badań grupy Lynena (117) synteza kwasów tłuszczowych z malonylo-CoA przebiega z utworzeniem malonylo \sim S-enzymu, który później kondensuje się z acetylo-CoA w procesie połączonym z dekarboksylacją zgodnie z reakcjami 3 i 4.



Z wymienionych enzymów tylko karboksylaza acetylo-CoA zawiera biotynę, która pełni rolę przekaźnika dwutlenku węgla (195, 196, 201, 202). Katalitycznym przekaźnikiem jest N_1 -karboksybiotyna połączona poprzez ϵ -aminową grupę lizyny z enzymem (120, 143) (rysunek 2). Karboksylaza acetylo-CoA jest prawdopodobnie *in vivo* związana z błonami cytoplazmatycznymi (131, 220) i pełni rolę regulatora szybkości syntezy kwasów tłuszczowych (18, 55, 100, 127, 142, 144, 219). Synteza malonylo-CoA z acetylo-CoA, HCO_3^- i ATP jest silnie aktywowana przez cytryniany lub

izocytryniany (21, 23, 62, 102, 127, 128, 130, 157, 194, 197, 202, 203). Aktywacja ta ma prawdopodobnie charakter działania allosterycznego (135). Niska temperatura odwracalnie znosi aktywację (145, 194) a towarzysząca zmiana współczynnika sedymentacji, wskazuje, że w obniżonej temperaturze holoenzym ulega dysocjacji lub też przyjmuje inną strukturę



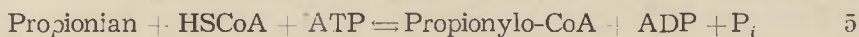
Rys. 2. Połączenie enzym-biotyna w karboksylacie acetylo-CoA

przestrzenną. Grupa Lane'a (62) oczyściła karboksylazę acetylo-CoA z wątroby kurczęcia i zbadała w mikroskopie elektronowym. W stanie zaktywowanym przez cytryniany enzym ma ciężar cząsteczkowy 7 800 000 i jest wydłużoną cząsteczką o splecionej z włókienek strukturze, grubości 70—100 Å i długości 7 000 Å, zawierającą 20 cząsteczek biotyny. Brak cytrynianu powoduje rozpad na mniejsze, nieaktywne podjednostki o średnicy 70—300 Å. Grupa Lane'a (62) przypuszcza, że zaktywowana cząsteczką może być także matrycą, do której dołączone zostają cząsteczki syntetazy kwasów tłuszczowych, tworząc razem multienzym zarówno syntetyzujący jak i zużywający malonylo-CoA. Malonylo-CoA może być także syntetyzowany z acetylo-CoA drogą transkarboksylacji ze szczawiooctanu lub szczawiooborsztynianu (1, 2, 80, 210). Karboksylaza acetylo-CoA jest hamowana przez długołańcuchowe pochodne acylowe CoA (19, 145). Hamowanie to jest kompetycyjne w stosunku do aktywatorów jakimi są cytryniany lub izocytryniany. Przypuszcza się, że jest to hamowanie drogą sprzężenia zwrotnego ponieważ długołańcuchowe pochodne acylowe CoA są ostatnimi niskocząsteczkowymi produktami pośrednimi w biosyntezie tłuszczów prostych i złożonych.

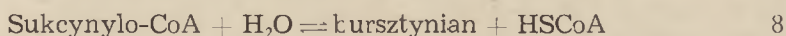
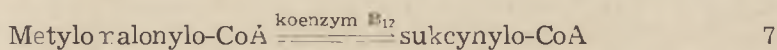
2. Karboksylaza propionilo-CoA (ligaza propionilo-CoA: $\text{CO}_2(\text{ADP})$) (E.C.6.4.1.3)

Kwas propionowy jest jednym z głównych metabolitów wytwarzanych przez florę bakteryjną w żwaczu (126, 184). Przypuszczano, że jest on metabolizowany drogą czterowęglowych kwasów, ponieważ propionian znakowany węglem ^{14}C w pozycji α lub β przekształcał się w mleczan lub pirogronian, u których atomy α i β były równomiernie znaczone (109, 147). Lardy i Peanasky (109, 110) zauważyli pierwsi, że ekstrakty z mi-

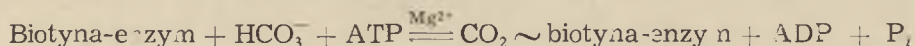
tochondriów wątroby od szczurów żywionych paszą ubogą w biotynę wykazują zmniejszoną zdolność karboksylowania propionianu. Pennington (152). zaobserwował, że w nabłonku zwacza owcy metabolizm kwasu propionowego jest uzależniony od obecności CO₂. Grupa Ochoa (13, 24, 48, 49, 50, 51, 133) wykazała, że najpierw w zależnej od ATP reakcji propionian estryfikowany jest do propionylo-CoA (reakcja 5), a następnie jest on karboksylowany kosztem hydrolizy wiązania wysokoenergetycznego z ATP do metylomalonylo-CoA (reakcja 6). Związek ten ulega izo-



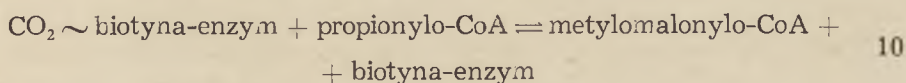
meryzacji pod wpływem zawierającej koenzym B₁₂ mutazy metylomalonylo-CoA (E.C.5.4.99.2) do sukcyntylo-CoA (reakcja 7), który później jest hydrolizowany na wolny bursztynian i CoA (reakcja 8). W 1961 roku grupa Ochoa (132, 134) doniosła o istnieniu jeszcze jednego enzymu uczestniczącego w metabolizmie kwasu propionowego, epimerazy metylomalonylo-CoA (E.C.5.1.99.1) (46) powszechnie błędnie nazywanej racemazą metylomalonylo-CoA.



Karboksylacja propionylo-CoA jest hamowana przez awidynę (65, 184). Karboksylazę propionylo-CoA wyodrębniono z mitochondriów wątroby wołu (65, 66, 67, 68, 124, 125) i z serca świni (86, 88, 148, 186). Ma ona ciężar cząsteczkowy około 700 000 i zawiera 4 mole biotyny na 1 mol białka (87), co sugeruje, że enzym ten składa się z czterech podjednostek, każda o ciężarze cząsteczkowym 175 000. To przypuszczenie potwierdza także rozszczepianie enzymu pod wpływem mocznika na małe cząsteczki jednakowej wielkości. Reakcja karboksylacji propionylo-CoA zachodzi w dwu etapach: aktywowanie dwutlenku węgla i powstanie wysokoenergetycznego połączenia CO₂~biotyna-enzym (reakcja 9) a następnie karboksylacja propionylo-CoA (reakcja 10).



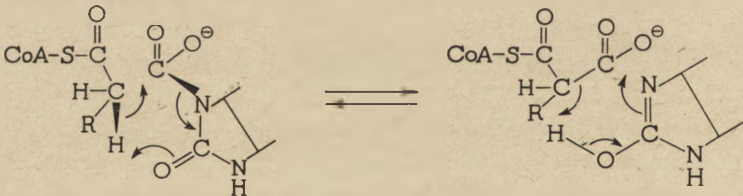
W reakcji 9 jeden mol CO₂ jest pobierany przez jeden mol związanej z enzymem biotyny (86, 87, 106) i ilościowo przenoszony (reakcja 10) na propionylo-CoA. W reakcji 10 nie są potrzebne ani jony magnezu, ani



nukleotydy adeniny i nieorganiczny fosforan (53, 85). Połączenie CO₂~biotyna-enzym może natomiast reagować z ADP i P_i dając 1 mol ATP na 1 mol związanego przez karboksylazę dwutlenku węgla (87). Rolę katali-

tycznego przenośnika dwutlenku węgla spełnia i tutaj N_1 -karboksybiotyna (77, 85) związana przez ϵ -aminową grupę lizyny z białkiem.

Steryiczny przebieg procesu przeniesienia grupy karboksylowej z połączenia $CO_2 \sim$ biotyna-enzym na propionylo-CoA badano używając karboksylazy z serca świni (161, 162). W wyniku karboksylacji propionylo-CoA pojawia się asymetryczny atom węgla, a w związku z tym możliwość powstania dwóch epimerów. W procesie enzymatycznym powstaje jednak tylko jeden izomer, nazwany „epimerem a”, który pod wpływem epimerazy metylomalonylo-CoA ulega izomeryzacji do „epimeru b” (84, 132, 161, 162), ten zaś jest substratem dla mutazy metylomalonylo-CoA. Epimeryzacja biegnie drogą enolizacji i jest odwracalna (161), co nasuwa przypuszczenie, że obydwa stereoisomery „a” i „b” posiadają zbliżoną wartość energii wiązania w tym asymetrycznym atomie węgla. Na podstawie analogii z innymi procesami enzymatycznymi przypuszcza się, że karboksylaza propionylo-CoA jest stereospecyficzna względem atomów wodoru przy α -atomie węgla propionylo-CoA i że tylko jeden z nich ulega wymianie na grupę karboksylową (161). Nasuwa to pytanie czy karboksylacja propionylo-CoA zachodzi z zachowaniem konfiguracji przy α -atomie węgla. Wyjaśniono, że „epimer a” metylomalonylo-CoA ma konfigurację L (161, 162, 176, 177). R \acute{e} t e y i L y n e n (161) wysuwają więc przypuszczenie, że enzymatyczna karboksylacja propionylo-CoA biegnie z zachowaniem konfiguracji, a zatem grupa karboksylowa zostaje wprowadzona w miejsce, które uprzednio zajmował wodór wymieniony w trakcie karboksylacji. Zgadza się to z ogólnie przyjętą hipotezą o elektrofilnym przeniesieniu grupy karboksylowej z enzymu na karboanion akceptora (rysunek 3). W procesie tym biotyna brałaby udział w postaci izomoczni-

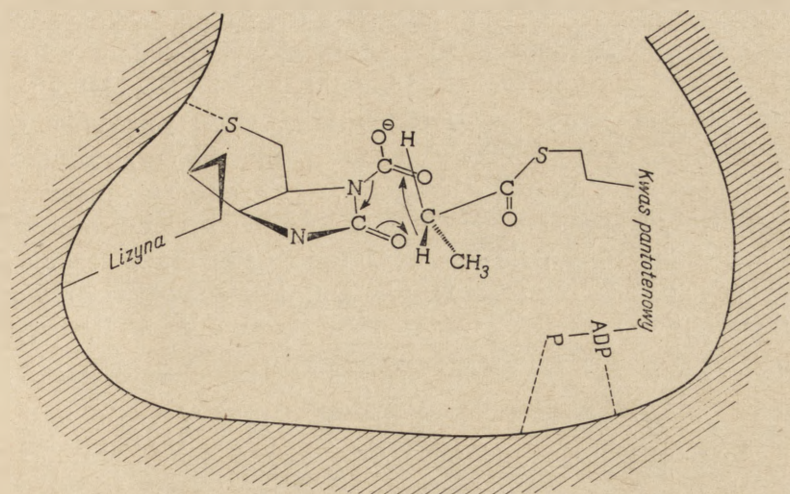


Rys. 3. Chemiczny mechanizm przenoszenia dwutlenku węgla z karboksybiotyny na substrat wg (161)

Wiązania ulegające polaryzacji przedstawiono pogrubioną strzałką

kowej, R \acute{e} t e y i L y n e n (161) proponują steryiczny przebieg przeniesienia grupy karboksylowej na propionylo-CoA przedstawiony na rysunku 4.

Karboksylaza propionylo-CoA występuje także u drobnoustrojów i roślin. Gibson i Knight (59) oraz Knight (97) donieśli, że bezkomórkowe ekstrakty z *Rhodospirillum rubrum* wiążą CO_2 w obecności propionianu, ATP i Mg^{2+} , a reakcja ta jest hamowana przez awidynę. Karboksylazę propionylo-CoA wykryto w *Mycobacterium smegma-*



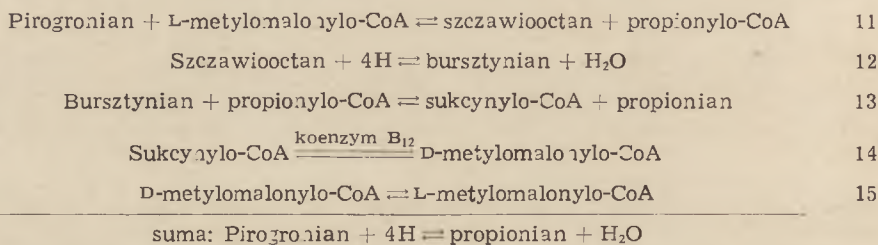
Rys. 4. Steryczny przebieg enzymatycznej karboksylacji propionyl-CoA. Skośne linie rysunku przedstawiają aktywną część enzymu. Przyjmuje się, że biotyna jest związana z ϵ -aminową grupą lizyny enzymu poprzez siarkę pierścienia biotyny, natomiast propionyl-CoA poprzez obdarzone ładunkiem grupy fosforanowe wg (161)

tis, gdzie także obserwowano hamowanie wiązania CO_2 przez awidyne (180), w *Streptomyces erythraeus* (205), w *Rhizobium meliloti* i *Rhizobium japonicum* (28) oraz u *Nocardia corallina* (12) i *Flavobacterium* sp. (5). Hatch i Stumpf (73) przypuszczają, że i u roślin metabolizm kwasu propionowego biegnie drogą karboksylacji propionyl-CoA do metylomalonyl-CoA.

3. Karboksyltransferaza metylomalonyl-CoA: pirogronian (E.C.2.1.3.1)

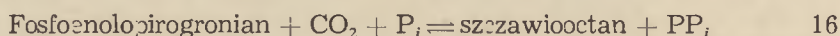
Delwiche (25, 30, 31) pierwszy doniósł, że bakterie kwasu propionowego dekarboksylują bursztynian do propionianu, oraz że reakcja ta zależy od biotyny. Przypuszczano, że u tych bakterii węglowodany są metabolizowane do pirogronianu, z którego drogą karboksylacji powstaje szczawiooctan redukowany następnie do bursztynianu a z tego po dekarboksylacji powstaje kwas propionowy i CO_2 . Droga metabolizowania węglowodanów w bakteriach propionowych okazała się odmienna. Podczas procesu dekarboksylacji uwalnia się nie wolny CO_2 , a inna jednostka jednowęglowa (153, 184, 211, 212). Kwas bursztynowy nie jest bezpośrednio dekarboksylowany, lecz najpierw łączy się z koenzymem A. Sukcynylo-CoA jest izomeryzowany, w zależnej od koenzymu B_{12} reakcji, do D-metylomalonil-CoA, ten zaś jest epimeryzowany do L-metylomalonil-CoA i dopiero ten ostatni ulega dekarboksylacji w zależnej od biotyny reakcji do propionyl-CoA. Dekarboksylacja ta zachodzi z jednoczesnym przeniesieniem grupy karboksylowej z metylomalonyl-CoA na pirogronian tak, że obok propionyl-CoA powstaje szczawiooctan (10, 29,

92, 181, 183, 184, 150, 154, 213). Katalizująca tę ostatnią reakcję karboksyltransferaza metylomalonylo-CoA: pirogronian, wyodrębniona z *Propionibacterium shermanii* (210), zawiera 1,5 µg biotyny na mg białka i podobnie jak karboksylaza z serca świni dysocjuje w 7M roztworze mocznika na podjednostki jednakowej wielkości. Katalityczną rolę przenośnika dwutlenku węgla spełnia i tutaj N₁-karboksybiotyna połączona poprzez grupę ε-aminową lizyny z apoenzymem (209). Szczególnie godne uwagi w transkarboksylacji metylomalonylo-CoA-pirogronian jest to, że reakcja ta zachodzi bez udziału ATP. Podczas fermentacji propionowej w *Propionibacterium shermanii* (schemat 1) powstaje stosunkowo dużo ATP, rozpad jed-



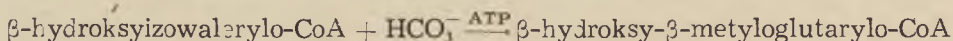
Schemat 1. Metabolizm kwasu propionowego u *Propionibacterium shermanii*

nej cząsteczki glukozy daje bowiem cztery cząsteczki ATP (4). Bakterie te nie zawierają w ogóle karboksylazy propionnylo-CoA i szczawiooctan może być regenerowany tylko drogą opisanej ostatnio (174, 175) syntezy z fosfoenolpirogronianu i CO₂ przez karboksyltransfosforylaza fosfoenolpirogronianową (reakcja 16). Biegając w kierunku odwrotnym reakcja ta może być sprzężona z kinazą pirogronianową i ADP co prowadzi do syntezy ATP. Tak więc rozbitcie nieorganicznego pirofosforanu może pośrednio dostarczyć energii potrzebnej do wytworzenia wiązania wysokoenergetycznego.



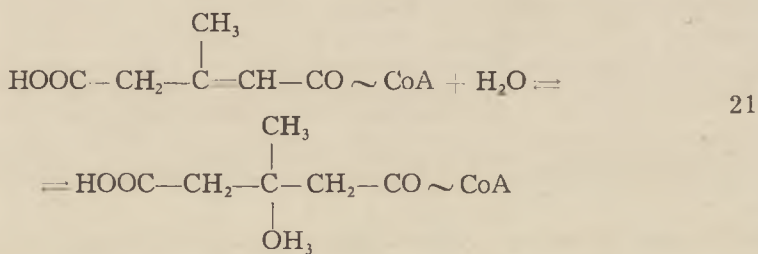
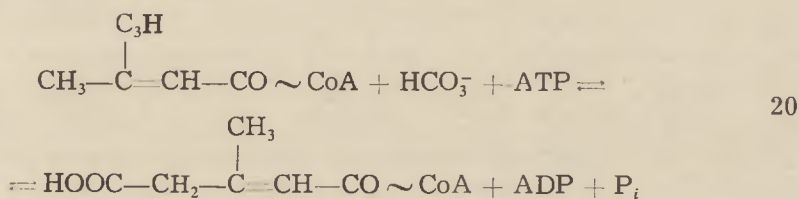
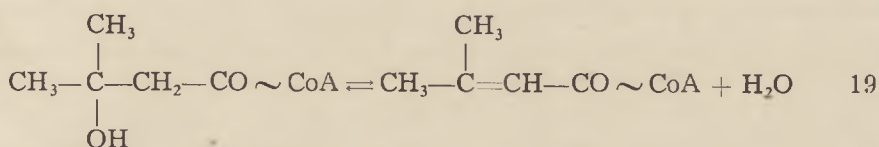
4. Karboksylaza β-metylokrotonylo-CoA (ligaza β-metylokrotonylo-CoA:CO₂) (E.C.6.4.1.4)

Plaut i Lardy (1955) zauważyli w 1950 roku, że u szczurów karmionych paszą ubogą w biotynę jest silnie zaburzony rozpad leucyny do acetylo-CoA i kwasu acetylooctowego przebiegający z pobraniem 1 cząsteczki CO₂ poprzez kwas izowalerianowy. Dalsze badania (6, 7) wykazały, że biologiczny rozpad leucyny przebiega poprzez β-hydroksyzowalerylo-CoA, który w zależnej od ATP reakcji ulega karboksylacji do β-hydroksy-β-metyloglutarylo-CoA (reakcja 17), a ten jest rozszczepiany na acetylo-CoA i kwas acetylooctowy (reakcja 18). Badania ekstraktów

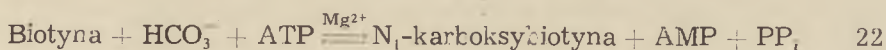


β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA \rightleftharpoons acetylo-CoA + kwas acetylooctowy 18

wątrobowych wykazały, że zaburzenie rozpadu leucyny jest spowodowane brakiem enzymu karboksylującego (204). Grupa Lynena (76, 113) badając materiał mikrobiologiczny wykazała, że do przemiany β -hydroksyzizowalerylo-CoA w β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA potrzebne są trzy enzymy: krotonaza, karboksylaza β -metylokrotonylo-CoA i metyloglutakonaza. Pierwszy z nich katalizuje odwodnienie β -hydroksyzizowalerylo-CoA do β -metylokrotonylo-CoA (reakcja 19), drugi w obecności ATP karboksyluje β -metylokrotonylo-CoA do β -metyloglutakonylo-CoA (reakcja 20), trzeci zaś uwadnia β -metyloglutakonylo-CoA do β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA (reakcja 21).



Karboksylazę β -metylokrotonylo-CoA oczyszczano około 180-krotnie i wykazano, że enzym zawiera na 184 000 g białka 1 mol biotyny, która łączy się z dwutlenkiem węgla w stosunku 1:1 oraz że reakcja karboksylowania β -metylokrotonylo-CoA jest odwracalna (77, 93, 113). Biologicznie czynnym przenośnikiem dwutlenku węgla jest N_1 -karboksybiotyna połączona poprzez grupę ϵ -aminową lizyny z apoenzymem (94, 114). Jest rzeczą godną uwagi, że karboksylaza β -metylokrotonylo-CoA może karboksylować także wolną biotynę w obecności HCO_3^- , ATP i Mg^{2+} dając N_1 -karboksybiotynę (reakcja 22); reakcja ta jest specyficzna tylko dla D-biotyny. Dotychczas nie stwierdzono by jakiegokolwiek innego enzymu mógł karboksylować wolną biotynę.



5. Karboksylaza pirogronianowa (ligaza pirogronian: $\text{CO}_2(\text{ADP})$) (E.C.6.4.1.1)

Enzym karboksylujący bezpośrednio pirogronian do szczawiooctanu po raz pierwszy opisali U t t e r i K e e c h (190). Karboksylacja ta hamowana przez awidyne, przebiega zgodnie z reakcją 23 i wymaga obecności HCO_3^- , ATP, Mg^{2+} oraz acetylo-CoA. Enzym katalizujący tę reakcję wyizolowano z mitochondriów wątroby kurczęcia (90, 165, 191) oraz z materiału mikrobiologicznego (15, 54, 121, 168). Ma on ciężar cząsteczkowy około 665 000 i zawiera 4 cząsteczki biotyny na 1 cząsteczkę enzymu (165).

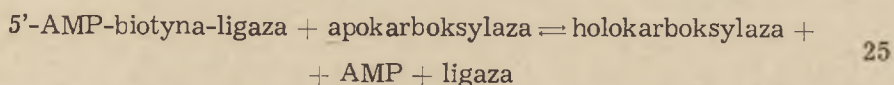


Karboksylaza pirogronianowa jest silnie aktywowana przez acetylo-CoA, potrzebny w pierwszym etapie karboksylacji, mianowicie podczas syntezy z HCO_3^- i ATP połączenia $\text{CO}_2\sim$ biotyna-enzym (27, 166). Karboksylaza pirogronianowa jest sprzęgnięta z karboksylazą fosfoenolopirogronianową, która kosztem rozbicia wiązania wysokoenergetycznego z GTP dekarboksyluje powstały szczawiooctan do fosfoenolopirogronianu (74, 81, 90, 171, 192). Zespolenie obu tych reakcji następuje w trakcie glukogenezy w tkankach wątroby. Aktywacja karboksylazy pirogronianowej przez acetylo-CoA jest więc także sposobem regulacji *in vivo* poziomu glukozy w wątrobie (75, 193). Szybkość karboksylowania pirogronianu do szczawiooctanu może być też regulowana hormonalnie, mianowicie po podaniu kortykosteroidów w wątrobie szczura silnie zwiększa się aktywność karboksylazy pirogronianowej (81).

IV. Wiązanie biotyny przez apoenzymy

Jak już wspomniano ekstrakty z mitochondriów wątrób od szczurów z niedoborem biotyny mają obniżoną zdolność karboksylowania propionilo-CoA. Szybkie reaktywowanie preparatów można osiągnąć przez inkubowanie *in vitro* skrawków wątrobowych z D-biotyną (103). Z wątrób szczurów z niedoborem biotyny wyodrębniono układ enzymatyczny, który katalizuje zależną od ATP syntezę holokarboksylazy propionilo-CoA łącząc D-biotynę kowalentnie poprzez ϵ -aminową grupę lizyny z apokarboksylazą (102, 103, 104, 105). Układ taki wyodrębniono także z ekstraktów nieoznaczonego drobnoustroju wyizolowanego z gleby (26, 52). Ekstrakty z *Propionibacterium shermanii* mają zdolność syntezy holokarboksylaz propionilo-CoA i β -metylokrotonilo-CoA z biotyny, ATP i apokarboksylaz uzyskanych z wątroby szczura lub z *Achromobacter sp.* (79, 103). Z ekstraktów *Propionibacterium shermanii* otrzymano enzym, który syntetyzował w obecności jonów Mg^{2+} i ATP holokarboksytransferazę metylomalonylo-CoA:pirogronian z apokarboksytransferazy i biotyny (107, 108). Z ekstraktów *Achromobacter sp.* wyizolowano enzym syntetyzujący

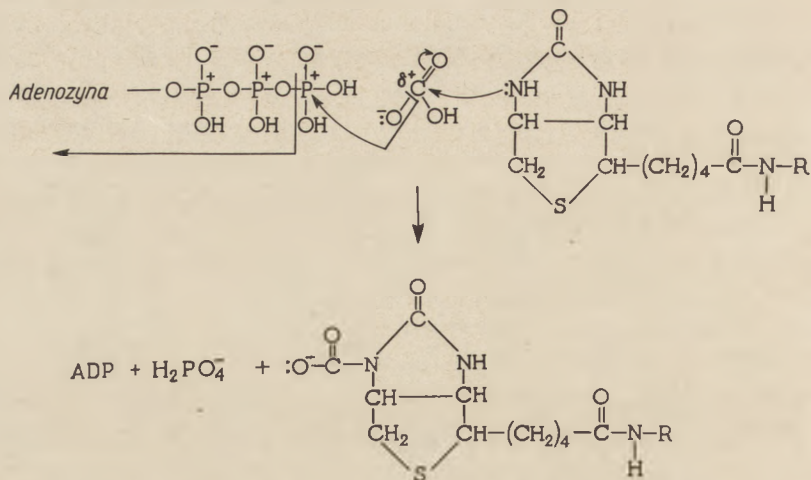
z apoenzymu, ATP i biotyny holokarboksylazę β -metylokrotonylo-CoA (79). Chemicznie otrzymana 5'-AMP-biotyna w pełni zastępuje zapotrzebowanie na ATP, biotyne i jony Mg^{2+} w syntezie holokarboksylazy propionylo-CoA z wątroby szczura (136, 172, 173) oraz holokarboksylazy β -metylokrotonylo-CoA w układzie enzymatycznym z *Achromobacter sp.* (79). Ponieważ mechanizm działania omawianych syntetaz holokarboksylaz jest identyczny i we wszystkich enzymach biotynowych biotyna przyłącza się poprzez ϵ -aminową grupę lizyny, można przypuszczać, że wbudowanie biotyny do wszystkich apokarboksylaz przebiega w ten sam sposób. Jak stwierdzono pierwszym etapem jest aktywacja biotyny i powstanie połączenia 5'-AMP-biotyna-enzym, które następnie reaguje z apokarboksylazą dając holokarboksylazę, wolny enzym i AMP. Enzym katalizujący ten proces (reakcja 24 i 25) nazwano ligazą biotyna:apokarboksylaza.



V. Rola biotyny w procesie wiązania CO_2 i karboksylacji

Przypuszczenie, że substratem dla karboksylaz jest kwaśny węglan a nie dwutlenek węgla (83, 93) potwierdzili Ochoa i wsp. (83) badając karboksylację przy pomocy krystalicznej karboksylazy propionylo-CoA z serca świni w obecności $NaHC^{18}O_3$. Stwierdzono, że jeden z atomów ciężkiego tlenu przenoszony jest na γ -resztę kwasu fosforowego w ATP, która uwalnia się jako znakowany ortofosforan, natomiast dwa pozostałe atomy ciężkiego tlenu znaleziono w grupie karboksylowej metylomalonylo-CoA. Na tej podstawie grupa Ochoa (83) sugeruje mechanizm wiązania dwutlenku węgla przedstawiony na rysunku 5.

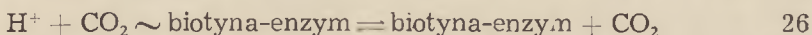
Jak wspomniano karboksylaza- β -metylokrotonylo-CoA może karboksylować w nieobecności właściwego substratu także wolną D-biotynę. Powstająca karboksybiotyna jest związkiem względnie trwałym (113). W temperaturze 20° w czasie 30 minut ulega dekarboksylacji tylko 14%, w niższej temperaturze związek ten jest znacznie trwalszy, jest jednak bardzo wrażliwy na działanie jonów wodorowych nawet w temperaturze 0° . Karboksybiotyna jest bardziej trwała od ukarboksylowanego enzymu biotynowego. Działanie dwuazometanem na karboksybiotynę prowadzi do powstania trwałego estru metylowego N_1 -karbometoksybiotyny, co wskazuje, że dwutlenek węgla wiąże się z atomem N_1 a nie z N_3 (94). Podobne wyniki otrzymano działając na ester metylowy biotyny chloromrówczanem metylu. Jakkolwiek reakcja ta może teoretycznie prowadzić do powstania estrów metylowych N_1 i N_3 -karbometoksybiotyny, to jednak



Rys. 5. Mechanizm wiązania dwutlenku węgla przez karboksylazę CoA w obecności ATP wg (83)

w 94% powstaje ester N₁, ponieważ bliskość atomów N₃ i C₆ w biotynie utrudnia powstanie estru N₃ (187). Obydwa te estry rozdzielono chromatograficznie. Strukturę estru metylowego N₁-karbometoksybiotyny potwierdzono także rentgenograficznie (17) otrzymując wyniki zgodne z sugestiami grupy Lynena, że CO₂-biotyna jest N₁-karboksybiotyną. Sposób stabilizowania karboksybiotyny dwuazometanem wykorzystano także do wyodrębnienia ¹⁴C-karboksybiotyny z ukarboksylowanych za pomocą ¹⁴CO₂ enzymów biotynowych; karboksylazy β-metylokrotonylo-CoA (95, 96), karboksylazy propionylo-CoA (106), karboksytransferazy metylomalonylo-CoA:pirogonian (209) oraz karboksylazy acetylo-CoA (146). Stabilizowane enzymy biotynowe trawiono enzymami proteolitycznymi (papaina, tripsyna, pronaza) otrzymując promieniotwórczą N₁-karbometoksybiotynę. Związek ten trawiono biotynidazą i uwolnioną N₁-karbometoksybiotynę estryfikowano dwuazometanem w celu ponownej stabilizacji. Wyizolowany ester metylowy N₁-karbometoksybiotyny skupiał całe piętno zawarte w połączeniu CO₂-biotyna-enzym. Grupa Lynena przypuszcza, że biotyna, będąc pochodną mocznika ma słabe własności kwasowe w ugrupowaniu mocznikowym, można więc uważać N₁-karboksybiotynę za swego rodzaju bezwodnik kwasowy (113, 114). Spolaryzowane wiązanie węgiel-azot umożliwia elektrofilne przeniesienie grupy karboksylowej z karboksybiotyny na karboanion α lub β-węgla substratu takiego jak acetylo-CoA, propionylo-CoA, β-metylokrotonylo-CoA lub pirogonian, a więc związki, w których grupy metylowa lub metylenowa mają tendencję do tworzenia karboanionów w sąsiedztwie grup karbonylowych. Przyjmuje się, że ta elektrofilna transkarboksylacja jest odwracalna, co wskazuje, że połączenie dwutlenku węgla z biotyną ma charakter wiązania wysokoenergetycznego. Oznaczono (209) energię swobodną

rozpadu ukarboksylowanej karboksyltransferazy metylomalonylo-CoA:pirogonian (reakcja 26). Uzyskując $\Delta F = 4700$ cal/mol, co pozwala zali-



czyć ukarboksylowane enzymy biotynowe do grupy związków wysokoenergetycznych, jednak o najniższym poziomie energii.

VI. Uwagi końcowe

Biotyna jest też koenzymem karboksylazy geranylo-CoA (169), przy czym karboksylacja tego związku zależy od obecności ATP i Mg^{2+} . Prawdopodobnie biotyna bierze udział jeszcze w innych niezbadanych dotychczas w pełni reakcjach. Na przykład biotyna potrzebna jest do syntezy indukowanego enzymu — oksydoreduktazy (dekarboksylującej) L-jabłczan:NAD (E.C.1.1.1.40) w *Lactobacillus arabinosus* (3, 14, 101, 156) i w wątrobie indyka (149). Enzym ten nie zawiera jednak biotyny ani też jego aktywność nie jest hamowana przez awidynę (88). Gdy hoduje się *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus arabinosus* i drożdże na pożywkach ubogich w biotynę aktywność karbamylotransferazy fosforan karbamylu:L-ornityna (E.C.2.1.3.3) i karbamylotransferazy fosforan karbamylu:L-asparaginan (E.C.2.1.3.2) jest obniżona, lecz nie stwierdzono by enzymy te zawierały biotynę (32, 33, 47, 158, 159, 160, 182). Ponieważ jednak w procesie syntezy wymienionych enzymów można zastąpić biotynę asparaginanem, asparaginą lub jej peptydami (35, 111, 160, 170) można przypuszczać, że przy niedoborze biotyny obniżona może być aktywność karboksylazy propionyl-CoA lub karboksylazy pirogonianowej co zmniejsza ilość fumaranu a więc i kwasu asparaginowego.

LITERATURA

1. Abraham S., Matthes K. J., Chaikoff I. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3, 646 (1960).
2. Abraham S., Matthes K. J., Chaikoff I. L., *Biochim. Biophys. Acta* 46, 197 (1961).
3. Ables P. G., Ravel J. M., Shive W., *J. Biol. Chem.* 236, 3263 (1961).
4. Allen S. H. G., Kellermeyer R. W., Stjernholm R. L., Wood H. G., *J. Bacteriol.* 87, 171 (1964).
5. Ayers W. A., *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 210 (1962).
6. Bachhavat B. K., Robinson W. G., Coon M. J., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3098 (1954).
7. Bachhavat B. K., Robinson W. G., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* 219, 539 (1956).
8. Baker B. R., Querry M. V., Bernstein S., Safir S. R., Subbarow Y., *J. Org. Chem.* 12, 167 (1947).

9. Baker B.R., Querry M.V., Mc Ewen W.L., Bernstein S., Safir S.R., Dorfman L., Subba Row Y., *J. Org. Chem.* **12**, 186 (1947).
10. Bartosiński B., *Post. Biochem.* **9**, 213 (1963).
11. Bateman W.G., *J. Biol. Chem.* **26**, 263 (1916).
12. Baugh C.L., Bates D.S., Claus W.C., Werkman C.H., *Enzymologia* **23**, 225 (1961).
13. Beck W.S., Flavin M., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **229**, 997 (1957).
14. Blanchard M.L., Korkes S., Del Campillo A., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **187**, 875 (1950).
15. Bloom S.J., Johnson M.J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2718 (1962).
16. Boas M.A., *Biochem. J.* **21**, 712 (1927).
17. Bonnemere C., Hamilton J.A., Steinrauf L.K., Knappe J., *Biochemistry* **4**, 240 (1965).
18. Bortz W.M., Abraham S., Chaikoff I.L., *J. Biol. Chem.* **238**, 1266 (1963).
19. Bortz W.M., Lynen F., *Biochem. Z.* **337**, 505 (1963).
20. Borquin J.P., Schnider O., Grüssner A., *Helv. Chim. Acta* **28**, 528 (1945).
21. Brady R.O., Gurin S., *J. Biol. Chem.* **199**, 421 (1952).
22. Brady R.O., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **44**, 993 (1958).
23. Bucker N.L.R., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 489 (1953).
24. Cannata J.J.B., Focesi A. jr., Mazumder R., Warner R.C., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **240**, 3249 (1964).
25. Chambers E.A., Delwiche E.A., *J. Bacteriol.* **68**, 131 (1954).
26. Christner J.E., Schlesinger M.J., Coon M.J., *J. Biol. Chem.* **239**, 3997 (1964).
27. Cooper T.G., Benedict C.R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 285 (1966).
28. De Hertogh A.A., Mayeaux P.A., Evans H.J., *J. Biol. Chem.* **239**, 2446 (1964).
29. Delwiche E.A., Phares E.F., Carson S.F., *Fed. Proc.* **12**, 194 (1953).
30. Delwiche E.A., *J. Bacteriol.* **56**, 811 (1948).
31. Delwiche E.A., *J. Bacteriol.* **59**, 439 (1950).
32. Dixon B., Rose A.H., *Biochem. J.* **95**, 25p (1965).
33. Dixon B., Rose A.H., *Biochem. J.* **99**, 513 (1966).
34. Dreker L., Scheidner J., De Ritter E., Rubin S.H., *Proc. Exptl. Biol. Med.* **78**, 381 (1951).
35. Duerre J.A., Lichstein H.C., *Canad. J. Microbiol.* **7**, 217 (1961).
36. Duschinsky R., Dolan J.A., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 2079 (1945).
37. Duschinsky R., Dolan L.A., Flower D., Rubin S.H., *Arch. Biochem.* **6**, 480 (1945).
38. Du Vigneaud V., Melville D.B., Folkers K., Wolf D.E., Moringo R., Keresztesy J.C., Harris S.A., *J. Biol. Chem.* **146**, 475 (1942).
39. Du Vigneaud V., Dittmer K., Hague E., Long B., *Science* **96**, 186 (1942).
40. Eakin R.E., Snell E.E., Williams K.J., *J. Biol. Chem.* **146**, 487 (1942).
41. Eakin R.E., Eakin E.A., *Science* **96**, 187 (1942).
42. Eggerer H., Lynen F., *Biochem. Z.* **335**, 540 (1962).
43. Eisenberg M.A., *Fed. Proc.* **21**, 467 (1962).
44. Eisenberg M.A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 437 (1962).
45. Elfort H.L., Wright L.D., *Fed. Proc.* **21**, 467 (1962).
46. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the International Union of Biochemistry, Brisbane 1964, str. 184.
47. Estes J.M., Ravel J.M., Shive W., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 6410 (1956).
48. Flavin M., *Fed. Proc.*, **14**, 211 (1955).

49. Flavin M., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **229**, 965 (1957).
50. Flavin M., Ortiz P.J., Ochoa S., *Nature* **176**, 823 (1955).
51. Flavin M., Castro-Mendoza H., Ochoa S. *J. Biol. Chem.* **229**, 981 (1957).
52. Foote J.L., Christner J.E., Coon M.J., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 676 (1963).
53. Friedman D.L., Stern J.R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 266 (1961).
54. Fuller R.C., Kornberg H.L., *Biochem. J.* **79**, 8p (1961).
55. Ganguly J., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 110 (1960).
56. Genghof D.S., *Arch. Biochem.* **62**, 63 (1950).
57. Gibson D.M., Titchener E.B., Wakil S.J., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 376 (1958).
58. Gibson K.D., Laver W.G., Neuberger A., *Biochem. J.* **70**, 71 (1958).
59. Gibson J., Knight M., *Biochem. J.* **78**, 8p (1961).
60. Goldberg M.V., Sternbach L.H., *US Pat.* **2**, 489, 232; **2**, 489, 235; **2**, 489, 238 (1949).
61. Goldberg M.V., Sternbach L.H., Kaiser S., Heineman S.D., Scheiner J., Rubin S.H., *Arch. Biochem.* **14**, 480 (1947).
62. Gregolin C., Ryder E., Kleinschmidt A.K., Warner R.C., Lane M.D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 148 (1966).
63. György P., *Ärztl. Fortbil* **28**, 377 (1931).
64. György P., Melville D.B., Burk D., Du Vigneaud V., *Science* **91**, 243 (1940).
65. Halenz D.R., Feng J., Hegre C.S., *J. Biol. Chem.* **237**, 2140 (1962).
66. Halenz D.R., Lane M.D., *J. Biol. Chem.* **235**, 878 (1960).
67. Halenz D.R., Lane M.D., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 426 (1961).
68. Halenz D.R., Lane M.D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 27 (1961).
69. Harris S.A., Wolf D.E., Mozingo R., Folkers K., *Science* **97**, 447 (1943).
70. Harris S.A., Wolf D.E., Mozingo R., Arth G.E., Anderson R.C., Easton N.R., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 2096 (1945).
71. Harris S.A., Wolf D.E., Mozingo R., Anderson R.C., Arth G.E., Easton N.R., Heyl D., Wilson A.N., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 1756 (1944).
72. Hatch D.M., Stumpf P.K., *J. Biol. Chem.* **236**, 2879 (1961).
73. Hatch D.M., Stumpf P.K., *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 193 (1962).
74. Henning H.V., Seubert W., *Biochem. Z.* **340**, 160 (1964).
75. Henning H.V., Stumpf P.K., Ohly B., Seubert W., *Biochem. Z.* **344**, 274 (1966).
76. Hilz H., Knappe J., Ringelmann E., Lynen F., *Biochem. Z.* **329**, 476 (1958).
77. Himes R.H., Young D.L., Ringelmann E., Lynen F., *Biochem. Z.* **337**, 48 (1963).
78. Hofmann K., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 694 1459 (1945).
79. Höpner T., Knappe J., *Biochem. Z.* **342**, 190 (1965).
80. Hülsman W.C., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 623 (1960).
81. Henning H.V., Seifert I., Seubert W., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 345 (1963).
82. Jaenicke L., Lynen F., *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, tom 3B, New York 1960, str. 3.
83. Kaziro Y., Hass L.F., Boyer P.D., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **237**, 1460 (1962).
84. Kaziro Y., Ochoa S., *Adv. Enzymol.* **25**, 283 (1964).

85. Kaziro Y., Grossmann A., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **240**, 64 (1965).
86. Kaziro Y., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **236**, 3131 (1961).
87. Kaziro Y., Ochoa S., Warner R.C., Chen J.Y. *J. Biol. Chem.* **236**, 1917 (1961).
88. Kaziro Y., Leone E., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **46**, 1319 (1960)
89. Klein H.P., *J. Bacteriol.* **73**, 530 (1957).
90. Keech D.B., Utter M.F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2609 (1963).
91. Kikuchi G., Kumar A., Talmage P., Shemin D., *J. Biol. Chem.* **233** 1214 (1958).
92. Kellermeier R.W., Allen S.H.G., Stjernholm R., Wood H.G., *J. Biol. Chem.* **239**, 2562 (1964).
93. Knappe J., Schlegel H.G., Lynen F., *Biochem. Z.* **335**, 101 (1961).
94. Knappe J., Ringelmann E., Lynen F., *Biochem. Z.* **335**, 168 (1961).
95. Knappe J., Wenger B., Wiegand U., *Biochem. Z.* **337**, 232 (1963).
96. Knappe J., Biederbiok K.H., Brümmer W., *Angew. Chem.* **74**, 432 (1962).
97. Knight M., *Biochem. J.* **84**, 170 (1962).
98. Kögl F., *Ber. Chem.* **68 A**, 16 (1935).
99. Kögl F., Tönnes B., *Z. Physiol. Chem.* **242**, 43 (1936).
100. Korchak H.M., Masoro E.J., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 354 (1962).
101. Korkes S., Del Campillo A., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **187**, 891 (1966)
102. Kosow D.P., Lane M.D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 439 (1962).
103. Kosow D.P., Huang S.C., Lane M.D., *J. Biol. Chem.* **237**, 3633 (1962)
104. Kosow D.P., Lane M.D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 191 (1961).
105. Kosow D.P., Lane M.D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 92 (1961).
106. Lane M.D., Lynen F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 379 (1963).
107. Lane M.D., Rominger K.L., Young D.L., Lynen F., *J. Biol. Chem.* **239**, 2865 (1964).
108. Lane M.D., Young D.L., Lynen F., *J. Biol. Chem.* **239**, 2858 (1964).
109. Lardy H.A., Peanasky R., *Physiol. Rev.* **33**, 560 (1953).
110. Lardy H.A., Adler J., *J. Biol. Chem.* **219**, 933 (1956).
111. Lardy H.A., Potter R.L., Elvehjem C.A., *J. Biol. Chem.* **169**, 451 (1947)
112. Lipmann F., *Adv. Enzymol.* **6**, 262 (1946).
113. Lynen F., Knappe J., Lorch E., Jütting G., Ringelmann E., *Angew. Chem.* **71**, 481 (1959).
114. Lynen F., Knappe J., Lorch E., Jütting G., Ringelmann E., Lachance J.P., *Biochem. Z.* **335**, 123 (1961).
115. Lynen F., *J. Cell Comp. Physiol.* **54**, suppl. 1, 33 (1959).
116. Lynen F., Tada M., *Angew. Chem.* **73**, 513 (1961).
117. Lynen F., Domagk G.F., Goldmann M., Kessel I., *Biochem. Z.*, **335**, 519 (1962).
118. Lynen F., *Fed. Proc.* **20**, 941 (1961).
119. Lynen F., Hopper-Kessel I., Eggerer H., *Biochem. Z.* **340**, 95 (1964).
120. Lynen F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**, 1775 (1964).
121. Losada M., Canovas I.L., Ruiz-Amil M., *Biochem. Z.* **340**, 60 (1964).
122. Lyon I., Geyer R.P., Marshall L.D., *J. Biol. Chem.* **217**, 757 (1955).
123. Lezius S.A., Ringelmann E., Lynen F., *Biochem. Z.* **336**, 510 (1963).
124. Lane M.D., Halenz D.R., Kosow D.P., Hegre C.S., *J. Biol. Chem.* **235**, 3082 (1960).
125. Lane M.D., Halenz D.R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 436 (1960).
126. Marston H.R., Allen S.H., Smith R.W., *Nature* **190**, 1085 (1961).
127. Martin D.B., Vagelos P.R., *J. Biol. Chem.* **237**, 1787 (1962).
128. Martin D.B., Vagelos P.R., *Fed. Proc.* **21**, 289 (1962).

129. Matsuhashi M., Matsuhashi S., Numa S., Lynen F., *Biochem. Z.* **340**, 243 (1964).
130. Matsuhashi M., Matsuhashi S., Lynen F., *Biochem. Z.* **340**, 263 (1964).
131. Margolis S. A., Baum H., *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 445 (1966).
132. Mazumder R., Sasakawa T., Kaziro Y., Ochoa S., *J. Biol. Chem.*
133. Mazumder R., Sasakawa T., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **238**, 50 (1963).
134. Mazumder R., Sasakawa T., Kaziro Y., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **237**, 3065 (1962).
135. Monod J., Jacob F., *Cold Spring Harb. Quant. Biol.* **26**, 389 (1961).
136. McAllister H. C., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **241**, 2855 (1966).
137. Melville D. B., Meyer A. W., Hofmann K., Du Vigneaud V., *J. Biol. Chem.* **146**, 487 (1942).
138. Melville D. B., *J. Biol. Chem.* **208**, 495 (1954).
139. Melville D. B., Genghof D. S., Lee J. M., *Fed. Proc.* **9**, 204 (1950).
140. Melville D. B., Genghof D. S., Lee J. M., *J. Biol. Chem.* **208**, 503 (1954).
141. Melville D. B., Dittmer K., Brown G. B., Du Vigneaud V., *Science* **98**, 497 (1943).
142. Myant N. B., Illife J., *The Control of Lipid Metabolism*, red. J. K. Grant, New York i Londyn 1963, str. 145.
143. Numa S., Ringelmann E., Lynen F., *Biochem. Z.* **340**, 228 (1964).
144. Numa S., Matsuhashi M., Lynen F., *Biochem. Z.* **334**, 203 (1961).
145. Numa S., Ringelmann E., *Biochem. Z.* **343**, 358 (1965).
146. Ochoa S., Kaziro Y., *Comprehensive Biochemistry*, tom 16, red. M. Florin i E. H. Stotz, Amsterdam 1965, str. 210.
147. Ochoa S., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **41**, 1145 (1959).
148. Ochoa S., Kaziro Y., *Fed. Proc.* **20**, 982 (1961).
149. Ochoa S., Mehler A., Blanchard M. L., Jukes T. H., Hoffmann C. E., Regan M., *J. Biol. Chem.* **170**, 413 (1947).
150. Overath P., Kellerman G. M., Lynen F., Fritz H. P., Keller H. J., *Biochem. Z.* **335**, 500 (1962).
151. Pawełkiewicz J., *International Symposium on B Vitamins*, red. J. Janicki, Poznań 1959, str. 372.
152. Pennington R. J., *Biochem. J.* **56**, 410 (1954).
153. Phares E. F., Delwiche E. A., Carson S. F., *J. Bacteriol.* **71**, 604 (1956).
154. Phares E. F., Carson S. F., *Bacteriol. Proc.* (1960) Abstr. 60 Ann. Meeting, Philadelphia 1—5. V.1960, str. 154.
155. Plaut G. W. E., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **186**, 705 (1950).
156. Plaut G. W. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 61 (1961).
157. Popjak G., Tietz A., *Biochem. J.* **56**, 46 (1954).
158. Ravel J. M., Grona M. L., Humphreys J. S., Shive W., *J. Biol. Chem.* **234**, 1452 (1959).
159. Ravel J. M., Shive W., *Fed. Proc.* **19**, 413 (1960).
160. Ravel J. M., Mollenhauer B. F., Shive W., *J. Biol. Chem.* **236**, 2268 (1961).
161. Rétey J., Lynen F., *Biochem. Z.* **342**, 256 (1965).
162. Rétey J., Lynen F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 358 (1964).
163. Robinson J. D., Bradley R. M., Brady R. O., *J. Biol. Chem.* **238**, 528 (1963).
164. Rubin S. H., Scheiner J., *Arch. Biochem. Biophys.* **23**, 400 (1949).
165. Scrutton M. C., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **240**, 1 (1965).
166. Scrutton M. C., Keech D. B., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **240**, 574 (1965).
167. Schmid H., *Helv. Chim. Acta* **27**, 127 (1944).

168. Seubert W., Remberger U., *Biochem. Z.* **334**, 401 (1961).
169. Seubert W., Fass E., Remberger U., *Biochem. Z.* **338**, 265 (1963).
170. Shive W., Rogers L.L., *J. Biol. Chem.* **169**, 453 (1947).
171. Shrago E., Lardy H. A., Nordlie R. C., Foster D. O., *J. Biol. Chem.* **238**, 3188 (1963).
172. Siegel F., Foote J. L., Christner J. E., Coon M. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 307 (1963).
173. Siegel L., Foote J. L., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1025 (1965).
174. Siu P.M.L., Wood H. G., Stjernholm R., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 21 (1961).
175. Siu P.M.L. Wood H. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 3044 (1962).
176. Sprecher M., Clark M. J., Sprinson D. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 581 (1964).
177. Sprecher M., Clark M. J., Sprinson D. B., *J. Biol. Chem.* **241**, 872 (1966).
178. Squires C., Stumpf P.K., Schmid C., *Plant Physiol.* **33**, 365 (1958).
179. Sternbach L. H., *Comprehensive Biochemistry*, tom 11. red. M. Florin i E. H. Stotz, Amsterdam 1963, str. 66.
180. Stjernholm R. L., Noble R. E., Koch-Weser D., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 174 (1962).
181. Stjernholm R. L., Wood H. G., V Międzynarodowy Kongres Biochemiczny. Moskwa 1961, Streszczenia 5, 146 1008.
182. Sund R. F., Ravel J. M., Shive W., *J. Biol. Chem.* **231**, 807 (1958).
183. Stadtman E. R., Overath P., Eggerer H., Lynen F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 1 (1960).
184. Swick R. W., Wood H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 28 (1960).
185. Tatum E. L., *J. Biol. Chem.* **160**, 455 (1945).
186. Tietz A., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **234**, 1394 (1959).
187. Traub W., *Science* **129**, 210 (1959).
188. Traub W., *Nature* **178**, 649 (1956).
189. Trotter J., Hamilton J. A., *Biochemistry* **5**, 713 (1966).
190. Utter M. F., Keech D. B., *J. Biol. Chem.* **235**, PC 17 (1960).
191. Utter M. F., Keech D.B., *J. Biol. Chem.* **238**, 2603 (1963).
192. Utter M. F., *Iowa State J. Sci.* **38**, 97 (1963).
193. Utter M. F., Keech D. B., Scrutton M. C., *Advances in Enzyme Regulation*, tom 2, red. G. Weber, Oxford 1964, str. 49.
194. Vagelos P. R., Alberts A. W., Martin D. B., *J. Biol. Chem.* **238**, 533 (1963).
195. Waite M., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 81 (1963).
196. Waite M., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 77 (1963).
197. Waite M., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2750 (1962).
198. Wakil S. J., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6465 (1958).
199. Wakil S. J., Titchener E. B., Gibson D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 227 (1959).
200. Wakil S. J., Ganguly J., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2597 (1959).
201. Wakil S. J., Gibson D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 122 (1960).
202. Wakil S. J., Titchener E. B., Gibson D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 225 (1958).
203. Waite M., *Fed. Proc.* **21**, 287 (1962).
204. Woessner J. E., Bachhavat B. K., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **233**, 520 (1958).
205. Wawszkiewicz E. J., Lynen F., *Biochem. Z.* **340**, 213 (1964).

206. Wolf D. E., Mozingo R., Harris S. A., Anderson R. C., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 2100 (1945).
207. Wolf D. E., Valiant J., Peck R. L., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2002 (1952).
208. Wood J. L., Du Vigneaud V., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 210 (1945).
209. Wood H. G., Lochmüller H., Riepertinger C., Lynen F., *Biochem Z.* **337**, 247 (1963).
210. Wood H. G., Allen S. H. G., Stjernholm R., Jacobson B., *J. Biol. Chem.* **238**, 547 (1963).
211. Wood H. G., Stjernholm R., Leaver F. W., *J. Bacteriol.* **72**, 142 (1956).
212. Wood H. G., Leaver F. W., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 207 (1953).
213. Wood H. G., Stjernholm R., *Proc. Nat. Acad. Sci US* **47**, 289 (1961).
214. Wright L. D., Cresson E. L., Skeggs H. R., Peck R. L., Wolf D. E., Wood T. R., Valiant J., Folkers K., *Science* **114**, 635 (1951).
215. Wright L. D., Cresson E. L., Skeggs H. R., Wood T. R., Peck R. L., Wolf D. E., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1048 (1952).
216. Wright L. D., Cresson E. L., Driscoll C. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 234 (1955).
217. Wright L. D., Cresson E. L., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4156 (1954).
218. Wright L. D., Cresson E. L., Valiant J., Wolf D. E., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4160, 4163 (1954).
219. Wieland O., Neufeldt I., Numa S., Lynen F., *Biochem. Z.* **336**, 455 (1963).
220. Yang S. F., Stumpf P. K., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 19 (1965).

ZDZISŁAW WOJCIECHOWSKI*

Cykl fotosyntetycznej redukcji węgla u bakterii

The Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Bacteria

The investigations on the photosynthetic carboxylation reactions and their participation in the cycle of the reduction of carbon compounds in bacteria are reviewed.

Wykonane w latach pięćdziesiątych prace Calvina i wsp. (9) doprowadziły do wyjaśnienia enzymatycznej reakcji włączania dwutlenku węgla przez jednokomórkowe glony i sformułowania cyklu fotosyntetycznej redukcji węgla nazwanego reduktywnym cyklem pentozowym. Istotą tego procesu jest przyłączenie cząsteczki CO_2 do cząsteczki rybulozo-1,5-dwufosforanu, redukcja do fosfortriozy kwasu 3-fosfoglicerynowego, powstałego w wyniku rozpadu produktu przyłączenia i zużytkowanie fosfortriozy częściowo do regeneracji akceptora CO_2 (tj. rybulozo-1,5-dwufosforanu), a częściowo do syntezy cukrów i innych związków. Obok karboksylacji rybulozo-1,5-dwufosforanu znany jest u organizmów roślinnych szereg innych reakcji karboksylacji — przypisuje się im jednak drugorzędne znaczenie. Z reakcji tych ilościowo najważniejsza jest reduktywna karboksylacja kwasu fosfoenolopirogronowego (8), mniejsze znaczenie mają prawdopodobnie reakcje karboksylacji α -ketoglutaranu (32) i pirogronianu (4).

Reduktywny cykl pentozowy był do niedawna jedynym znanym cyklicznym mechanizmem redukcji węgla i przyjmowano powszechnie, że jest to mechanizm ogólny, funkcjonujący zarówno u roślin wyższych, jak i u fotosyntetyzujących bakterii. Pogląd ten nie był w sposób wystarczający poparty dowodami doświadczalnymi.

Bakterie fotosyntetyzujące były często obiektem w badaniach procesu świetlnego przenoszenia elektronów, natomiast problem enzymatycznych reakcji włączania CO_2 i redukcji węgla był stosunkowo mniej badany. Zdolność niektórych bakterii fotosyntetyzujących do wzrostu w ciemności przy wykorzystaniu związków organicznych z podłoża jako źródła energii i węgla nasuwała od dawna przypuszczenie, że możliwe jest

* Mgr, st. asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

funkcjonowanie u bakterii fotosyntetyzujących innych mechanizmów fotosyntetycznej redukcji węgla, niż reduktywny cykl pentozowy.

W latach 1964—1965 stwierdzono u bakterii fotosyntetyzujących włączanie CO_2 zachodzące przy bezpośrednim udziale zredukowanej na świetle ferredoksyny (11, 13, 14 i 18). Stało się to punktem wyjścia dalszych prac, których rezultatem było wykrycie przez Evansa, Buchana i Arnona w 1966 roku (19) nowego mechanizmu fotosyntetycznej redukcji węgla, nazwanego reduktywnym cyklem kwasów karboksylowych.

I. Reduktywny cykl pentozowy u bakterii

W 1952 roku Glover, Kamen i Van Genderen (22) pierwsi wykazali, że włączanie $^{14}\text{CO}_2$ przez fotosyntetyzujące komórki *Rhodospirillum rubrum* prowadzi do szybkiego powstawania znakowanego kwasu 3-fosfoglicerynowego a następnie fosforanów cukrów. Stoppani, Fuller i Calvin (38), po przeprowadzeniu bardziej szczegółowych badań kinetyki włączania $^{14}\text{CO}_2$ do wcześniej znakujących się metabolitów, doszli do wniosku, że mikroorganizmy te włączają CO_2 na świetle głównie poprzez reduktywny cykl pentozowy oraz w niewielkim stopniu — w reakcji reduktywnej karboksylacji kwasu fosfopenolopirogronowego. W ciemności natomiast przeważa ta druga reakcja, jakkolwiek reduktywny cykl pentozowy jeszcze funkcjonuje.

W 1962 roku Smillie, Rigopoulos i Kelly (37) stwierdzili, że w ekstraktach z fotosyntetyzujących bakterii *Chlorobium thiosulfatophilum* i *Chromatium* znajdują się wszystkie enzymy reduktywnego cyklu pentozowego z kluczowym enzymem — karboksydysmutazą (karboksylazą rybulozo-1,5-dwufosforanu) włącznie. Aktywności poszczególnych enzymów cyklu były zbliżone do aktywności w fotosyntetyzujących tkankach roślin wyższych. Wyniki uzyskane przez tych autorów są w pełnej zgodzie z wcześniejszymi pracami, w których wykazano, że kwas 3-fosfoglicerynowy jest jednym z pierwszych znakowanych produktów fotosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$ u *Chromatium* (20, 21).

Wydaje się obecnie pewne, że reduktywny cykl pentozowy lub jakiś jego wariant funkcjonuje również u bakterii chemosyntetyzujących. Główny enzym reduktywnego cyklu pentozowego — karboksydysmutazę znaleziono u wielu mikroorganizmów chemosyntetyzujących, między innymi u *Thiobacillus thioparus* (35), *T. denitrificans* (28, 42), *T. thiooxidans* (39), *T. novellus* (2), *Hydrogenomonas* sp. (10, 27) i *Nitrobacter agilis* (1), przy czym w komórkach rosnących heterotrofowo obserwuje się spadek aktywności tego enzymu (2). Rozmieszczenie izotopu w produktach krótkotrwałej chemosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$ jest bardzo zbliżone do jego rozmieszczenia w produktach fotosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$ u glonów (1).

II. Włączanie CO₂ na świetle przy udziale zredukowanej ferredoksyny

W ostatnich latach ukazało się wiele doniesień o bezpośrednim udziale zredukowanej ferredoksyny w reakcjach włączania CO₂ przez komórki bakterii. Obecność enzymów katalizujących tego rodzaju reakcje wykryto w ekstraktach zarówno bakterii fotosyntetyzujących (11, 13, 14, 18), jak również nie fotosyntetyzujących (3, 7, 33). Odkrycia te zasługują na szczególną uwagę z kilku względów:

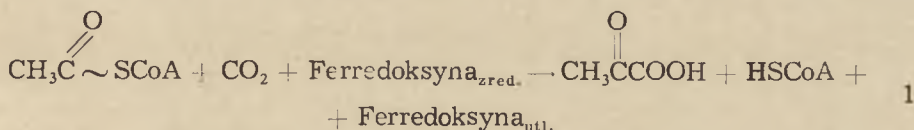
1) Ferredoksyna jest jednym z przenośników elektronów uczestniczących w przepływie elektronów zachodzącym na świetle w chloroplastach (względnie chromatoforach bakteryjnych) — to znaczy jest składnikiem aparatu zamieniającego energię świetlną w chemiczną.

2) Nigdy przedtem nie obserwowano, aby zredukowana ferredoksyna była bezpośrednio używana jako donator elektronów w reakcjach reduktywnej karboksylacji. Za właściwy czynnik redukujący wytwarzany w reakcji świetlnej uważano dotąd NADPH₂ powstający w wyniku przeniesienia elektronów ze zredukowanej ferredoksyny na NADP (40).

3) Ze względu na wyjątkowo niski potencjał oksydo-redukcyjny wynoszący - 420 mV przy pH 7 (tj. około 100 mV niższy, niż potencjał oksydo-redukcyjny NADP) udział ferredoksyny w reakcjach redukcji umożliwia pokonanie barier energetycznych, dla których przekroczenia potencjał oksydo-redukcyjny dwunukleotydów nikotynoamidoadeninowych jest niewystarczający.

1. Syntaza pirogronianu

Karboksylację acetylokoenzymu A do pirogronianu przy udziale zredukowanej ferredoksyny (równanie 1) wykazali po raz pierwszy Bachofen, Buchanan i Arnon (7) w ekstraktach z niefotosyntetyzujących (lecz zawierających ferredoksynę) bakterii *Clostridium pasteurianum*.



Katalizowane przez syntazę pirogronianu z tego mikroorganizmu włączanie ¹⁴CO₂ do acetylokoenzymu A i powstawanie znakowanego na węglu grupy karboksylowej pirogronianu można obserwować w warunkach, w których zapewniony jest stały dopływ zredukowanej ferredoksyny. Osiągnąć to można inkubując ekstrakty w ciemności w atmosferze wodoru, który przy współudziale znajdującej się w nich hydrogenazy, służy jako donator elektronów do redukcji ferredoksyny lub też inkubując ekstrakty na świetle w atmosferze argonu lub azotu z odpowiednio spre-

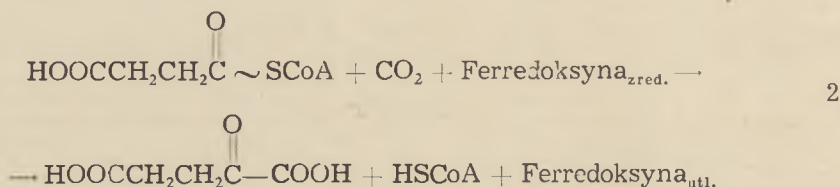
parowanymi fragmentami chloroplastów szpinaku, które mają zdolność redukcji ferredoksyny w obecności askorbinianu jako donatora elektronów i katalitycznych ilości 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu. Zredukowane nukleotydy nikotynoamidoadeninowe nie mogą zastąpić zredukowanej ferredoksyny, co świadczy o jej bezpośrednim udziale w syntezie pirogronianu z CO_2 i acetylokoenzymu A (11). Udział ferredoksyny w reduktywnej karboksylacji „czynnego octanu” stwierdzono również u innych nie fotosyntetyzujących, lecz zawierających ferredoksynę mikroorganizmów, a mianowicie u *Clostridium kluyveri* (3) i *Clostridium acidurici* (33).

Buchanan, Bachofen i Arnon (11 i 14) stwierdzili katalizowanie analogicznej reakcji przez bezkomórkowe ekstrakty z fotosyntetyzujących bakterii *Chlorobium thiosulfatophilum* i *Chromatium* podczas inkubacji na świetle z preparatami nieoczyszczonych chromatoforów z tych samych mikroorganizmów lub fragmentami chloroplastów szpinaku. Syntezę pirogronianu z *Chlorobium thiosulfatophilum* udało się częściowo oczyścić, uzyskując około 30-krotny wzrost aktywności właściwej, przez frakcjonowanie białek ekstraktu na kolumnie z DEAE-celulozy oraz frakcjonowanie wytrącanie siarczanem amonu i alkoholem (18).

Syntaza pirogronianu nie jest enzymem specyficznym gatunkowo wobec ferredoksyny. Ferredoksynę *Chromatium* zastąpić można na przykład ferredoksyną szpinaku, przy czym nie obserwuje się zasadniczych zmian szybkości syntezy pirogronianu przez bezkomórkowy ekstrakt z *Chromatium* (11).

2. Syntaza α -ketoglutaranu

W 1965 roku Buchanan i Evans (13) wykazali, że bezkomórkowe ekstrakty z *Chlorobium thiosulfatophilum*, obok reakcji reduktywnej karboksylacji „czynnego octanu”, katalizują również reakcję włączenia CO_2 do sukcyntylokoenzymu A (równanie 2).



Reakcja ta katalizowana przez enzym nazwany syntazą α -ketoglutaranu zachodzi podczas inkubacji bezkomórkowych ekstraktów na świetle z preparatem chromatoforów bakteryjnych lub fragmentami chloroplastów szpinaku. Syntaza α -ketoglutaranu, podobnie jak syntaza pirogronianu, nie wykazuje specyficzności gatunkowej wobec ferredoksyny. Jeżeli z ekstraktu usunie się rodzimą ferredoksynę przez zatrzymanie na

kolumnie z *DEAE*-celulozy — zdolność syntezy α -ketoglutaranu przez ekstrakt można przywrócić dodając ferredoksyny z roślin wyższych (13).

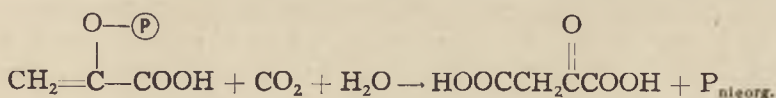
Prawdopodobnie taki sam mechanizm syntezy α -ketoglutaranu istnieje u fotosyntetyzujących bakterii *Rhodospirillum rubrum*. Shigesada i wsp. (36), badając rozmieszczenie izotopu w kwasie glutaminowym syntetyzowanym na świetle przez nienaruszone komórki *R. rubrum* z $^{14}\text{CO}_2$ i $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -bursztynianu, wykazali, że synteza tego związku zachodzi w wyniku reduktywnej karboksylacji bursztynianu i następnej aminacji powstałego kwasu α -ketoglutarowego.

III. Reduktywny cykl kwasów karboksylowych

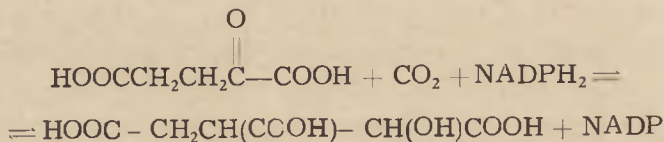
Wykrycie reduktywnej karboksylacji „czynnego octanu” i „czynnego bursztynianu” przy udziale zredukowanej w reakcji świetlnej ferredoksyny było doniosłym wydarzeniem w badaniach fotosyntezy bakteryjnej. Niemniej jednak mechanizm regeneracji akceptorów CO_2 , to jest acetylokoenzymu A i sukcylokoenzymu A, pozostawał nadal nie wyjaśniony. Powszechnie przyjmuje się, że każde fotosyntetyczne włączenie CO_2 zachodzi w procesie cyklicznym ze względu na konieczność stałej regeneracji akceptora dwutlenku węgla. Dalsze badania poszły więc w kierunku poszukiwania takiego cyklicznego mechanizmu, w skład którego wchodziłyby obie omówione wcześniej reakcje karboksylacji.

W 1966 roku Evans, Buchanan i Arnon (19) przedstawili taki mechanizm funkcjonujący — ich zdaniem — u beztlenowych fotosyntetyzujących bakterii *Chlorobium thiosulfatophilum* i nazwany przez nich reduktywnym cyklem kwasów karboksylowych. Cykl ten, będący w części odwróceniem cyklu kwasów trójkarboksylowych, przedstawiony jest na schemacie 1. Reduktywny cykl kwasów karboksylowych zawiera cztery reakcje włączenia CO_2 (karboksylacji). Dwie z tych reakcji to omówione już reakcje reduktywnej karboksylacji acetylokoenzymu A i sukcylokoenzymu A (równanie 1 i 2), odwrotne do znanych z cyklu kwasów trójkarboksylowych reakcji oksydatywnej dekarboksylacji pirogronianu i α -ketoglutaranu, które w warunkach aerobowych są w komórkach nieodwracalne. U *Chlorobium thiosulfatophilum* odwrócenie tych reakcji możliwe jest w wyniku bezpośredniego działania fotochemicznie zredukowanej ferredoksyny — reduktora o znacznie niższym potencjale oksydo-redukcyjnym, niż inne znane reduktory organiczne.

Pozostałe dwie reakcje karboksylacji w reduktywnym cyklu kwasów karboksylowych — fosfoenolopirogronianu do szczawiooctanu (równanie 3) i α -ketoglutaranu do izocytrynianu (równanie 4) są od dawna znane.



3



4

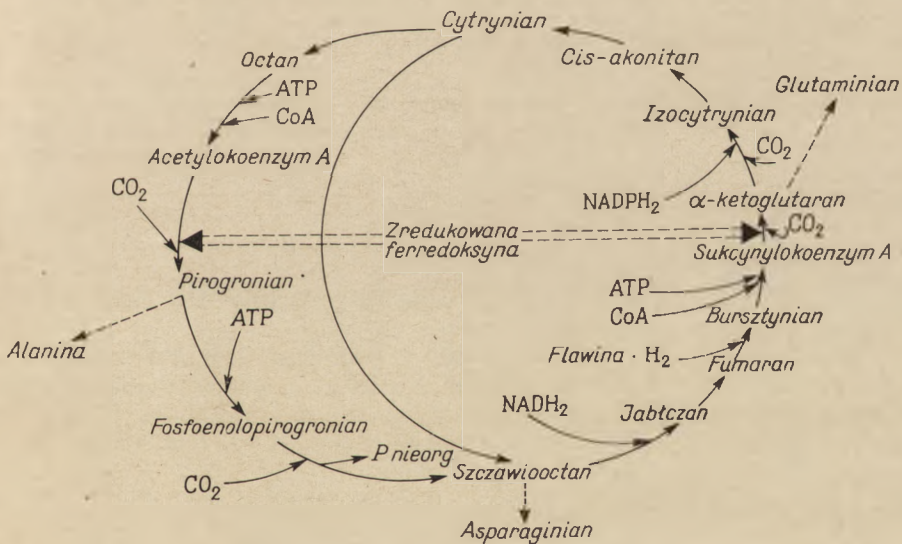
Enzym katalizujący pierwszą z nich, karboksylaza fosfoenolopirogronianu, wykryty został w liściach szpinaku przez Bandurskiego i Greinera (8); różni się on od podobnych enzymów pochodzenia zwierzęcego (43 i 44) tym, że reszta fosforanowa nie jest przenoszona na ADP lub IDP, lecz uwolniona w postaci fosforanu nieorganicznego. Syntaza fosfoenolopirogronianu — enzym syntetyzujący fosfoenolopirogronian z pirogronianu i ATP wykryty został niedawno przez Coopera i Kornberga u *Escherichia coli* (15), a jego obecność w ekstraktach z *Chlorobium thiosulfatophilum* wykazali Buchanan i Evans (12).

Evans, Buchanan i Arnon (19) przedstawili dowody funkcjonowania reduktywnego cyklu kwasów karboksylowych u *Chlorobium thiosulfatophilum*, wykazując obecność wszystkich niezbędnych enzymów w bezkomórkowych ekstraktach, mierząc ich aktywności oraz identyfikując znakowane metabolity powstające w wyniku krótkotrwałej fotosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$. Kinetyczne badania przeprowadzone przez tych autorów wykazały, że w krótkich czasach po podaniu $^{14}\text{CO}_2$ pierwszym pojawiającym się trwałym, znakowanym produktem fotosyntezy jest kwas glutaminowy (po 30 sekundach 75% całkowitej włączonej radioaktywności), powstający na drodze aminacji α -ketoglutaranu. Mniejsze ilości radioaktywności odnaleziono w kwasach bursztynowym i asparaginowym. Natomiast w związkach zawierających fosfor (kwas 3-fosfoglicerynowy i fosforany cukrów), które są metabolitami reduktywnego cyklu pentozowego odnaleziono zaledwie 10% całkowitej włączonej radioaktywności. Wyniki te są zdecydowanie różne od uzyskiwanych przez Calvina i wsp. (9) podczas badań nad fotosyntetycznym włączaniem $^{14}\text{CO}_2$ przez zielone glony, gdzie obserwowano co prawda szybkie znakowanie licznych aminokwasów (między innymi kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego) oraz metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych — jednak wyraźnie wyprzedzało je pojawianie się radioaktywności w kwasie 3-fosfoglicerynowym i fosforanach cukrów.

Obecność poszczególnych enzymów niezbędnych do funkcjonowania reduktywnego cyklu kwasów karboksylowych wykazano w ekstraktach z *Chlorobium thiosulfatophilum*, podając właściwe dla odpowiednich enzymów znakowane ^{14}C substraty oraz potrzebne kofaktory i identyfikując powstałe znakowane produkty. Porównanie aktywności poszczególnych enzymów reduktywnego cyklu kwasów karboksylowych w ekstraktach z szybkością włączania CO_2 przez nienaruszone komórki wykazało, że aktywności wszystkich enzymów są wystarczające do funkcjonowania cyklu.

Reduktywny cykl kwasów karboksylowych wymaga do funkcjonowania oprócz zredukowanej ferredoksyny także zredukowanych dwunukleotydów nikotynoamidoadeninowych (zarówno NADPH_2 , jak i NADH_2) oraz ATP. Wszystkie niezbędne kofaktory powstają w wyniku zachodzącego na świetle w aparacie fotosyntetycznym (chromatoforach) przepływu elektronów lub w reakcjach sprzężonych z tym przepływem. Ferredoksyna, jako składnik fotosyntetycznego łańcucha przenoszącego elektrony, bierze udział w fosforylacji fotosyntetycznej dostarczającej ATP (5, 41). Przeniesienie elektronów ze zredukowanej w procesie świetlnym ferredoksyny na NADP, katalizowane przez fotosyntetyczną reduktazę NADP (25, 26), prowadzi do wytworzenia NADPH_2 (6, 16, 17, 24, 34, 40). Również bezpośredni udział ferredoksyny w redukcji NAD wykazano niedawno u fotosyntetyzujących bakterii *Chlorobium* i *Chromatium* (45).

Jeden pełny obrót reduktywnego cyklu kwasów karboksylowych, w skład którego wchodzi cztery reakcje karboksylacji, prowadzi do powstania netto jednej cząsteczki czterowęglowego dwukarboksylowego kwasu. Liczne metabolity cyklu mogą być zużywane bezpośrednio do syntezy aminokwasów, tłuszczów i barwników porfiryńowych — niektóre możliwości tych syntez zaznaczone są na schemacie.



Schemat 1. Reduktywny cykl kwasów karboksylowych (wg 19)

IV. Uwagi końcowe

Jak już wspomniano, w ekstraktach z *Chlorobium thiosulfatophilum* wykazano obecność wszystkich enzymów niezbędnych do funkcjonowania reduktywnego cyklu pentozowego z kluczowym enzymem — karboksydys-

mutazą włącznie (37). Wydaje się więc, że w tym fotosyntetyzującym mikroorganizmie występują dwa równoległe działające mechanizmy cyklicznej redukcji węgla w procesie fotosyntezy. Być może, reduktywny cykl pentozowy jest mechanizmem dostarczającym cukrów, natomiast reduktywny cykl kwasów karboksylowych dostarcza łańcuchów węglowych zużywanych bezpośrednio do syntezy aminokwasów oraz lipidów. Brak na razie danych pozwalających na stwierdzenie, jaki udział ma każdy z tych mechanizmów w ogólnym fotosyntetycznym włączaniu CO_2 przez bakterie. Nie wiadomo również dotąd, jak szeroko rozpowszechniony jest reduktywny cykl kwasów karboksylowych. Zdaniem Evansa, Buchanana i Arnona (19) prawdopodobne jest, że cykl ten funkcjonuje również u innych fotosyntetyzujących bakterii. Przemawia za tym wykrywanie aminokwasów takich jak alanina, kwas glutaminowy i kwas asparaginowy, jako głównych znakowanych produktów krótkotrwałej fotosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$ u *Chromatium* (21) i *Rhodospirillum rubrum* (23). Możliwe również, że reduktywny cykl kwasów karboksylowych lub jakiś jego wariant funkcjonuje w beztlenowych, nie fotosyntetyzujących bakteriach zawierających ferredoksynę.

LITERATURA

1. Aleem M. I. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 14 (1965).
2. Aleem M. I. H., Huang E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 515 (1965).
3. Andrews I. G., Morris J. G., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 176 (1965).
4. Arnon D. I., *Nature* **167**, 1008 (1951).
5. Arnon D. I., Tagawa K., Tsujimoto H. V., *Science* **140**, 378 (1963).
6. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 47 (1959).
7. Bachofen R., Buchanan B. B., Arnon D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 690 (1964).
8. Bandurski R. S., Greiner C. H., *J. Biol. Chem.* **204**, 781 (1953).
9. Bassham J. A., Calvin M., *Path of Carbon in Photosynthesis*, Benjamin Press, New York 1962.
10. Bergmann F. H., Towne J. C., Burriss R. H., *J. Biol. Chem.* **230**, 13 (1958).
11. Buchanan B. B., Arnon D. I., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 163 (1965).
12. Buchanan B. B., Evans M. C. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 484 (1966).
13. Buchanan B. B., Evans M. C. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1212 (1965).
14. Buchanan B. B., Bachofen R., Arnon D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 839 (1964).
15. Cooper R. A., Kornberg H. L., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 618 (1965).
16. Davenport H. E., Hill R., *Biochem. J.* **77**, 471 (1960).
17. Davenport H. E., Hill R., *Biochem. J.* **74**, 493 (1960).

18. Evans M. C. W., Buchanan B. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1420 (1965).
19. Evans M. C. W., Buchanan B. B., Arnon D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 928 (1966).
20. Fuller E. C., Anderson I. C., *Plant Physiol.* **32**, xvi (1957).
21. Fuller E. C., Smillie R. M., Sisler E. C., Kornberg H. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2140 (1961).
22. Glover J., Kamen M. D., Van Genderen H., *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 384 (1952).
23. Hoare D. S., *Biochem. J.* **87**, 284 (1963).
24. Horio T., Yamashita T., *Biochem. Z.* **338**, 526 (1963).
25. Keister D. L., San Pietro A., Stolzen-Bach J. E., *J. Biol. Chem.* **235**, 2989 (1960).
26. Kertesz D., *Nature* **180**, 506 (1957).
27. McFadden B. A., Chang-Chu, Tu L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 728 (1965).
28. Milhaud G., Aubert J. P., Millet J., *C. R. Acad. Sci.* **243**, 102 (1956).
29. Moyle J., *Biochem. J.* **63**, 552 (1956).
30. Moyle J., Dixon M., *Biochem. J.* **63**, 548 (1956).
31. Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **174**, 133 (1948).
32. Ochoa S., *Sympos. Soc. Exptl. Biol. (Cambridge)* **5**, 29 (1951).
33. Raeburn S., Rabinowitz J. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 304 (1965).
34. San Pietro A., Lang A. M., *J. Biol. Chem.* **231**, 211 (1958).
35. Santer M., Vishniac W., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 157 (1955).
36. Shigesada K., Hidaka K., Katsuki H., Tanaka S., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 182 (1966).
37. Smillie R. M., Rigopoulos N., Kelly H., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 612 (1962).
38. Stoppani A. O. M., Fuller R. C., Calvin M., *J. Bacteriol.* **69**, 491 (1955).
39. Suzuki I., Werkman C. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 112 (1958).
40. Tagawa K., Arnon D. I., *Nature* **195**, 537 (1962).
41. Tagawa K., Tsujimoto H. Y., Arnon D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 567 (1963).
42. Trudinger P. A., *Biochem. J.* **64**, 274 (1956).
43. Utter M. F., Kurahashi K., *J. Biol. Chem.* **207**, 821 (1954).
44. Utter M. F., Kurahashi K., Rose I. A., *J. Biol. Chem.* **207**, 803 (1954).
45. Weaver P., Tinker K., Valentine R. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 195 (1965).

JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH*

Metody elektrochromatograficzne

Electrochromatographic Methods

The development and applications of elektrochromatographic methods are reviewed.

I. Charakterystyka i rodzaje elektrochromatografii

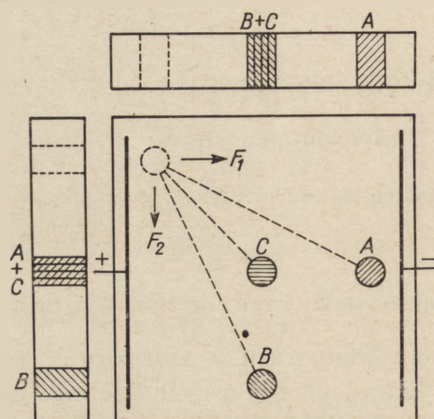
Metodykę elektrochromatografii w rozmaitych jej modyfikacjach zalicza się obecnie do jednej z najlepszych technik chromatograficznych, w szczególności w zastosowaniu do analizy złożonych mieszanin aminokwasowych w materiale biologicznym. W piśmiennictwie brak dotychczas artykułów przeglądowych odnośnie elektrochromatografii, jej użyteczności i krytycznej oceny. Dlatego przedstawienie chronologicznego rozwoju tej metody w ocenie porównawczej z innymi technikami, w oparciu o prace źródłowe własne i innych autorów może oddać usługi dla wielu pracowni chemicznych i biochemicznych.

W definiowaniu elektrochromatografii w poszczególnych podręcznikach i monografiach nie ma jednolitego ujęcia. W polskim wydawnictwie „Chromatografia” (37) definiuje się elektrochromatografię jako ruch cząsteczek w układzie chromatograficznym wywołany przez równoczesne albo sukcesywne stosowanie przepływu rozpuszczalnika i sił elektrycznych. Według definicji Caessona (12) metoda elektrochromatografii jest kombinacją procesu elektroforezy i chromatografii odbywających się równocześnie albo sukcesywnie w dowolnej kolejności. Jako nośniki służyć mogą dla celów elektrochromatografii bibuła, żele krzemowe, agar, celuloza, proszki celitowe, skrobia i sproszkowane żywice. Wszystkie te materiały znajdują dziś zastosowanie w technice kolumnowej, bibułowej i płytkowej. Spływ buforu po arkuszu bibuły lub w kolumnie, albo na płytce z adsorbentem w polu elektrycznym prostopadłym do kierunku przepływu nosi nazwę elektrochromatografii ciągłej. Odróżniamy technikę wąskiego pasma, jeżeli bufor spływa z jednego określonego miejsca na nośniku i technikę szerokiego pasma, jeżeli spływ odbywa się w spo-

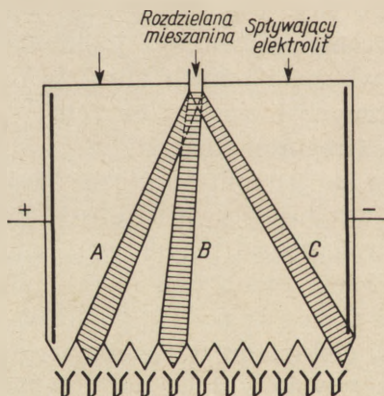
* Prof. dr, były kierownik Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie.

sób ciągle po całej powierzchni nośnika (rys. 1 i 2). Technika, w której oba procesy chromatografii i elektroforezy przebiegają sukcesywnie nosi nazwę elektrochromatografii nieciągłej.

Metoda elektrochromatografii pozwala zwiększyć selektywność rozdzielania proporcjonalnie do różnic między ładunkami składników badanych mieszanin.



Rys. 1. Elektrochromatografia ciągła z pasma wąskiego (37)



Rys. 2. Elektrochromatografia ciągła z pasma szerokiego (37)

Jako jedni z pierwszych Grassman i Hannig (18, 19, 20) zastosowali metodę elektrochromatografii do rozdzielania białek surowicy. Ich metoda opiera się na zasadzie równoczesnego działania obu sił, to znaczy siły spływu buforu i siły pola elektrycznego działającej prostopadle do kierunku spływu buforu. Dobór odpowiedniego buforu, pH i napięcia prądu umożliwił autorom dokonanie preparatywnego rozdzielania białek surowicy z 100 procentową wydajnością w zestawie kilkunastu komór według własnego projektu (Elphor V).

Szersze zastosowanie znalazła technika sukcesywnego rozdzielania chromatograficznego adsorpcyjnego lub rozdzielczego po elektroforezie według Durrum (14), Straina (46), Haugarda (23), Hartmana (22) i innych.

Do metod elektrochromatograficznych zaliczano swego czasu oryginalną metodę Kamińskiego znaną dziś pod nazwą elektrometrycznej lub potencjometrycznej (27, 28). Autor identyfikował rozdzielone chromatograficznie na bibule związki na podstawie różnic w ich ładunkach elektrycznych przez przykładanie elektrody do odpowiednich miejsc na chromatogramie. W zależności od rodzaju badanych substancji stosowano różne rodzaje elektrod. W miejscach lokalizacji poszczególnych związków na bibule notowano różne potencjały. Zastosowana nieco później właściwa nazwa metody elektrometrycznej okazała się uzasadniona. Metoda elektrochromatograficzna w kombinacji chromatografii adsorpcyjnej na kolumnie i elektroforezy według Durrum (14) okazała się bardzo cenna w analizie preparatywnej złożonych mieszanin.

II. Elektrochromatografia bibulowa

Gruntowne i wszechstronne opracowanie metodyki elektrochromatograficznej na bibule dla aminokwasów w płynach ustrojowych i hydroliżatach białkowych podali Boulanger i Biserte (5, 6, 7, 8, 11). Ich metoda obejmuje kilka kolejnych etapów:

A) Elektroforeza pH — 3,9, bufor: pirydyna, kwas octowy, woda (30:100:487), bibuła *Arches 304*, lub *Whatman 1*, (28×48 cm), 10—20 μ l roztworu, 400 V, 4 godziny. Uzyskuje się rozdział kwasu cysteinowego, siarczanu- θ -tyrozyny, kwasu asparaginowego, glutaminowego, glutationu zredukowanego, kwasu α -aminoadypinowego, aminokwasów obojętnych (łącznie), kwasu β -aminoizomasłowego, aminokwasów zasadowych (łącznie), kolaminy i amin biologicznie czynnych.

B) I. Elektroforeza pH — 3,9. II. Chromatografia. Ad I: bufor jak w A. *Whatman 1*, 400 V, 15 godzin lub 600 V, 7—8 godzin. Ad II: do wyboru układy: butanol, kwas octowy, woda (4:1:5), 24—30 godzin, spływowa lub butanol-pirydyna, kwas octowy, woda (30:6:24:20), 6—8 godzin, wstępująca albo też chloroform, metanol, 90% kwas octowy (100:15:5), 6—8 godzin, wstępująca.

C) I. Elektroforeza pH — 3,9. II. Chromatografia. Ad. I: bufor o pH 3,9, 1 N kwas octowy, *Whatman 3*. Ad II: technika spływowa, układ n -butanol, kwas octowy, woda (4:1:5), 20 godzin; rechromatografia dwukierunkowa: n -butanol, kwas octowy, woda (4:1:5) oraz metyloetyloketon, aceton, woda (3:1:0,6), 24 godziny. Uzyskuje się dobry rozdział: seryny, glicyny, waliny, metioniny, tryptofanu. Przy rechromatografii dwukierunkowej uzyskuje się rozdział leucyn.

D) Rozdział aminokwasów zasadowych przeprowadza się po elucji z elektroforogramu stosując chromatografię dwukierunkową w układach butanol, kwas octowy, woda oraz fenol z wodą i amoniakiem. Autorzy stosują również zamiast chromatografii elektroforez dwukierunkową: I — elektroforeza, pH 11,7, bufor amoniakalny, *Arches 304* (27×40 cm), 400 V, 15 godzin; II — elektroforeza, pH 6,5, bufor-pirydyna, kwas octowy, woda (200:8:792), *Whatman 1* (47×57 cm), 400 V, 15 godzin.

Autorzy uzyskali za pomocą swej kombinowanej techniki dobre wyniki mieszczące się przy oznaczeniach ilościowych w granicach błędu do 10% dla większości znanych aminokwasów i do 25% dla tryptofanu, hydroksyproliny i asparaginy.

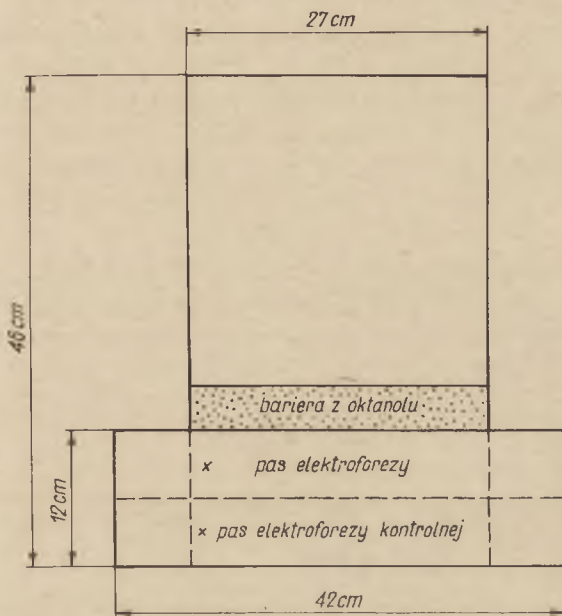
Większość innych kombinacji elektroforezy z chromatografią ogłoszonych przez różnych autorów (14, 16, 24, 25, 30, 31, 32, 35, 52, 57) opiera się na wspólnej zasadzie elektroforezy w buforze kwaśnym i chromatografii w układzie butanolu z kwasem octowym. Niektórzy z nich (24, 25, 30) stosują elektroforezę wysokonapięciową (70—100 V/cm).

Na technice zespołu francuskiego z Lille oparła się *Relvas* (42) w oznaczeniach ilościowych poszczególnych aminokwasów w płynach ustrojowych, stosując elucję bibuły 75% acetonem w ciągu 30 min. i wywoływanie aminokwasów kwaśnych i obojętnych 1% roztworem ninhydryny w acetonie z dodatkiem 10% buforu fosforanowego o pH 7. Do wywołania aminokwasów zasadowych posłużył 1% roztwór ninhydryny w acetonie z dodatkiem 6% kwasu octowego. Oznaczenia przeprowadzano w spektrofotometrze *Unicam SP-500* przy 575 m μ , a dla asparaginy przy 350 m μ . Odwrotną kolejność procesów elektroforezy i chromatografii zastosowała *Blass* (9, 10) do rozdziału amin. Tego typu kombinację nazwano słusznie nie elektrochromatografią ale chromatoforezą. Bez wątplenia metodyka zespołu *Boulangier—Biserte* jest cenna i użyteczna w zastosowaniu do analiz złożonych mieszanin aminokwasowych, ponadto jest doskonale opracowana pod względem analitycznym, ale nie uzyskała ona większego znaczenia i rozpowszechnienia z powodu długotrwałości złożonego procesu rozdziału.

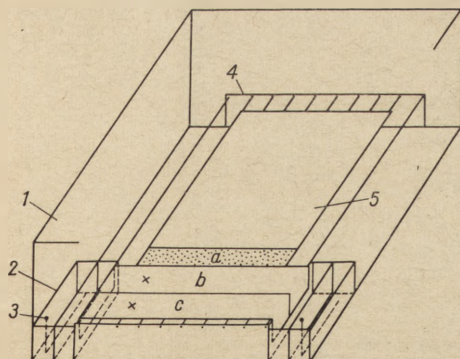
Natomiast nowsza metoda zaproponowana przez *Fischla i Segala* (15) okazała się dogodniejsza dla badań seryjnych aminoacydurii i aminoacydemii, a przede wszystkim znacznie krótsza. Oba procesy elektroforezy i chromatografii przeprowadza się sukcesywnie tylko na jednym arkuszu bibuły przyciętym w kształcie litery T. W celu zabezpieczenia od dyfuzji buforu stosuje się spryskanie oktanołem części bibuły przeznaczonej dla chromatografii. Napięcie prądu wynosi około 700 V, pH buforu około 2,2, skład buforu: kwas octowy 7,8% i kwas mrówkowy 2,5% w stosunku 1:1, czas 1 godzina. Chromatografię występującą prowadzi się w układzie: butanol, kwas octowy, woda (4:1:1). Do znacznego skrócenia czasu przyczynia się w pierwszym rzędzie eliminacja wstępnego procesu przygotowawczego do analizy chromatogra-

ficznej, mianowicie odsalania, które jest niezbędne w chromatografii dwukierunkowej. Przy stosowaniu chromatografii dwukierunkowej jednym z układów rozwijających jest fenol. Na niekorzyść fenolu przemawia długi czas rozwijania i szkodliwy jego wpływ na niektóre aminokwasy. Omówiona technika Fischla i Segala posłużyła nam po wprowadzeniu własnych modyfikacji do badań nad aminoacydurią fizjologiczną i patologiczną (38, 39, 40, 58, 59).

Na arkusz bibuły wycięty w kształcie litery T o wymiarach podanych na rysunku (rysunek 3 i 4) nanosi się po 20—30 μ l moczu pierwotnego w dwu miejscach na rozszerzonej części bibuły.



Rys. 3. Wykrój bibuły do elektrochromatografii (15, 38)

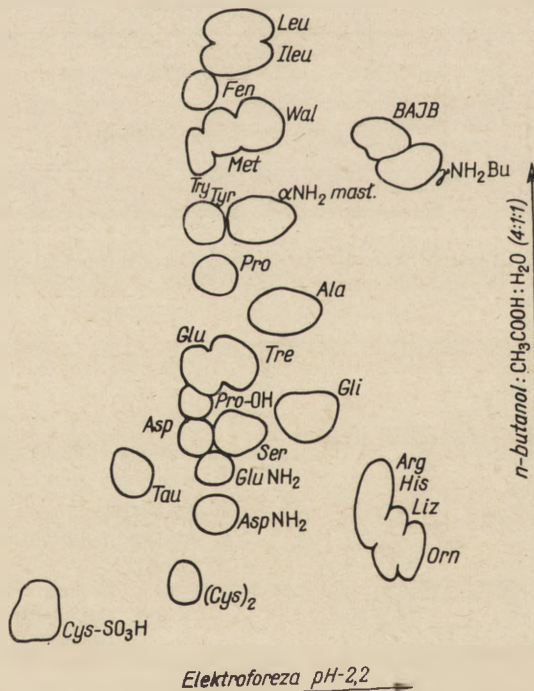


1. kamera 60×60 cm
2. naczynia elektrodowe
3. elektrody
4. statyw z prętami szklanymi
5. bibuła
 - a. bariera z oktanolu
 - b. pas elektroforezy
 - c. pas kontrolny elektroforezy
 - x. punkt startu

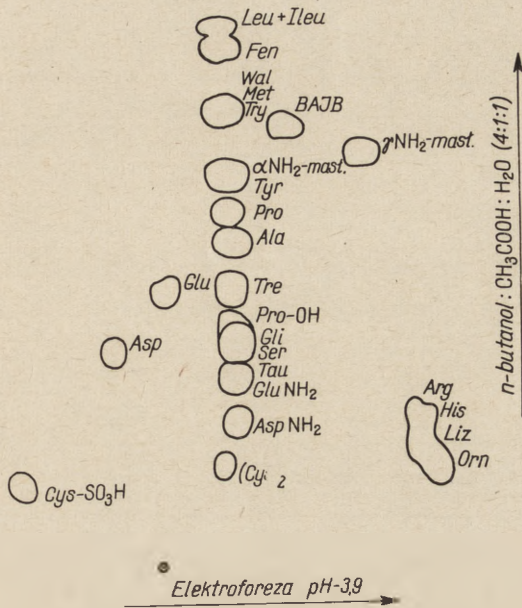
Rys. 4. Komora do elektrochromatografii (38)

Próba naniesiona niżej służy dla celów kontroli. Bezpośrednio po ukończeniu elektroforezy wywołuje się tylko pasek kontrolny po odcięciu z arkusza. Obraz rozdziału uzyskany na pasku kontrolnym stanowi podstawę dla ustalenia sposobu rozdziału chromatograficznego. Bariereę oktanolową, której usunięcie z bibuły wymaga dłuższego czasu, ogranicza się tylko do 2 cm. Elektroforezę przeprowadza się w pH 2,2 w buforze lotnym mrówczanowo-octanowym w stosunku podanym powyżej, przy napięciu 20 V/cm, natężeniu prądu 0,7—0,8 mA, w czasie 1 godziny. Chromatogramy po dokładnym wysuszeniu i odparowaniu oktanolu rozwija się dwukrotnie w układzie butanol, kwas octowy, woda (4:1:1). Plamy wywołuje się jedno procentowym roztworem ninhydryny w acetonie w pokojowej temperaturze. Dopiero po kilku godzinach ogrzewa się chromatogramy w suszarce do 60°. Podobnie przygotowuje się elektrochromatogramy z surowicy po odbiałczeniu 10% kwasem trójchlorooctowym w stosunku 1:1. Po odwirowaniu usuwa się kwas trójchlorooctowy przez kilkakrotne wytrząsanie z eterem i nanosi na bibułę 60 μ l co odpowiada 30 μ l surowicy przed odbiałczeniem. Przykłady elektrochromatogramów przedstawiają rysunki 5—8.

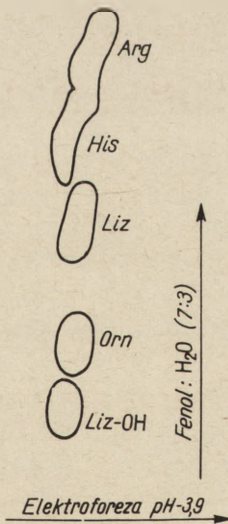
Wprowadzenie ani oryginalna metoda Fischla i Segala ani nasza modyfikacja nie pozwalają uzyskać na jednym tylko elektrochromatogramie doskonałego rozdzielania 20—30 aminokwasów występujących zwykle w materiale biologicznym, ale inne zalety tej metody jak znacz-



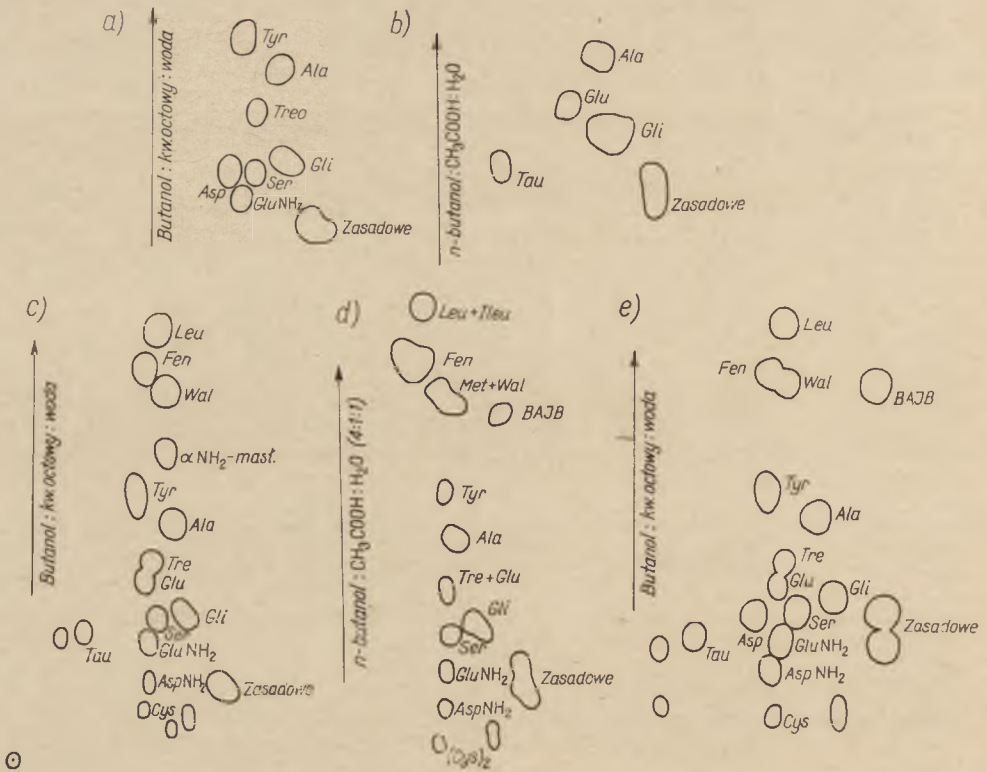
Rys. 5. Elektrochromatogram aminokwasów wzorcowych (pH 2,2) (38, 39, 40)



Rys. 6. Elektrochromatogram aminokwasów wzorcowych (pH 3,9) (38, 39, 40)



Rys. 7. Elektrochromatogram aminokwasów zasadowych (38)



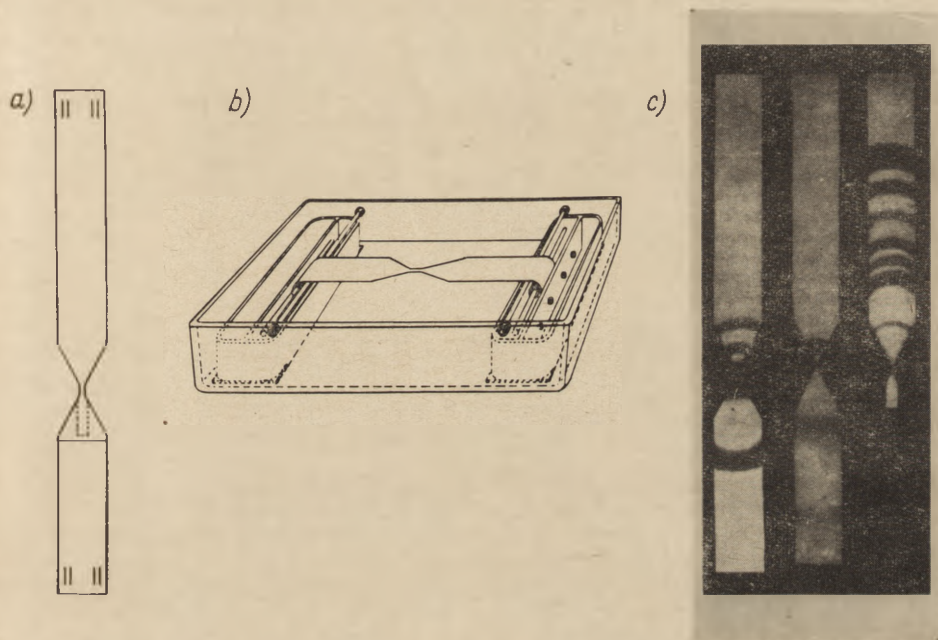
Rys. 8. Elektrochromatogram aminokwasów w moczu dziecka

- a) fizjologiczny (39)
- b) w osteochondritis (40)
- c) w niedorozwoju umysłowym (39)
- d) w fenylketonurii (39)
- e) w osteodystrophia fibrosa (40)

ne skrócenie czasu analizy, ponadto możliwość wykorzystania jednego elektroforogramu do chromatografii w różnych układach równocześnie na odpowiednio odciętych paskach z pierwotnego arkusza T lub sukcesywnie, uzasadniają zaliczenie tej metody do bardzo wygodnej i użytecznej dla biochemii klinicznej. Stosowanie różnych układów rozwijających dla aminokwasów obojętnych, kwaśnych i zasadowych oraz kilku testów wywołujących umożliwia właściwą identyfikację poszczególnych aminokwasów nawet w niezupełnie rozdzielonych plamach. Podane przykłady elektrochromatogramów z moczu w przypadkach schorzeń kostnych u dzieci, przy niedorozwoju umysłowym, w fenylketonurii stanowią poparcie poglądu, że metoda ta nadaje się może lepiej od innych do celów diagnostyki lekarskiej. Czas trwania jednej serii analiz nawet przy kilkakrotnym suszeniu i kilkogodzinnym rozwijaniu w różnych układach nie powinien przekroczyć 24 godzin. Na uwagę zasługują również udane próby rozdzielu aminokwasów podobną techniką opraco-

waną przez W r o ń s k i e g o (56a, b). Przy zastosowaniu dwugodzinnej elektroforezy autor uzyskuje rozdział aminokwasów na 6 stref. W drugim kierunku autor stosował wyłącznie chromatografię w układzie butanol, kwas octowy, woda.

Pomysłową technikę elektrochromatograficzną na wąskich paskach bibuły z przewężeniami w środku stosuje M a t t h i a s (33). Dwie elektroforezy ze zmieniającym kierunkiem rozdziału (anoda — katoda) przy napięciu około 150 V w buforze: pirydyna, kwas octowy, woda



Rys. 9. Elektrochromatografia techniką Matthiasa (33)

a) wykrój bibuły,

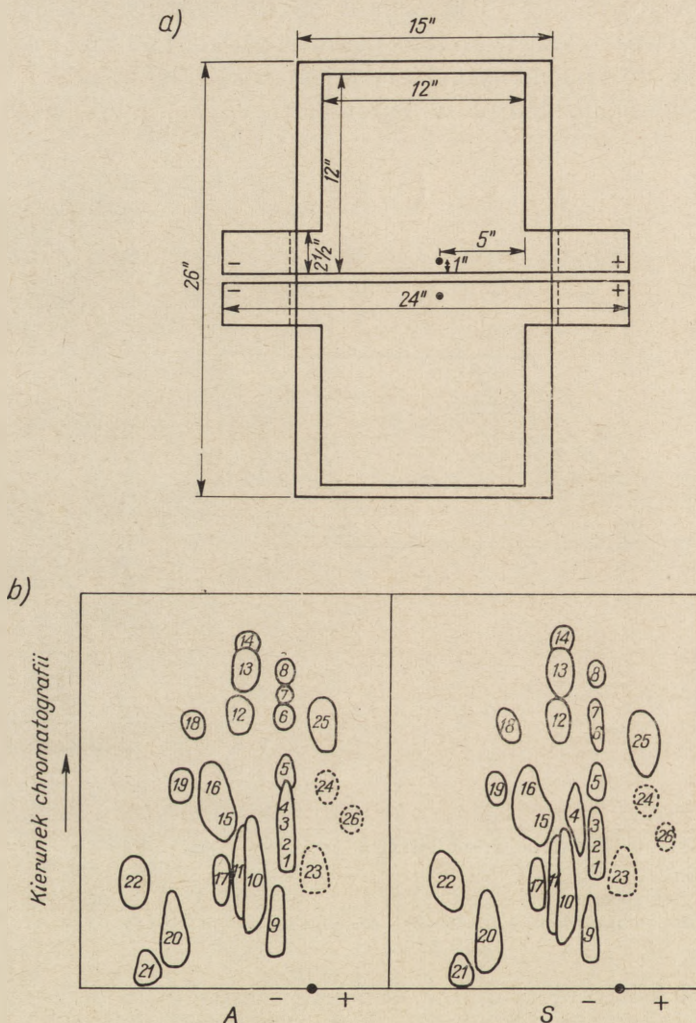
b) komora do elektroforezy.

c) chromatogramy aminokwasów kwaśnych, zasadowych i obojętnych

i dwukrotna chromatografia w układach: butanol, kwas octowy, woda pozwalają rozmieścić oddzielnie na 3 połówkach pasków aminokwasy kwaśne, obojętne i zasadowe (rysunek 9, a, b, c).

W końcu wspomnieć należy o sukcesach techniki elektrochromatograficznej w analizie peptydów. Identyfikacja peptydów otrzymywanych podczas częściowej hydrolizy enzymatycznej białek znalazła obecnie szerokie zastosowanie w badaniach struktury białek. Technikę tę znaną pod nazwą „*fingerprinting*” stosowali I n g r a m (26), B a g l i o n i (1, 2) do porównania hemoglobiny patologicznych z fizjologicznymi. W tej samej komorze przeprowadza się równocześnie dla obu rozтворów kontrolnego i badanego elektroforezę na odpowiednio wyciętych

arkuszach bibuły przy pH 6,5 w buforze: pirydyna, kwas octowy, woda według Michla (34), przy napięciu 19 V/cm w czasie 150 minut. Następnie chromatogramy rozwija się w drugim kierunku w klasycznym układzie butanol, kwas octowy, woda (rysunek 10 a, b).



Rys. 10. Elektrochromatografia hydrolizatów hemoglobiny (*fingerprint*) (25)

a) wykrój bibuły

b) elektrochromatogramy hemoglobiny normalnej A i patologicznej S (26)

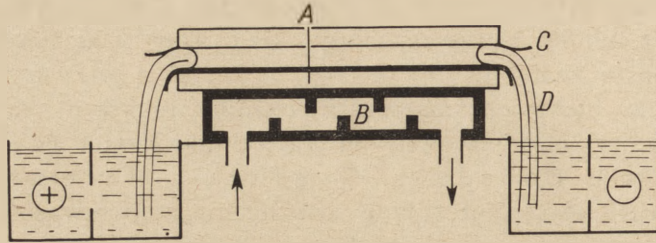
Inną jeszcze kombinację elektroforezy i chromatografii na bibułach jonowymiennych zastosowali Street i Nogy (47, 48) do rozdzielania mieszanin preparatów farmaceutycznych z grupy barbituranów i salicylanów. Główną zaletą ich techniki jest szybkość obu procesów. Elektroforeza trwa 30 minut, chromatografia 20 minut.

III. Elektrochromatografia cienkowarstwowa

Sukcesy chromatografii cienkowarstwowej w ostatnim pięcioleciu wykazują wyraźnie jej wyższość nad chromatografią bibułową i uzasadniają podjęcie prób przystosowania techniki elektrochromatograficznej do płytek z adsorbentami. Znaczne skrócenie czasu analizy, zwiększenie czułości spowodowane mniejszą powierzchnią plam na płytkach w porównaniu z bibułą, lepsze rozdziały składników w złożonych mieszaninach podnoszą znaczenie tej metody. Jednymi z pierwszych publikacji w dziedzinie elektrochromatografii cienkowarstwowej są prace Honneggera (24, 25). Pierwowzorem dla techniki Honneggera była praca z 1946 roku Consdena, Gordona i Martina (13), którzy przeprowadzili elektroforetyczne rozdzielania aminokwasów i peptydów na żelu krzemionkowym. Na podstawie badań porównawczych przeprowadzonych na mieszaninach aminokwasów i amin Honnegger ustalił optymalne warunki dla ich rozdziału. Z adsorbentów użyteczne są żel krzemowy, kwas krzemowy (*Kieselgur*) i tlenek glinu. Z łatwych do usunięcia z płytek buforów lotnych najlepszymi okazały się: 1) mieszanina 2N kwasu octowego z 0,6N kwasem mrówkowym, *pH* 2,0, 2) pirydyna, kwas octowy, woda w stosunku 1:10:90, *pH* 3,6, a z nielotnych — 0,1M cytrynian sodowy *pH* 3,9. Do rozdziału chromatograficznego stosowano przeważnie mieszaniny: butanol, kwas octowy, woda (60:20:20) i fenol z wodą (75:25) po usunięciu buforu po elektroforezie. Ilość substancji przypadająca na jedną plamę nie przekraczała 10 μg , a objętość nanoszonego roztworu wynosiła około 5 mm^3 . Do wywoływania plam służyły roztwory ninhydryny (0,2% w acetonie lub w 0,5% kwasie octowym). Elektrochromatogramy suszono w 110—115° w czasie 5—10 min. W mieszaninach aminokwasów i amin aminokwasy barwiły się szybciej od amin.

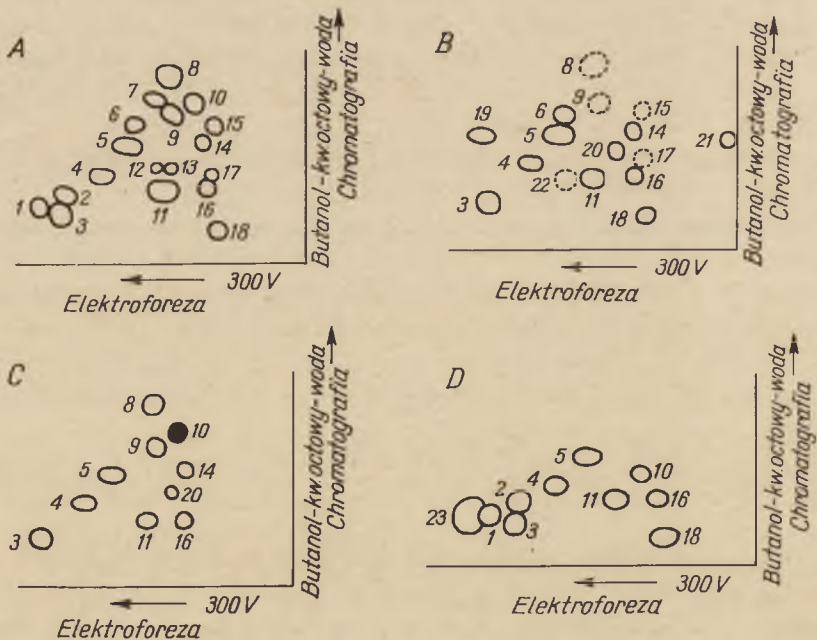
Oprócz Honneggera elektrochromatografię na płytkach stosowali Pastuska (41), Kapłan i Schneider (29), Nybom (36), Hannig (21), Stegeman (44, 45) i inni. Z adsorbentów używane były najczęściej żele krzemowe czyste lub z domieszką buforu cytrynianowego i celulozy MN 300. Elektroforezę przeprowadzano zwykle w buforze lotnym w *pH* około 2, czasem 3,9 przy napięciu około 400 V. Chromatogramy rozwijano na ogół techniką wstępującą w klasycznym układzie: butanol, kwas octowy, woda (4:1:1), czasem w układzie: chloroform, metanol, 17% amoniak (2:2:1). Nybom wprowadził jeszcze dodatkowo dwa inne układy: propanol, pirydyna, woda (5:1:2) i metyloetyloketon, kwas mrówkowy, woda (24:1:6). W ostatnich dwu latach dokonano w technice elektrochromatografii cienkowarstwowej dalszych udoskonaleń, a mianowicie rozszerzono zakres stosowanych adsorbentów. Bardzo użyteczne okazały się adsorbenty mieszane z celulozy i żelu krzemionowego w stosunku 10:4 + 60 ml H_2O . Zmodyfikowano również ko-

mory do elektrochromatografii przez wprowadzenie bloku chłodzącego ze szkła lub pleksiglasu dla dopływu bieżącej wody pod płytkę i specjalnych knotów łącznikowych z bibuły *Whatmana* z osłonkami celofanowymi w miejscach styku z płytką (53) (rysunek 11). Potrzebę chłodzenia podczas elektroforezy już nawet przy napięciach powyżej 10 V/cm podkreślał *H o n e g g e r*. Celowe i użyteczne wydaje się również zastosowane przez



Rys. 11. Komora chłodzona do elektrochromatografii cienkowarstwowej (53)
A — płytka z adsorbentem, B — blok chłodzący, C — osłonki celofanowe, D — knot z bibuły

W a l k e r a (53) nakraplanie indykatora uniwersalnego na płytce w kilku miejscach nad startem, w celu śledzenia prawidłowej migracji substancji. Elektrochromatogramy wykonane tą metodą przedstawia rysunek 12.



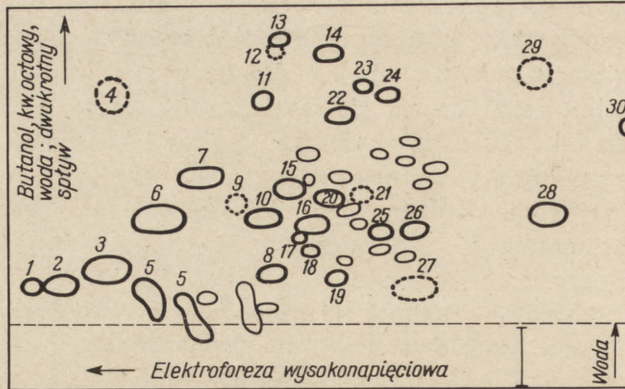
Rys. 12. Elektrochromatogramy aminokwasów wzorcowych (A), w moczu fizjologicznym (B), w fenylketonurii (C) i cystynurii (D) (53)

1. Liz, 2. Arg, 3. His, 4. Gil, 5. Ala, 6. Pro, 7. Wal, 8. Leu+Ileu, 9. Met, 10. Fen, 11. Ser,
12. Tre, 13. Glu, 14. Tyr, 15. Try, 16. Asp, 17. Pro-OH, 18. Cys, 19. BAIBA, 20. GluNH₂,
21. Tau, 22. Asp. NH₂.

Sprawa kolejności nanoszenia próbek na płytki i spryskiwania ich buforem podlega jeszcze dyskusji. Większość autorów przychyliła się do poglądu, że najpierw należy nanieść badany roztwór na płytkę, a potem zwilżyć płytkę buforem. Stosuje się dwa sposoby wprowadzania buforu: można spryskać od razu całą powierzchnię płytki buforem, lub zwilżać ją stopniowo za pomocą wilgotnego paska bibuły umieszczonego na krawędzi płytki. Dyskusji podlega również kolejność obu procesów elektroforezy i chromatografii. Na przykład Richard (43) stosuje najpierw chromatografię, a potem elektroforezę. Większość autorów stosuje kolejność odwrotną. Dodatkowa procedura przemywania płytek po elektroforezie wodą destylowaną wprowadzona przez Troughtona (49) do elektrochromatografii cienkowarstwowej jest uzasadniona. Wade i Morgan (51) wprowadzili ten sposób do chromatografii fosforanów na bibule w celu zagęszczenia plam i zmniejszenia ich powierzchni. W zakresie układów rozwijających notuje się w pracach poszczególnych autorów znaczną ich różnorodność. Oprócz klasycznego układu butanolu z kwasem octowym stosuje się układy z metyloetyloketonem w celu uzyskania dobrego rozdzielania kwasu glutaminowego od treoniny, ponadto układy kombinowane z pirydyną i kwasem octowym dające dobre rozdzielanie asparaginy i glutaminy.

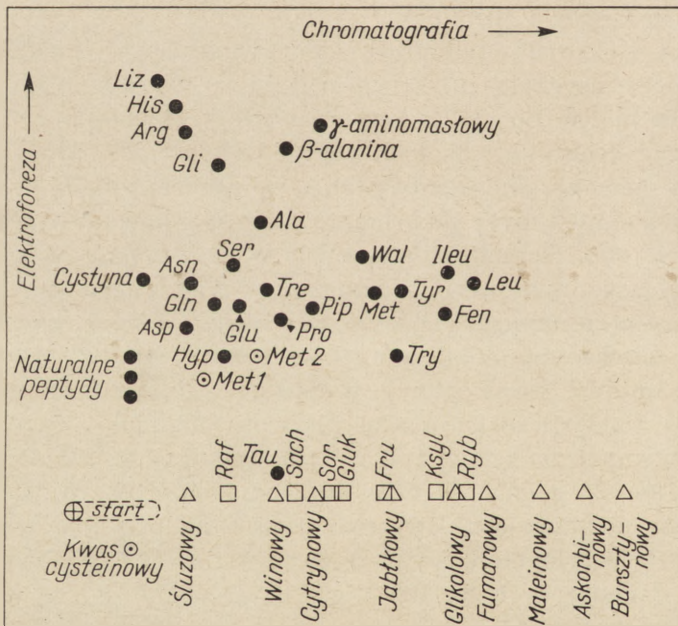
Technika elektrochromatografii cienkowarstwowej znalazła również zastosowanie i uzyskała przewagę nad bibulową dla enzymatycznych hydrolizatów białek. Specjalne komory według Glaesmera (17) okazały się pożyteczne w rozdzielaniu peptydów dla celów preparatywnych. Największe sukcesy odniesiono jednak za pomocą kombinacji elektroforezy wysokonapięciowej z chromatografią cienkowarstwową. Połączenie walorów obu technik stosowanych wspólnie daje w ostatecznym efekcie najlepsze rezultaty. Według Troughtona w kombinacji elektroforezy przy napięciu 50 V/cm, pH 1,4, 20—30 mA, na płytce z adsorbentem mieszanym (celuloza + żel krzemowy, 4:1) i chromatografii w układzie butanol, kwas octowy, woda (5:1:4) dwukrotnie, uzyskuje się z 20—40 μ l fizjologicznego moczu pierwotnego około 30 plam ninhydrynopozytywnych na jednej tylko płytce (rysunek 13). Czas analizy nie przekracza 24—36 godzin. W celu uzyskania lepszych rozdzielanie stosowano jeszcze dodatkowe układy rozwijające, na przykład fenol z wodą (80:20) i metyloetyloketon, kwas octowy, woda (14:6:5). Przy wyższych napięciach dochodzących do 100 V/cm uzyskiwano jeszcze więcej plam ninhydrynopozytywnych i były one lepiej rozdzielone. Zdaniem autora czułość dla poszczególnych aminokwasów dochodzi przy tej technice do 0,001 μ g.

Inni jeszcze autorzy (3, 4) uzyskali doskonałe wyniki rozdzielania aminokwasów obok cukrów i kwasów organicznych w materiale roślinnym (wyciągi z liści) na jednej tylko płytce z adsorbentem mieszanym (celuloza + żel krzemowy) przy napięciach 50 V/cm w dwu układach sukce-



Rys. 13. Elektrochromatogram aminokwasów i związków ninhydrynopozytywnych w moczu pierwotnym (49)

1. Orn, 2. Liz, 3. Arg, 4. BAIBA, 5. His, 6. Gli, 7. Ala, 8. Gli-Gli, 9. peptyd, 10. Ser, 11. Wal, 12. Ileu, 13. Leu, 14. Fen, 15. Tre, 16. GluNH₂, 17. Asp, 18. AspNH₂, 19. Cys, 20. Glu, 21. Pro-OH, 22. Tyr, 23. Try, 24. Met, 25, 26. Met-SO₂, 27. kreatyna, 28. Tau, 29. mocznik, 30. kwas cysteinowy



Rys. 14. Elektrochromatogram aminokwasów, cukrów i organicznych kwasów (4)

(●) Aminokwasy

(○) Produkty rozkładu aminokwasów: met 1 — sulfotlenek metioniny; met — sulfon metioniny; kwas piroolidono-karboksyłowy (nie zaznaczony) znajduje się mniej więcej w tym samym miejscu co kwas cytrynowy

(□) Cukry: raf — rafinoza, sach — sacharoza, sor — sorbitol, gluk — glukoza, fru — fruktoza, ksyl — ksyoza, ryb — ryboza

(△) Kwasy organiczne

sywnie stosowanych: 1) metyloetyloketon, pirydyna, woda, kwas octowy (70:15:15:2), 2) propanol, woda, octan propylowy, kwas octowy, pirydyna (20:60:20:4:1) w czasie 4,5 godzin. Na uwagę zasługują dobre rozdziały leucyny od izoleucyny, fenyloalaniny, β -alaniny, tryptofanu i metioniny, kwasu glutaminowego i asparaginowego, glutaminy i asparaginy, glicyny i seryny, a ponadto cukrów i niektórych kwasów organicznych (patrz rysunek 14).

IV. Ocena metodyki elektrochromatograficznej

Przegląd różnych modyfikacji techniki elektrochromatograficznej jest sprawdzianem stałego i ciągłego postępu w rozwoju metod chromatograficznych. Jako układy modelowe dla wykazania zalet tej techniki służyły głównie mieszaniny aminokwasów wzorcowych lub z materiału biologicznego. Niewątpliwie elektrochromatografia uzyskała aktualnie wyższość nad chromatografią dwukierunkową. Uproszczona procedura wstępna (zbędne odsalenie materiału), większa czułość metody i znacznie krótszy czas pełnej analizy zdecydowały o sukcesie tej techniki. Dalszy postęp stanowi zastąpienie bibuły adsorbentem na płytce. Uzyskano w krótszym czasie lepsze jeszcze rozdziały i większą czułość. Największe jednak sukcesy odniesiono w elektrochromatografii płytkowej przy wysokich napięciach dochodzących do 100 V/cm. Świadczą o tym wyniki prób Troughtona, który uzyskiwał w 20—40 μ l pierwotnego moczu 30 do 55 plam ninhydrinopozytywnych i Bieleckiego, który rozdzielał na jednej płytce aminokwasy, cukrowce i kwasy organiczne. Także wykorzystanie tej techniki do analizy petydów w enzymatycznych hydrolizatach białkowych (*fingerprinting*) (54, 55) stanowi dodatkowy jej sukces.

LITERATURA

1. Baglioni C., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 342 (1961).
2. Baglioni C., Ingram V. M., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 253 (1961).
3. Bielecki R.L., *Anal. Biochem.* **12**, 230 (1965).
4. Bielecki R.L., Turner N.A., *Anal. Biochem.* **17**, 278 (1966).
5. Biserte G., Plaquet-Schoonaert T., Boulanger P., Paysant P., *J. Chromatog.* **3**, 25 (1960).
6. Biserte G., Dautrevaux M., Boulanger P., *Bull. Soc. Chim.* 2954 (1963).
7. Biserte G., Han K., Paysant P., Boulanger P., *Clin. Chim. Acta* **8**, 359 (1963).
8. Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol. Franc.* **39**, 661 (1957).
9. Blass J., Lecomte O., Polonowski J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 627 (1954).
10. Blass J., Sarraff A., *J. Chromatog.* **3**, 168 (1960).

11. Boulanger P., Biserte G., *Acides Aminées Libres et Combinés de l'urine Humaine: Exposés Annuels de Biochimie Médicale* **18**, 123 (1956).
12. Caesson S., *Nature* **159**, 708 (1947).
13. Condsen R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.* **40**, 33 (1946).
14. Durrum E. L., *Colloid Sci.* **6**, 274 (1951).
15. Fischl J., Segal D., *Clin. Chim. Acta* **8**, 479 (1963).
16. Gerlaxte S., Renard M., *Compt. Rend. 27c, Congres intern. Chim. Ind. Bruxelles* 1954.
17. Glaesmer R., Ruckpaul K., Jung W., *Z. Med. Labortechnik* **6**, 175 (1965).
18. Grassman W., Hannig K., *Z. Angew. Chem.* **62**, 170 (1950).
19. Grassman W., Hannig K., *Naturwissenschaften* **37**, 397 (1950).
20. Grassman W., Hannig K., Plocki M., *Z. Physiol. Chem.* **299**, 258 (1955).
21. Hannig K., *Komunikat prywatny Firmy Dessaga*.
22. Hartman F., Müller H. J., *Naturwissenschaften* **39**, 283 (1952).
23. Haugard G., Kroner T. D., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2135 (1948).
24. Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta* **40**, 847 (1957).
25. Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta* **44**, 173 (1961).
26. Ingram V. M., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 539 (1958).
27. Kamieński B., *Sprawozdania Polskiej Akad. Umiej. Kraków* **50**, 15 (1949).
28. Kamieński B., *Sprawozdania Polskiej Akad. Umiej. Kraków* **52**, 913 (1951).
29. Kaplan J. M., Schneider F. L., *Microchem. J.* **6**, 557 (1962).
30. Kickhofen B., Westphal O., *Z. Naturforsch.* **7b**, 659 (1952).
31. Knauff H. G., *Nature* **182**, 937 (1958).
32. Li C. H., Geschwind J. J., Cole R. D., Rade J. D., Harris J. J., Dixon J. L., *Nature* **176**, 687 (1955).
33. Mathias W., *J. Chromatog.* **2**, 434 (1959).
34. Michl H., *Monatsh. Chem.* **82**, 489 (1951).
35. Monnier P., Huquet R., Gras J., IX Congres Soc. Pharm. de France (1957).
36. Nybom N., *Physiol. Plantarum* **17**, 434 (1964).
37. Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M., *Chromatografia*, PWN, Warszawa 1956, str. 85, 87.
38. Opieńska-Blauth J., Tomaszewski L., *Metody Chromatograficzne w badaniach aminokwasów*, PZWL, Warszawa 1956.
39. Opieńska-Blauth J., Gębala A., Kozłowska T., Sanecka-Obacz M., Stryjecka M., *Prace i Materiały Naukowe Inst. Matki i Dziecka VI*, 313 (1965).
40. Opieńska-Blauth J., Gębala A., Sanecka-Obacz M., Kozłowska T., Stryjecka M., *Ann. Paediat.* **207**, 115 (1966).
41. Pastuska G., Trinks H., *Chemiker Ztg.* **86**, 135 (1962).
42. Relvas M. E., *Clin. Chim. Acta* **8**, 12 (1963).
43. Ritschard W., *J. Chromatog.* **16**, 327 (1964).
44. Stegemann H., Lerch B., *Anal. Biochem.* **9**, 417 (1964).
45. Stegemann H., Hillebrecht R., Rien W., *Z. Physiol. Chem.* **340**, 11 (1965).
46. Strain H. H., Sullivan J. C., *Anal. Chem.* **23**, 816 (1951).
47. Street H. V., Nyogi S. K., *Nature* **190**, 537 (1961).
48. Street H. V., Nyogi S. K., *Nature* **190**, 716 (1961).
49. Troughton W. D., Rosemary M. B., Brown St. C., *Am. J. Clin. Pathol.* **46**, 138 (1966).
50. Turner N. A., Redgwelt R. J., *J. Chromatog.* **21**, 729 (1966).
51. Wade H. M., Morgan D. M., *Biochem. J.* **60**, 264 (1955).

52. Wagner J., *Naturwissenschaften* **45**, 110 (1958).
53. Walker W.H.C., Bark M., *Clin. Chim. Acta* **13**, 241 (1966).
54. Wieland Th., Georgopoulos D., *Biochem. Z.* **340**, 476 (1964).
55. Wieland Th., Georgopoulos D., Kompe H., *Biochem. Z.* **340**, 483 (1964).
56a. Wroński A., *Chemia Analityczna* **10**, 1001 (1965).
56b. Wroński A., *Chemia Analityczna* **11**, 957 (1966).
57. Verhelle V., Merlevede M., 2 Colloq. sur les Proteines, Hospital St. Jean, Bruges 1954.
58. Zając J., Rakuć J., *Chemia Analityczna* **9**, 975 (1964).
59. Zając J., *Chemia Analityczna* **7**, 945 (1962).

ADDENDUM

Na zainteresowanie zasługuje jeszcze jedna odmiana metodyki elektrochromatograficznej na bibule: McDonald, Ribeiro i Banaszek (1) rozdzielili dwadzieścia kilka aminokwasów stosując równocześnie siły elektryczne (elektroforezę) w jednym kierunku i chromatografię techniką wirówkową — w drugim (Aparatura „*Elektrochromatofuge Labline*”). Sylvia Bottomley (2) uzyskała znacznie lepsze rozdziały mieszanin aminokwasów stosując zamiast bibuły Whatman jonowymienną bibułę z DEAE. Optymalne warunki rozdziału są następujące: rozpuszczalnik — 0,005M NaCl, szybkość wirowania 320 obr/min, przepływu rozpuszczalnika 1,0 ml/min, natężenie prądu 32 mA, napięcie 800—1000 V, czas trwania rozdziału około 50 min. Elektrochromatogramy wywoływano roztworem acetonowym ninhydriny z 10% dodatkiem kwasu octowego lodowatego. Temperatura suszenia po wywołaniu 50—60°C w czasie 15—20 min. Bezpośrednio po wywołaniu i wysuszeniu elektrochromatogramu pojawiają się swoiście zabarwione plamy poszczególnych aminokwasów. Uzyskano dobre rozdziały aminokwasów w mieszaninach wzorcowych, w moczu, surowicy i wyciągach z erytrocytów. Ponadto przeprowadzono oznaczenia ilościowe i półilościowe większości aminokwasów. Znaczne skrócenie czasu analizy i większa czułość przemawiają na korzyść tej techniki.

- 1 McDonald H. J., Ribeiro L. P., Banaszak L. J. *Anal. Chem.* **31**, 825 (1959).
2 S. Bottomley, *Anal. Biochem.* **18**, 742 (1967).

RECENZJE

Development of Metabolism as Related to Nutrition (Symposium Prag 1966), red. P. Hahn, O. Koldovsky, wyd. S. Karger A. G. Basel, New York 1967

Książka licząca 310 str. obejmuje materiały oraz dyskusję z trzeciego kolejnego sympozjum fizjologii rozwojowej zorganizowanego przez Instytut Fizjologii Czechosłowackiej Akademii Nauk (Praga 11—14 stycznia 1966 r.), a poświęconego rozwojowi funkcji metabolicznych ze szczególnym uwzględnieniem wpływu pożywienia. 26 przedstawionych prac oraz liczne wypowiedzi w dyskusji uzupełniono wprowadzeniem od redakcji i spisem uczestników. Około 60 osób reprezentowało 12 krajów europejskich (Szwecja, Francja, W. Brytania, CSSR, NRD, NRF, ZSRR, Holandia, Polska, Belgia, Finlandia, Włochy) i USA. Ponadto w obradach uczestniczył przedstawiciel UNICEF, a przewodnictwem było w rękach dr R. A. Mc Cane z Zakładu Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu w Cambridge. Reprezentowane były zakłady fizjologii, kliniki pediatriczne, specjalistyczne instytuty, między innymi Matki i Dziecka, Żywienia itp.

W ciągu obrad omawiano metaboliczne funkcje przewodu pokarmowego i przemiany tłuszczowe, a także ich zmiany w czasie rozwoju osobniczego. Poszczególne prace obejmowały dość różnorodny aspekt związany z tytułem sympozjum i były przeprowadzane na izolowanych tkankach, organizmach zwierzęcych, a także ludziach.

Do ciekawszych prac nad funkcją metaboliczną przewodu pokarmowego można zaliczyć badania nad rozwojem transportu cukru w przewodzie pokarmowym kurcząt (P. H. Bogner — USA) oraz systemie regulującym aktywność alkalicznej fosfatazy w dwunastnicy kurcząt i myszy (F. Moog i R. D. Grey — USA), a także w jelicie cienkim w czasie rozwoju płodu ludzkiego (A. Dahlquist i T. Lindberg — Szwecja). Zespół badaczy z CSSR i NRD (O. Koldovský, A. Heringová, J. Hošková, V. Jirsová, R. Noack, M. Friedrich i G. Schenck) przedstawił ciekawe i bardzo obszerne wyniki z zakresu rozwojowej biochemii jelita cienkiego, dotyczące zwłaszcza aktywności β -galaktozydazy, enzymów proteolitycznych i lipolitycznych rosnących noworodków szczurów, myszy i królików. Prace nad rozwojem funkcji jelita cienkiego płodu człowieka, zwłaszcza związanych z transportem glukozy są kontynuacją badań grupy uczonych czechosłowackich (V. Jirsová, O. Koldovsky i inni). W pracy J. G. Lecce (USA) przedstawiono poglądy na temat absorpcji makrocząsteczek (w szczególności γ -globulin) przez przewód pokarmowy noworodka wykazując różnice gatunkowe w tym procesie. Omówiono również rozwój absorpcji jelitowej witaminy B₁₂ i aminokwasów (T. H. Wilson (USA). Ponadto przedstawiono i dyskutowano szereg prac z zakresu metabolizmu tłuszczu zwracając uwagę na konieczność badań poszczególnych enzymów w rozwoju osobniczym oraz w związku z pożywieniem i kontrolą hormonalną (P. Hahn, Z. Drahot, V. Melichar, M. Novák i E. Honová z CSSR, D. Hull z W. Brytanii, Ch. M. Van Duyne z USA).

Interesujące wyniki (J. Dobbing — W. Brytania) wskazujące na możliwość wpływu niedożywienia na zmiany w centralnym układzie nerwowym, a zwłaszcza wpływu na procesy mielinizacji w zależności od okresu, czasu i natężenia niedo-

żywienia wywołały dość długą dyskusję. N. B. Myant (W. Brytania) omówił rolę tarczycy w rozwoju mózgu ssaków. Grupę prac poświęconych rozwojowi enzymów rozpoczęła H. B. Burch (USA) omawiając poziom metabolitów, zwłaszcza cukrowców, jako wskaźników zmian podczas wzrostu i rozwoju. Zagadnienia związane z metabolizmem mocznika i pirymidyn w różnych tkankach podczas rozwoju płodów i po urodzeniu przedstawili N. Kretchmer, R. Hurvitz (USA) i N. Raiha (Finlandia) oraz H. Illnerová (CSSR), a pracownicy Instytutu Matki i Dziecka z Warszawy (J. Bojanek, K. Bożkova i St. Kurzepa) omówili ciekawe wyniki prac nad poziomem serotoniny (5 HT) oraz aktywnością 5 HTP dekarboksylazy i oksydazy monoaminowej (MAO) w czterech podkomórkowych frakcjach wątroby u 1, 4, 7, 10 i 14-dniowych oraz dorosłych królików. Znaczenie centralnej regulacji ze strony układu nerwowego, syntezy i aktywności różnych enzymów w tkankach embrionalnych i u dorosłych ssaków przedstawiono (V. S. Iljin — ZSRR) na przykładzie wątroby, mięśni i nerek królików oraz szczurów. D. G. Walker, H. H. Khan i S. W. Eaton (W. Brytania) przedstawili wyniki badań nad enzymami katalizującymi fosforylację heksoz u nowonarodzonych świnek morskich i szczurów i zwrócili szczególną uwagę na wpływ wprowadzania większej ilości glukozy do diety na aktywność glukokinazy w wątrobie. K. Schreier i V. Porath (NRF) przedstawili dane o wpływie ilości białka w diecie na syntezę i rozpad białek różnych narządów młodych szczurów w okresie wzrostu. Omówiono również (L. Leibson — ZSRR) poglądy i wyniki prac, zwłaszcza radzieckich w dziedzinie czynników endokrynologicznych regulujących metabolizm cukrowców w rozwijającym się zarodku kurzym. Obserwacje dotyczące rozwoju czterech typów komórek trzustki ssaków (szczur, świnka morska, człowiek) w okresie płodowym i po urodzeniu przedstawił B. Hellman (Szwecja). Związek między rodzajem tłuszczu w diecie niemowląt, a absorpcją wapnia był przedmiotem referatu E. M. Widdowson (W. Brytania). Omówienia badań nad homostazą glukozy (A. Schwartz i inni — USA) oraz źródłami energii (V. Melichar i inni — CSSR) u noworodków zakończyły obrady.

Należy podkreślić, że wydane materiały zostały opracowane bardzo starannie, a dyskusje po każdej z prac, jak również dyskusje ogólne po każdym dniu obrad mimo, że nie wyczerpują zagadnień, dają ciekawy przegląd stanu badań i poglądów na związek między żywieniem a metabolizmem rozwojowym u organizmów wyższych.

St. Berger

**Mechanizmy reakcji biochemicznych, Lloyd L. Ingrahm,
Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1966, str. 134**

Tłumaczył z angielskiego Jacek Terpiński. Tytuł oryginału „Biochemical Mechanisms”.

Omawiana książka jest krótką, zwartą rozprawą o mechanizmie niektórych podstawowych reakcji biochemicznych. Autor przeprowadził wykład w dwu częściach. W pierwszej części omówił, w oparciu o współczesne wiadomości z budowy materii, podstawy teoretyczne reagowania związków nieorganicznych i organicznych. Ta część książki zawiera omówienie orbitali atomowych, powstawanie orbitali cząsteczkowych i układu wiązań sprzężonych. Autor omówił również zjawiska towarzyszące tworzeniu związków kompleksowych, reakcje podstawienia, stany przejściowe, wiązania jonowe itp. oraz scharakteryzował rolę metali jako

katalizatorów reakcji chemicznych. W ostatnim rozdziale autor nawiązuje, bardziej bezpośrednio, do biochemii omawiając wiązania wysokoenergetyczne na przykładzie takich związków jak adenzyno-5'-trójfosforan, aktywny siarczan itp.

Druga część książki obejmuje osiem krótkich rozdziałów o reakcjach estryfikacji i hydrolizy, o reakcji eliminacji, mechanizmie dekarboksylacji. Dalej autor omówił reakcje utleniania, różne typy kondensacji, reakcje alkilowania. Osobny rozdział poświęcony jest mechanizmom przegrupowywania atomów wewnątrz cząsteczki. Autor rozważa na kilku przykładach możliwości różnych mechanizmów przegrupowania. Rozdział ten kończą rozważania nad rolą witaminy B₁₂ w reakcjach przegrupowań kwasu glutaminowego w kwas β-metyloasparaginowy i metylomalonylo-koenzymu A w sukcylokoenzym A. Tę część książki kończy krótkie omówienie mechanizmu transaminacji.

Każda z dwu części książki zaopatrzona jest w osobny zestaw literatury, uwzględniający prace przede wszystkim z lat pięćdziesiątych, a tylko w pojedynczych przypadkach z roku 1960. W ogólnej ocenie książki należy podkreślić, że autor przy omawianiu poszczególnych reakcji biochemicznych położył główny nacisk na stronę fizykochemiczną mechanizmów, a pominął zupełnie stronę fizjologiczną. Poza tym wiele mechanizmów podanych ma charakter wysoce spekulatywny, o czym autor wspomina we wstępie. Książkę tę można polecić jako studium uzupełniające w czasie nauki biochemii.

J. W. Szarkowski

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Konferencja na temat biochemii ściany naczyniowej i miażdżycy, Poznań 16.12.1966r.

Rozwój badań metabolizmu ściany naczyniowej łączy się z poszukiwaniami przyczyn i mechanizmów powstawania zmian patologicznych, zwłaszcza miażdżycy, należących do głównych przyczyn zgonów. Celem konferencji zorganizowanej pod patronatem Zarządu Głównego P. T. Bioch. było omówienie doświadczeń, wymiana poglądów oraz nawiązanie współpracy w tej dziedzinie.

Zespołowy charakter czynników wywołujących zaburzenia przemian i zmiany naczyniowe oraz krótki przegląd złożonych zagadnień doświadczalnych stanowiły treść uwag wstępnych (A. Horst, Poznań). Dyskusje, kierowane kolejno przez uczestników konferencji, poprzedzały krótkie programowe wprowadzenia w wybrane zagadnienia. 1. Gospodarka energetyczna w ścianie tętniczej (H. Karoń, Poznań), przy pewnych cechach odrębności (odwrócony efekt Pasteura), uzasadnia słabszą wydajność spalania a także syntez, wobec malejącej w czasie zawartości związków wysokoenergetycznych. 2. Enzymatyczne aspekty przemiany lipidowej (J. Patelski, Poznań) dotyczą syntez oraz różnic i zmian w aktywności enzymów katalizujących hydrolizę fosfolipidów, glicerydów i estrów cholesterolu w ścianie tętniczej. Spostrzeżenia wzrostu aktywności lipidów i spadku aktywności esterazy cholesterolowej, szybszej aktywacji kwasów tłuszczowych wielonienasyconych i największego gromadzenia estrów cholesterolu z takimi kwasami wskazują na znaczenie mechanizmu estryfikacji w ścianie tętniczej. 3. Lipidy i lipoproteidy osocza (J. Paluszak, Poznań), których badania mogą mieć znaczenie pomocnicze, przyciągają uwagę ze względu na znaczenie transportowe i antygenowe komponenty białkowej. 4. Metabolizm, zwłaszcza fosfolipidów (R. Niemirol, Gdańsk), w sensie wymiany poszczególnych składników, przepuszczalności i starzenia się ściany naczyniowej, jest słabo poznany. Jakkolwiek względnie wysoka aktywność fosfolipazy A i obecność fosfolipazy B wskazują na intensywniejszy katabolizm fosfolipidów niż innych estrów kwasów tłuszczowych w ścianie tętniczej, to jednak badania tych procesów i ich patofizjologia są dopiero w początkach (Z. Waligóra, Poznań). 5. Miażdżycza doświadczalna (T. Chruściel, Zabrze) nie potrafiła dotąd dostarczyć dobrego modelu zmian występujących u człowieka. Oprócz dalszych prób w tym kierunku są konieczne badania tętnicy ludzkiej w zakresie różnych przemian, szczególnie może węglowodanowej, z uwzględnieniem umiejscowienia ich w poszczególnych warstwach. 6. Środki farmaceutyczne (Z. Kleinrok, Zabrze), działające się na szereg grup działających na rozmaite procesy, nie spełniły dotąd oczekiwań. 7. Ponadto omawiano zagadnienia: a. Struktura chemiczna i dynamika zmian w ścianie naczyniowej (J. Hanzlik, Lublin) — dotyczy szczególnie kolagenu, którego zawartość w warstwie wewnętrznej i środkowej znacznie wzrasta w miarę starzenia się. b. Kryteria i epidemiologia miażdżycy oraz hemodynamika tętnic (J. Roguski i J. Hasik, Poznań) — obejmują między innymi zagadnienia para-miażdżycy oraz zespołowe badania miażdżycy małych tętnic, zwiększające możliwości rozpoznawcze. c. Czynniki genetyczne (D. Rożynkova, Lublin) — mają znaczenie

w podatności części ludzi na miażdżycę, które trudno określić wobec nieznanych mechanizmów powstawania zaburzeń.

Postęp podstawowych badań warunkujących poznanie patogenety i sposobów zapobiegania oraz leczenia miażdżycy i innych chorób układu naczyniowego jest mierny. Rozwiązanie tych zagadnień nie wydaje się bliskie wobec niedostatecznych zasobów sił i środków, braku koordynacji wysiłków i współpracy. Uczestnicy konferencji postanowili wymienić informacje o prowadzonych pracach oraz kontynuować w przyszłości podobne spotkania o zawężonej tematyce.

J. Patelski

X Międzynarodowy Kongres Medycyny Wewnętrznej

Polskie Towarzystwo Internistów uprzejmie zawiadamia, że X Międzynarodowy Kongres Medycyny Wewnętrznej odbędzie się w Warszawie w dniach 11—14 września 1968 roku.

Tematy

Tematy główne:

1. Rola zaburzeń enzymatycznych w patogenecie chorób wewnętrznych
2. Zaburzenie przemiany białkowej

Tematy dodatkowe:

1. Zagadnienia etyczne, prawne i społeczne we współczesnej terapii i naukowych badaniach klinicznych
2. Zastosowanie metod matematycznych w medycynie wewnętrznej
3. Rehabilitacja w medycynie wewnętrznej
4. Najnowsze osiągnięcia w medycynie wewnętrznej

Program

Wykład wprowadzający do każdego tematu głównego i dodatkowego wygłosi zaproszony mówca. Oczekuje się, że zgłoszone poza tym referaty uwzględnią wszystkie aspekty każdego z tematów. Program Kongresu będzie opracowany w ten sposób, by umożliwić uczestnikom możliwie szybki i jasny wgląd w ostatnie osiągnięcia w tych dziedzinach z punktu widzenia zarówno nauk podstawowych jak i medycyny praktycznej.

Utworzone zostaną sekcje dla pewnej liczby uczestników celem swobodnej wymiany zdań w zakresie specjalistycznych naukowych lub praktycznych zagadnień. Możliwość osobistej dyskusji stanowić będzie ważny element programu Kongresu.

Języki

Podczas plenarnych zebrań językiem urzędowym będzie: — angielski, francuski, niemiecki i rosyjski przy jednoczesnym tłumaczeniu.

Podczas zebrań sekcji może być używany którykolwiek z języków urzędowych, z pierwszeństwem dla języka angielskiego.

Na zebraniach sekcji nie będzie tłumaczy.

Program towarzyski

Przed rozpoczęciem jak i po zakończeniu Kongresu zorganizowanych zostanie szereg atrakcyjnych wycieczek celem umożliwienia uczestnikom obejrzenia Polski i zwiedzenia najbliższych okolic. Podczas trwania Kongresu odbędzie się oficjalne przyjęcie i koncert Warszawskiej Orkiestry Filharmonii Narodowej. Przewidziany jest również specjalny Program dla Pań oraz dla osób towarzyszących uczestnikom Kongresu.

Informacje

Dalsze informacje zostaną przesłane w odpowiednim czasie wszystkim członkom Międzynarodowego Towarzystwa Medycyny Wewnętrznej oraz tym, którzy nadeślą Komitetowi Organizacyjnemu kartę pocztową z podaniem swego nazwiska i adresu.

Sekretariat

X Międzynarodowego Kongresu Medycyny Wewnętrznej: — Wydział Medyczny, Instytut Doskonalenia Lekarzy — Warszawa, ul. Solec 93 — Polska.

SPIS TREŚCI

J. Święcki, B. Lubas-Librant — Pamięci Marii Skłodowskiej-Curie w setną rocznicę Jej urodzin	495
I. Szumiel — Hormonalna regulacja czynności genów	505
S. Poznański, J. Jakubowski, J. Rymaszewski, A. Reps — Niekóre właściwości kazeiny i jej genetycznych odmian	521
M. Trenkner, T. J. Otto — Biologia przeszczepów narządowych	541
B. Bartosiński, B. Zagalak — Koenzymatyczne funkcje biotyny	563
Z. Wojciechowski — Cykl fotosyntetycznej redukcji węgla u bakterii	585
J. Opieńska-Blauth — Metody elektrochromatograficzne	595
Recenzje książek (S. Berger, J. W. Szarkowski)	613
Konferencja na temat biochemii ściany naczyniowej i miażdżycy, Poznań, 16 XII 1966 (J. Patelski)	617
Komunikat o Międzynarodowym Kongresie Medycyny Wewnętrznej	618

W 1-szym zeszycie 14 tomu ukażą się:

1. Biochemia układu fibrynolitycznego osocza krwi, *N. Wołosowicz, L. Jaroszewicz, S. Niewiarowski*
2. Budowa hemoglobiny i jej związek z funkcją, *J. Kwiatkowska*
3. Defekty enzymatyczne krwinek czerwonych, *K. Konopka*
4. Methemoglobina i jej redukcja w krwinkach czerwonych, *A. J. Hłyńczak, J. Sysa*
5. Trawienie i wchłanianie trójglicerydów, *M. G. Sarzała*
6. Aktualne poglądy na strukturę i własności kolagenu, *M. Skonieczna, I. Sopata, J. Wize, E. Wojtecka-Lukasik*
7. Molekularne uszkodzenia elastyny i kolagenu w latyryzmie, *W. Ardel*
8. Występowanie hydroksyproliny u ssaków i jej wydalanie do moczu, *D. Kruze*
9. Metody automatyczne w biochemii klinicznej z zastosowaniem autoanalyzera, *J. Hankiewicz*

POSTĘPY BIOCHEMII

NOVEMBER 1967

ARTICLES IN POLISH

Volume 13

Number 4

J. Święcki, B. Lubas-Librant — In Memory of Maria Skłodowska-Curie, on hundredth Anniversary of Her Birth (Inst. of Oncology, Gliwice)	495
I. Szumiel — Hormonal Control of Gene Function (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	505
S. Poznański, J. Jakubowski, J. Rymaszewski, A. Reps — Some Properties of Caseins and their genetic Variants (Dep. Dairy Techn., High School of Agriculture, Olsztyn)	521
M. Trenkner, T. J. Otto — Biology of Organ Transplantation (Clin. Thoracosurgery, Inst. of Tubercul., Warszawa)	541
B. Bartosiński, B. Zagalak — Coenzymatic Function of Biotin (Pharm. Manufact., Jelenia Góra, Dep. Biochem. High School of Agriculture, Poznań)	563
Z. Wojciechowski — The Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Bacteria (Dep. Biochem. Univ. Warszawa)	585
J. Opieńska-Blauth — Electrochromatographic Methods (Med. School, Lublin)	595
Chronicle	613

SERIA PWN

WSPÓŁCZESNA BIBLIOTEKA NAUKOWA
OMEGA

w 1967 r.

Państwowe Wydawnictwo Naukowe, spełniając życzenia Czytelników serii OMEGA, wprowadza od 1967 roku dalsze udogodnienia w sprzedaży, a mianowicie:

- pojedyncze tomiki będą dostępne w wolnej sprzedaży,
- można zamawiać komplet lub wybór tomików,
- zamówione tomiki będą — na życzenie — wysyłane pocztą do domu.

Książki serii OMEGA dają encyklopedyczny przegląd wiedzy współczesnej w zakresie różnych dyscyplin oraz informują o aktualnych problemach nauki.

Od roku 1963 w serii OMEGA ukazało się 68 tomików.

W roku 1967 ukaze się 20 tomików pojedynczych, w cenie zł 10,— za tomik i 4 tomiki podwójne, w cenie zł 20,— za tomik.

Prospekty, informujące szczegółowo o tematyce serii OMEGA w roku 1967, znajdują się w księgarniach „Domu Książki”.

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., 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

J. Święcki, B. Lubas-Librant — Pamięci Marii Skłodowskiej-Curie w setną rocznicę Jej urodzin	495
I. Szumiel — Hormonalna regulacja czynności genów	505
S. Poznański, J. Jakubowski, J. Rymaszewski, A. Reps — Niektóre właściwości kazeiny i jej genetycznych odmian	521
M. Trenkner, T. J. Otto — Biologia przeszczepów narządowych	541
B. Bartosiński, B. Zagalak — Koenzymatyczne funkcje biotyny	563
Z. Wojciechowski — Cykl fotosyntetycznej redukcji węgla u bakterii	585
J. Opieńska-Blauth — Metody elektrochromatograficzne	595
Recenzje książek (S. Berger, J. W. Szarkowski)	613
Konferencja na temat biochemii ściany naczyniowej i miażdżycy, Poznań, 16 XII 1966 (J. Patelski)	617
Komunikat o Międzynarodowym Kongresie Medycyny Wewnętrznej	618