

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1968

tom 14

nr 2

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

Redakcja zastrzega sobie 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 „górną” i „dół”.

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1968
tom XIV
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

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

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa 12, ul. Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1967

Nakład 2000 (1888 + 112)	Oddano do składania 22.I 1968
Ark. wyd. 14, ark. druk wkl. kred.	Podpisano do druku w maju 1968
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Zam. nr 176/68. N-24.
Cena zł 20.—	Druk ukończono w czerwcu 1968

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JADWIGA BRYŁA *, BARBARA FRĄCKOWIAK **

Współzależność oddychania mitochondrialnego i glikolizy cytoplazmatycznej

Integration of Mitochondrial Respiration and Cytoplasmic Glycolysis

Some factors affecting the inhibition of cytoplasmic glycolysis by respiration and of respiration by glycolysis are presented.

Już prawie sto lat minęło od czasu, kiedy P a s t e u r (92) zaobserwował, że przeniesienie drożdży z warunków beztlenowych do tlenowych powoduje znaczne zahamowanie procesów fermentacyjnych. Zjawisko hamowania glikolizy przez oddychanie zostało nazwane efektem Pasteura. W roku 1929 C r a b t r e e (22) zauważył, że dodanie glukozy do intensywnie oddychających tkanek nowotworowych zmniejsza pobieranie tlenu. Obserwacja ta nie znalazła oddźwięku aż do roku 1951, gdy K u n i w s p . (64) oraz E l ' T s i n e i S e i t z (25) zaobserwowali hamujący wpływ glukozy i fruktozy na oddychanie komórek raka puchlinowego u myszy. Proces ten nazwano efektem Crabtree.

Istnienie efektów Pasteura i Crabtree sugerowało ścisłą współzależność metabolizmu glukozy i tlenu (38, 85, 120). Szczególnie dogodne do badań okazały się krwinki czerwone i komórki nowotworowe charakteryzujące się dużą intensywnością glikolizy (60, 105, 134). Ostatnio stosuje się również układy rekonstruowane, w których można badać oddziaływania między poszczególnymi układami enzymatycznymi zmieniając ich skład ilościowy (38).

Do wyjaśnienia współzależności glikolizy i oddychania w dużym stopniu przyczyniły się wyniki badań nad poziomem wewnątrzkomórkowym substratów, nukleotydów adenylowych i innych koenzymów oraz fosforanu, a także wprowadzenie ulepszonych metod pomiaru stopnia utleniania i redukcji składników łańcucha oddechowego (20). Określenie rozmieszczenia enzymów wewnątrz komórki pozwoliło nato-

* Mgr, st. asystent Zakładu Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

** Mgr, asystent Zakładu Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

miast badać rozmieszczenie substancji ograniczających szybkości poszczególnych procesów w organellach komórkowych (97).

Badania wykazały, że efekty Pasteura i Crabtree są spowodowane współdziałaniem wielu czynników regulujących szybkość procesów metabolicznych.

I. Rola nukleotydów adenylowych i fosforanu

W regulacji szybkości procesów glikolizy i oddychania mają zasadnicze znaczenie składniki układu oksydacyjnej fosforylacji. Dowodów na poparcie tego stwierdzenia dostarczyły głównie badania stopnia redukcji nośników łańcucha oddechowego oraz wpływu czynników rozprzegających. Istnieją jednak rozbieżności co do tego, który ze składników warunkujących potencjał fosforylacyjny ma podstawowe znaczenie: jedni autorzy (3, 13, 15, 18, 19, 20, 36, 39, 42, 54, 55, 77, 79, 81, 86, 102, 111, 112, 113) uważają, że ADP, inni (7, 37, 44, 53, 62, 65, 124, 128, 131, 132, 133, 134, 135, 136), że nieorganiczny fosforan.

Tablica 1

Wzajemne oddziaływanie efektów Crabtree i Pasteura w układach rekonstruowanych (wg 38)

Doświadczenie	Badane składniki układu	Zużycie tlenu (μg -równoważniki)	Wytwarzanie mleczanu (μmole)
A	a) Mitochondria	3,8	
	b) Mitochondria + heksokinaza + fosfofruktokinaza	8,0	
	c) Mitochondria + układ katalizujący glikolizę	5,5	6,0
	d) Układ katalizujący glikolizę (w nieobecności mitochondriów)		6,9
B	a) Mitochondria	6,1	
	d) Mitochondria + heksokinaza + fosfofruktokinaza	10,0	
	c) Mitochondria + układ katalizujący glikolizę	10,1	1,7
	d) Układ katalizujący glikolizę (w nieobecności mitochondriów)		7,5

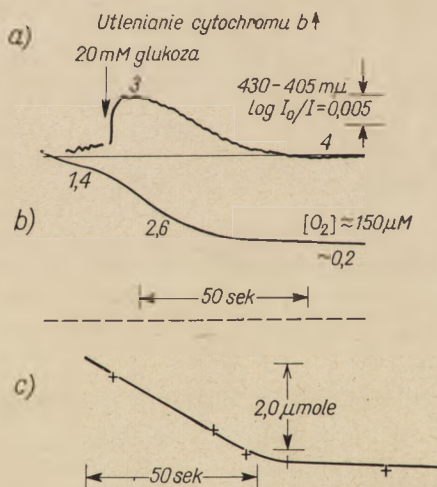
Mitochondria wątroby szczura w doświadczeniu A zawierały 5,5 mg białka, a w doświadczeniu B — 10 mg białka

Wzajemną zależność efektów Pasteura i Crabtree w układach rekonstruowanych w warunkach tlenowych ilustruje tablica 1. W doświadczeniach stosowano glutaminian jako substrat oddechowy, glukozę i fruktozę jako substraty glikolizy oraz katalizujący glikolizę układ zawierający następujące enzymy: fosfofruktokinazę, aldolazę, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, fosfoglicerokinazę i fosfogliceromutazę (z mięśni

królika) oraz heksokinazę, enolazę, kinazę kwasu pirogronowego i dehydrogenazę mleczanową (z drożdży). Doświadczenia przeprowadzono z małą ilością (A) i dużą ilością (B) mitochondriów. Dodanie heksokinazy i fosfofruktokinazy do małej ilości mitochondriów (doświadczenie Ab) znacznie pobudzało oddychanie na skutek dostarczenia ADP wytwarzanego w reakcjach katalizowanych przez te enzymy. Natomiast dodanie do mitochondriów układu katalizującego glikolizę (doświadczenie Ac) zmniejszyło pobieranie tlenu w porównaniu z doświadczeniem Ab. W tych warunkach również szybkość glikolizy (mierzona ilością wytwarzanego mleczanu) była mniejsza od szybkości w układzie nie zawierającym mitochondriów (doświadczenie Ad). Hamowanie oddychania przez układ zawierający enzymy glikolityczne nie zachodzi w obecności dużo większej ilości mitochondriów (doświadczenie Bb i c). Jednakże wtedy następuje większe zahamowanie glikolizy niż w obecności małych ilości mitochondriów (por. doświadczenia Ac i d).

1. Wpływ ADP

Dowodów na to, że ADP jest czynnikiem hamującym lub ograniczającym szybkości oddychania i glikolizy dostarczyły badania stopnia utleniania i redukcji poszczególnych składników łańcucha oddechowego (19, 20, 81).

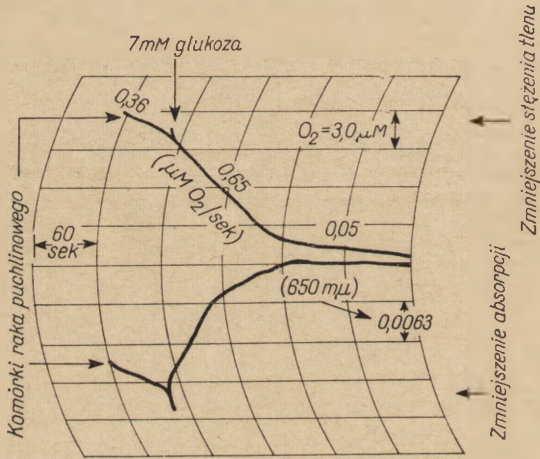


Rys. 1. Zmiany stanu oksydoredukcyjnego cytochromu b podczas oddychania i glikolizy we wzbogaconej glukozą zawieszinie komórek raka puchlinowego (wg 20)
 a) spektrofotometryczny pomiar utlenienia cytochromu b
 b) polarograficzny pomiar szybkości oddychania
 c) zużycie glukozy.

Dodanie glukozy do zawiesiny komórek raka puchlinowego powoduje krótkotrwałe przyspieszenie szybkości oddychania i glikolizy, czemu towarzyszy gwałtowne utlenianie cytochromu b (rysunek 1a). Mniej więcej

po jednej minucie następuje zarówno hamowanie oddychania i glikolizy, jak i zmniejszenie stopnia utleniania cytochromu b, podczas gdy cytochromy c i a pozostają w dalszym ciągu utlenione.

Na podstawie zmian stanu oksydo-redukcyjnego cytochromu b oraz innych składników łańcucha oddechowego, które są podobne do zmian zachodzących w izolowanych mitochondriach w obecności i nieobecności ADP, Chance i Hess (15, 20) wyciągnęli wniosek, że hamowanie jest następstwem braku ADP. Autorzy ci uważają, że ATP, wytwarzany w stosunkowo małej ilości przez komórki oddychające przy udziale endogennych substratów, może być wykorzystywany po dodaniu glukozy, do jej fosforylacji. Wytwarzany w tej reakcji ADP aktywuje oddychanie (13, 14, 58, 69, 111). Jeżeli ilość dodanej glukozy jest mniejsza niż ilość wytwarzanego ATP, następuje tak zwany krótkotrwały efekt Crabtree i oddychanie może być wznowione po kolejnym dodaniu glukozy (18, 20).



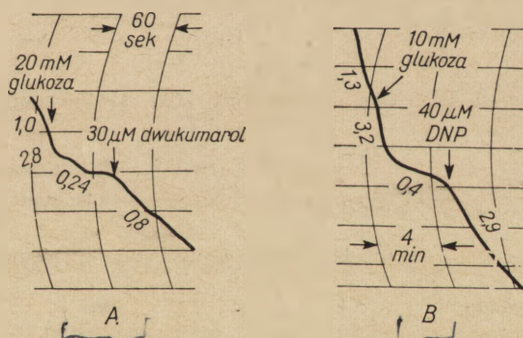
Rys. 2. Wpływ dodania glukozy na oddychanie w zawiesinie komórek Ehrlicha raka puchlinowego oraz towarzyszące mu rozproszenie światła (wg 91)

Ufosforylowana glukoza ulega dalszym przemianom, co powoduje dopływ pirogronianu do mitochondriów. Następuje szybki wzrost oddychania, w wyniku czego stężenie wewnątrzkomórkowe ADP maleje gwałtownie i mitochondria przechodzą ze stanu 3 do stanu 4, w którym ADP jest czynnikiem ograniczającym szybkość oddychania. Obserwuje się przeto zahamowanie oddychania (rysunek 1b). Dla wyjaśnienia hamowania glikolizy w tych warunkach (rysunek 1c) Chance i Hess (15, 42), Racker i wsp. (102, 136) oraz Lynen i Koenigsberger (79) wysunęli hipotezę, że ATP nagromadzone w znacznej ilości w mitochondriach może nie być dostępne dla cytoplazmatycznych enzymów fosforylujących glukozę. Potwierdzeniem słuszności tej hipotezy są obser-

wacje Packera i Goldera (91). Zauważyli oni, że oddychaniu endogennemu komórek raka puchlinowego towarzyszyło powolne zmniejszanie się rozproszenia światła, a dodanie glukozy powodowało prawie dwukrotne przyspieszenie szybkości oddychania oraz zwiększanie się rozproszenia światła aż do czasu, kiedy oddychanie zostało zahamowane (rysunek 2). Wzrost rozproszenia światła w aktywnej fazie oddychania występujący po dodaniu ADP do izolowanych mitochondriów z wielu tkanek zwierzęcych i nowotworowych przypisuje się skurczom mitochondriów (16, 90, 99).

Packer i Golder (91) przyjęli, że wzrost rozproszenia światła po dodaniu glukozy może być wynikiem kurczenia się mitochondriów na skutek nagromadzenia się ATP. Błona mitochondriów w stanie skurczu staje się nieprzepuszczalna dla ATP (98, 99, 110), a jego brak we frakcji cytoplazmatycznej powoduje zahamowanie glikolizy, co z kolei powoduje brak ADP wytwarzanego w reakcjach fosforylacji glukozy i zahamowanie oddychania (107).

Ważnym dowodem na korzyść hipotezy o kluczowym znaczeniu nukleotydów adenylowych w regulacji metabolizmu glukozy i tlenu jest cofanie hamowania oddychania i glikolizy przez dodanie czynników rozprzegających oksydacyjną fosforylację (18, 20, 37, 42, 56, 62, 112, 134). Typowym przykładem tego zjawiska są wyniki doświadczenia przedstawione na rysunku 3.



Rys. 3. Przywracanie zahamowanego dodaniem glukozy oddychania zawiesiny komórek raka puchlinowego w obecności dwukumarolu (a) i 2,4-dwunitrofenolu (DNP) (b) (wg 18)

Cyfry umieszczone przy zapisie elektrody platynowej oznaczają ilość pobieranego tlenu w $\mu\text{molach/litr/sekunde}$.

Niecałkowite przywrócenie szybkości oddychania po dodaniu dwukumarolu czy 2,4-dwunitrofenolu (DNP) może być wynikiem współzawodnictwa o ADP między enzymami mitochondrialnymi i cytoplazmatycznymi, ponieważ ADP jest również wykorzystywane do fosforylacji substratowej podczas utleniania α -ketoglutaranu (37).

Hamowanie oddychania przez glikolizę występuje również wtedy, gdy szybkość wytwarzania ADP podczas glikolizy jest większa niż szybkość jego fosforylacji w procesie oddychania. Ponadto efekt Crabtree występuje również w obecności jodooctanu, który hamuje proces glikolizy na poziomie reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę triozofosforanową, a więc przed miejscem wymagającym udziału ADP. Na podstawie tych obserwacji I b s e n i wsp. (54) wysunęli przypuszczenie, że hamowanie oddychania przez glikolizę nie jest spowodowane bezpośrednio przez współzawodnictwo między tymi dwoma procesami o ADP.

2. Wpływ fosforanu

Niektórzy autorzy uważają fosforan za główny czynnik ograniczający szybkość glikolizy zarówno w komórkach raka puchlinowego (53, 120, 131, 132, 133, 134, 136), czy w krwinkach czerwonych (105), jak i w układach rekonstruowanych (115). Ponieważ większe stężenia fosforanu bardziej stymulują glikolizę w nienaruszonych komórkach niż w wyciągach bezkomórkowych, wydaje się, że transport fosforanu przez błony komórkowe odgrywa ważną rolę w regulacji współzależności oddychania i glikolizy (44, 62, 65, 115, 135). Wskazuje na to również wzrost stężenia fosforanu wewnątrz komórek oraz zwiększenie szybkości pobierania glukozy i wytwarzania kwasu mlekowego przez komórki raka puchlinowego przy większych stężeniach fosforanu w środowisku (tablica 2). Obserwacje te wskazują na stopniowe eliminowanie efektu Pasteura wraz ze zwiększaniem zawartości fosforanu w komórkach.

Tablica 2

Wpływ ilości fosforanu na efekt Pasteura w komórkach raka puchlinowego myszy (wg 135)

Stężenie fosforanu w środowisku (μmole na ml)	Faza gazowa	Stężenie fosforanu w komórkach*	Zużycie glukozy	Wytwarzanie mleczanu	Efekt Pasteura* (w %)
		w μmolach/ml zawiesiny komórek/godzinę			
3	Powietrze	5,1	72	80	58
3	Azot	5,9	135	190	
30	Powietrze	6,2	123	161	40
30	Azot	7,0	174	270	
60	Powietrze	6,8	160	230	27
60	Azot	7,3	197	314	

* % efektu Pasteura jest wyrażony stosunkiem różnicy ilości mleczanu wytworzonego w warunkach beztlenowych do ilości mleczanu wytworzonego w warunkach beztlenowych,

Duże stężenia fosforanu znoszą częściowo również efekt Crabtree (7, 135).

Znaczne stymulowanie glikolizy przez fosforan jest prawdopodobnie wynikiem przyspieszenia szybkości reakcji katalizowanej przez dehydro-

genazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, jedyny enzym glikolityczny wymagający fosforanu jako substratu (121). Ponadto fosforan może aktywować fosfofruktokinazę znosząc hamujący wpływ ATP (83, 93).

Okazało się (52, 58, 66, 104), że zarówno 2,4-dwunitrofenol rozprzegający oksydacyjną fosforylację jak też azydek i oligomycyna, które uniemożliwiają estryfikację fosforanu w procesie oksydacyjnej fosforylacji, hamują oddychanie skrawków nerki szczura tylko w około 30% i zwiększają szybkość glikolizy do poziomu charakterystycznego dla warunków beztlenowych (tablica 3). Transport fosforanu natomiast ulega zahamowaniu tylko w obecności 2,4-dwunitrofenolu. Stąd wyciągnięto wniosek, że energia wymagana dla transportu fosforanu przez błony komórkowe może pochodzić z wysokoenergetycznych pośredników oksydacyjnej fosforylacji (por. artykuł B r y ł y i G a r d a s a) (8), wytwarzanych przed miejscem hamowania oligomycyną lub azydkiem (128).

T a b l i c a

Transport fosforanu przez błony komórkowe w nieobecności i obecności inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji (wg 128)

Faza gazowa	Badane składniki układu	Zużycie tlenu	Wytwarzanie mleczanu	Pobieranie fosforanu	Transport fosforanu *
		w μ molach/mg świeżej tkanki			
CO ₂ —O ₂	Kontrola	18	2,0	4,8	3,8
	2,4-dwunitrofenol (0,25 mM)	11	6,6	1,2	0,2
	Oligomycyna (1,4 μ g/ml)	14	7,6	4,8	3,8
	Azydek sodowy (2,0 mM)	15	8,2	4,9	3,9
CO ₂ —N ₂	Bez dodatków		6,8	1,0	0,0

* różnica pobierania fosforanu w warunkach tlenowych i beztlenowych.

3. Lokalizacja miejsca oksydacyjnej fosforylacji odpowiedzialnego za hamowanie glikolizy

ADP i fosforan mogą być wykorzystywane w reakcjach oksydacyjnej fosforylacji w trzech odcinkach łańcucha oddechowego: między NAD⁺ a cytochromem b, cytochromem b a cytochromem c i na poziomie oksydazy cytochromowej (125). Do niedawna sądzono, że zapotrzebowanie na ADP i fosforan przez każde z trzech miejsc fosforylacji na poziomie łańcucha oddechowego ma jednakowe znaczenie we współzawodnictwie oddychania i glikolizy. Jednak w roku 1962 Wenner i Santalo (122) zaobserwowali, że po zahamowaniu amytalem utleniania substratów przy udziale NAD⁺ w nienaruszonych komórkach raka puchlinowego, utlenianie bursztynianu nie hamowało szybkości glikolizy lub miało na nią bardzo niewielki wpływ. Interpretację tych spostrzeżeń uniemożliwił jednak fakt, że amytał obniża również wydajności oksydacyjnej fosforylacji sprzężonej z utlenianiem bursztynianu (26). Wyciągnięcie właściwych wniosków umożliwiło dopiero zastosowanie rotenonu, który hamuje

utlenianie substratów przy udziale NAD^+ bardziej specyficznie niż amytal nie wpływając na oksydacyjną fosforylację, ani na reakcję katalizowaną przez ATP-azę ani też na wymianę P-ATP (27).

Tablica 4

Wpływ utleniania bursztynianu na szybkość glikolizy w komórkach raka puchlinowego myszy w nieobecności i w obecności rotenonu (wg 21)

Badane składniki układu		Zużycie		Wytwarzanie
Rotenon	Bursztynian	tlenu	glukozy	mleczanu
μmole				
0	—	4,3	9,9	11,2
	+	5,6	8,6	11,0
$7 \times 10^{-8}\text{M}$	—	2,0	15,2	21,6
	+	4,6	16,0	20,1
	—	0,7	17,3	25,0
$7 \times 10^{-7}\text{M}$	—	0,7	17,3	25,0
	+	4,9	16,7	22,3

Rotenon hamuje endogenne oddychanie komórek raka puchlinowego, co powoduje stymulację przemian glikolitycznych (tablica 4). Dodanie bursztynianu wznawia oddychanie, jednakże bez równoczesnego zahamowania zużycia glukozy i wytwarzania mleczanu. Obserwacje te sugerują, że przenoszenie elektronów z cytochromu b w kierunku tlenu, chociaż sprzężone z dwiema fosforylacjami, nie ma wpływu na szybkość cytoplazmatycznej glikolizy. Na tej podstawie Cereijo-Santalo i Wenner (21) postulują, że szybkość glikolizy i oddychania jest regulowana przez pierwsze miejsce oksydacyjnej fosforylacji.

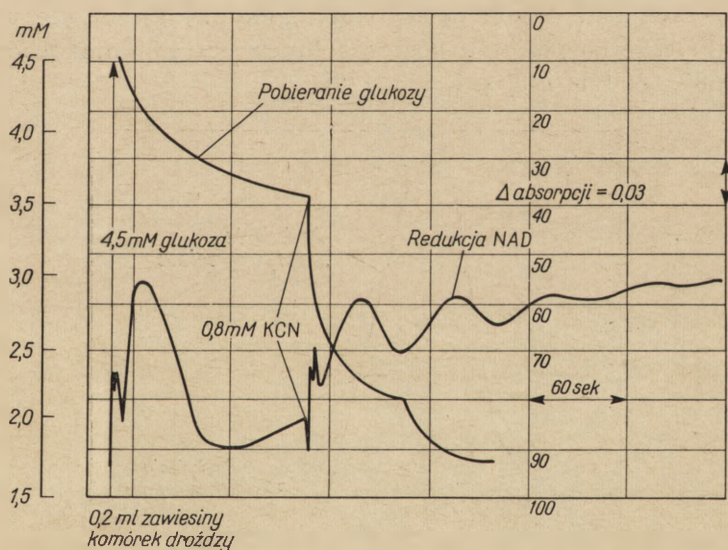
II. Rola nukleotydów nikotynoamidoadeninowych

Niektórzy autorzy (4, 6, 61) próbują tłumaczyć zjawisko współzależności oddychania i glikolizy zmianami poziomu nukleotydów nikotynoamidoadeninowych. Podczas glikolizy nagromadza się bowiem $\text{NAD}^{\text{zred.}}$, wytwarzany w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Dla umożliwienia glikolizy muszą zatem istnieć odpowiednie mechanizmy utleniające cytoplazmatyczny $\text{NAD}^{\text{zred.}}$. Ponieważ błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla tego nukleotydu (70), jego utlenianie może zachodzić przy udziale albo metabolitów i enzymów cytoplazmatycznych albo metabolitów łatwo dyfundujących przez błonę mitochondrialną oraz enzymów występujących zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach. Reakcjami katalizowanymi tylko przez enzymy cytoplazmatyczne są: redukcja pirogronianu do mleczanu (szczególnie charakterystyczna dla komórek mięśniowych) oraz redukcja aldehydu octowego do etanolu (występująca u drożdży). Utlenianie $\text{NAD}^{\text{zred.}}$ przy współudziale enzymów mitochondrialnych zachodzi w następujący sposób: zredukowane metabolity cytoplazmatyczne prze-

nikają do mitochondriów, gdzie redukują wewnątrzmitochondrialną pulę NAD^+ , powracają do cytoplazmy w formie utlenionej, gdzie ulegają redukcji utleniając cytoplazmatyczny NAD zred. Do metabolitów tego typu należą układy: jabłczan — szczawiooctan, (występujący prawdopodobnie w większości tkanek zwierząt kręgowych) oraz α -glicerofosforan — fosfodwuhydroksyaceton (występujący w mięśniach owadów (9, 28)). Zagadnienie to szczegółowo omówiono w jednym z poprzednich zeszytów *Postępów Biochemii* (126).

Ponadto w utlenianiu pozamitochondrialnego NAD zred. mogą spełniać pewną rolę takie enzymy jak: dehydrogenaza amidu kwasu liponowego (6, 57) i transhydrogenaza NAD (59).

Udział enzymów mitochondrialnych w utlenianiu cytoplazmatycznego NAD zred. zostaje wyeliminowany po przeniesieniu komórek do warunków beztlenowych. Powoduje to zwiększanie ilości zredukowanych nukleotydów nikotynoamidoadeninowych w cytoplazmie. Zastosowanie techniki spektrofotometrycznej i fluorymetrycznej pozwoliło stwierdzić, że proces ten zachodzi w sposób oscylacyjny zarówno u różnych gatunków drożdży (11, 17, 24, 46), w komórkach raka puchlinowego (12), w komórkach *E.coli* (29), jak i w przeprowadzających glikolizę ekstraktach serca wołu (30).



Rys. 4. Zmiany stężenia zredukowanych nukleotydów nikotynoamidoadeninowych i glukozy w czasie tlenowej i beztlenowej glikolizy w komórkach drożdży (wg 46)

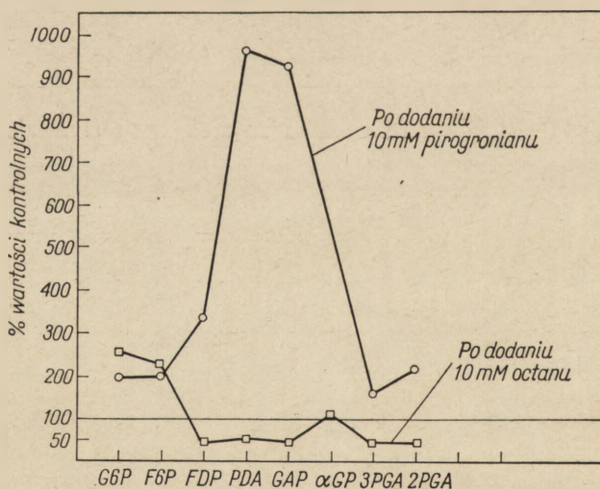
Dodanie glukozy do zawiesiny komórek drożdży (*Saccharomyces carlsbergensis*) w warunkach tlenowych powoduje początkowo gwałtowne zwiększenie, a następnie ubytek ilości zredukowanych nukleotydów nikotynoamidoadeninowych, po czym poziom NAD zred. nieznacznie wzrasta. Po dodaniu cyjanku potasu powodującego anaerobiozę obserwuje się przez

pewien czas oscylacyjne zmiany w poziomie NAD zređ. Procesowi temu towarzyszy zachodzące również w sposób oscylacyjny zużywanie glukozy (rysunek 4).

Oscylacyjne zmiany ilości NAD zređ. można częściowo zahamować preinkubując komórki drożdży z etanolem (45). Ponieważ utlenianie etanolu jest związane z wysokim potencjałem fosforylacyjnym hamowanie to mogłoby być spowodowane wysokim poziomem ATP (80). Potwierdzeniem tej sugestii może być przywrócenie oscylacyjnych zmian po dodaniu 2-dezoksyglukozy. Związek ten ulega fosforylacji w reakcji katalizowanej przez heksokinazę i nie jest dalej metabolizowany w cyklu glikolitycznym, co powoduje zmniejszenie ilości ATP przy równoczesnym zwiększeniu stężenia ADP. Obserwacje te sugerują, że oscylacyjne zmiany ilości NAD zređ. są kontrolowane przez stężenie nukleotydów adenylowych (4, 49). Ponieważ jednak zmianom oscylacyjnym również ulegają stężenia pośredników glikolizy, wydaje się, że zmiany te są wynikiem specyficznej kinetyki enzymów glikolitycznych: fosfoheksokinazy i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (4, 40, 43, 45).

III. Kontrola aktywności enzymów glikolitycznych

W badaniach nad regulacją szybkości glikolizy niezwykle użyteczne okazało się śledzenie poziomu poszczególnych pośredników tego procesu (10, 48, 78, 87, 88, 106, 123, 124, 128, 129).



Rys. 5. Wpływ octanu i pirogronianu na zawartość związków pośrednich glikolizy w sercu szczura inkubowanym z glukozą (wg 123). Zawartość poszczególnych związków wyrażono w procentach wartości kontrolnych otrzymanych dla serc inkubowanych z glukozą.

G6P — glukozo-6-fosforan, F6P — fruktozo-6-fosforan, FDP — fruktozodwufosforan, PDA — fosfodwuhydroksyaceton, GAP — aldehyd 3-fosfoglicerynowy, α-GP — α-glicerofosforan, 3PGA — kwas 3-fosfoglicerynowy, 2PGA — kwas 2-fosfoglicerynowy.

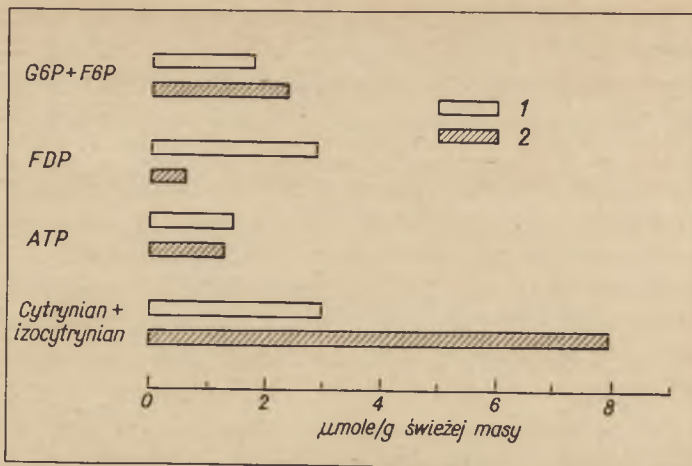
Zmiany zawartości pośredników glikolitycznych w inkubowanym z glukozą sercu szczura po dodaniu octanu lub pirogronianu — metabolitów zarówno glikolizy jak i oddychania — przedstawia rysunek 5. Obserwowany po dodaniu octanu wzrost ilości monofosforanów heksoz przy jednoczesnym zmniejszeniu zawartości fruktozodwufosforanu i pozostałych pośredników glikolizy wskazuje na hamowanie reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę. Możliwe jest również wtedy hamowanie heksokinazy w wyniku nagromadzenia glukozo-6-fosforanu (101, 121). W przeciwieństwie do octanu, pirogronian powoduje wzrost ilości fruktozodwufosforanu oraz znaczny wzrost ilości fosfotrioz, zaś ilość wytwarzanych kwasów 3-fosfoglicerynowego i 2-fosfoglicerynowego tylko nieznacznie przewyższa wartości kontroli. Spostrzeżenia te sugerują, że czynnikiem ograniczającym szybkość glikolizy w tym przypadku może być aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

1. Fosfofruktokinaza

Hamowanie szybkości glikolizy w warunkach tlenowych wielu autorów tłumaczy inhibicją fosfofruktokinazy przez zwiększone stężenie wewnątrzkomórkowego ATP, wytwarzanego w procesie oksydacyjnej fosforylacji (2, 10, 32, 48, 68, 75, 82, 83, 84, 89, 92, 93, 94, 96, 103, 107, 114, 128, 129, 130). Hamujące działanie ATP na ten enzym cofa się po dodaniu fosforanu (33, 34, 67, 68, 74, 82, 83, 84, 93, 102, 116, 117, 129), adenozynomonofosforanu (33, 34, 48, 67, 68, 74, 82, 93, 103, 114, 116, 130), adenozynodwufosforanu (48, 67, 68, 72, 82, 93, 116), fruktozo-6-fosforanu (10, 33, 34, 84, 114, 129) lub fruktozodwufosforanu (33, 34, 67, 68, 93). Dlatego też stosunek zawartości ATP do AMP, ADP i fosforanu w komórce wydaje się mieć decydujące znaczenie dla wywoływania efektu Pasteura (48, 76, 93, 103, 128, 129).

W roku 1962 Passonneau i Lowry (93) zauważyli, że po dodaniu glukozy do zawiesiny drożdży obok niewielkich zmian zawartości ATP obserwuje się znaczne zwiększenie ilości cytrynianu i izocytrynianu (rysunek 6). Cytrynian w warunkach tlenowych tworzy się w reakcji szczawiooctanu z acetylo-CoA powstającym w wyniku utleniania pirogronianu. Ponieważ cytrynian jest inhibitorem fosfofruktokinazy (118), a zmiany zawartości monofosforanów heksoz i fruktozodwufosforanu sugerują hamowanie glikolizy właśnie na etapie katalizowanym przez fosfofruktokinazę, wydaje się, że ilość cytrynianu w komórce może regulować aktywność tego enzymu, a tym samym wpływać także na szybkość procesu glikolizy (34, 35, 84, 94, 95, 106, 121, 124). Przypuszczenie to popiera również fakt, że nagromadzone podczas preinkubacji serca szczura w roztworze fluoroocetanu (inhibitor akonitazy) duże ilości cytrynianu powodują hamowanie glikolizy na poziomie fosfofruktokinazy (5, 124).

Hamowanie fosfofruktokinazy zarówno przez cytrynian jak i przez



Rys. 6. Zawartość fosforanów heksoz, ATP i cytrynianu z izocytrynianem w fermentujących drożdżach (wg 106)
Skróty jak pod rysunkiem 5.

ATP, jest eliminowane przez fosforan, AMP i fruktozodwufosforan (95). Wiadomo, że w wątrobie około 70% wewnątrzkomórkowego cytrynianu występuje we frakcji mitochondrialnej (108). Wydaje się jednak, że wobec hamowania fosfofruktokinazy przez bardzo małe ilości cytrynianu, jego cytoplazmatyczne stężenie podobnie jak fizjologiczne stężenie ATP (96) może całkowicie wystarczać do regulacji intensywności glikolizy (95).

Fosfofruktokinaza jest jedynym znanym enzymem, który jest hamowany przez jeden z substratów (ATP), a stymulowany przez drugi substrat (fruktozo-6-fosforan) oraz produkty reakcji (ADP i fruktozodwufosforan) (93). Działanie fosfofruktokinazy w komórkach raka puchlinowego tłumaczy się w dwojaki sposób.

W pierwszym schemacie zaproponowanym przez Passonneau i Lowry'ego (73, 93, 94) oraz Moursa (83) przyjmuje się istnienie co najmniej dwóch miejsc przyłączenia ATP: miejsca substratowego i miejsca (lub miejsc) hamowania. Wu (127) przypuszcza, że fosforan, fruktozo-6-fosforan i inne czynniki stymulujące mogą współzawodniczyć z ATP tylko o miejsca hamowania. Przy niskich stężeniach ATP zostaje zajęte miejsce substratowe i tylko jedno miejsce hamowania, co wpływa w małym stopniu na aktywność fosfofruktokinazy. Natomiast przy wysokich stężeniach ATP zajmowane są obydwa miejsca hamowania, co znacznie zmniejsza aktywność enzymu. Przyłączenie ATP bowiem tak zmienia konformację enzymu, że miejsce przyłączenia fruktozo-6-fosforanu oddala się od miejsca substratowego dla ATP i oddziaływanie tych dwu substratów jest mało prawdopodobne. Czas upływający od dodania ATP do osiągnięcia maksymalnego zahamowania może być czasem potrzebnym do zajęcia tych zmian konformacyjnych. Ponieważ fosforan

i AMP przywracają aktywność fosfofruktokinazy jedynie wtedy, gdy została ona zahamowana przez ATP, Wu uważa, że związki te przywracają uprzednią konformację enzymu drogą wymiany z ATP w miejscach hamowania. Podobny efekt mają również wysokie stężenia fruktozo-6-fosforanu. Ten schemat nie wyjaśnia hamowania przez cytrynian reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę. Przyjęcie oddzielnego miejsca hamowania dla tego związku (94) wydaje się konieczne do wyjaśnienia jego działania.

Drugi schemat działania fosfofruktokinazy, proponowany przez Wu (127), zakłada rozpad fosfofruktokinazy w obecności ATP na nieaktywne podjednostki. Powstawanie takich podjednostek zaobserwowano podczas inkubacji enzymu w pH 5,8 (84), lub w roztworze 2M mocznika (71).

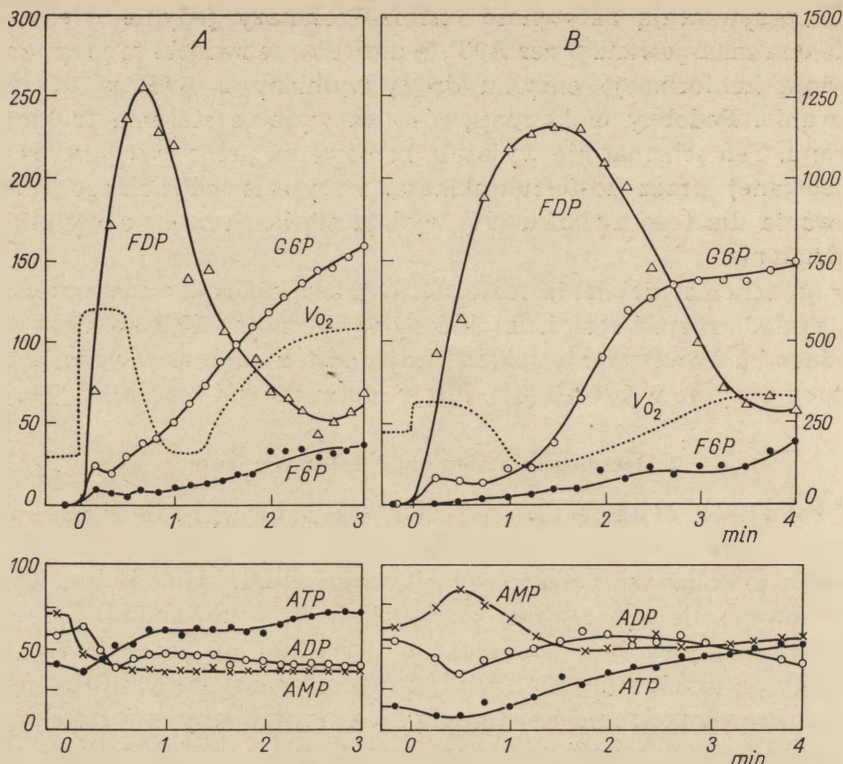
2. Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

W roku 1959 Hatch i Turner (41) zauważyli, że w warunkach tlenowych dodanie heksozomonofosforanu lub fruktozodwufosforanu hamowało glikolizę w wyciągach z kielków grochu. Dodanie kwasu 3-fosfoglicerynowego nie wywoływało tego efektu. Wnioskowano stąd, że obecność tlenu wpływa bezpośrednio lub pośrednio na jeden z enzymów konieczny do przekształcenia fruktozodwufosforanu w kwas 3-fosfoglicerynowy. Prawdopodobnie jest to dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, której aktywność po dodaniu cysteiny lub zredukowanego glutationu powraca do poziomu charakterystycznego dla warunków beztlenowych (37, 41, 50, 51, 100, 119). Sugeruje to, że istotne znaczenie dla kontroli szybkości glikolizy poprzez regulację aktywności tego enzymu ma stan redukcji pewnych grup -SH. Za tą hipotezą przemawia ścisła zależność między zawartością grup -SH w wyciągach cytoplazmatycznych a intensywnością procesu glikolizy (41).

3. Wpływ warunków środowiska

W latach 1965—1966 Hommes (47, 48) stwierdził, że mechanizm kontroli szybkości glikolizy u drożdży w warunkach tlenowych zależy od zawartości glukozy w pożywce. W drożdżach hodowanych na pożywce zawierającej 0,6% glukozy, przeniesionych do środowiska reakcyjnego obserwuje się największe stężenie fruktozodwufosforanu wtedy, gdy rozpoczyna się hamowanie oddychania (rysunek 7A). Równocześnie zmniejsza się stężenie AMP i ADP — aktywatorów fosfofruktokinazy, a wzrasta stężenie ATP — jej inhibitora. Spostrzeżenia te wskazują, że hamowanie oddychania w tych warunkach jest skutkiem braku akceptora fosforanu, a hamowanie glikolizy — wynikiem hamowania fosfofruktokinazy przez zwiększone stężenie ATP (48).

Innymi cechami odznaczają się drożdże hodowane na pożywce zawierającej 2% glukozy. Po przeniesieniu do środowiska reakcyjnego wyka-



Rys. 7. Stężenie glukozy-6-fosforanu, fruktozy-6-fosforanu, fruktozodwufosforanu i nukleotydów adenylinowych podczas tlenowej glikolizy u drożdży (wg 48)
 A — Drożdże hodowane na pożywce zawierającej 0,6% glukozy, B — Drożdże hodowane na pożywce zawierającej 2% glukozy. Wyniki wyrażone w nmolach na minutę i komórkę.

zują one największe stężenie fruktozodwufosforanu w czasie, gdy szybkość oddychania jest najmniejsza, a zawartość AMP w komórkach przewyższa ilość ATP (rysunek 7B). A zatem w tych warunkach zmiana aktywności fosfofruktokinazy nie może warunkować efektu Crabtree — punkt kontrolujący szybkość oddychania musi znajdować się w dalszych etapach glikolizy. Ponieważ równocześnie ilość pirogronianu w komórkach drożdży maleje, a fosfoenolpirogronianu wzrasta, wydaje się, że hamowanie reakcji przekształcenia fosfoenolpirogronianu w pirogronian ogranicza dopływ substratu do mitochondriów i wskutek tego hamuje oddychanie. To tłumaczyłoby również wzrost stopnia utlenienia cytochromów obserwowany podczas efektu Crabtree po dodaniu glukozy do tych drożdży (47).

IV. Uwagi końcowe

Procesy hamowania glikolizy przez oddychanie (efekt Pasteura) i oddychania przez glikolizę (efekt Crabtree) mogą być przykładami mechanizmu niehormonalnej regulacji metabolizmu komórkowego (37). Jest

prawdopodobne, że różne typy komórek i tkanek różnią się sposobami regulowania tych procesów. Niskie stężenia nukleotydów adenylowych mogą wpływać hamująco na oddychanie lub glikolizę np. komórek He La (27) i raka puchlinowego (20, 91). Określone stężenia inhibitorów enzymów glikolitycznych regulując ich aktywność mogą ograniczać oddychanie lub glikolizę w erytrocytach (105), mięśniach (89), mózgu (74), drożdżach (47, 48) i komórkach raka puchlinowego (130).

Zjawisko hamowania glikolizy przez oddychanie nie jest jednak charakterystyczne dla wszystkich typów komórek. Na przykład Cramer (23) zaobserwował, że mitochondrialne oddychanie mózgu szczura stymuluje glikolizę katalizowaną przez układ cytoplazmatyczny otrzymany z tej tkanki, a Schwartz i Lee (109) wykazali podobny efekt mitochondriów nerki świnki morskiej na układ glikolityczny serca i mózgu. Fakt, że mitochondria z danej tkanki dodane do cytoplazmy komórek mózgu, serca i pewnych typów komórek rakowatych (1) stymulują glikolizę w przeciwieństwie do mitochondriów wątroby lub śledziony, wskazuje na istnienie biochemicznych różnic między mitochondriami pochodzącymi z różnych tkanek (109).

Chociaż zjawisko współzależności procesów oddychania i glikolizy jest badane od wielu lat, to jednak dotychczas nie wyjaśniono ostatecznie mechanizmu regulującego szybkość tych procesów. Przyczyny i skutki indukowania i hamowania zarówno glikolizy jak i oddychania są bowiem różnorakie i dlatego niełatwe do zidentyfikowania.

LITERATURA

1. Aisenberg A. Reinfarje B., Potter V. R., *J. Biol. Chem.* **224**, 1099, 1115 (1957).
2. Barker J., Khan M. A. A., Solomos T., *Nature* **211**, 547 (1966).
3. Belitzer W. R. *Biochem. Z.* **283**, 339 (1936).
4. Betz A., Chance B., *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 579 (1965).
5. Bowman R. H., *Biochem. J.* **93**, 13 C (1964).
6. Boxer G. E., Devlin T. M., *Science* **134**, 1495 (1961).
7. Brin M., Mc Kee R. W., *Cancer Res.* **16**, 364 (1956).
8. Bryła J., Gardas A., *Post. Biochem.* **11**, 395 (1965).
9. Bücher T., Klingenberg M., *Angew. Chem.* **70**, 522 (1958).
10. Bücher T., *Angew. Chem.* **71**, 744 (1959).
11. Chance B., *Fed. Proc.* **11**, 196 (1952).
12. Chance B., w *The Mechanism of Enzyme Action*, red. W. D. McElroy B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore, 1954, str. 455.
13. Chance B., Williams G. R., *J. Biol. Chem.* **217**, 383 (1955).
14. Chance B., Williams G. R., *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
15. Chance B., Hess B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **63**, 1008 (1956).
16. Chance B., Packer L., *Biochem. J.* **68**, 295 (1958).
17. Chance B., w *Ciba Foundation Symp. on the Regulation of Cell Metabolism*, red. G. E. Wolstenholme, C. M. O'Connor, J. and A. Churchill, Londyn 1959, str. 91.

18. Chance B., Hess B., *J. Biol. Chem.* **234**, 2416 (1959).
19. Chance B., Hess B., *J. Biol. Chem.* **234**, 2421 (1959).
20. Chance B., Hess B., *Science* **129**, 700 (1959).
21. Cereijo-Santalo R., Wenner C. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 491 (1964).
22. Crabtree H. G., *Biochem. J.* **23**, 536 (1929).
23. Cramer J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 155 (1960).
24. Duyrens L. N. M., Ames J., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 19 (1957).
25. El'Tsina N. V., Sietz I. F., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **77**, 653 (1951).
26. Ernster L., Dallner G., Azzone G. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 1124 (1963).
27. Ernster L., Azzone G. F., Danielson L., Weinbach E. C., *J. Biol. Chem.* **238**, 1834 (1963).
28. Estabrook R. W., Sacktor B., *J. Biol. Chem.* **233**, 1014 (1958).
29. Estabrook R. W., Maitra P. K., Scott D. B. M., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 181 (1962).
30. Frenkel R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 497 (1965).
31. Fromageot C., Chaix P., *Enzymologia* **3**, 288 (1937).
32. Fromm W. J., Zewe V., *J. Biol. Chem.* **237**, 1661 (1962).
33. Garfinkel D., w Control of Energy Metabolism, red. B. Chance, R. W. Estabrook i J. R. Williamson, Academic Press, New York 1965, str. 101.
34. Garfinkel D., *J. Biol. Chem.* **241**, 286 (1966).
35. Garland P. B., Randle P. J., Newsholme E. A., *Nature* **200**, 169 (1963).
36. Gatt S., *Fed. Proc.* **16**, 184 (1957).
37. Gatt S., Racker E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1015 (1959).
38. Gatt S., Racker E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1024 (1959).
39. Gatt S., Krimsky I., Racker E., *Fed. Proc.* **15**, 259 (1956).
40. Glos A., Chance B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 174 (1964).
41. Hatch M. D., Turner J. F., *Biochem. J.* **72**, 524 (1959).
42. Hess B., Chance B., *J. Biol. Chem.* **236**, 239 (1961).
43. Higgins J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51**, 989 (1964).
44. Holzer H., Grunicke H., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 591 (1961).
45. Hommes F. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 36 (1964).
46. Hommes F. A., *Comp. Biochem. Phys.* **14**, 231 (1965).
47. Hommes F. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 168 (1965).
48. Hommes F. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 324 (1966).
49. Hommes F., A., Schurmans Steknoven F. M. A. H., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 427 (1964).
50. Horn R. S., Hangaard E. S., Hangaard N., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 149 (1965).
51. Horn R. S., Hangaard N., *J. Biol. Chem.* **241**, 3078 (1966).
52. Huijing F., Slater E. C., *J. Biochem.* (Tokyo) **49**, 493, (1961).
53. Ibsen H. K., Coe E. L., McKee R. W., *Cancer Res.* **20**, 1399 (1960).
54. Ibsen H. K., Coe E. L., McKee R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 384 (1958).
55. Johnson M. J., *Science* **94**, 200 (1941).
56. Judah J. D., Williams-Ashman H. G., *Biochem. J.* **48**, 33 (1951).
57. Kaniuga Z., *Post. Biochem.* **10**, 7 (1964).
58. Kaniuga Z., Bryła J., *Post. Biochem.* **12**, 451 (1966).
59. Kaplan N. O., Colowick S. P., Neufeld E. F., *J. Biol. Chem.* **205**, 31 (1953).
60. Kit S., Griffin A. C., *Cancer Res.* **18**, 621 (1958).
61. Klingenberg M., w Control of Energy Metabolism, red. B. Chance, R.

- W. Estabrook i J. R. Williamson, Academic Press, New York 1965, str. 149.
62. Koobs D. H., McKee R. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 523 (1966).
 63. Krebs H., w *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Academic Press — PWN — Londyn-Warszawa, 1966, str. 105.
 64. Kun E., Talalay P., Williams-Ashman H. G., *Cancer Res.* **11**, 855 (1951).
 65. Kvamme E., *Acta Physiol. Scan.* **42**, 204, 219 (1958).
 66. Lardy E. A., Johnson D., McMurray W. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 589 (1958).
 67. Lardy O. H., Newsholme E. A., Randle P. J., *Biochem. J.* **93**, 641 (1964).
 68. Lardy H. A., Parks R. E., w *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, red. O. H. Gaebler, Academic Press, New York 1956, str. 584.
 69. Lardy A. H., Wellman H., *J. Biol. Chem.* **195**, 215 (1952).
 70. Lahninger A. L., *J. Biol. Chem.* **190**, 345 (1951).
 71. Ling K. H., Morcus F., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 1893 (1965).
 72. Londberg-Holm K. K., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 464 (1959).
 73. Lowry O. H., w *Control of Energy Metabolism*, red. B. Chance R. W. Estabrook i J. R. Williamson, Academic Press, New York, 1965, str. 65.
 74. Lowry O. H., Passonneau J. V., Hasselberger F. X., Schulz D. W., *J. Biol. Chem.* **239**, 18 (1964).
 75. Lowry O. H., Passonneau J. V., *J. Biol. Chem.* **239**, 31 (1964).
 76. Lowry O. H., Passonneau J. V., VI International Congress of Biochemistry 1964, Abstracts, str. 705.
 77. Lynen F., *Ann. Chem.* **546**, 120 (1941).
 78. Lynen F., Hartman G., Netter K. F., Schuegraff A., w *Regulation of Cell Metabolism*, red. G. E. W. Wolstenholme, C. M. O'Connor, J. i A. Churchill, Londyn 1959, str. 256.
 79. Lynen F., Koenigsberger R. A., *Ann. Chem.* **573**, 61 (1951).
 80. Maitra P. K., *Fed. Proc.* **21**, 56 (1962).
 81. Maitra P. K., Chance B., w *Control of Energy Metabolism*, red. B. Chance, R. W. Estabrook i J. R. Williamson, Academic Press, New York 1965, str. 157.
 82. Mansour T. E., Mansour J. M., *J. Biol. Chem.* **237**, 629 (1962).
 83. Mansour T. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 2285 (1963).
 84. Mansour T. E., *J. Biol. Chem.* **240**, 2165 (1965).
 85. McKee R. E., Frary S. C., Koobs D. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 389 (1966).
 86. Meyerhof O., Fiala S., *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 1 (1950).
 87. Minakami S., Saito T., Suzuki C., Yoshikawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 748 (1964).
 88. Newsholme E. A., Randle P. J., Machester K. L., *Nature* **193**, 270 (1962).
 89. Newsholme E. A., Randle P. J., *Biochem. J.* **80**, 655 (1961).
 90. Packer L., *J. Biol. Chem.* **235**, 242 (1960).
 91. Packer L., Golder R. H., *J. Biol. Chem.* **235**, 1234 (1960).
 92. Pasteur L., *Etudes sur la biere*, Gauthier-Villars, Paris 1876.
 93. Passonneau J. V., Lowry O. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 10 (1962).
 94. Passonneau J. V., Lowry O. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 372 (1963).
 95. Permegiani A., Bowman R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 268 (1963).

96. Permeggiani A., Morgan H. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 252 (1962).
97. Peters R. A., *Nature* **177**, 426 (1956).
98. Potter V. R., Siekevitz P., Simonson H. C., *J. Biol. Chem.* **205**, 893 (1953).
99. Price C. A., Fonnesu A., Davies R. E., *Biochem. J.* **64**, 754 (1956).
100. Quastel J. H., Wheatley A. H. M., *Biochem. J.* **26**, 2169 (1932).
101. Racker E., *Adv. Enzymol.* **15**, 173 (1954).
102. Racker E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **63**, 1017 (1956).
103. Regen D. M., Davis W. W., Morgan M. E., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **239**, 43 (1964).
104. Robertson H. E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.* **214**, 295 (1955).
105. Rose I. A., Warms J. V. B., O'Connell E. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 33 (1964).
106. Salas M. L., Vinuela E., Salas M., Sols A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 371 (1965).
107. Sauer L. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 294 (1964).
108. Schneider J. C., Striebich M. J., Hogeboom G. H., *J. Biol. Chem.* **222**, 969 (1956).
109. Schwartz A., Lee K. S., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 590 (1960).
110. Siekevitz P., Potter V. R., *J. Biol. Chem.* **215**, 221 (1955).
111. Slater E. C., Holton F. A., *Biochem. J.* **55**, 530 (1953).
112. Ternner C., *Biochem. J.* **64**, 523 (1956).
113. Turner J. F., *Nature* **174**, 692 (1954).
114. Underwood A. H., Newsholme E. A., *Biochem. J.* **95**, 868 (1965).
115. Uyeda K., Racker E., w Control of Energy Metabolism red. B. Chance, R. W. Estabrook i J. R. Williamson, Academic Press, New York 1965, str. 127.
116. Uyeda K., Racker E., *J. Biol. Chem.* **240**, 4682 (1965).
117. Uyeda K., Racker E., *J. Biol. Chem.* **240**, 4689 (1965).
118. Vinuela E., Salas M. L., Salas M., Sols A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 371 (1965).
119. Wagner J., Hanata V., Manova I., Kael K., Abstracts of IV FEBS Meeting, Oslo 1967, Universitetsforlaget, Oslo 1967, str. 26.
120. Walker T. K., *Nature* **181**, 940 (1958).
121. Weil-Malhebre H., Bone A. D., *Biochem. J.* **49**, 339 (1951).
122. Wenner C. E., Santalo R. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 67 (1962).
123. Williamson J. R., *J. Biol. Chem.* **240**, 2308 (1965).
124. Williamson J. R., Jones E. A., Azzone G. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 696 (1964).
125. Wojtczak L., *Post. Biochem.* **8**, 73 (1962).
126. Wojtczak A. B., *Post. Biochem.* **12**, 537 (1966).
127. Wu R., *J. Biol. Chem.* **234**, 2806 (1959).
128. Wu R., *J. Biol. Chem.* **240**, 2373 (1965).
129. Wu R., *J. Biol. Chem.* **240**, 2827 (1965).
130. Wu R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 79 (1964).
131. Wu R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 401 (1965).
132. Wu R., w Control of Energy Metabolism, red. B. Chance, R. W. Estabrook i J. R. Williamson, Academic Press, New York 1965, str. 187.
133. Wu R., Racker E., *Fed. Proc.* **16**, 274 (1957).
134. Wu R., Racker E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1029 (1959).
135. Wu R., Racker E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1036 (1959).
136. Wu R., Racker E., w Control mechanism in respiration and fermentation, red. B. Wright, The Ronald Press Company, New York 1963, str. 265.

ANNA GRONOWSKA-SENGER*

Współczesne poglądy na mechanizm konwersji β -karotenu do witaminy A

Present Knowledge of β -Carotene Conversion into Vitamin A

Some recent works in the biochemical explanation of β -carotene conversion to vitamin A are presented with special reference to its mechanism and site.

I. Wstęp

Witamina A nie występuje w świecie roślinnym, może być natomiast syntetyzowana w organizmach zwierzęcych z roślinnych barwników karotenoidowych. Jednakże prowitaminami są tylko nieliczne z tych barwników, a mianowicie te, które zawierają w cząsteczce przynajmniej jeden pierścień β -jononowy i mają konfigurację przestrzenną *trans* (77).

Z punktu widzenia żywienia człowieka najważniejszą rolę spełnia β -karoten, nie tylko z uwagi na jego wysoką zawartość w większości spożywanych produktów, ale także dzięki obecności w cząsteczce dwu pierścieni β -jononowych, co warunkuje jego stosunkowo dużą aktywność biologiczną jako prekursora witaminy A w porównaniu z pozostałymi prowitaminami (17, 30). Biorąc pod uwagę, że około 25% dziennego zapotrzebowania na witaminę A pokrywane jest przez karoten (22) zagadnienie mechanizmu konwersji tej prowitaminy nabiera szczególnego znaczenia.

II. Miejsce konwersji w organizmie

Pierwszym, który zaobserwował tworzenie się witaminy A z karotenu w organizmie żywym, był Moore (45). Stwierdził on, że w wątrobie szczurów zubożonych uprzednio w witaminę A i otrzymujących duże dawki karotenu, pojawiły się znaczne ilości tej witaminy przy śladowej zawartości karotenu. Dzięki temu przez około 20 lat utrzymywał się pogląd, że wątroba stanowi główne miejsce konwersji (46). Za hipotezą tą przemawiały też obserwacje Olcott i McCanna (47), którzy inkubując

* Mgr inż., starszy asystent Katedry Technologii i Higieny Żywienia Człowieka Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

karoten z tkanką wątrobową szczurów pozbawionych witaminy A w diecie, otrzymali witaminę A, co przypisali działaniu zawartych w wątrobie enzymów nazwanych karotenazą. Jednak przypuszczenia te nie zostały potwierdzone (2, 55).

W toku dalszych badań nad konwersją karotenu do witaminy A P o p p e r i G r e e n b e r g (54), L e a s e i w s p. (37) oraz S e x t o n i w s p. (59) stwierdzili, że pozajelitowe wprowadzenie β -karotenu nie cofa objawów niedoboru witaminy A, co podważyło teorię Moore'a. Obserwacje te znalazły potwierdzenie w pracach K r a u z e g o i P i e r c e (36), T h o m p s o n a i w s p. (65, 66), K o n a i T h o m p s o n a (33), którzy wykazali, że wprowadzony pozajelitowo roztwór olejowy lub koloidalny β -karotenu nie ulega konwersji do witaminy A, gromadząc się w niezmiennionej postaci w wątrobie i innych tkankach organizmu, podczas gdy doustne podanie karotenu, powoduje pojawienie się witaminy A najpierw w ścianie jelita cienkiego, a po pewnym czasie w limfie, krwi oraz ostatecznie w wątrobie. Badania te przyczyniły się do powstania hipotezy, że ściana jelita może stanowić miejsce konwersji karotenu (1, 12, 13, 38, 64, 65, 68, 70). W wyniku dalszych obserwacji przeprowadzonych na różnych zwierzętach (3, 4, 5, 6, 7, 10, 24, 34, 60, 67, 74) stwierdzono jednak u szczura, królika, świnki morskiej, owcy, świni i kurczęcia, że wprowadzony pozajelitowo β -karoten ulega konwersji do witaminy A. Okazało się więc, że zależnie od gatunku zwierzęcia zdolność do konwersji nie ogranicza się wyłącznie do ściany jelita cienkiego, ale obejmuje prawdopodobnie również tkanki (35, 39, 41, 42, 43, 44, 73).

Chociaż przekształcenie β -karotenu do witaminy A może zachodzić także w wątrobie (75), to jednak jelito jest głównym miejscem, w którym proces ten przebiega (do 50% wartości dla całego organizmu) (19, 25, 49, 51), przy czym najbardziej aktywny jest górny odcinek jelita cienkiego do 1/3 jego długości. Środkowa część wykazuje dużo niższą, a końcowa — bardzo małą zdolność do konwersji karotenu, co może być związane z brakiem pobudzających ten proces soli żółci i niezdolnością komórek do przekształcenia zaadsorbowanego składnika.

III. Konwersja *in vitro*

W celu wyjaśnienia mechanizmu konwersji wiele uwagi poświęcono uzyskaniu odpowiedniego systemu *in vitro*, zdolnego wydajnie przekształcać karoten do witaminy A (13, 15, 16, 33, 61, 70, 73). Stosowanie różnych technik izolacji jelita jak: pętla jelitowa (50, 51), wywrotki jelitowe (71), skrawki jelitowe (23, 25, 53), homogenat jelitowy (31, 63) i zawiesina komórek tkanki nabłonkowej jelita (19, 21) oraz trudności związane ze znalezieniem odpowiedniej metody dla dokładnego oznaczania ilości powstałej witaminy A w obecności β -karotenu, prowadziły do uzyskania kontrowersyjnych wyników.

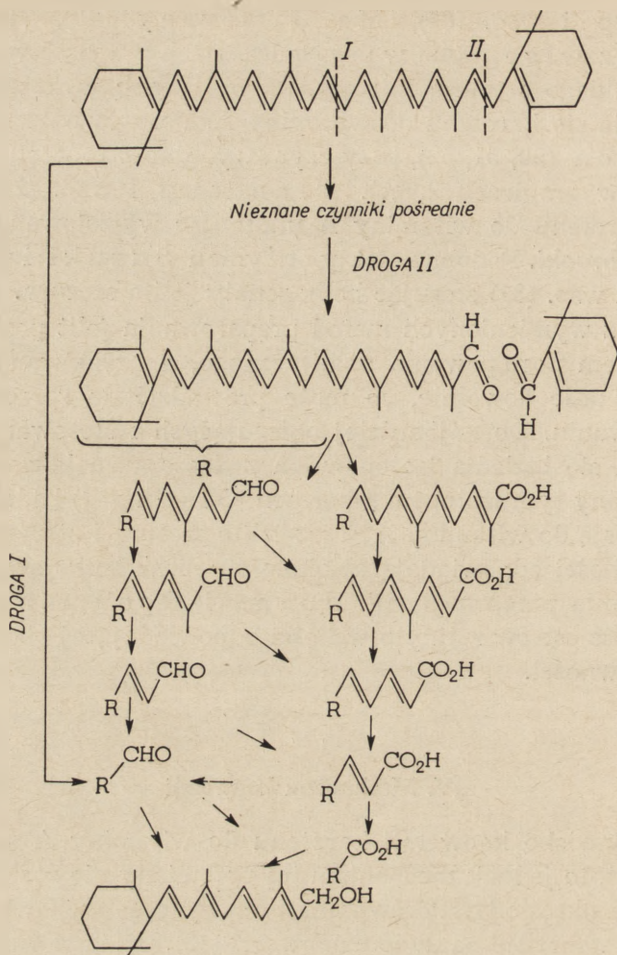
Stallcup i wsp. (62), Mc Gillivray (40), Rosenberg i wsp. (57) oraz Olsen (48) w doświadczeniach z wyizolowanymi pętlami jelita cienkiego szczura, kurcząt, krów i owiec wykazali możliwość przekształcenia się karotenu do witaminy A. Pozytywne wyniki uzyskał również Olson (50, 51, 52), przy czym wydajność procesu była stosunkowo niska (w granicach 2,5%). Grangaud i wsp. (21) stwierdzili konwersję karotenu do witaminy A inkubując wyizolowane jelito ryby *Gambusia holbrooki*. Podobne efekty otrzymali Suzuki i wsp. (63) oraz Koizumi i wsp. (31) stosując homogenaty jelita szczura.

W każdej z wymienionych metod preparowania jelit posługiwano się innym rodzajem postępowania analitycznego, a uzyskiwane wyniki interpretowano dość dowolnie, co może prowadzić do sprzeczności przy ich porównywaniu. Do najbardziej obiecujących i stosowanych ostatnio metod zalicza się badania izotopowe, a zwłaszcza znakowanie ^{14}C . Stosując znakowany tym izotopem β -karoten Olson (51) badał jego absorpcję i konwersję do witaminy A przez jelito szczura i otrzymał estry witaminy A w ilości odpowiadającej około 40—50% znikającego karotenu. Podobne badania przeprowadzili Huang i Goodman (26), stwierdzając obecność estrów retinolu w ilości odpowiadającej około 90% ogólnej radioaktywności.

IV. Mechanizm konwersji

Chociaż zjawisko konwersji karotenu do witaminy A znane jest od przeszło 35 lat, to jednak mechanizm tej przemiany nie został dotychczas jednoznacznie określony. Porównanie budowy cząsteczkowej β -karotenu i witaminy A wskazuje na dwie możliwości (18), przedstawione na rysunku 1. Pierwszą stanowi hipoteza centralnego rozpadu cząsteczki β -karotenu w pozycji I (28) prowadzącego do powstania dwu cząsteczek aldehydu witaminy A, który jest następnie redukowany do retinolu. Druga możliwość to rozpad cząsteczki karotenu w pobliżu pierścienia β -jononowego (pozycja II) i stopniowa degradacja na drodze β -oksydacji, aż do uzyskania cząsteczki witaminy A. Przy założeniu 100% wydajności reakcji stopień konwersji powinien być w pierwszym przypadku równy 2, a w drugim równy 1.

Według teorii rozpadu w pobliżu pierścienia β -jononu, degradacja karotenu polega na stopniowym utlenianiu łańcucha izoprenowego, przy czym Redfearn (56) wykazał, że w wyższych homologach witaminy A grupy metylowe w położeniu β w stosunku do utlenianego atomu węgla nie hamują dalszego utlenienia. Utlenianie to prowadzi do uzyskania retinolu, w którym obecność grupy metylowej w pozycji β uniemożliwia dalsze utlenienie (9). Glover i wsp. (13) jako jedni z pierwszych wykazali, że w organizmie retinal stanowi formę pośrednią przy powstawa-



Rys. 1. Mechanizm konwersji β -karotenu do witaminy A według (15)

niu witaminy A z karotenu. Również na drodze chemicznej β -karoten może ulec utlenieniu z wytworzeniem aldehydu witaminy A (27, 69), ale z teoretycznego punktu widzenia (14) bardziej podatne na utlenianie jest końcowe a nie centralne wiązanie podwójne w łańcuchu izoprenowym. Obok formy aldehydowej witaminy A przy chemicznym rozpadzie cząsteczki β -karotenu pojawiły się pochodne typu retinalu zawierające pierścień β -jononowy z bocznym łańcuchem alifatycznym mniejszym lub większym niż w cząsteczce witaminy A. Wszystkie te związki nazwano apokarotenoidami (przedrostek „apo” oznacza skrócenie łańcucha alifatycznego i utratę podwójnych wiązań w porównaniu z cząsteczką β -karotenu). Glover i Redfearn (14) podali doustnie kilka z β -apokarotenoidów szczurom pozbawionym witaminy A i stwierdzili tworzenie się retinolu, przy czym stopień konwersji każdego z nich był niski i wy-

nosił mniej niż 4% w porównaniu z wartościami uzyskanymi z podobnych dawek β -karotenu.

Prace nad metabolizmem i aktywnością biologiczną różnych β -apokarotenoidów (15, 16), które uważane są za pośrednie stadia w degradacji cząsteczki β -karotenu, nasunęły następujące wnioski:

1. stopniowa degradacja nie jest główną metaboliczną drogą przejścia β -karotenu w witaminę A,
2. w przypadku tworzenia witaminy A z β -apokarotenoidów, degradacja niekoniecznie musi przebiegać drogą β -oksydacji. W wyniku dalszych obserwacji (15, 16) stwierdzono, że po karmieniu szczurów 15, 15'-¹⁴C znakowanym β -karotenem, specyficzna aktywność wyizolowanej 1-¹⁴C witaminy A była znacznie wyższa od tej, którą otrzymano z β -apokarotenoidów, co potwierdza w zupełności poprzednie badania z materiałem nieizotopowym.

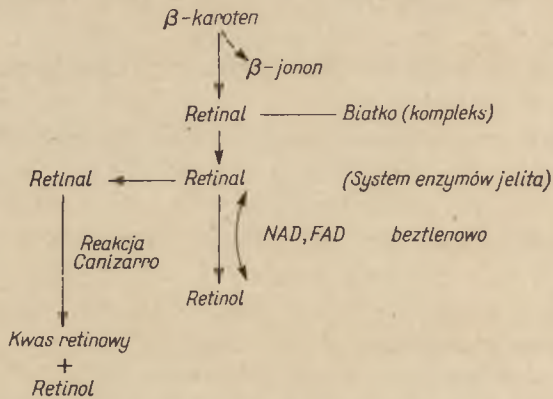
Naturalne występowanie β -apo-8'-karotenoidów potwierdza przypuszczenie, że stopniowa degradacja β -karotenu może mieć miejsce w pewnym stopniu w przyrodzie (8). W roślinach przekształcenie β -karotenu w witaminę A na ogół nie zachodzi. Jednak Winterstein i wsp. (72) stwierdzili obecność retinalu w szpinaku i innych roślinach. Mikroorganizmy są zdolne do tworzenia olefin w obecności źródła węgla z przyłączeniem tlenu atmosferycznego w miejscach podwójnego wiązania (29). Dmitrowskij i Starikowa (11) stosując kulturę *Pseudomonas aeruginosa* uzyskali przekształcenie wprowadzonego karotenu w witaminę A w 70%.

Wydaje się, że najbardziej prawdopodobna jednak jest teoria centralnego rozpadu cząsteczki β -karotenu. Przemawia za nią fakt, że stosunek utworzonej witaminy A do użytego karotenu jest wyższy od jedności. Sahaishi i wsp. (58) w badaniach nad degradacją β -karotenu i metabolizmem witaminy A w jelicie szczura, stwierdzili obecność dwu metabolitów pośrednich, tj. β -jononu oraz kompleksu białka z aldehydem witaminy A. W późniejszych badaniach (32) wykazano, że przemiana β -karotenu do witaminy A następuje istotnie drogą centralnego rozpadu, przy czym powstający retinal związany z białkiem, ulega dalszym przemianom do formy alkoholowej i kwasowej (rysunek 2).

Chemizm konwersji związany jest prawdopodobnie z procesami oksydoredukcji, ponieważ w powstałej cząsteczce pojawia się tlen, a produkt pęknięcia, retinal, jest szybko redukowany do witaminy A. Goodman i wsp. (19, 20) w badaniach nad mechanizmem biosyntezy witaminy A przy użyciu preparatów enzymatycznych z jelita szczura oraz podwójnie znakowanego β -karotenu ³H przy węglu w pozycjach 15 i 15' oraz ¹⁴C wykazali, że cząsteczka tlenu reaguje z dwoma centralnymi atomami węgla w cząsteczce β -karotenu. Następnie centralne podwójne wiązanie w łańcuchu β -karotenu ulega rozszczepieniu z utworzeniem dwóch moli retinolu zestryfikowanego głównie z kwasem palmitynowym. Do podob-

nych wniosków doszedł H a r a s h i m a (23) badając konwersję karotenu do witaminy A przez skrawki jelitowe szczura.

Tak więc mechanizm konwersji nadal nie jest w pełni wyjaśniony.



Rys. 2. Metaboliczna droga przemian β -karotenu i witaminy A, według (32)
retinal — forma aldehydowa witaminy A; retinol — forma alkoholowa witaminy A; kwas
retinowy — forma kwasowa witaminy A.

V. Czynniki wpływające na konwersję

Jak wykazały liczne badania, konwersja karotenu do witaminy A *in vivo* zależy od wielu czynników. Oprócz budowy przestrzennej cząsteczki β -karotenu, na przebieg tego procesu wpływają źródła karotenu, metody podawania, wielkość dawki, skład diety, gatunek i płeć organizmu, stan funkcjonalny gruczołów wydzielania wewnętrznego, a także obecność niektórych witamin i antybiotyków. Również w warunkach *in vitro* ocena tego procesu wymaga uwzględnienia wielu czynników warunkujących jego aktywność.

H a r a s h i m a (23) w doświadczeniach nad mechanizmem konwersji karotenu przez skrawki jelitowe szczura stwierdził konieczność obecności tlenu atmosferycznego w materiale inkubowanym. Podobne efekty uzyskały G o o d m a n i H u a n g (19) w badaniach biosyntezy witaminy A przy użyciu preparatów enzymatycznych jelita, wykazując ponadto stymulujące działanie glutationu w tej reakcji. O l s o n (50) jako pierwszy zaobserwował potrzebę obecności soli żółci, której wpływ związany jest być może z własnościami emulgującymi, zwiększającymi efektywność procesu. K o i z u m i i w s p. (31) stwierdzili, że przemiana β -karotenu do witaminy A w homogenatach jelit szczurów pozbawionych w diecie tiaminy jest bardzo niska, przy czym dodatek NAD i FAD (jednocześnie) podnosi wydajność procesu. Z a l e s s k a j a (76) badając wpływ eksperymentalnej hipo- i hipertyreozы na konwersję karotenu do witaminy A *in vitro* w tkankach świnek morskich wykazała hamujące działanie tiouracylu a stymulujące — tyroksyny.

Z przytoczonego przeglądu literatury wynika, że czynniki warunkujące wysoką wydajność konwersji karotenu do witaminy A nie zostały jednoznacznie określone. Szczególnie ważne byłoby znalezienie układu enzymatycznego, warunkującego ten tak istotny dla organizmów żywych proces.

LITERATURA

1. Aleksander J., Goodwin T., *Brit. J. Nutr.* **4**, 421 (1950).
2. Ahmad B., *Biochem. J.* **25**, 493 (1931).
3. Bieri J., *Fed. Proc.* **8**, 184 (1949).
4. Bieri J., Schultze M., *Arch. Biochem.* **34**, 280 (1951).
5. Bieri J., Sandman R., *Fed. Proc.* **10**, 376 (1951).
6. Bieri J., Pollard C., *Brit. J. Nutr.* **8**, 32 (1954).
7. Bieri J., *Arch. Biochem.* **56**, 90 (1955).
8. Brubacher G., Gloor V., Wiss O., *Chimia* **14**, 19 (1960).
9. Carter H., Osman E., Levine H., Gann S., *J. Biol. Chem.* **128**, XIII (1939).
10. Church D., Mac Vicar R., Bieri J., Baker F., Pope L., *J. Anim. Sci.* **13**, 677 (1954).
11. Dmitrowskij A., Starikowa N., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **163**, 495 (1965).
12. Glover J., Goodwin T., Morton R., *Biochem. J.* **41**, XIV (1947).
13. Glover J., Goodwin T., Morton R., *Biochem. J.* **43**, 109 (1948).
14. Glover J., Redfearn E., *Biochem. J.* **58**, XV (1954).
15. Glover J., *Ann. Resp. Chem. Soc.* **56**, 331 (1960a).
16. Glover J., *Vitam. Horm.* **18**, 371 (1960b).
17. Goodwin T., *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Chapman and Hall Ltd. Londyn, (1952).
18. Goodwin T., *The Biosynthesis of Vitamins and Related Compounds*, Acad. Press, Londyn (1963).
19. Goodman S., Huang H., *Science* **149**, 879 (1965).
20. Goodman S., Huang H., Shiratori T., *J. Biol. Chem.* **241**, 1929 (1966).
21. Grangaud R., Massonet R., Conquy J., Ridolfo J., *C. R. Acad. Sci.*, Paris **252**, 1854, **253**, 336 (1961).
22. Greaves J., Tan J., *Brit. J. Nutr.* **20**, 819 (1966).
23. Harashima K., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 211 (1964).
24. Hentges J., Grummer R., Sorensen D., *J. Anim. Sci.* **11**, 794 (1952).
25. Hou C., Harashima K., Funahashi S., *Biochem. J.*, Tokyo **58**, 101 (1965).
26. Huang H., Goodman S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2839 (1965).
27. Hunter R., Williams N., *J. Chem. Soc.* 554 (1945).
28. Hunter R., *Nature* **158**, 257 (1946).
29. Ishikura T., Foster W., *Nature* **198**, 892 (1961).
30. Karrer P., Jucker E., *Carotenoids*, Elsev. Publ. Co., Amsterdam (1950).
31. Koizumi I., Suzuki T., Takhashi M., Oshima T., Sahashi Y., *Vitamin* **6**, 211 (1960).
32. Koizumi I., Suzuki T., Sahashi Y., *Vitamin* **9**, 154 (1963).
33. Kon S., Thompson S., *Brit. J. Nutr.* **5**, 114 (1951).
34. Kon S., McGillivray W., Thompson S., *Brit. J. Nutr.* **9**, 244 (1955).

35. Kowalewski K., Henrotin E., *Acta Gastro-Enterol. Belg.* **13**, 864 (1950).
36. Krause R., Pierce H., *Arch. Biochem.* **19**, 145 (1948).
37. Lease J., Lease E., Steenbock H., Bauman C., *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 502 (1942).
38. Mattson F., Mehl J., Deul H., *Arch. Biochem.* **15**, 65 (1947).
39. Mc Gillivray W., *N. Z. J. Sci. Tech.* **38**, 466 (1956).
40. Mc Gillivray W., *Austral. J. Scientific Res.* **B4**, 370 (1951).
41. Mc Gillivray W., Worker N., *J. Dairy Res.* **24**, 346 (1957).
42. Mc Gillivray W., Worker N., *N. Z. J. Agric. Res.* **1**, 267 (1958a).
43. Mc Gillivray W., Worker N., *N. Z. J. Agric. Res.* **1**, 273 (1958b).
44. Mc Gillivray W., *Brit. J. Nutr.* **15**, 313 (1961).
45. Moore T., *Biochem. J.* **24**, 692 (1930).
46. Moore T., *Biochem. J.* **25**, 275 (1931).
47. Olcot H., Mc Cann D., *J. Biol. Chem.* **94**, 185 (1931).
48. Olsen E., Harvey J., Hill D., Branion H., *Poultry Sci.* **38**, 950 (1959).
49. Olson J., *Fed. Proc.* **18**, 296 (1959).
50. Olson J., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 166 (1960).
51. Olson J., *J. Biol. Chem.* **236**, 349 (1961).
52. Olson J., *Fed. Proc.* **21**, 473 (1962).
53. Olson J., *J. Lipid. Res.* **5**, 402 (1964).
54. Popper H., Greenberg R., *Arch. Pathol.* **11**, 32 (1941).
55. Rea J., Drumond J., *Ztschr. Vitaminforsch.* **1**, 177 (1932).
56. Redfearn E., *Biochem. J.* **66**, 39 (1957).
57. Rosenberg A., Sobel A., *Arch. Biochem. Biophys.* **44**, 320 (1953).
58. Sahashi Y., Suzuki T., Koizumi I., *Vitamins* **25**, 151 (1962).
59. Sexton E., Mehl J., Deul H., *J. Nutr.* **31**, 299 (1946).
60. Sibbald I., Hutcheson L., *Poultry Sci.* **39**, 99 (1960).
61. Skala J., Hrubá F., *Am. J. Physiol.* **458**, 206 (1964).
62. Stallcup O., Herman H., *J. Dairy Sci.* **33**, 237 (1950).
63. Suzuki T., Koizumi I., Sahashi Y., *J. Vitamin.* **5**, 102 (1959).
64. Thompson S., Ganguly J., Kon S., *Brit. J. Nutr.* **1**, V (1947).
65. Thompson S., Ganguly J., Kon S., *Brit. J. Nutr.* **3**, 50 (1949).
66. Thompson S., Braude R., Coates M., *Brit. J. Nutr.* **4**, 398 (1950).
67. Tomarelli R., Charvey J., Bernhart F., *Proc. Exptl. Biol. Med.* **63**, 108 (1946).
68. Wagner H., Wyler F., Rindi G., Bernart K., *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* **18**, 438 (1960).
69. Wendler N., Rosenblum C., Tishler M., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 234 (1950).
70. Wiese C., Mehl J., Deul H., *Arch. Biochem.* **17**, 75 (1947).
71. Wilson T., Wiseman G., *J. Physiol.* **123**, 116 (1954).
72. Winterstein A., Hegedus B., *Ztschr. Physiol. Chem.* **321**, 97 (1960).
73. Worker N., *Brit. J. Nutr.* **11**, 42 (1957).
74. Worker N., *Brit. J. Nutr.* **13**, 400 (1959).
75. Zachman R., Olson J., *J. Biol. Chem.* **238**, 541 (1963).
76. Zalesskaja J., *Biochimija* **30**, 1132 (1965).
77. Zechmeister L., *Chem. Rev.* **34**, 267 (1944).

ALICJA SZWEYKOWSKA*

Postępy badań nad cytokininami

Recent Progress in Cytokinin Research

The term cytokinins has been recently accepted to designate substances with kinetin-like biological activity. Studies of structure/activity relationships suggest that high cytokinin activity is limited to N_6 -substituted adenines. Cytokinins have been shown to be constituents of some tRNAs in which they are located adjacently to the anticodon.

I. Nomenklatura

W roku 1955 Skoog, Strong i Miller (34) zaproponowali nazwę kininy dla grupy substancji o aktywności biologicznej podobnej do tej, jaką wykazywała kinetyna (6-furfuryloaminopuryna). Okazało się jednak, że nieco wcześniej nazwę tę nadano grupie niskocząsteczkowych polipeptydów działających na mięśnie gładkie i zakończenia nerwowe zwierząt, a więc o aktywności zupełnie odmiennej od kinetyny. Przez pewien czas oba znaczenia nazwy kininy współistniały, powodując jednak pewne nieporozumienia i niedogodności. Próbowano więc zastępować nazwę nadaną przez Skooga i wsp. Dużą popularność zdobyła sobie nazwa fitokininy, której przedrostek podkreślał roślinny charakter tej grupy substancji (por. 30). Gromadziły się jednak fakty świadczące o obecności i aktywności tych związków także w tkankach zwierzęcych (3, 11) oraz w komórkach bakteryjnych (14, 35), a więc o ich uniwersalnym biologicznym występowaniu i roli. W roku 1965 odkrywcy kinetyny i autorzy nazwy kininy — Skoog, Strong i Miller (37) — po wielu konsultacjach zaproponowali nazwę cytokininy na określenie substancji o kinetyno-podobnej aktywności biologicznej. Nawiązuje ona do pobudzania przez te związki cytokinezy w różnego rodzaju komórkach roślinnych oraz w niektórych komórkach zwierzęcych. Nazwa ta została — jak się wydaje — powszechnie przyjęta (między innymi na międzynarodowym sympozjum poświęconym substancjom wzrostowym u roślin w roku 1966 w Kühlungsborn, NRD, por. także poz. lit. 31), zarówno ze względu na

* Doc. dr, Kierownik Katedry Botaniki Ogólnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

to, iż wiąże się ona z pierwszym zaobserwowanym efektem biologicznym kinetyny (por. termin auksyny Koezla i Haagensmita), jak i że wysunięta została przez grupę odkrywców tych substancji mających szczególne prawo do nadania im nazwy.

II. Struktura chemiczna a aktywność

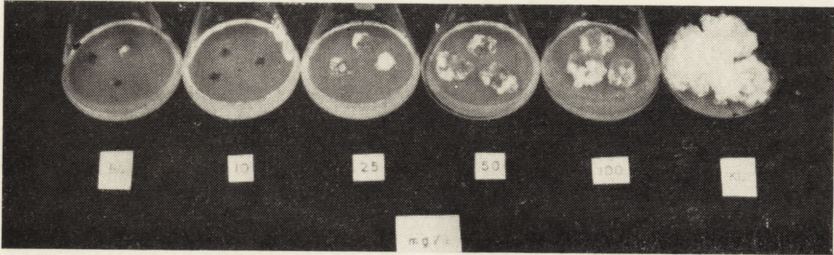
Po wyodrębnieniu i identyfikacji kinetyny (If) (24) otrzymano na drodze syntetycznej wiele substancji jej pokrewnych i wykazujących podobną aktywność biologiczną. Pierwsze badania (16, 26, 38) wskazywały, że aktywność kinetyno-podobna ogranicza się do pochodnych 6-aminopurynowych. Bardziej dokładne i systematyczne badania nad zależnością między aktywnością biologiczną a strukturą chemiczną przeprowadzili Skoog, Leonard i wsp. (36). Zbadali oni 69 związków, przeważnie purynowych lub blisko spokrewnionych z purynami, wśród których było 13 nowych związków, opisanych po raz pierwszy.

Względna aktywność cytokinin może różnić się nieco w zależności od użytego testu biologicznego, jak wykazał między innymi Letham (19) badając aktywność biologiczną pięciu cytokinin za pomocą pięciu różnych testów. W badaniach Skooga, Leonarda i wsp., których wyniki zostaną niżej przedstawione, oznaczano aktywność cytokininową najbardziej czułym i specyficznym testem na cytokiny — testem tytoniowym (por. poz. lit. 31).

W teście tym opracowanym w laboratorium Skooga używa się kultury tkankowej rdzenia łądki tytoniu, która rośnie wyłącznie w obecności cytokiny w pożywce. Tkanka ta reaguje już na stężenie 0,2 μg kinetyny/1 litr, co pozwala na wykrycie tej substancji w ilości około 0,01 μg (w 50 ml pożywki). Wzrost tkanki jest proporcjonalny do stężenia cytokinin w pożywce, w przypadku kinetyny w granicach 1—15 μg /1 litr.

Kulturę tkankową otrzymuje się przez wycięcie w aseptycznych warunkach małego fragmentu rdzenia z łądki tytoniu i umieszczenie go na odpowiedniej pożywce (22). Rozwija się z niego kalusowa tkanka, którą następnie można wielokrotnie przeszczepiać. Przed użyciem do testu, tkankę przeszczepia się dwukrotnie (w odstępach 4—5 tygodniowych) na pożywkę ze stosunkowo niską zawartością kinetyny. Po takim przygotowaniu małe (30—50 mg) kawałki tkanki przeszczepia się na pożywki zawierające substancje lub wyciągi, których aktywność cytokininowa ma być oznaczona. Reakcja tkanki jest widoczna po około 7—10 dniach, końcowy rezultat w postaci oznaczenia świeżej i suchej masy tkanki otrzymujemy po 4—5 tygodniach. Załączona fotografia przedstawia przykład takiego testu (Rysunek 1).

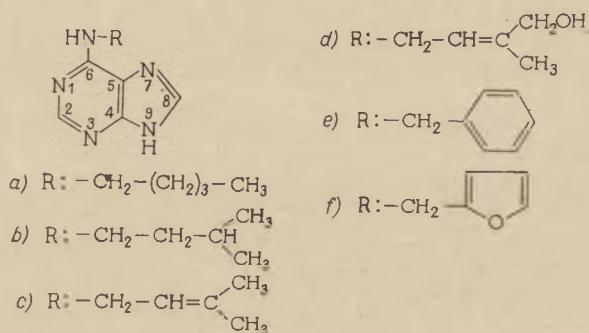
6-Alkiloaminopuryny. Aktywność alkilowych pochodnych adeniny zależy od długości łańcucha alkilowego. Najwyższą specyficzną aktywnością



Rys. 1. Test tytoniowy na cytokiny

Kolejno od lewej: kultura kontrolna bez cytokinin w pożywce, kultury z różnymi stężeniami testowanej substancji, w ostatniej kolbce na prawo — kontrolna kultura kinetynowa zawierająca 30 μg kinetyny/1 litr pożywki

spośród pochodnych nasyconych odznacza się 6-pentyloaminopuryna (Ia) oraz jej izomer 6-izoamyloaminopuryna (Ib). Są one aktywne w teście tytoniowym począwszy od stężenia 10^{-9}M , co odpowiada aktywności kinetyny. Podobne rezultaty otrzymali Rothwell i Wright (33) badając aktywność czterech pochodnych alkilowych 6-aminopuryny za pomocą trzech testów biologicznych. Pochodne alkilowe wyższe od pięciowęglowych aż do 6-decyloaminopuryny włącznie, wykazują słabnącą wraz z długością łańcucha aktywność, podobnie jak pochodne niższe, choć 6-etyloaminopuryna wykazuje jeszcze stosunkowo wysoką aktywność. Pewną aktywność posiada także 6-metyloaminopuryna (stężenie progowe 10^{-4}M), jednakże jej obecność wyraźnie obniża reakcję tkanki tytoniowej na optymalne stężenia bardziej aktywnych cytokinin. Również sama adenina wykazuje niewielką, ale wyraźną aktywność wzrastającą w zakresie stężeń od $2 \cdot 10^{-4}$ do $8 \cdot 10^{-4}\text{M}$. Nie jest wykluczone, że działa nie sama adenina, ale jej N_6 pochodne tworzące się w tkance tytoniowej przy wysokiej zawartości adeniny w komórkach.



I

Obecność wiązań nienasyconych w podstawniku alkilowym znacznie zwiększa aktywność cytokininy. 6-(γ,γ -dwumetylo)-alliloaminopuryna (izopentenyloadenina, IPA) (Ic) jest około 10 razy aktywniejsza od 6-izoamyloaminopuryny i kinetyny. Jest to obok zeatyny (Id) najaktywniejsza ze znanych dotąd cytokinin, wykrywalna w teście tytoniowym w stężeniu 10^{-10} — 10^{-11}M . Podobnie 6-farnezyloaminopuryna i 6-geranyloaminopuryna są aktywniejsze od 6-decyloaminopuryny.

6-Aryloaminopuryny. Spośród pochodnych pierścieniowych najaktywniejsza jest 6-benzyloaminopuryna (Ie); pod względem aktywności zajmuje ona miejsce pomiędzy kinetyną a IPA, a jej najniższe wykrywalne stężenie wynosi $8 \cdot 10^{-10}\text{M}$. Podobnie jak w pochodnych alkilowych, obecność podwójnych wiązań w podstawniku arylowym zwiększa aktywność cytokininy: 6-feniloaminopuryna jest znacznie aktywniejsza od 6-cykloheksyloaminopuryny.

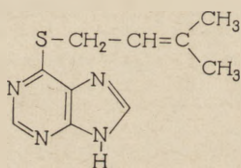
Zarówno usunięcie grupy metylenowej łączącej podstawnik z aminopuryną w pozycji N_6 jak i przedłużenie mostku obniża aktywność. Za-

równy 6-fenylaminopuryna jak i 6-(β -fenoksy)etyloaminopuryna wykazują tylko około 1/5 aktywności 6-benzylaminopuryny.

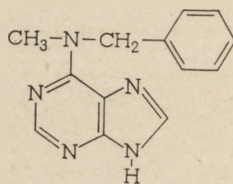
Podstawienie chloru w pozycji *orto* w pochodnych benzyloaminowych zwiększa aktywność cząsteczki, w pozycji *meta* daje bardzo niewielki efekt, a w pozycji *para* działa silnie hamująco. Wprowadzenie innych grup (-OH, -CH₃, -NO₂, -SO₃H, -NH₂) obniża aktywność.

W wyniku dołączenia do 6-metyloaminopuryny silnie polarnego pierścienia dezoksyrybozy powstaje aktywna cytokinina, wykrywalna w stężeniu $2 \cdot 10^{-8}$ — 10^{-7} M. Aktywność tego związku jak również bardzo wysoka aktywność zeatyny (Id) świadczą, iż obecność grup polarnych w bocznym łańcuchu lub pierścieniu nie przeszkadza biologicznej aktywności cytokinin.

Modyfikacja adeninowego składnika cząsteczki. Istotne znaczenie dla aktywności cytokininy ma struktura samej adeninowej części cząsteczki. Zastąpienie w IPA atomu azotu grupy aminowej atomem siarki (II) obniża jej aktywność około 100 razy, a zastąpienie w kinetynie atomu węgla w pozycji 8 atomem azotu (azakinetyna) — około 20 razy. Wymiana atomów węgla i azotu między pozycjami 7 i 8 kompletnie eliminuje aktywność cytokinin.



II



III

Pozycja podstawnika. Miejsce, w którym grupa alkilowa lub arylowa dołączona jest do cząsteczki adeniny, wpływa również w istotny sposób na aktywność cytokinin. Z wcześniejszych badań (2, 12) wynikało, iż nie tylko pochodne podstawione w pozycji N₆-, lecz także 1- i 3-podstawione pochodne adeniny mają aktywność cytokinin. Starannie przeprowadzone doświadczenia z czystymi preparatami substancji i bez stosowania wyższych temperatur w procedurze testu (17, 18, 32) wykazały jednak, że aktywność ograniczona jest do N₆-podstawionych pochodnych. Wyniki doświadczeń, w których uzyskano aktywność 1- i 3-podstawionych pochodnych adeniny, były prawdopodobnie rezultatem stosowania wyższej temperatury w trakcie przygotowania doświadczenia (rozpuszczanie substancji, sterylizacja pożywek), w której związki te łatwo przekształcają się w N₆-podstawione pochodne. Podobnie przedstawia się sprawa z 9-podstawionymi adeninami, w tym jednak przypadku przegrupowanie podstawnika w pozycję N₆ zachodzi trudniej.

Dwupodstawione adeniny. Wprowadzenie drugiego podstawnika w pozycjach N₆-, 7- i 9- do aktywnej cząsteczki adeniny podstawionej w grupie aminowej obniża znacznie jej aktywność. Dołączenie grupy metylo-

wej w pozycji N₆ kinetyny lub 6-benzyloaminopuryny (III) zmniejsza ich aktywność ponad 100 razy. Podobnie zmniejszona była aktywność pochodnych dwubenzylowych: N_{6,7}-dwubenzyloadeniny oraz N_{6,9}-dwubenzyloadeniny. 9-Rybozydy kinetyny i IPA były 2—5 razy mniej aktywne od odpowiednich wolnych zasad.

Szczególne znaczenie dla aktywności cytokinin mają wolne pozycje 1 i 3: po ich podstawieniu aktywność praktycznie zanika, na przykład nieaktywne są 1-metylo-6-benzyloaminopuryna oraz 3-metylo-6-benzyloaminopuryna. Bardzo aktywna IPA (Ic) traci całkowicie aktywność, gdy wskutek związania jej γ -węgla z azotem w pozycji 1, przekształca się w związek trójpierścieniowy.

Z przedstawionych badań nad pochodnymi purynowymi wynika, że wysoka aktywność cytokininowa związana jest z N₆-jednopodstawionymi pochodnymi adeniny, przy czym na stopień aktywności duży wpływ mają wielkość, kształt, skład, nasycenie i ładunek podstawnika. Wyjątek w tej regule stanowią pochodne pirymidyny, które według K u ł a j e w e j i wsp. (15) są aktywne w pewnych systemach, oraz pewne pochodne moczniaka (7, 13), które wykazują aktywność w stymulowaniu wzrostu w tych samych biotestach, co pochodne adeniny. Czy jednak funkcjonują one także w tych samych mechanizmach kontrolujących wzrost, jest jeszcze sprawą otwartą.

III. Występowanie cytokinin w naturze i ich lokalizacja w komórce

Pierwszą zidentyfikowaną cytokininę — kinetynę — wyodrębniono w 1955 roku (24) z produktów autoklawowania DNA przy niskim pH i dotychczas nie stwierdzono jej występowania w naturze. Od dawna jednak wiadomo było, że substancje o kinetyno-podobnej aktywności występują w dużych ilościach zwłaszcza w endospermie nasion (mleko kokosowe, mleko kukurydziane). W roku 1963 L e t h a m (21) wyizolował z endospermy kukurydzy pierwszą naturalną cytokininę, którą nazwał zeatyną (Id). Okazało się, że wysoka zawartość cytokinin jest też związana z pewnymi chorobami roślin, np. ze zmianami powodowanymi przez *Corynebacterium fascians*, nowotworami roślinnymi (*crown-gall*) i galasami.

W roku 1966 K l ä m b t, T h i e s i S k o o g (14) wyodrębnili z *Corynebacterium fascians* IPA (Ic), której struktura tylko nieznacznie różni się od zeatyny. Cytokiny występują też w roślinach niższych: w roku 1966 B a u e r (1) otrzymał ze sporofitowej tkanki mchu krystaliczną substancję o silnej aktywności cytokininowej, którą nazwał bryokiną. O jej budowie chemicznej wiadomo na razie tylko tyle, że — podobnie jak inne cytokiny — jest ona pochodną adeniny. Charakter i lokalizacja podstawnika nie zostały jeszcze określone; nie jest wykluczone,

że bryokinina okaże się jedną ze zidentyfikowanych już naturalnych cytokinin. W roku 1962 McCalla, Morré i Osborne (23) wykazali, że niewielka ilość znakowanej N_6 -benzyloadeniny ulega włączeniu do RNA w starzejących się liściach. Fox w roku 1966 (9) stwierdził w tkankach tytoniu i soi rosnących na pożywcze ze znakowaną N_6 -benzyloadeniną, iż związek ten włącza się głównie do frakcji rozpuszczalnego RNA (sRNA).

W roku 1966 Zachau i wsp. (41) oraz Biemann i wsp. (4) wyodrębnili IPA z komórek drożdży i wykazali, iż jest ona tam składnikiem dwu odmian RNA przenoszącego (tRNA) specyficznego dla seryny. Charakterystyczna jest przy tym lokalizacja tej zasady w cząsteczce tRNA w miejscu bezpośrednio przylegającym do antykodonu. Mniej więcej równocześnie Hall i wsp. (11) wyizolowali rybozyd IPA z enzymatycznego hydrolizatu sRNA drożdży i wątroby cielęcej. Cytokininową aktywność stwierdzono ponadto w preparatach sRNA z wątroby owcy i szczura (3), siewek kukurydzy (20) i niedojrzałych ziarniaków kukurydzy (10). Skoog i wsp. (35) stwierdzili cytokininową aktywność w preparatach tRNA różnego pochodzenia (drożdże, wątroba, *Escherichia coli*), przy czym wysoką aktywnością wyróżniały się frakcje tRNA dla seryny, a także dla izoleucyny i tyrozyny. W cząsteczkach tRNA dla tyrozyny Raj-Bhandary (29) wykazał także obecność IPA w pozycji przyległej do antykodonu. Natomiast zupełnym brakiem aktywności odznaczały się frakcje odpowiadające tRNA dla glicyny, alaniny, argininy, waliny i fenyloalaniny. Ostatnio Hall i wsp. (10) wyizolowali IPA z preparatów sRNA pochodzącego ze szpinaku i groszku. W sRNA szpinaku, groszku i kukurydzy znaleźli ponadto inną jeszcze cytokininę, bardzo zbliżoną do zeatyny, różniącą się od niej tylko pozycją *cis* grupy hydroksylowej w stosunku do metylenowego atomu węgla.

Trudno dziś powiedzieć, jakie jest znaczenie cytokinin w pewnych rodzajach tRNA. Fox (9) wysunął hipotezę, że cytokininy grają w tRNA rolę podobną do roli niektórych pochodnych metylowych zasad (8), nadając mu zdolność do wiązania i przenoszenia aminokwasów. Jeszcze trudniej jest spekulować na temat, czy obecność i ewentualna funkcja cytokinin w tRNA mają jakiś związek z wieloraką i silną aktywnością biologiczną cytokinin. Cytokininy indukują organogenezę w roślinnych kulturach tkankowych, kontrolują dominację wierzchołkową pędu i jego rozgałęzianie się, przyspieszają kwitnienie, stymulują kiełkowanie nasion, regulują transport substancji, mobilizację i akumulację metabolitów, zapobiegają procesom starzenia się. Przy tak niespecyficznym działaniu fizjologicznym, charakterystycznym zresztą i dla innych roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju, należy oczekiwać, że na poziomie molekularnym reakcja, w której biorą udział cytokininy, należy do jednego z podstawowych procesów metabolicznych. W doświadczeniach F o x a (9) nad włączaniem N_6 -benzyloadeniny znakowanej ^{14}C w pozycji 8 do RNA nie-

wielką część radioaktywności odnajdowano także we frakcji nie należącej do rozpuszczalnego ani rybosomowego RNA. Frakcja ta charakteryzowała się właściwościami przypisywanymi informacyjnemu RNA (mRNA). Na tej podstawie Fox wysunął drugą, alternatywną hipotezę, według której cytokininy działają jako derepresory informacji genetycznej, w ten sposób, że ich włączenie do określonego rodzaju mRNA pozbawia go normalnej funkcji represora.

Charakterystycznym efektem biochemicznym cytokinin jest stymulacja syntezy RNA i białka (27, 28, 40), a morfogenetyczne efekty cytokinin mogą być blokowane przez inhibitory syntezy RNA i białka (6, 39). Wollghehn (40) stwierdził, że stymulacja syntezy RNA przez kinetynę dotyczy w jednakowym stopniu wszystkich wyodrębnionych przez niego frakcji. Na tej podstawie Mottles (25) sądzi, że działanie kinetyny może polegać na stabilizacji systemu polirybosomów, pociągającej za sobą dłuższą żywotność mRNA, lub na generalnym znoszeniu represji genów na drodze generalnego wyłączenia histonów, uważanych za składniki systemu represyjnego komórki. Rola efektorów genetycznych jest zresztą przypisywana także innym regulatorom wzrostu i rozwoju roślin (5). Można przypuszczać, że w warunkach naturalnych, kontrolowanych także przez inne systemy regulatorów, endogenne cytokininy działają bardziej specyficznie w systemie aktywacji genów.

Obecny stan wiedzy o cytokininach nie pozwala na sformułowanie bardziej szczegółowych koncepcji na temat ich roli w metabolizmie kwasów nukleinowych i białek. Możemy jedynie oczekiwać, że intensywne badania prowadzone w tym kierunku rzucą wkrótce więcej światła na zagadnienie działania i znaczenia cytokinin na poziomie molekularnym.

LITERATURA

1. Bauer L., *Z. Pflanzphysiol.* **54**, 241 (1966).
2. Beauchesne G., Goutarel R., *Physiol. Plantarum* **16**, 630 (1963).
3. Bellamy A. R., *Nature* **211**, 1093 (1966).
4. Biemann K., Tsunakawa S., Sonnenbichler J., Feldmann H., Dutting D., Zachau H. G., *Angew. Chem.* **78**, 600 (1966).
5. Bonner J., *The Molecular Biology of Development*, Oxford Univ. Press, New York and Oxford, 1965, str. 117—132.
6. Brandes H., Bopp M., *Naturwiss.* **52**, 521 (1965).
7. Bruce M. I., Zwar J. A., Kefford N. P., *Life Sci.* **4**, 461 (1965).
8. Comb D. G., Katz S. J., *J. Mol. Biol.* **8**, 790 (1964).
9. Fox J. E., *Plant Physiol.* **41**, 75 (1966).
10. Hall R. H., Csonka L., David H., McLennan B., *Science* **156**, 69 (1967).
11. Hall R. H., Robins M. J., Stasiuk L., Thedford R., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2614 (1966).
12. Hamzi H. Q., Skoog F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 76 (1964).
13. Kefford N. P., Bruce M. I., Zwar J. A., *Planta* **68**, 292 (1966).

14. Klämbt D., Thies G., Skoog F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 52 (1966).
15. Kułajewa O. N., Czernyszew E. A., Kajutenko L. A., Dołgaja M. E., Worobiewa I. P., Popowa E. A., Klaczko N. Ł., *Fizjol. Rast.* **12**, 902 (1965).
16. Kuraishi S., *Sci. Paper Coll. Gen. Educ., Univ. of Tokyo* **9**, 67 (1959).
17. Leonard N. J., Achmatowicz S., Loepky R. N., Carraway K. L., Bradbury R. B., Grimm W. A. H., Szweykowska A., Skoog F., Nie opublikowane dane.
18. Leonard N. J., Achmatowicz B., Loepky R. N., Carraway K. L., Grimm W. A. H., Szweykowska A., Hamzi H. Q., Skoog F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 709 (1966).
19. Letham D. S., *Planta* **74**, 228 (1967).
20. Letham D. S., Ralph R. K., *Life Sci.* **6**, 387 (1967).
21. Letham D. S., Shannon J. S., McDonald I. R., *Proc. Chem., Soc.* str. 230 (1964).
22. Linsmaier E. M., Skoog F., *Physiol. Plantarum* **18**, 100 (1965).
23. McCalla D. R., Morré D. J., Osborne D., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 522 (1962).
24. Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltza M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375 (1956).
25. Mothes K., *Biol. Rundschau* **4**, 211 (1966).
26. Okumura F. S., Enishi N., Itoh H., Masumura M., Kuraishi S., *Bull. Chem. Soc. Jap.* **32**, 886 (1959).
27. Olszewska M. J., *Acta Soc. Bot. Pol.* **28**, 175 (1959).
28. Parthier B., *Flora* **156-A**, 344 (1965).
29. Raj Bhandary U. L., nie opublikowane dane.
30. Rogozińska J. H., *Post. Biochem.* **12**, 265 (1966).
31. Rogozińska J. H., *Wiad. Bot.* **11**, 77 (1967).
32. Rogozińska J. H., Helgeson J. P., Skoog F., *Physiol. Plant.* **17**, 165 (1964).
33. Rothwell K., Wright S. T. C., *Proc. Roy. Soc. B* **167**, 202 (1957).
34. Skoog F., *J. Cell Comp. Physiol.* **46**, 365 (1955).
35. Skoog F., Armstrong D., Cherayil J. D., Hampel A. E., Bock R. M., *Science* **154**, 1354 (1966).
36. Skoog F., Hamzi H. Q., Szweykowska A., Leonard N. J., Carraway K. L., Fuji T., Helgeson J. P., Loepky R. N., *Phytochemistry*, **6**, 1169 (1967).
37. Skoog F., Strong F. M., Miller C. O., *Science* **148**, 532 (1965).
38. Strong F. M., *Topics in Microbial Chemistry*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1958, str. 98—157.
39. Szweykowska A., Schneider J., *Acta Soc. Bot. Pol.* **36**, 735 (1967).
40. Wollgiehn R., *Flora* **156-A**, 291 (1965).
41. Zachau H. G., Dutting G. D., Feldmann H., *Angew. Chem.* **78**, 392 (1966).

MARIAN MICHNIEWICZ*

Przydatność metody mikrobiologicznej do badań nad regulatorami wzrostu roślin

The Microbiological Test as a Method for Determination of Plant Growth Regulators

The possibility of the application of bacteria for testing of plant growth regulators is discussed.

Endogenne regulatory wzrostu stanowią potężny czynnik kontrolujący wzrost i rozwój rośliny. Liczba substancji zaliczanych do tej kategorii związków stale wzrasta. Obok auksyn, giberelin czy cytokinin, wymienić tu należy także dużą grupę inhibitorów wzrostu. Grupa ta obejmuje różnorodne pod względem chemicznym i fizjologicznym substancje, których hamujący wpływ na wzrost i rozwój rośliny ma charakter odwracalny. W zależności od funkcji fizjologicznej mówimy o inhibitorach wzrostu, kiełkowania, kwitnienia itp. Kryterium podziału stanowi tu zatem obserwowany efekt, a nie mechanizm działania na poziomie molekularnym. Tak więc pojęcie inhibitor w sensie fizjologicznym jest inne od znaczenia tego terminu w biochemii lub chemii.

Występowanie inhibitorów wzrostu u roślin jest powszechne, a obecność ich stwierdzono we wszystkich organach roślin, należących do najróżnorodniejszych jednostek systematycznych (11).

Do inhibitorów wzrostu należy szereg nienasyconych laktonów, a wśród nich kumaryna, występująca w roślinach w postaci β -glikozydu kwasu *o*-hydroksy-*cis*-cynamonowego, związek znany przede wszystkim jako inhibitor kiełkowania nasion. Inhibitorami wzrostu jest wiele związków fenolowych, między innymi kwasy (na przykład *trans*-cynamonowy, chlorogenowy, i chelidoniowy) oraz flawonoidy (11) (na przykład florydzyna, glukozyd floretyny, inhibitor charakterystyczny dla jabłoni (7, 16)). Do inhibitorów zaliczyć należy także abscysynę, pochodną kwasu pentadienowego, kontrolującą głównie zjawiska opadania liści i spoczynek (5).

Mimo dużych osiągnięć w dziedzinie badań nad wyodrębnianiem i o-

* Prof. dr, kierownik Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu

Wykaz stosowanych skrótów: GA₃ — kwas giberelowy, IAA — kwas 3-indoliloctowy.

znaczaniem czynnych związków występujących w roślinie oraz wprowadzenia nowych metod jak chromatografia cienkowarstwowa czy gazowa, wielu z tych związków nie zdołano dotąd zidentyfikować i o ich obecności wnioskuje się jedynie na podstawie odpowiednich testów biologicznych. Odnosi się to zwłaszcza do inhibitorów wzrostu. Przykładem może być bardzo pospolicie występujący w materiale roślinnym tak zwany „inhibitor β ”, wyizolowany po raz pierwszy w roku 1953 przez Bennett-Clarka i Keforda (2) i dotychczas jeszcze nie zidentyfikowany. Wykazuje on odczyn kwaśny, rozpuszcza się w etanolu, benzenie, eterze dwuetylowym i wodzie, na chromatogramach bibułowych rozwijanych w izopropanolu, amoniaku i wodzie (10:1:1) jego R_f wynosi 0,6—0,8. Okazało się, że jest to związek kompleksowy, w skład którego wchodzi zarówno związki fenolowe jak też substancje nie będące fenolami (17).

Niektóre z testów biologicznych stosowanych przy oznaczaniu auksyn, giberelin czy cytokinin odznaczają się dostateczną specyficnością, pozwalającą z dużym prawdopodobieństwem zaszeregować dany związek do odpowiedniej grupy substancji wzrostowych.

Specyficznym testem na auksynę jest wygięciowy test owsiany. Auksyna, wprowadzona w bloczku agarowym na jedną stronę dekapitowanego wierzchołka koleoptyli owsa, stymuluje wzrost tej właśnie strony, co wywołuje skrzywienie koleoptyli. Stopień skrzywienia zależy od ilości wprowadzonej substancji wzrostowej (1, 8).

Za najbardziej specyficzne testy do oznaczania giberelin uważa się testy karłowatych mutantów kukurydzy lub grochu. Giberelina zdolna jest przełamać tu genetyczną karłowatość i pobudzić wzrost pędu (10).

Za specyficzny test biologiczny do oznaczania cytokinin przyjmuje się test rdzenia tytoniu. Pod wpływem cytokininy podziały komórek tkanki rdzenia tytoniu, hodowanej *in vitro*, przebiegają szybciej, co powoduje znaczny jej przyrost (19).

Niestety dotychczas nie znamy specyficznych testów biologicznych dla ogromnej większości inhibitorów wzrostu, a o ich obecności wnioskujemy często tylko na podstawie hamowania wzrostu wycinków koleoptyli owsa czy pszenicy. Test ten, nazywany często „testem cylindrycznym”, stosowany jest również do oznaczania auksyn. Zasada testu polega na stymulacji (w przypadku auksyn) lub hamowaniu (w przypadku inhibitorów) wzrostu subapikalnych wycinków koleoptyli owsa lub pszenicy umieszczonych w podłożu zawierającym wodny eluat z odpowiedniego wycinka chromatogramu bibułowego, oraz najczęściej sacharozę i bufor fosforanowy (1, 8).

Do wykrywania inhibitorów można również stosować tak zwany test pierwszego liścia owsa, używany także do oznaczania gibereliny. Wycinki koleoptyli owsa obejmujące węzeł oraz część pod- i nadwęzłową umieszcza się w małych probówkach zawierających badaną substancję. Stymulacja wzrostu pierwszego liścia w porównaniu z kontrolą świadczy

o obecności gibereliny, natomiast hamowanie wskazuje na obecność inhibitora wzrostu (9).

Do oznaczania inhibitorów stosuje się niekiedy także test polegający na określaniu ich hamującego wpływu na kiełkowanie nasion czy też na wzrost korzeni rzeżuchy (1, 8).

Wszystkie opisane tu testy używane do badań inhibitorów wzrostu nie są jednak specyficzne, ponieważ hamowanie może być wywołane przez bardzo różne pod względem chemicznym związki przemieszczające się na chromatogramach z podobną szybkością. Nawet identyfikacja inhibitorów o dobrze już znanym składzie chemicznym jak florydzyne czy abscysyna, narażają na podobne trudności. Materiał roślinny zawiera bowiem często tak małe ilości tych związków, że nie można ich określić za pomocą innych metod. Dodatkową trudność stanowi uzyskanie czystych wzorców niektórych związków, na przykład abscysyny, ponieważ nie są one, jak dotąd, produkowane dla celów handlowych.

Ostatnio zwrócono uwagę na możliwość zastosowania metod mikrobiologicznych do identyfikacji regulatorów wzrostu roślin. Niektóre mikroorganizmy reagują bowiem na pewne związki chemiczne w sposób wysoce specyficzny, co dało podstawę do zastosowania ich przy oznaczaniu witamin i aminokwasów (3), antybiotyków (6), mikroelementów (15), alkaloidów (18) i innych.

Próby zastosowania mikroorganizmów do oznaczania regulatorów wzrostu roślin podjęto w Zakładach: Fizjologii Roślin i Mikrobiologii Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu.

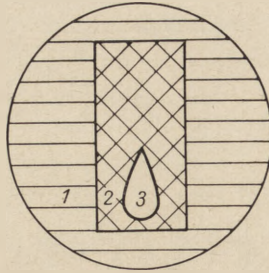
Badano dwa różne inhibitory z nasion sosny, z których jeden wyodrębniano 70% acetonem (metoda ekstrakcji giberelin), drugi zaś — 80% metanolem (metoda ekstrakcji auksyn) (12, 13). Pierwszy inhibitor (nazwany umownie Pa) poddany chromatografii na bibule *Whatman 3*, w układzie rozwijającym: n-butanol, kwas octowy, woda (19:1:6) wykazywał R_f w zakresie 0,6—0,8. Dla drugiego inhibitora chromatografowanego na bibule *Whatman 3*, w układzie rozwijającym: izopropanol, amoniak, woda (10:1:1) R_f mieścił się w granicach 0,7—0,8.

Inhibitor Pa hamował w tekście stosowanym przy oznaczaniu giberelin wzrost pierwszego liścia owsa oraz obniżał jego wzrost pobudzony działaniem kwasu giberelowego (GA_3). Nie wpływał natomiast na cylindryczny test koleoptyli owsa, używany do oznaczania auksyny, ani też nie obniżał stymulacji wzrostu wycinków koleoptyli owsa, wywołanej auksyną (IAA).

Inhibitor Pm hamował wzrost pierwszego liścia owsa zarówno nie pobudzony jak i pobudzony przez GA_3 , jak również wzrost wycinków koleoptyli owsa niestymulowany i stymulowany przez IAA.

Do badania inhibitorów Pa i Pm Strzelczyk i Michniewicz zastosowali metodę mikrobiologiczną (20, 21, 22). Wycinki rozwiniętych i wysuszonych chromatogramów zawierające inhibitory umieszczano w szalkach Petriego na agarze zawierającym zawiesinę bakterii testowej

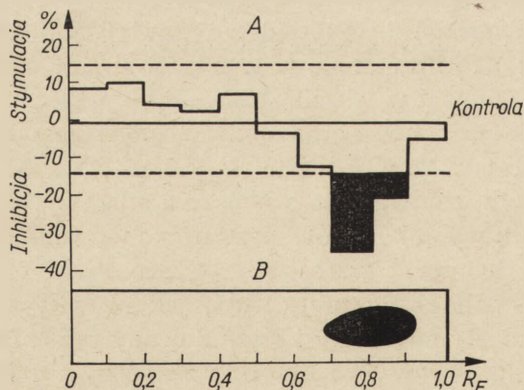
nałożonym cienką warstwą na agar odżywczy. Szalki przetrzymywano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin, w celu umożliwienia dyfuzji substancji aktywnych do agaru. Następnie bibułę usuwano, a szalki umieszczano w termostacie o temperaturze 26°C na przeciąg 3—5 godzin. Po tym czasie obserwowano wzrost bakterii testowej (rysunek 1).



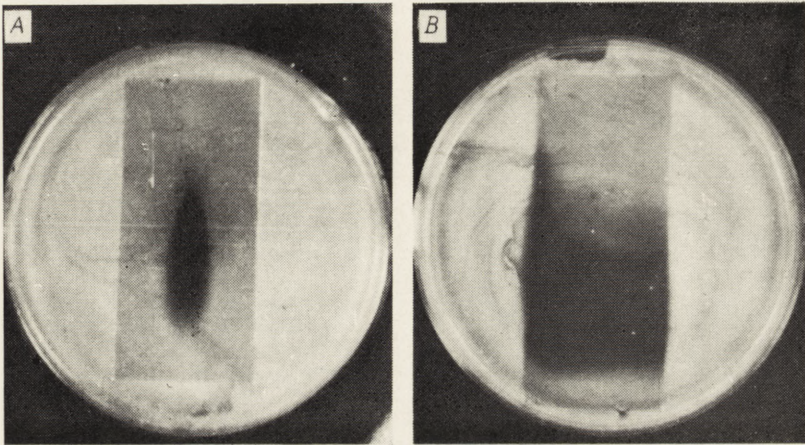
Rys. 1. Schemat przedstawiający ułożenie stref wzrostu bakterii testowej na agarze 1 — silny wzrost bakterii testowej, 2 — słaby wzrost bakterii w miejscu przyłożenia fragmentu, chromatogramu, 3 — strefa kompletnego zahamowania wzrostu bakterii testowej w miejscu występowania inhibitora, po 3—5 godz. inkubacji w temp. 26°C (22).

Do testów stosowano rozmaite gatunki bakterii zarówno gram-dodatnich jak i gram-ujemnych: *Agrobacterium radiobacter*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium michiganense*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium aurantiacum*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sarcina lutea*. Na inhibitor Pm tylko trzy spośród nich, a mianowicie: *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*, zareagowały zupełnym zahamowaniem wzrostu (rysunek 2). Inhibitor Pa nie wywoływał natomiast hamowania wzrostu żadnej ze stosowanych bakterii.

Porównanie wyników uzyskanych za pomocą testu pierwszego liścia owsa oraz metody mikrobiologicznej (rysunek 3) wskazuje, że test bakte-



Rys. 3. Lokalizacja inhibitora Pm wyizolowanego metodą chromatografii bibułowej z nasion sosny. określona testem pierwszego liścia owsa (A) i testem mikrobiologicznym (B)



Rys. 2. Hamowanie wzrostu *Bacillus subtilis* w strefie występowania inhibitora Pm naniesionego na chromatogram w ilości odpowiadającej 0,5 g nasion sosny. Roztwory zawierające inhibitory nanoszono na chromatogram w postaci kropli (A) lub wstęgowo (B). Fotografia przedstawia fragment chromatogramu, stanowiący końcową część 20-cm paska bibuły, umieszczony w szalce Petriego (20).

ryjny określa znacznie dokładniej położenie inhibitora na chromatogramie. Uzyskuje się podobny efekt jak w przypadku chromatografii związków dających barwne reakcje z odpowiednimi odczynnikami. Z porównania wyników obu testów widać wyraźnie, że statystycznie istotna strefa hamowania wzrostu w teście pierwszego liścia owsa jest mniejsza niż strefa wyznaczona testem bakteryjnym.

Ponadto czułość testu mikrobiologicznego jest znacznie większa. Okazało się bowiem, że statystycznie istotne hamowanie wzrostu pierwszego liścia owsa uzyskiwano nanosząc na chromatogramy wyciąg w ilości równoważnej co najmniej 250 mg nasion sosny. Test mikrobiologiczny wykazał natomiast wyraźne hamowanie wzrostu bakterii już przy nanieśieniu ekstraktu w ilości odpowiadającej 50 mg nasion, przy czym granice strefy zahamowania zaznaczały się bardzo wyraźnie.

Zastosowanie testu mikrobiologicznego pozwoliło także wnioskować, że badane inhibitory nie były związkami toksycznymi ani antybiotykami, nie wpływały bowiem na wzrost wielu różnych gatunków bakterii, a u tych gatunków, które reagowały na inhibitor Pm, zahamowanie wzrostu ustępowało już po okresie doby.

Metodę mikrobiologiczną oznaczania regulatorów wzrostu roślin przystosowano także do chromatografii cienkowarstwowej (20, 21, 22). Płytkę szklaną pokrytą żelem, na którym dokonano rozdziału inhibitorów po dokładnym usunięciu układu rozwijającego, umieszczano w szalkach Petriego i pokrywano cienką warstwą agaru odżywczego z zawiesiną bakterii testowych i z dodatkiem skrobi. Po inkubacji trwającej 18 godzin w temperaturze pokojowej i dodatkowo 3—5 godzin w temperaturze 26°C, na płytce agarowe działało płynem Lugola. Strefa hamowania wzrostu bakterii, w której skrobia nie została rozłożona przez amylazę bakterii dawała z jodem ciemnoniebieskie zabarwienie, a reszta agaru była żółta. Wywołanie tym sposobem chromatogramu inhibitora Pm wykazało, że w substancji tej zawarte są prawdopodobnie trzy składniki hamujące wzrost bakterii testowej.

Metodę mikrobiologiczną zastosowano również do identyfikacji związków fenolowych (23). Związki te występują w roślinach bardzo pospolicie i w stosunkowo dużych ilościach, a wiele z nich wpływa specyficznie na wzrost rośliny działając jako stymulatory lub inhibitory (24, 25).

Związki fenolowe rozdzielone na bibule chromatograficznej *Whatman 3* w układach: n-butanol, kwas octowy, woda (19:1:6) lub izopropanol, amoniak, woda (10:1:1), badano testem mikrobiologicznym, techniką opisaną wyżej.

Okazało się (tablica 1), że szereg związków fenolowych występujących w roślinach wpływa w różnym stopniu na wzrost bakterii testowych. Jedne z tych związków wywoływały hamowanie wszystkich bakterii użytych do doświadczeń (kwas *trans*-cynamonowy), inne nie wpływały na wzrost żadnej z bakterii testowych (kwas ferulowy), inne wreszcie hamo-

wały wzrost kilku lub nawet tylko jednego gatunku bakterii (na przykład florydzyzna, która hamowała jedynie wzrost *Flavobacterium aurantiacum*). Zdolność poszczególnych gatunków bakterii do różnego reagowania na różne związki fenolowe może być wykorzystana do identyfikacji tych związków w materiale roślinnym. Metodę mikrobiologiczną można też przystosować do oznaczeń ilościowych znajdując drogą rozcieńczeń najniższe stężenie badanego związku fenolowego wywołujące hamowanie wzrostu bakterii.

Tablica 1

Reakcja wzrostowa bakterii testowych na związki fenolowe (23)

Związek fenolowy	Gatunek bakterii reagujący hamowaniem wzrostu
Kwas cynamonowy (<i>trans</i>) Kwas <i>o</i> -kumarowy Kumaryna	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Arthrobacter globiformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Corynebacterium michiganense</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Flavobacterium aurantiacum</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Sarcina lutea</i>
Naringenina	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Arthrobacter globiformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Flavobacterium aurantiacum</i> <i>Sarcina lutea</i>
Wanilina	<i>Arthrobacter globiformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Sarcina lutea</i>
Florydzyzna Kwas galusowy	<i>Flavobacterium aurantiacum</i>
Kwasy: chelidoniowy ferulowy gentyzynowy <i>p</i> -hydrobenzoesowy kawowy <i>p</i> -oksybenzoesowy protokatechowy salicylowy taninowy	Nie zareagowała żadna z bakterii testowych

Uzyskane dotychczas wyniki zachęcają do dalszych prób stosowania metody mikrobiologicznej w badaniach nad identyfikacją regulatorów wzrostu roślin, zwłaszcza że procedura doświadczeń jest bardzo prosta

i szybka. Należałoby jednak zbadać większą liczbę gatunków bakterii testowych sprawdzając ich wrażliwość na szereg innych inhibitorów wzrostu, a także na auksyny, gibereliny i cytokininy. Nie jest wykluczone, że uda się znaleźć bakterie, które reagowałyby w sposób specyficzny na poszczególne związki chemiczne, wchodząc w skład wymienionych grup. Chodziłoby tu zwłaszcza o grupę giberelin, do której zalicza się aktualnie co najmniej 17 różnych związków (4), wykazujących zdecydowanie odrębne właściwości fizjologiczne (14), a których identyfikacja napotyka w naszych warunkach na szczególne trudności.

LITERATURA

1. Audus L. J., *Plant Growth Substances*, L. Hill Ltd., Londyn 1959.
2. Bennet-Clark T. A., Kefford N. P., *Nature* **171**, 645 (1953).
3. Burton-Wright E. C., *The Microbiological Assay of the Vitamin B-complex and Amino-acids*, I. Pitman a. Sons Ltd., Londyn, 1952.
4. Cavell B. D., Mac Millan J., Pryce R. J., Sheppard A. C., *Phytochem.* **6**, 867 (1967).
5. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., *Nature* **210**, 627 (1966).
6. Goldberg H. S., *Antibiotics. Their Chemistry and Non-Medical Uses*, D. van Nostrand, Comp. Inc., Toronto, New York, Londyn, 1959.
7. Grochowska M. J., *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. sci. biol.* **12**, 379 (1964).
8. Kentzer T., *Wiad. Bot.* **1**, 115 (1957).
9. Michniewicz M., *Acta Soc. Bot. Polon.* **30**, 553 (1961).
10. Michniewicz M., *Wiad. Bot.* **7**, 117 (1963).
11. Michniewicz M., *Wiad. Bot.* **10**, 151 (1966).
12. Michniewicz M., Kopcewicz J., *Roczn. Nauk Roln.* **90A**, 659 (1966).
13. Michniewicz M., Kopcewicz J., *Roczn. Nauk Roln.* **94A**, w druku.
14. Michniewicz M., Lang A., *Planta* **58**, 549 (1962).
15. Nowosielski O., *Roczn. Glebozn.* **8**, 89 (1960).
16. Pieniążek J., *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. sci. biol.* **12**, 227 (1964).
17. Rabinow P. M., Wareing P. F., Thomas T. H., *Nature* **199**, 875 (1963).
18. Reifer I., Możejko-Toczko M., *Acta Microbiol. Polon.* **9**, 151 (1960).
19. Rogozińska J., *Acta Soc. Bot. Polon.* **35**, 425 (1966).
20. Strzelczyk E., Michniewicz M., *Acta Microbiol. Polon.* **17**, (w druku).
21. Strzelczyk E., Michniewicz M., *Acta Microbiol. Polon.* **17**, (w druku).
22. Strzelczyk E., Michniewicz M., *Soil Biology* **3**, 32 (1967).
23. Strzelczyk E., Michniewicz M., *Acta Microbiol. Polon.* **17**, w druku.
24. Tomaszewski M., *Post. Biochem.* **6**, 357 (1960).
25. Tomaszewski M., w *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale*, wyd. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1964, str. 335.

STANISŁAW KOHLMÜNZER *

Alkaloidy *Catharanthus roseus* G. Don. — nowa grupa związków biologicznie czynnych

Alkaloids of *Catharanthus roseus* G. Don. — New Group of Biologically Active Compounds

Chemical and biological properties of this new class of plant pharmacologically active substances are reviewed. Informations concerning biosynthesis, biological and chemical modifications of oncolytic active alkaloids as well as their pharmacological and clinical use are given.

W ostatnim piętnastoleciu znacznie posunęły się naprzód badania nad substancjami chemicznymi roślinnego pochodzenia, zwłaszcza nad tymi, które mogą mieć zastosowanie lecznicze, a przede wszystkim nad alkaloidami indolowymi rośliny *Catharanthus roseus* G. Don. (*Apocynaceae*).

Postęp prac nad alkaloidami *Catharanthus roseus* najlepiej ilustruje fakt, że w r. 1957 znane były tylko 4 związki alkaloidowe z tej rośliny, podczas gdy obecnie znamy ich ponad 60.

W badaniach nad tymi substancjami największy udział mają badacze amerykańscy: S v o b o d a i wsp. (191—203), G o r m a n i wsp. (60—66), N e u s s i wsp. (145—151), kanadyjscy: N o b l e i wsp. (153—156) i francuscy: J a n o t i wsp. (89, 90). W Polsce już od roku 1956 prowadzone są badania w Zakładzie Farmakologii P.A.N. (105—108, 123, 124) na surowcu roślinnym wyhodowanym w kraju. Są to pierwsze badania nad surowcem pochodzenia europejskiego.

Catharanthus roseus G. Don. jest pantropikalną rośliną trwałą z rodziny *Apocynaceae*. Bardzo rozpowszechnione choć według S t e a m a (189) niewłaściwe nazwy gatunkowe tej rośliny to *Vinca rosea* L. i *Lochnera rosea* Reich. Roślina zadomowiona jest w Ameryce Środkowej i Południowej, w Indiach, Wietnamie oraz na Madagaskarze. W Europie bywa hodowana jako jednoroczna roślina ozdobna w rejonie Morza Śródziemnego i w Niemczech. Jest to niewysoka krzewinka lub krzew o skórkowatych, owalno-wydłużonych, połyskujących liściach oraz żywo różowych kwiatach pięciopłatkowych (zrosłych) o wydłużonej rurce korony. Znane są też odmiany biało kwitnące, lub centkowane. Dość skomplikowaną taksonomię botaniczną w obrębie rodzajów *Vinca*, *Lochnera* i *Catharanthus* naświetlają opracowania kilku autorów (44, 47, 115, 163, 167, 189).

* Doc. dr, Zakład Farmakologii P.A.N. w Krakowie.

Surowcem alkaloidowym jest zasadniczo cała roślina, głównie jednak korzenie i liście. Ogólna zawartość alkaloidów w korzeniach dochodzi do 2—3%, a w korzeniach bocznych nawet do 9,0% (47, 54, 123), w liściach natomiast do 0,63% (47).

Uprawę *Catharanthus roseus* jako surowca alkaloidowego podjęto w Europie Środkowej, najpierw w Polsce (105, 123, 124), później na Węgrzech (97) i w Rumunii (29). W tych warunkach geoklimatycznych jest ona rośliną jednoroczną. W Polsce prowadzono także badania nad wpływem kwasu gibberelowego (czynnik wzrostowy) oraz wpływem nawożenia mineralnego na wzrost tej rośliny (124).

Roślinę tę stosowano w medycynie ludowej Płd. Afryki, Australii, Wietnamu, Filipin, Anglii i in. (32, 47, 165, 189).

Intensywne badania nad alkaloidami *Catharanthus roseus* podjęto w związku ze spostrzeżeniami B e e r a (9), który badając przypisywane tej roślinie przez medycynę ludową (47) własności antydiabetyczne, zaobserwował u doświadczalnych szczurów wyraźną leukopenię wywołaną przez nieznaną ciało czynne. Frakcjonując aktywne wyciągi na podstawie testów biologicznych N o b l e i wsp. (153) wyodrębnili czynną frakcję alkaloidową, a z niej alkaloid o silnym działaniu leukopenicznym, który nazwano winkaleukoblastyną (obecnie winblastyną). W latach 1956—1964 w laboratorium Lilly w U.S.A. otrzymano wiele dalszych alkaloidów indolowych, z których kilka odznaczało się zdolnością hamowania rozwoju niektórych przeszczepialnych nowotworów u zwierząt (60, 191—201).

Zastosowanie chromatografii kolumnowej w skali fabrycznej pozwoliło uzyskać z *Catharanthus* związki alkaloidowe w ilościach umożliwiających zbadanie ich własności fizykochemicznych i farmakologicznych, a w kilku wypadkach na ustalenie struktury chemicznej. Dwa spośród nich: siarczan winblastyny i siarczan winkrystyny znalazły zastosowanie w leczeniu niektórych postaci białaczek i chorób nowotworowych, inne zaś, o wybitnym działaniu farmakologicznym są w fazie badań klinicznych.

I. Wyodrębnianie alkaloidów *Catharanthus roseus* G. Don

Wyodrębnianie poszczególnych alkaloidów jest utrudnione przez ich występowanie w większych zespołach alkaloidowych. W *Catharanthus roseus* G. Don. zespoły alkaloidowe są bardzo duże (ponad 60 związków) a ich skład jakościowy i ilościowy jest różny w różnych organach rośliny. Na przykład główny alkaloid liści — windolina (XV) nie występuje w ogóle w organach podziemnych, natomiast główny alkaloid korzeni — ajmalicyna (I) jedynie w bardzo niewielkich ilościach znajduje się w liściach.

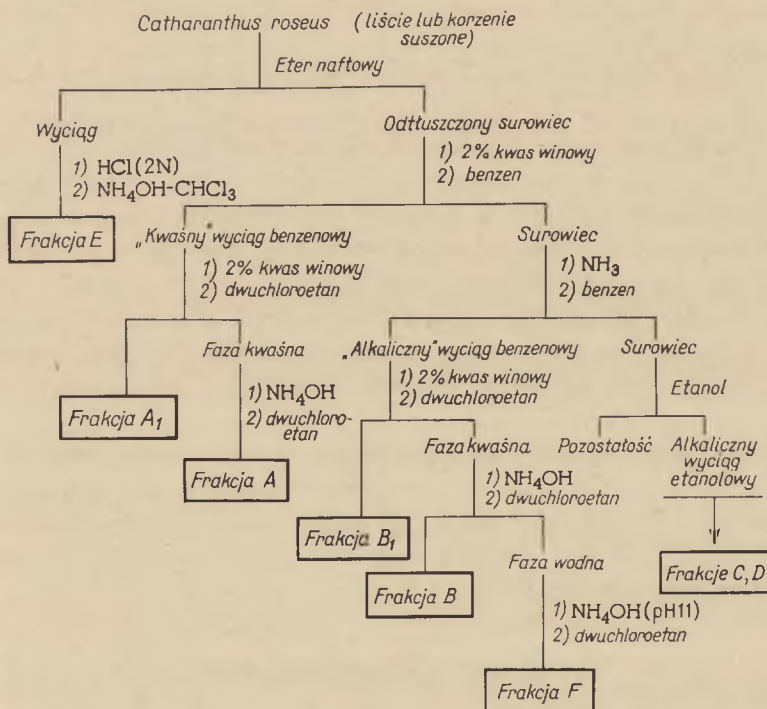
Izolowanie niektórych alkaloidów *Catharanthus roseus* można przeprowadzić w stosunkowo prosty sposób. Na przykład ajmalicynę (I) można

otrzywać z zespołu alkaloidów korzeni stosując wyłącznie selektywną ekstrakcję (106).

Większość jednak alkaloidów *Catharanthus roseus* otrzymano stosując po kilkakrotnej selektywnej ekstrakcji przy różnych wartościach pH wielokrotne rozdziały chromatograficzne na kolumnach przy użyciu techniki gradientowej.

Ekstrakcja. Podstawą selektywnej ekstrakcji pozwalającej na wstępne wydzielenie frakcji alkaloidowych o mniej skomplikowanym składzie są różnice w zasadowości i rozpuszczalności poszczególnych alkaloidów.

Ekstrakcję alkaloidów z liści — organów zawierających najbardziej złożone kompleksy alkaloidowe — opracowaną szczegółowo przez S v o b o d ę i wsp. (60, 191, 192, 195) przedstawia schemat 1. W podobny sposób można ekstrahować również alkaloidy korzeni. Rozdział oparto na różnej rozpuszczalności winianów alkaloidów w rozpuszczalnikach organicznych (dwuchloroetanie lub chloroformie), mianowicie winiany alkaloidów będących słabymi zasadami rozpuszczają się w nich stosunkowo łatwo. Osobną grupę stanowią dość liczne w *Catharanthus roseus* alkaloidy rozpuszczalne w eterze naftowym.



Schemat 1. Ekstrakcja alkaloidów z liści *Catharanthus roseus*

Rozdział alkaloidów. Otrzymane drogą ekstrakcji frakcje alkaloidowe są złożonymi mieszaninami zawierającymi nieraz do 30 alkaloidów (na przykład frakcja A, schemat 1). Rozdziela się je na kolumnach wypełnio-

nych dezaktywowanym tlenkiem glinu. Do eluowania stosuje się: benzen, mieszaniny benzenu z chloroformem lub chlorkiem metylenu, chloroform oraz mieszaniny chloroformu z metanolem.

Pierwszy rozdział na kolumnie doprowadza zazwyczaj jedynie do wyodrębnienia niektórych związków alkaloidowych zwłaszcza we frakcjach eluowanych benzenem. Z tych frakcji wyodrębniono czystą tetrahydroalstoninę (II), katarantynę (VII) i windolinę (XV). Kilkakrotna rechromatografia doprowadza do otrzymania dalszych związków, zwłaszcza tych o większej cząsteczce. Niektóre alkaloidy dimeryczne można wydzielić w postaci dobrze krystalizujących siarczanów. W ten sposób Noble i wsp. (153) otrzymali krystaliczny siarczan winblastyny — alkaloidu o wybitnych własnościach cytostatycznych. Kilka innych alkaloidów dimerycznych, które występują nieraz w ilościach śladowych wyodrębniono (193, 196—202) przeprowadzając mieszaninę alkaloidów z roztworu w benzenie do 0,1M kwasu cytrynowego za pomocą destylacji z parą wodną (ang. *water run down technique*), a następnie ekstrahując wielokrotnie benzenem kwaśny roztwór alkaloidowy przy wzrastających wartościach *pH* (3,4, 3,9 itd. aż do 7,5). Po oddestylowaniu benzenu pod zmniejszonym ciśnieniem i krystalizacji pozostałości z odpowiednich rozpuszczalników (metanol, etanol, eter) otrzymano krystaliczne alkaloidy w postaci zasad lub siarczanów. Metoda ta daje dobre wyniki przy izolowaniu słabo zasadowych alkaloidów dimerycznych, na przykład winkrystyny (XXII) (193, 196, 201, 202). Trudności przy izolowaniu tego typu alkaloidów może ilustrować fakt, że wydajność preparatywna winkrystyny jest rzędu 3×10^{-4} %. Alkaloid ten otrzymuje się na skalę przemysłową z wydajnością najniższą ze wszystkich dotychczas otrzymywanych w przemyśle substancji leczniczych.

Oczyszczenie i krystalizacja alkaloidów. Kilkakrotna krystalizacja w zasadzie doprowadza do uzyskania czystych związków, które kontroluje się na podstawie widma w podczerwieni, przy pomocy analizy fizykochemicznej oraz chromatografii cienkowarstwowej. Otrzymanie analitycznie czystych substancji jest bardzo trudne ze względu na ich nietrwałość oraz adsorbowanie się cząsteczek rozpuszczalników. Stąd też wynikają liczne korekty dotyczące właściwości fizykochemicznych a także danych o strukturze chemicznej poszczególnych alkaloidów, zwłaszcza o dużej cząsteczce (dimerycznych).

II. Budowa i własności chemiczne

Poznane dotychczas alkaloidy *Catharanthus roseus* są mniej lub więcej rozbudowanymi pochodnymi indolu lub dwuhydroindolu. Ogólnie przyjęty podział wyróżnia grupę alkaloidów monomerycznych o cząsteczkach zbudowanych z 18—25 atomów węgla oraz alkaloidów dimerycznych o budowie symetrycznej lub asymetrycznej i cząsteczkach zbudowanych

Tablica 1

Alkaloidy *Catharanthus roseus* G. Don.

Alkaloid	Wzór sumaryczny	Wzór strukt.	Lit.	T. topn. °C	Występowanie*
Alkaloidy monomeryczne indolowe:					
Ajmalicyna	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	I	(164)		
Alstonina**	$C_{21}H_{20}N_2O_3$		(185)	253—254	l, k
Ammorozyna	—			286 (.HCl)	
Dwuhydrositsirikina	$C_{21}H_{28}N_2O_3$			221—225	k
Izositsirikina ($\cdot 1/2 H_2SO_4$)	$C_{21}H_{26}N_2O_3 \cdot 1/2 H_2SO_4$		(63)	215	l, k
Katarantyna	$C_{21}H_{24}N_2O_2 \cdot H_2O$	VII	(64)	126—128	l, k
Katyndyna ($\cdot H_2SO_4$)	—		(146)	239—245 r.	k
Kawincydyna ($\cdot 1/2 H_2SO_4$)	—			236—239 r.	k
Kawincyna ($\cdot 1/2 H_2SO_4$)	$C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot 1/2 H_2SO_4$			275—277 r.	l, k
Lochneryna	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	VI	(137)	202—203	l, k
Rezerpina**	$C_{33}H_{40}N_2O_3$	IV	(6)	264—265	k
Serpentyna	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	III	(27)	156—157	k
Sitsirikina ($\cdot 1/2 H_2SO_4$)	$C_{21}H_{26}N_2O_3 \cdot 1/2 H_2SO_4$	VIII	(111)	239—241 r.	l, k
Tetrahydroalstonina	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	II	(184)	230—231	l, k
Winaspina	—			235—238	l
2-acyloindolowe:					
Perywidyna	$C_{70}H_{22}N_2O_4$			271—279	l
Perywina	$C_{20}H_{24}N_2O_3$	IX	(65)	180—181	l, k
Perozyna ($\cdot 1/2 H_2SO_4$)	—		(192)	219—225	l, k
oksyindolowe:					
Mitrafyлина	$C_{21}H_{26}N_2O_4$	X	(198)	269—270	l, k
α -metyleno-indolinowe:					
Akuamicyna	$C_{20}H_{22}N_2O_2$	XI	(198)	181—182	k
Akuamina**	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	V	(89)	258—260	k
Lochnerycyna	$C_{21}H_{24}N_2O_2$	XII	(141)	190—193 r.	l
Lochnerydyna	$C_{20}H_{24}N_2O_3$	XIII	(142)	211—214 r.	l
Lochnerynina	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	XIV	(140)	168—169	l
Lochnerywina	$C_{24}H_{28}N_2O_5$		(141)	278—280	k
Lochrowicyna	$C_{20}H_{22}N_2O_3$			234—238	l
Lochrowidyna	$C_{22}H_{26}N_2O_4$			213—218	l
Lochrowina	$C_{23}H_{30}N_2O_3$			258—263	l
dwohydroindolowe:					
Dezacylowindolina	$C_{23}H_{30}N_2O_5$	XVI	(67)	164—165	l
Maandrozyna ($\cdot 1/2 H_2SO_4$)	—		(68)	160—173	k

Tablica 1 cd.

Alkaloid	Wzór sumaryczny	Wzór strukt.	Lit.	T. topn. °C	Występowanie*
Windolina	$C_{25}H_{32}N_2O_6$	XV	(60) (62) (98)	154—155	l
Windolinina ($\cdot 2$ HCl)	$C_{21}H_{24}N_2O_2 \cdot 2$ HCl	XVII	(143) (192) (139)	210—212 r.	l
Windorozyna	$C_{24}H_{30}N_2O_5$	XVIII	(140)	167	l
Winkolidyna	$C_{23}H_{26}N_2O_3$			165—170	l
Winkolina	$C_{21}H_{24}N_2O_4$			230—233	l
o różnej budowie:					
Amokalina	$C_{19}H_{22}N_2$			335 r.	k
Perykalina	$C_{18}H_{20}N_2$			196—202	k
Perymiwina	$C_{21}H_{22}N_2O_4$			292—293 r.	l
Wirozyna	$C_{22}H_{26}N_2O_4$			258—261 r.	k
Alkaloidy dimeryczne indolowo-indolinowe:					
Dezacetylowinblastyna ($\cdot H_2SO_4$)	$C_{44}H_{56}N_4O_8 \cdot H_2SO_4$			320 r.	l
Izoleurozyna	$C_{46}H_{60}N_4O_9$			202—206 r.	l
Karozyna	$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$			214—218	l
Katarycyna	$C_{46}H_{52}N_4O_{10}$			231—234 r.	l
Kataryna	$C_{46}H_{52}N_4O_9 \cdot CH_3OH$			271—275 r.	l
Leurozydyna	—			208—211 r.	k, l
Leurozyna	$C_{46}H_{58}N_4O_9 \cdot 8$ H ₂ O			202—205 r.	k, l
Leurozyna ($\cdot H_2SO_4$)	$C_{41}H_{54}N_3O_9 \cdot H_2SO_4$			335 r.	k
Neoleurokrystyna	$C_{44}H_{56}N_4O_{12}$			188—196 r.	l
Neoleurozydyna	$C_{48}H_{62}N_4O_{11}$			219—225 r.	l
Pleurozyna	$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$			191—194 r.	l
Rowidyna ($\cdot H_2SO_4$)	—			320 r.	l
Winafina	—			229—235	l
Winblastyna	$C_{46}H_{56}N_4O_9 \cdot (C_2H_5)_2O$	XXI	(149) (150) (153)	201—211	k, l
Winkatycyna ($\cdot H_2SO_4$)	—			320 r.	l
Winkrystyna	$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$	XXII	(193)	218—220 r.	k, l
różnej budowy:					
Karozydyna	—			263—278 r.	k, l
Winkamycyna	—			224—228 r.	l
Winkarodyna	$C_{44}H_{52}N_4O_{10}$			253—256 r.	l
Windolicyna	$(C_{25}H_{22}N_2O_6)$			248—251 r.	l
Winkolidyna	$C_{48}H_{64}N_4O_{10}$			244—250 r.	l
Winozydyna	$C_{44}H_{52}N_4O_{10}(?)$			253—257 r.	k
Winsedycyna	—			206	n
Winsedyna	—			198—200	n

* objaśnienia: k — korzeń, l — liście, n — nasiona;

** znaleziono tylko w niektórych surowcach

z 44—50 atomów węgla. Własności spektralne oraz ustalona w niektórych przypadkach struktura chemiczna wskazują, że między tymi dwoma grupami związków alkaloidowych istnieje ścisła zależność i że związki dimeryczne w zasadzie są zbudowane z dwóch jednakowych lub niejednakowych cząsteczek alkaloidów monomerycznych, które albo są identyczne z występującymi w surowcu albo bardzo do nich podobne. Wyraźnie wykazuje to przykład winblastyny (XXI), której budowa została stosunkowo dobrze poznana.

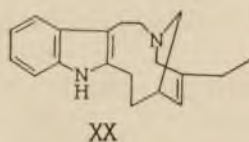
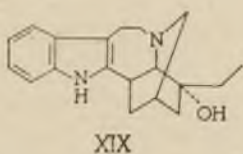
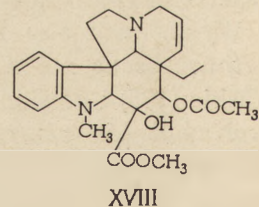
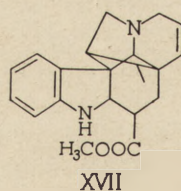
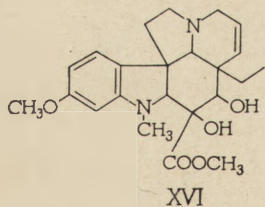
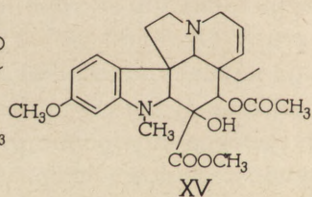
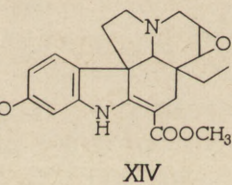
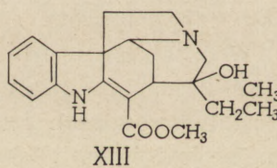
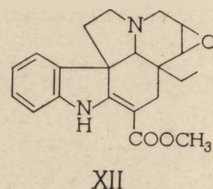
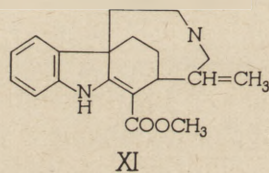
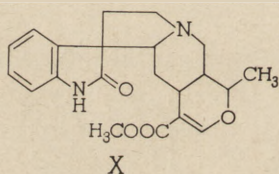
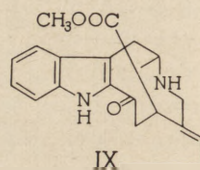
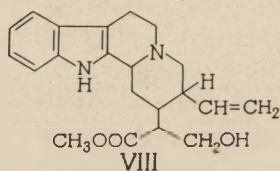
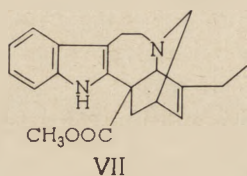
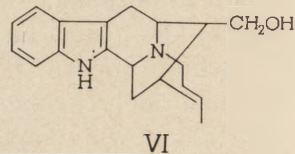
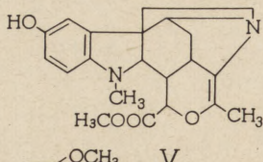
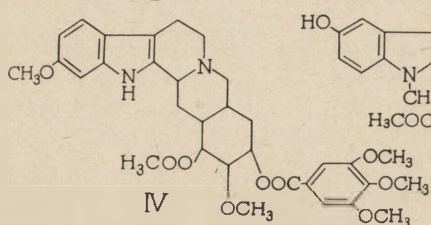
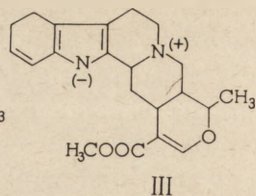
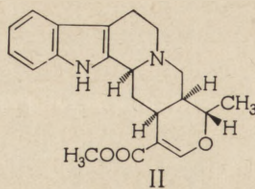
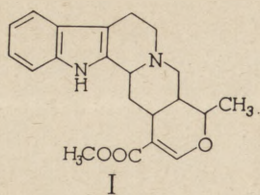
Podział alkaloidów na grupy i typy chemiczne oraz niektóre ich własności fizyko-chemiczne podano w tablicy 1.

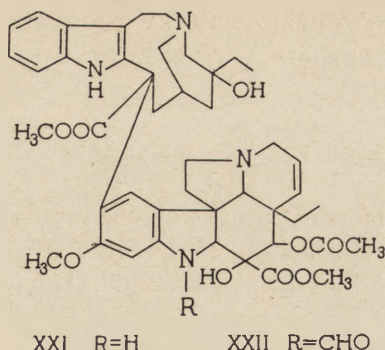
Poznane dotychczas wzory strukturalne niektórych alkaloidów (I—XXII) stanowią uzupełnienie danych zawartych w tabeli.

W grupie alkaloidów monomerycznych, stosunkowo lepiej poznanej pod względem budowy chemicznej i dominującej ilościowo w surowcu roślinnym, znajdują się związki typu karbolin (na przykład ajmalicina, tetrahydroalstonina, serpentyna, mitrafaylina, sitsirikina), a także związki dwuhydroindolowe, które ponadto stanowią często człon budowy cząsteczki alkaloidów dimerycznych (jak na przykład windolina). Katarantyna (VII) zaliczana jest do grupy alkaloidów typu ibogainy (izolowanej z *Tabernanthe iboga*) (64), jest ona jedynym alkaloidem *Catharanthus roseus* zawierającym ugrupowanie izochinolinowe. Lochneryna (VI) zaliczana jest do grupy ajmaliny (izolowanej z *Rauwolfia serpentina*), windolina (XV), dezacetylowindolina (XVI), windolinina (XVII), lochnerycyna (XII) i lochnerynina (XIV) — do grupy alkaloidów typu aspidosperminy (izolowanej z *Aspidosperma Quebracho*), akuamicyna (XI) i lochnerydyna (XII) do typu alkaloidu strychniny (ze *Strychnos nux vomica*), perywina (IX) — do grupy alkaloidu wobazyny (izolowanej z *Voacanga africana*). Katyndyna i kawincyna — alkaloidy o nie ustalonych wzorach strukturalnych — są zbliżone w budowie do sitsirikiny (VIII). Wydaje się, że amorozyzna jest zbliżona do lochneryny. Perozyzna jest prawdopodobnie izomerem perywiny. Budowa lochnerywiny jest nieznaną — jest to związek o charakterze obojętnego laktamu (64).

Występowanie niektórych alkaloidów monomerycznych w *Catharanthus roseus* nie zostało potwierdzone. Na przykład badania amerykańskie (195) i polskie (105) nie wykazały w zespole alkaloidów korzeniowych obecności rezerpiny, o której donieśli Basu i Sorkar (6, 18). Podobnie Svoboda i wsp. (195) nie znaleźli akuaminy, wykrytej przez Janot i wsp. (89) w surowcu pochodzącym z Madagaskaru, ani alstoniny, o której donieśli autorzy hinduscy (169, 170), japońscy (184) i rumuńscy (29).

Wskazuje to na możliwość istnienia „ras geograficznych” *Catharanthus roseus* o różnym składzie alkaloidów. Podobnie obserwowano znaczne różnice w aktywności przeciwleukemicznej *Catharanthus roseus* w zależności od pochodzenia surowca. Najaktywniejsze były rośliny wielo-





letnie z Indii, wykazujące czterokrotnie większą aktywność niż rośliny jednoroczne hodowane w Kanadzie (153).

W grupie alkaloidów dimerycznych dotychczas ustalono jedynie wzory strukturalne kilku związków, przede wszystkim winblastyny (XXI) i winkrystyny (XXII), najaktywniejszych farmakologicznie. Widma w podczerwieni, nadfiolecie, rezonans jądrowy, produkty degradacji świadczą o zbliżonej do winblastyny budowie większej grupy alkaloidów: leurozyny, leurozydyny (oba te związki są też aktywne przeciwleukemicznie), izoleurozyny, kataryny, katarycyny, pleurozyny, neoleurokrystyny i neoleurozydyny.

Pozostałe alkaloidy dimeryczne mają inną, dotychczas nie znaną budowę, przy czym windolicyna i windolidyna są przypuszczalnie symetrycznymi dimerami windoliny (XV).

Strukturę winblastyny (XXI) i winkrystyny (XXII) ustalało kilku badaczy (61, 145, 146, 147, 150). Początkowo sądzono, że cząsteczka winblastyny zbudowana jest z windoliny (XV) i katarantyny (VII) (61, 145), a więc alkaloidów występujących również oddzielnie w surowcu. Później Neuss i wsp. (149, 150) wyjaśnili, że w wyniku rozbicia cząsteczki winblastyny otrzymuje się obok windoliny związek zbliżony lecz nieco odmienny od katarantyny — welbanaminę (XIX) lub klewaminę (XX).

Otrzymano również syntetyczne dimery podobne do winblastyny. Gorman i Sweeny (65) otrzymali produkt kondensacji windoliny (XV) z perywinolem, uzyskanym przez redukcję perywiny (IX). Próbuje się też zsyntetyzować biologicznie aktywne połączenia podobne do winblastyny przez połączenie windoliny ze związkami typu katarantyny, jak na przykład klewamina (XIX) (64, 203).

Ważniejsze dane fizyko-chemiczne oraz widma w podczerwieni alkaloidów indolowych, w tym również alkaloidów *Catharanthus roseus* zebrali Neuss (148) i Hesse (80).

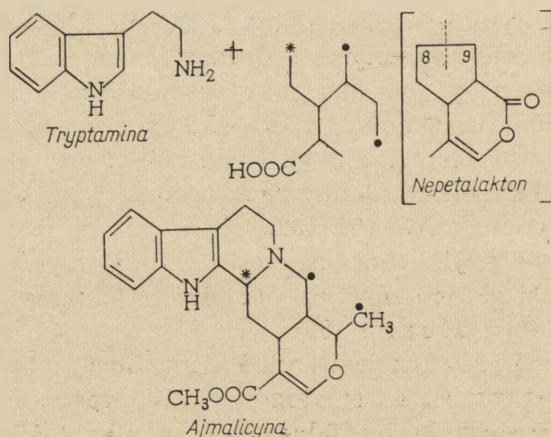
Bardzo pomocną przy różnicowaniu i identyfikacji alkaloidów *Catharanthus roseus* jest metoda chromatografii cienkowarstwowej (31, 48, 49, 70, 88, 107). Zastosowanie specjalnego odczynnika CAS (70) dającego z alkaloidami różne odczyny barwne pozwala wyróżnić 8 klas chromogen-

nych alkaloidów (48), co w połączeniu z wartościami R_f daje duże możliwości identyfikacji, szczególnie przy zastosowaniu chromatografii dwukierunkowej.

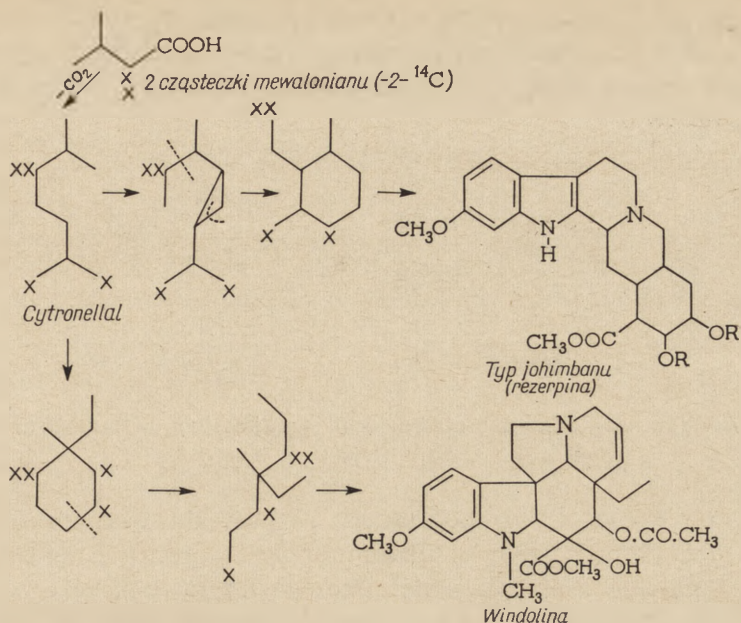
III. Biogeneza alkaloidów

Biogeneza bardziej złożonych alkaloidów indolowych nie jest jeszcze całkowicie poznana. Prekursorem części indolowej tych związków jest zwykle tryptofan względnie tryptamina (69, 117, 120, 138). Związki te wbudowują się również do cząsteczek alkaloidów indolowych u *Catharanthus roseus* (120). Najwięcej wątpliwości budzi biogeneza pozostałej części, która stanowi zazwyczaj fragment 9-cio lub 10-cio węglowy. Istnieją cztery zasadnicze hipotezy (71, 138): 1) Woodwarda zakładająca rozpad dwuhydroksyfenyloalaniny (215), 2) monoterpenowa Thomasa (204), 3) prefenowa Wenkerta (211—213) i 4) octanowo-malonowa Leete (118, 119). Spośród nich najbardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza monoterpenowa, wymagająca jednak dalszego potwierdzenia eksperymentalnego. Schemat biogenezy ajmalicyny i innych podobnej budowy alkaloidów według hipotezy monoterpenowej przedstawia rysunek 1, na którym jako fragment 10-węglowy podano przykładowo nepetalakton, chociaż w przyrodzie spotykamy wiele związków chemicznych o podobnym ugrupowaniu (irydoidy). Biosynteza alkaloidu zgodnie z tym schematem wymaga rozbicia wiązania pomiędzy C_8 i C_9 nepetalaktonu, ale znane są też liczne monoterpeny o nie zamkniętym pierścieniu, na przykład cytronelal i inne.

Hipoteza mewalonowa (monoterpenowa) uzyskała poparcie w pracach Scotta i Wrighta (181), którzy proponują przebieg biosyntezy alkaloidów indolowych typu rezerpiny i windoliny przedstawiony na rysunku 2. Hipoteza ta jest uważana za prawdopodobną również przez kilku innych autorów (19, 59).

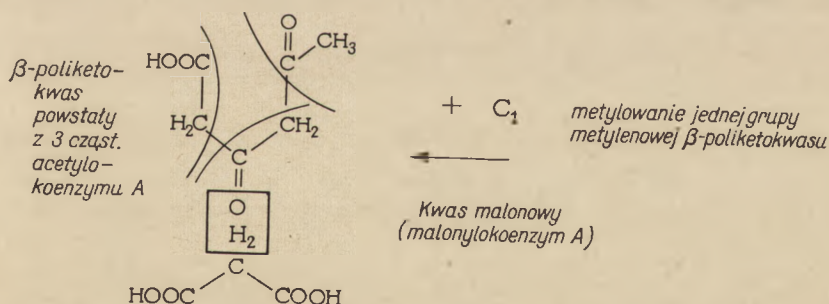


Rys. 1. Biogeneza ajmalicyny według hipotezy monoterpenowej Thomasa (204)



Rys. 2. Biosynteza alkaloidów indolowych typu rezerpiny i windoliny według hipotezy monoterpenowej (181)

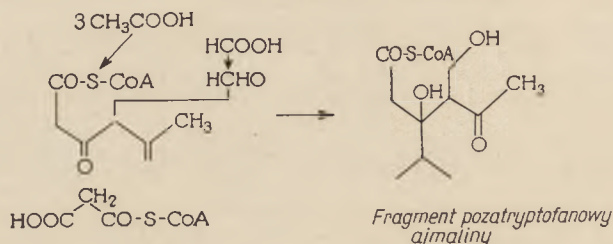
Natomiast Leete (118, 119) odrzucił hipotezę monoterpenową, ponieważ lakton kwasu mewalonowego (prekursor licznych monoterpenów) nie wbudowuje się do alkaloidów indolowych *Rauwolfia serpentina*. Sugeruje on, że biosynteza zachodzi z udziałem aktywnego octanu i kwasu malonowego (rysunek 3). Leete i Ghosal (118) udowodnili, że kwas malonowy wbudowuje się w ajmalinę u *Rauwolfia serpentina* (rysunek 4).



Rys. 3. Biosynteza alkaloidów według hipotezy octanowo-malonowej Leete'a (118, 119)

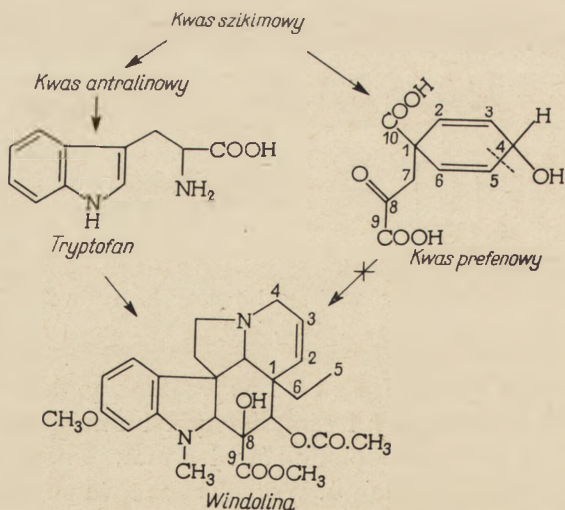
Uzyskane jednak przez Leete i wsp. (120) wyniki badań nad biosyntezą windoliny, katarantyny i ajmalicyny eliminują dla tych związków drogę octanową a prawdopodobnie również mewalonową (ponieważ kwas mewalonowy pochodzi z octanu). Wskazują one, że po dodaniu octanu ¹⁴C znakowane są wszystkie atomy węgla w cząsteczce tych związków, a nie

tylko część nietryptofanowa. Wydaje się, że octan włącza się do ogólnego metabolizmu węglowodanów i jest wysoce prawdopodobne, że prekursorzy fragmentu 10-węglowego są bezpośrednio związane z metabolizmem węglowodanów.



Rys. 4. Wbudowywanie kwasu malonowego w ajmalinę u *Rauwolfia serpentina* (118)

Stolle i wsp. (190) podkreślają, że radioaktywność związków po podaniu octanu jest często efektem przypadkowym, a ponadto hipoteza octanowo-malonowa nie wyjaśnia, dlaczego fragment poza tryptofanowy cząsteczki alkaloidu ma 10 atomów węgla (9). Nieindolowa część windoliny nie może pochodzić z kwasu pfeńowego ani z jego prekursora — kwasu szikimowego (190), ponieważ wbudowują się one wyłącznie w część indolową cząsteczki windoliny. Według *M o t h e s a* (138) kwas pfeńowy wbudowywany jest w tę cząsteczkę prawdopodobnie *via* tryptofan (rysunek 5). Prekursorami zaś tryptofanu mogą być: seryna, ryboza i kwas antranilowy (poprzez kwas szikimowy). *W e n k e r t* (213) uważa, że niektóre typy alkaloidów indolowych, na przykład typ aspidosperminy, powstają nie bezpośrednio z tryptofanu, ale z jego prekursorów, pochodnych kwasu antranilowego.



Rys. 5. Wbudowywanie kwasu pfeńowego w windolinę według *M o t h e s a* (138).

IV. Alkaloidy *Catharanthus roseus* w hodowli tkankowej

Hodowlę tkanki kallusowej *Catharanthus roseus* prowadzili z dobrymi wynikami B a b c o c k i wsp. (5), H a r r i s i wsp. (76) oraz R i c h t e r (175). Najlepsze wyniki uzyskano stosując stałą pożywkę Wooda (72, 76). Zawiera ona inozytol i kinetynę, natomiast nie ma w niej mleczka kokosowego. W ekstraktach z suszonej tkanki kallusowej zidentyfikowano kilka alkaloidów monomerycznych między innymi windolinę i windolinę (główne alkaloidy liści *Catharanthus roseus*). Jak dotychczas nie udało się stwierdzić wytwarzania alkaloidów dimerycznych w hodowlach tkankowych. H a r r i s i wsp. (76) hodując tkankę *Catharanthus roseus* na pożywce płynnej znaleźli alkaloidy nie tylko w uformowanej tkance ale i w pożywce. B o d e r i wsp. (13) przeprowadzili z powodzeniem hodowlę tkanki nowotworowej (*crown-gall*) *Catharanthus roseus* na płynnej pożywce White'a spodziewając się uzyskać biologiczne modyfikacje alkaloidów. W wyhodowanej tkance znaleziono około 0,1 mg alkaloidów na 1 g suszonej tkanki i zidentyfikowano windolinę oraz prawdopodobnie winkolinę. W tej hodowli prowadzonej przez 1—4 tygodni dodana do pożywki windolina uległa modyfikacji na dezacetylowindolinę oraz produkty utlenienia. Zauważono, że windolina pobudza wzrost tkanki nowotworowej *Catharanthus roseus*.

V. Biologiczne i chemiczne modyfikacje alkaloidów

Biologiczne modyfikacje alkaloidów *Catharanthus roseus* próbowano uzyskać także za pomocą mikroorganizmów. W ten sposób można, jak wiadomo, często uzyskać trudne do otrzymania w drodze syntezy chemicznej produkty o wysokiej aktywności fizjologicznej.

M a l l e t i wsp. (122) przeprowadzili próby konwersji windoliny za pomocą ponad 400 mikroorganizmów. Spośród 364 gatunków *Streptomyces* zdolność tę wykazało 78 szczepów, z 25 gatunków należących do *Actinoplanaceae* — 6 szczepów, a spośród 36 gatunków bakterii — 2 szczepy. Natomiast żaden z gatunków pleśniaków przekształcających związki steroidowe nie wpływał na konwersję windoliny. Technika badań była następująca: płynną hodowlę wybranego szczepu inkubowano z dodatkiem windoliny (0,4 mg/ml). Codziennie pobierane próbki badano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po uzyskaniu maksymalnego przekształcenia wyodrębniano końcowe produkty, oczyszczano i badano chemicznie. Stosując szczepy *Streptomyces* uzyskano 8—9 związków różnych chromatograficznie. Jeden z nich zidentyfikowano przez porównanie widm w podczerwieni jako dezacetylowindolinę (XVI). Ten związek z kolei był przekształcany przez szczep *Streptomyces cinnamomeus* do eteru dezacetylowindoliny. Charakter pozostałych związków uzyskanych w wyniku konwersji windoliny nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony.

Największe wysiłki skierowano na zmodyfikowanie chemiczne sześciu alkaloidów dimerycznych z *Catharanthus roseus*, które wykazywały własności onkolityczne. Wśród nich największe znaczenie mają winblastyna (XXI) i winkrystyna (XXII), związki o zbliżonej strukturze chemicznej. Liczne próby ich modyfikacji chemicznych, zmierzają do uzyskania pochodnych o większej aktywności fizjologicznej względnie mniejszej toksyczności. Szczególnie interesujące okazały się półsyntetyczne 4-acyloanalogi winblastyny, otrzymane przez zastąpienie jej grupy acetylowej różnymi podstawnikami (75, 96, 203), przy czym najlepsze działanie antyleukemiczne u myszy DBA/2 z przeszczepialną białaczką P 1534 wykazały pochodne propionylowa i chloroacetylowa. Otrzymane następnie 4- α -aminoacetyloanalogi winblastyny wykazały jeszcze lepsze działanie, szczególnie pochodna z podstawioną grupą dwuaminoacetylową, która w dawce 5 mg/kg powodowała długotrwałe przeżywanie zwierząt doświadczalnych. Obecnie bada się klinicznie przydatność tego związku.

VI. Własności biologiczne i terapeutyczne

Najwcześniejsze dane o własnościach terapeutycznych *Catharanthus roseus* pochodzą z medycyny ludowej (32, 47, 165, 166, 189). Chopra i wsp. (27, 28) wykazali jej działanie przeciwbakteryjne i własność obniżania ciśnienia krwi. Okazało się, że aktywność hypotensyjna zależy głównie od ajmalicyny, którą już uprzednio wyizolowano z rośliny *Rauwolfia serpentina* (110, 185). Własności hypotensyjne ajmalicyny zostały stosunkowo dobrze poznane (89, 90, 106, 110, 133, 168, 171, 179, 189). Wykazuje ona działanie obwodowe, adrenolityczne i znalazła zastosowanie lecznicze *per se* i w kombinacjach z rezerpiną w różnych postaciach choroby nadciśnieniowej i schorzeń układu krążenia (133, 217).

Niewątpliwie największe znaczenie z punktu widzenia farmakologicznego uzyskały te alkaloidy *Catharanthus roseus*, które wykazały własności hamowania rozwoju niektórych złośliwych nowotworów u zwierząt a także u ludzi (1, 52, 94, 95, 187, 195, 203). Jak już wspomniano, badania nad antydiabetycznym działaniem tych alkaloidów nie potwierdziły wprawdzie w pełni przypisywanych im własności (81, 116, 157) ale zwróciły uwagę na wywoływany przez nie efekt leukopeniczny (8, 36, 37) prowadzący aż do śmierci zwierząt doświadczalnych. Wyciągi z *Catharanthus roseus* zmniejszały liczbę leukocytów u szczura w ciągu 3—5 dni poniżej 10 000.

Spośród alkaloidów dimerycznych najsilniejsze działanie onkostatyczne wykazują cztery związki: winblastyna (XXI), winkrystyna (XXII), leurozyna i leurozydyna. Inne alkaloidy dimeryczne odznaczają się mniejszą aktywnością (leurozywina, rowidyna, lochnerynina) lub są nieaktywne. Działanie onkostatyczne wyciągów z całej rośliny, zespołów

i frakcji alkaloidowych również prawdopodobnie zależy od obecności tych alkaloidów.

Głównym obiektem badań była przeszczepialna ostra białaczka P-1534 u myszy DBA/2 (91, 92, 93, 109, 134, 135). Zwierzęta traktowane siarczanem winblastyny w dawce 0,05—0,6 mg/kg przeżywały 40—150% dłużej niż kontrolne. Leurozyna dawała podobne efekty w dawce 3,0—7,5 mg/kg.

Otrzymana w 1963 roku winkrystyna przedłużała o 30—220% okres przeżywania zwierząt (dawka 0,05—0,35 mg/kg), a leurozydyna o 20—130% (dawka 2,0—10,0 mg/kg). Zwiększone dawki dawały znaczne przedłużenia okresu przeżywania.

Pomimo zbliżonej budowy chemicznej alkaloidy te wykazują różne spektrum aktywności przeciwumorowej (203). Toksyczność ostra (LD_{50}) wynosi dla winblastyny 17,0 mg/kg, dla winkrystyny zaś 2,0 mg/kg. Silny efekt leukopeniczny występuje tylko przy stosowaniu winblastyny, co przy wyższych dawkach prowadzi do śmierci zwierzęcia. Winkrystyna nie wywołuje tak silnej leukopenii, daje natomiast uboczne efekty neurologiczne.

Chcąc wyjaśnić mechanizm działania winblastyny, leurozyny i winkrystyny badano ich wpływ na przebieg procesów mitotycznych u roślin i zwierząt (22—25, 38, 42, 45, 103, 144, 160—162, 176, 186, 206). Hamowały one mitozę w stadium metafazy; winblastyna i winkrystyna wywoływały efekt C-mitotyczny, a leurozyna — zaburzenia mitoz (ang. *ball metaphase*). Wydaje się jednak, że efekt mitostatyczny nie jest związany z własnościami onkolitycznymi alkaloidów (203). Własność hamowania podziałów oraz wpływ na morfologię białych i czerwonych ciałek krwi obserwowano wielu autorów (13, 14, 56, 73, 74, 216). Nie stwierdzono wyraźnego wpływu hamującego ani pobudzającego na glikolizę komórek nowotworowych (158). Więcej danych o mechanizmie działania alkaloidów *Catharanthus roseus* dostarczyły badania nad ich wpływem na metabolizm kwasów nukleinowych (34, 35, 173, 174) w zawiesinach komórek szpiku kostnego i komórek grasicy szczurów. Już Noble (153) zauważył wyraźny wpływ winblastyny i innych alkaloidów na czynność szpiku kostnego u szczurów *Wistar*. Richards i wsp. (173, 174) obserwowali wbudowywanie się *in vitro* ^{14}C -mrówczanu w kwasy nukleinowe tkanek szczurów zdrowych. Okazało się, że winblastyna wpływa hamująco na przebieg niektórych reakcji biosyntezy DNA, szczególnie zaś fragmentu purynowego. Wpływ hamujący na biosyntezę DNA w komórkach grasicy *in vitro* wykazywały tylko winblastyna, winkrystyna i leurozyna — nie wykazywały go leurozydyna i rezerpina. Beer (9) w doświadczeniach podobnego typu nad biosyntezą kwasów nukleinowych u szczurów stwierdził, że winblastyna nie wpływa na dobrze już rozwinięte guzy przeszczepialne (rak Erlicha) oraz na regenerującą się wątrobę, natomiast szpik kostny reaguje silnie na winblastynę *in vitro*

i *in vivo*, przy czym silniej hamowana jest synteza DNA niż RNA. Wpływ winblastyny na metabolizm komórek białaczkowych L 1210 u myszy badał H u n t e r (86). Łączenie winblastyny z innymi czynnikami kancerostatycznymi jak kolchicina, 6-merkaptopuryna, 8-azaguanina, kortyzon, dawały przedłużenia okresu przeżywania u myszy (39). Niektóre aminokwasy, jak kwas glutaminowy, asparaginowy, arginina, cytrulina i ornityna, które próbowano stosować łącznie z tym alkaloidem dla zmniejszenia toksyczności obniżały przeciwnieoplastyczne działanie winblastyny (35, 36, 37, 39). Aminokwasy te są uważane za inaktywatory winblastyny.

Dotychczasowe badania prowadzone głównie przy zastosowaniu znakowanej izotopowo winblastyny wykazały, że hamujący wpływ tego związku na biosyntezę kwasów nukleinowych polega głównie na zahamowaniu wbudowywania części purynowej lub pirymidynowej ale już po wytworzeniu się pierścienia puryny lub pirymidyny. Efekt ten występuje dopiero po kilkunastu godzinach od wprowadzenia winblastyny i jedynie po dużych jej dawkach (174). Metabolizm winblastyny w ustroju badano za pomocą znakowanej trytem winblastyny (10, 11, 121). Wprowadzona dożylnie winblastyna jest szybko usuwana z krwioobiegu i w postaci nieznanymi metabolitów gromadzi się głównie w woreczku żółciowym. Wprowadzona dootrzewnowo — wchłania się powoli do krwi. Interesujące jest, że czule na działanie winblastyny szpik kostny i grasica akumulują jej mniej niż inne organy (na przykład wątroba, nerki).

Biochemiczne własności alkaloidów *Catharanthus roseus*, głównie winblastyny zestawili i opisał R o s s o (178).

S v o b o d a, G o r m a n i R o o t (202) wykazali, że nie bez uzasadnienia przypisywano tej roślinie własności hypoglikemiczne. Są one jednak właściwe tylko kilku alkaloidom. Silny efekt hypoglikemiczny u normalnych szczurów wywiera leurozyna a szczególnie windolinina (XVIII), której działanie jest silniejsze aniżeli tolbutamidu. Słabszy efekt hypoglikemiczny wykazują: katarantyna (VII), lochneryna (VI), tetrahydroalstonina (II) i windolina (XV).

S v o b o d a i w s p. (201) wykazali też, że niektóre z wymienionych alkaloidów, głównie windolinina i katarantyna, są silnymi diuretykami. W ten sposób ujawniono nowe możliwości zastosowań leczniczych alkaloidów *Catharanthus roseus*.

Główne zastosowanie w leczeniu znalazły te alkaloidy w niektórych schorzeniach o charakterze nowotworowym. Siarczan winblastyny i siarczan winkrystyny produkowane już w postaci leków dały dobre wyniki w chorobie Hodgkina (2, 17, 26, 53, 58, 84, 85, 104, 126, 127, 130, 152, 207—210), powodując całkowite lub częściowe remisje w przeciągu kilkunastu tygodni. Jeszcze lepsze wyniki osiągnięto, stosując kombinowaną terapię promieniami X i środkami alkilującymi oraz winblastyną lub winkrystyną. Winblastyna jest w tym przypadku lepiej znoszona niż winkrystyna. Pewne efekty uzyskano również w leczeniu mięsaka limfa-

tycznego (*lymphosarcoma*) — w tym wypadku winkrystyna okazała się skuteczniejsza (ale bardziej toksyczna) niż winblastyna. W tablicy 2 podano wyniki klinicznego leczenia uzyskane przez Frei (52) w tych schorzeniach.

Tablica 2

Wpływ alkaloidów *Catharanthus roseus* na niektóre choroby nowotworowe w zastosowaniu klinicznym wg Frei (52)

	Całkowite remisje	Częściowe remisje	Ogółem
Choroba Hodgkina			
Winblastyna	25%	50%	75%
Winkrystyna	25%	50%	75%
Lymphosarcoma (mięsak limfatyczny)			
Winblastyna	10%	20%	30%
Winkrystyna	20%	40%	60%
Ostra białaczka dzieci			
Winblastyna	0	0	0
Winkrystyna	40%	30%	70%

Ostre białaczki, szczególnie u dzieci, podlegały silnie wpływowi leczenia winkrystyną (3, 15, 20, 21, 33, 46, 100, 101, 125, 128, 132, 172, 177, 182, 183). Jeszcze lepsze efekty lecznicze uzyskano stosując połączone leczenie kortykosteroidami i winkrystyną. Winkrystyna nie wpływała na białaczki chroniczne. Wyraźną skuteczność leczenia winblastyną i winkrystyną zaobserwowano tylko w wymienionych typach chorób nowotworowych (30, 131, 187), w innych chorobach nowotworowych zaś uzyskano pewne pozytywne wyniki leczenia, jednak nie tak jednoznaczne.

W odróżnieniu od wielu związków chemoterapeutycznych i promieniowania X stosowanych w chorobach nowotworowych, winkrystyna mało wpływa na czynność szpiku kostnego, nadaje się więc do kombinowanego podawania z innymi kancerostatykami. Tego typu terapia pozwala osiągnąć remisje stanów leukemicznych w rozmiarach dotychczas nieosiągalnych.

Działanie winblastyny i winkrystyny zbadano już wielokrotnie w klinikach (7, 12, 40, 50, 57, 77-79, 83, 102, 113, 114, 129, 159, 188, 205, 214). Możliwości stosowania tych leków ogranicza ich działanie uboczne: w przypadku winblastyny to głównie wywoływanie leukopenii, winkrystyny zaś — różnego rodzaju neuropatii (41, 52, 82).

Teratogenność tych związków nie została jeszcze wystarczająco zbadana. Armstrong i wsp. (4) nie stwierdzili efektu teratogenego po 11-to miesięcznym stosowaniu winblastyny u ludzi, natomiast Ferm (51) zaobserwował pewne zaburzenia u płodów chomików złocistych.

Innych alkaloidów dimerycznych nie przebadano jeszcze klinicznie. Duże nadzieje wiąże się z leurozyną, które odznacza się wprawdzie wy-

soką toksyczością ale bardzo silnie hamuje komórki nowotworowe w hodowli tkankowej (136), a nawet rozpuszcza je zupełnie (203). Te własności są jednak w dużym stopniu inaktywowane przez surowicę krwi.

Alkaloidy *Catharanthus roseus* ze względu na szeroki zakres swojej aktywności biologicznej, różnorodność działania przy zbliżonej budowie chemicznej, oraz ich własności biochemiczne i zależności biogenetyczne są doskonałym modelem dla kompleksowych badań substancji czynnych w świecie roślinnym.

LITERATURA

1. Aisenberg A. C., *Nature* **200**, 484 (1963).
2. Armstrong J. G., Dyke R. W., Fonts P. J., Gahimer J. E., *Canc. Chem. Rpt.* **18**, 49 (1962).
3. Armstrong J. G., Dyke R. W., Fonts P. J., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 301 (1962).
4. Armstrong J. G., Dyke R. W., Fonts P. J., *Science* **143**, 703 (1964).
5. Babcock P. A., Carew D. P., *Lloydia* **25**, 209 (1962).
6. Basu N. K., Sarkar B., *Nature* **181**, 552 (1958).
7. Bernard J., Jacquillet C., Boiron M., Weil M., Soto R., *Presse Med.* **72**, 1471 (1964).
8. Beer C. T., British Emp. Cancer Campaign. 33-th Ann. Rept. 427 (1955).
9. Beer C. T., *Can. Canc. Conf.* **4**, 355, 368 (1961).
10. Beer C. T., Wilson M. L., Bell J., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **42**, 1 (1964).
11. Beer C. T., Richards J. F., *Lloydia* **27**, 352 (1964).
12. Bleeher N. M., Jollitee A. M., *Brit. J. Canc.* **19**, 268 (1965).
13. Boder G. B., Gorman M., Johnson I. S., Simpon P. J., *Lloydia* **27**, 328 (1964).
14. Boggs D. R., et al., *Blood* **23**, 53 (1964).
15. Bohannon R. A., Miller D. G., Diamand H., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 305 (1962).
16. Bonner P., Mc Murray W., Biemann K., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1439 (1964).
17. Bousser J., Bilski-Pesquier G., Piguët H., *Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — Vinca rosea Alkaloids* 119 (1966).
18. Bose B. C., Vijayvargiya R., Bhatnagar J. N., *Ind. J. Med. Sci.* **13**, 905 (1959).
19. McCapra F., Morey T., Scott A. I., Wright I. G., *Chem. Comm.* **21**, 537 (1965).
20. Carbone P., Brindley C. O., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 312 (1962).
21. Carbone P., Bono V., Frei E., Brindley G., *Blood* **21**, 640 (1963).
22. Cardinali G., Cardinali M., Enein A., *Verh. 8 Kongr. Europ. Ges. Hömat.* 146 (1961).
23. Cardinali G. et al., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 215 (1961).
24. Cardinali G., Cardinali M., Enein A., *Blood* **21**, 102 (1963).
25. Cardinali G. et al., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **4**, 10 (1963).
26. Chassagne P., Cruveiller J., Georges Jonet L., Mory T., *Rev. Med.* 917 (1963).

27. Chopra I. C., Jamwal K. S., Pillay P. P., Santhakumari T. N., *Ind. J. Med. Res.* **45**, 567 (1956).
28. Chopra I. C., Jamwal K. S., Chopra C. I., Nair C. P., Pillay P. P., *Ind. J. Med. Res.* **47**, 39 (1959).
29. Ciulei I., Tarpo E., Contro P., Gheorghiu M., Matescu G., Paslavascu N., *Pharmazie* **20**, 522 (1965).
30. Cohlán S. Q., et al., *Lancet* **1**, 1390 (1964).
31. Cone N. J., Miller R., Neuss N., *J. Pharm. Sci.* **52**, 688 (1963).
32. Corkill A. B., *Med. J. Australia* **1**, 86 (1929).
33. Costa G., Gailani S., Holland J. F., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 312 (1962).
34. Creasey W. A., Markiw M. E., *Biochem. Pharmacol.* **13**, 135 (1963).
35. Creasey W. A., Markiw M. E., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 60 (1964).
36. Cutts J. H., Beer C. T., Noble R. L., *Rev. Can. Biol.* **76**, 882 (1957).
37. Cutts J. H., Beer C. T., Noble R. L., *Canc. Res.* **20**, 1023 (1960).
38. Cutts J. H., *Cancer Res.* **21**, 168 (1961).
39. Cutts J. H., *Biochem. Pharmacol.* **13**, 421 (1964).
40. Debray J., *Semaine thérapeutique* **40**, 91 (1964).
41. De Myer W., *Neurology* **14**, 262 (1962).
42. Deysson G., Truhaut R., *Compt. Rend.* **257**, 3512 (1963).
43. Djerassi C., Flores S. E., Budzikiewicz H., Wilson J. M., Durham I., Le Men M. M., Vlat M., Gorman M., Neuss N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 113 (1963).
44. Dwyer W. D., *Lloydia* **27**, 282 (1964).
45. Ebiná T. et al., *Saishiny Igaku* **17**, 2504 (1962).
46. Evans A. E., Fabber S., Brunet S., Mariano P. J., *Cancer* **16**, 1302 (1963).
47. Farnsworth N. R., *Lloydia* **24**, 105 (1961).
48. Farnsworth N. R., Blomster R. N., Damratoski D., Meer W. A., Cannamoto L. V., *Lloydia* **27**, 302 (1964).
49. Farnsworth N. R., Hilinski I. M., *J. Chromatog.* **18**, 184 (1965).
50. Feireich E. J., Karon M., Frei E., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **5**, 20 (1965).
51. Ferm J., *Science* **141**, 426 (1963).
52. Frei E., Franzino A., Shuider B., Costa G., Colsky J., Brindley C. O., Hosley H., Holland J. T., Gold G. L., Johnson U., *Canc. Chem. Rept.* **12**, 125 (1961).
53. Frost J. W., Goldwein M. I., Bryon J. A., *Ann. Int. Med.* **56**, 854 (1962).
54. Gabbai M., Thèse des alcaloïdes de Vinca et Catharanthus Univ. de Paris (1958).
55. Gary-Bobo J., *Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — Vinca rosea Alkaloids* 159 (1966).
56. Gerhartz H., Hampel K. E., *Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — Vinca rosea Alkaloids* 157 (1966).
57. Gerhartz H., Hampel K. E., *Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — Vinca rosea Alkaloids* 169 (1966).
58. Gerzon K., Cochran J. E. Jr., White L. A., Monehan R., Krumkalus E., Scroggs R. E., Mills J., *J. Med. Pharm. Chem.* **1**, 223 (1959).
59. Goeggel H., Arigoni D., *Chem. Comm.* **21**, 138 (1965).
60. Gorman M., Neuss N., Svoboda G. H., Barnes A. J. Jr., Cone N. J., *J. Am. Pharm. Ass. Sc. Ed.* **48**, 256 (1959).
61. Gorman M., Neuss N., Svoboda G. H., *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 4745 (1959).

62. Gorman M., Neuss N., Biemann K., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1058 (1962).
63. Gorman M., Neuss N., *Annal. Chem. (Roma)* **53**, 43 (1963).
64. Gorman M., Neuss N., *Lloydia* **27**, 393 (1964).
65. Gorman M., Sweeny J., *Tetrahedron Letters* 3105 (1964).
66. Gorman M., Tust R. H., Svoboda G. H., Le Men J., *Lloydia* **27**, 214 (1964).
67. Groger D., Stolle K., *Naturwissenschaften* **51**, 63 (1964).
68. Groger D., Stolle K., Falshaw C. P., *Naturwissenschaften* **52**, 132 (1965).
69. Groger D., Stolle K., Mothes K., *Tetrahedron Letters* str. 2579 (1964).
70. Groger D., Stolle K., *Arch. Pharm.* **238**, 246 (1965).
71. Groger D., *Herba Hungarica* **5**, 23 (1966).
72. Grutzmann K. D., *Pharmazie* **21**, 339 (1966).
73. Hampel K. E., Gerhartz H., *Verh. deutsch. Ges. inn. Med.* **68**, 256 (1962).
74. Hampel K. E., Gerhartz H., *Krebsforschung u. Krebsbekämpfung V*, 97 (1964).
75. Hargrove W. W., *Lloydia* **27**, 340 (1964).
76. Harris A. L., Nylund H. B., Carew D. P., *Lloydia* **27**, 322 (1964).
77. Hertz R., Lipsett M. B., Moy R. H., *Canc. Res.* **20**, 1050 (1960).
78. Hertz R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y.* **281**, 105 (1960).
79. Hertz R., *Proc. IV Canad. Canc. Res. Conf.* 399 (1961).
80. Hesse M., *Indolalkaloide in Tabellen*, Springer Verl. Berlin (1964).
81. High-Jones P., *Lancet* **2**, 891 (1955).
82. Hildebrandt J., Coers C., *Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — Vinca rosea Alkaloids* 175 (1966).
83. Hill J. M., Loeb E., *Canc. Chem. Rept.* **15**, 41 (1961).
84. Hodes M. E., Rohn R. J., Bond W. H., *J. Lab. Clin. Med.* **54**, 626 (1959).
85. Hodes M. E., Rohn R. J., Bond W. H., *Cancer Res.* **20**, 1041 (1960).
86. Hunter J. C., *Biochem. Pharmacol.* **12**, 283 (1963).
87. Jacquillet C., Weil M., *Semaine therapeutique* **40**, 395 (1964).
88. Jakovljević I. M., Seay L. D., Shaffer R. W., *J. Pharm. Sci.* **53**, 553 (1964).
89. Janot M. M., Le Men J., *Compt. Rend.* **243**, 1789 (1956).
90. Janot M. M., Le Men J., Fau C., *Bull. Soc. Chim. Fr.* 891 (1959).
91. Johnson I. S., Wright H. F., Svoboda G. H., *J. Lab. Clin. Med.* **54**, 830 (1959).
92. Johnson I. S., Wright H. F., *Acta Union. Inter. Contra Canc.* **16**, 676 (1960).
93. Johnson I. S., Wright H. F., Svoboda G. H., Vlantis J., *Cancer Res.* **20**, 1016 (1960).
94. Johnson I. S., Vlantis J., Mattas B., Wright H. F., *Proc. IV Canad. Canc. Res. Conf.* 339 (1961).
95. Johnson I. S., Armstrong J. G., Gorman M., Burnett J. P. Jr., *Cancer Res.* **23**, 1399 (1963).
96. Johnson I. S., Hargrove W. W., Wright H. F., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **6**, 33 (1965).
97. Jovanovics K., Márk G., Hörömpö L., Szasz K., *Acta Pharm. Hungar.* **34**, 36 (1964).
98. Kamat V. N., Desa J., Vaz A., Fernandes F., Bhatnagar S., *Symp. on the util. of Ind. med. plants*, Lucknow 1957.
99. Kamat V. N., Desa J., Vaz A., Fernandes F., Bhatnagar S., *Ind. J. Med. Res.* **46**, 588 (1958).
100. Karon M., et al., *Pediatrics* **30**, 79 (1962).

101. Karon M., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 333 (1962).
102. Keiser G., Braunner K., Martz G., *Schw. Med. Wochnschr.* **92**, 486 (1962).
103. Kellner B. et al., V Hung. Congress of Oncology Budapest (1961).
104. Kenis Y., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — *Vinca rosea* Alkaloids 129 (1966).
105. Kohlmünzer S., *Dissert. Pharm.* **10**, 115 (1958).
106. Kohlmünzer S., Krupińska J., *Dissert. Pharm.* **12**, 85 (1960).
107. Kohlmünzer S., Tomczyk H., *Dissert. Pharm.* **19**, 213 (1967).
108. Kohlmünzer S., Tomczyk H., *Dissert. Pharm.* **19**, 403 (1967).
109. Krakoff I. H., Miller D. G., Karnofsky D. A., Diamand H. D., Burchenal J. H., Craver L. F., *Acta Union. Intern. Contra Canc.* **16**, 867 (1960).
110. Kronenberg G., Achelis J., *Arzneimittelforschung* **4**, 270 (1954).
111. Kutney I. P., Brown R. T., *Tetrahedron Letters* str. 1815 (1963).
112. Kutney I. P., Trotter J., Tabata T., Karigan A., Camerman N., *Chem. Ind.* 648 (1963).
113. Lacher M. J., Durant J. R., *Ann. Int. Med.* **62**, 468 (1965).
114. Lassman L. P., Pearge G. W., Gang J., *Lancet* **1**, 296 (1965).
115. Lawrence G. H., *Bailaya* **7**, 113 (1959).
116. Lee D. H., Drew W. R. M., *Med. J. Australia* **1**, 699 (1929).
117. Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6338 (1960).
118. Leete E., Ghosal S., *Tetrahedron Letters* str. 1179 (1962).
119. Leete E., Ghosal S., Edwards P. N., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1068 (1962).
120. Leete E., Ahmal A., Kompis J., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4168 (1965).
121. Mahon R. L., *Experientia* **19**, 1 (1963).
122. Mallet G. E., Fukuda D. S., Gorman M., *Lloydia* **27**, 334 (1964).
123. Markiewicz L., *Dissert. Pharm.* **16**, 207 i 241 (1964).
124. Markiewicz L., *Dissert. Pharm.* **17**, 343 (1965).
125. Martin J., Compton N., *Lancet* **2**, 1080 (1963).
126. Mathé G., Schweinguth O., Brule G., Aniel J. L., Catton A., Thomas M., Zamet P., *Presse medic.* **70**, 1349 (1962).
127. Mathé G., *Semaine therapeutique* **39**, 394 (1963).
128. Mathé G., Schweinguth O., Brule G., Brerin C., Aniel J. L., Schwanenberg L., Schneider M., Catton A., Jasmin C., Smadja R., *Presse medic.* **10**, 529 (1963).
129. Mathé G. et al., *Semaine therapeutique* **40**, 320 (1964).
130. Mathé G., Schweinguth O., Schneider M., Aniel J. L., Cattan A., Schwanenberg L., Brule G., Smadja R., *Sem. Hop. Paris* **5**, 370 (1964).
131. Mathé G., Schneider M., Schwanenberg L., Aniel J. L., Cattan A., Schlumberger J. R., Gracia O., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — *Vinca rosea* Alkaloids 97 (1966).
132. Mehta S. H., Mather H. G., *Brit. J. Clin. Pract.* **18**, 721 (1964).
133. Mela C., *Fitoterapia* (Milano) **36**, 8 (1965).
134. Miller D. G., Diamand H. D., Craver L. F., *Cancer. Res.* **19**, 1204 (1959).
135. Miller D. G., Diamand H. D., Craver L. F., *Clin. Pharm. Therap.* **1**, 31 (1960).
136. Morasca L., Rainisio C., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem. — *Vinca rosea* Alkaloids 50 (1966).
137. Mores W. B., Zaltzman P., Beereboom J. J., Pakrashi S. C., Djerassi C., *Chem. Ind.* 773 (1956).

138. Mothes K., *Lloydia* **29**, 156 (1966).
139. Moza B., Trojanek J., *Chem. Ind.* 1425 (1962).
140. Moza B., Trojanek J., *Coll. Czech. Chem. Comm.* **28**, 1419 (1963).
141. Moza B., Trojanek J., Bose A. K., Das K. G., Funke P., *Lloydia* **27**, 416 (1964).
142. Nagakawa Y. J., Wilson J. M., Budzikiewicz H., Djerassi C., *Chem. Ind.* 1986 (1962).
143. Nair C. P., Pillay P. P., *Tetrahedron* **6**, 89 (1959).
144. Nemeth L., Kellner B., *Neoplasma* **10**, 149 (1963).
145. Neuss N., Gorman M., Svoboda G. H., Maciak G., Beer C. T., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4754 (1959).
146. Neuss N., Gorman M., *Tetrahedron Letters* 206 (1961).
147. Neuss N., Gorman M., Boaz M. E., Cone N. J., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1509 (1962).
148. Neuss N., Lilly Collection of Physical Data on Indole and Dihydroindole Alkaloids, Lilly, Indianapolis 1963.
149. Neuss N., Gorman M., Cone N. J., *Lloydia* **27**, 389 (1964).
150. Neuss N., Gorman M., Hargrove W., Cone N. J., Biemann K., Büchi G., Manning R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1440 (1964).
151. Neuss N., Johnson I. S., Armstrong J. G., Jansen C. J. Jr., *Advances in Chemotherapy*, Acad. Press New York 1964, Vol. 1, str. 133.
152. Newall J., Pringle J. F., *Scot. Med. J.* **10**, 288 (1965).
153. Noble R. L., Beer C. T., Cutts J. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **76**, 882 (1958).
154. Noble R. L., Beer C. T., Cutts J. H., *Biochem. Pharmacol.* **1**, 347 (1958).
155. Noble R. L., IV Canad. Canc. Conf. **4**, 333 (1961).
156. Noble R. L., *Lloydia* **27**, 280 (1964).
157. Nye L. J., Fitzgerald M. E., *Med. J. Australia* **2**, 626 (1928).
158. Olrecht P., Fusenig N. E., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem.—*Vinca rosea* Alkaloids 77 (1966).
159. Oehme J., Erschenbach C., *Deutsche Med. Wochenschr.* 1208 (1964).
160. Palmer C. G., Warren A. K., *Proc. Am. Canc. Res.* **4**, 350 (1963).
161. Palmer C. G., Warren A. K., Simpson P. J., *Canc. Chem. Res.* **1—2**, 31 (1963).
162. Palmer C. G., Livergood D., Warren A., Simpson P. J., Johnson I. S., *Exp. Cell Res.* **20**, 198 (1960).
163. Paris R., Moyse-Mignon H., *J. Agr. Trop. Bot. Appl.* **4**, 481 (1957).
164. Paris R., Moyse-Mignon H., *Compt. Rend.* **236**, 1993 (1953).
165. Peckolt T., *Ber. Deutsch. Pharm. Ges.* **20**, 36 (1910).
166. Pernet R., Meyer G., Michel J., Ratsiandarama G., *Compt. Rend.* **243**, 1353 (1956).
167. Pichon M., *Bull. Museum Hist. Nat.* **23**, 439 (1951).
168. Pieri J., *Presse medic.* **70**, 1569 (1957).
169. Pillay P. P., Santhakumari T. N., Nair C. P., *Bull. Res. Inst. Unive. Kerala* **5**, 65 (1957).
170. Pillay P. P., Santhakumari T. N., *J. Sci. Ind. Res.* **20 B** 459 (1959).
171. Popelak A., Kaiser F., Spingler H., Achelis J., Kronenberg G., *Naturwissenschaften* **40**, 625 (1953).
172. Radzikowski C., *Canc. Chem. Rept.* **32**, 15 (1963).
173. Richards J. F., Jones R. G. W., Beer C. T., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **20**, 198 (1960).
174. Richards J. T., Beer C. T., *Lloydia* **27**, 346 (1964).

175. Richter I., Stolle K., Gröger D., Mothes K., *Naturwissenschaften* **52**, 305 (1965).
119 (1964).
176. Rirolli C., Simonelli L., Gennori M., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **40**,
177. Rohn R. J., Hodes M. E., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 355 (1962).
178. Rosso R., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem.—*Vinca rosea* Alkaloids 177 (1966).
179. Schmitt H., Gonard P., *Therapie* **12**, 274 (1957).
180. Schmitt H., Schmitt H. H., *Therapie* **13**, 246 (1958).
181. Scott A., Wright I. G., *Chem. Comm.* **21**, 537 (1965).
182. Selawry O. S., Delta B. G., *Proc. Am. Ass. Canc. Res.* **3**, 360 (1962).
183. Selawry O. S., Hananian J., *J. Am. Med. Ass.* **183**, 741 (1963).
184. Shimizu M., Uhimara F., *J. Pharm. Soc. Jap.* **6**, 324 (1958).
185. Siddiqui S., Siddiqui R. H., *J. Ind. Chem. Soc.* **8**, 667 (1931).
186. Siebs W., *Z. Zellforschung* **61**, 231 (1963).
187. Sproston E., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem.—*Vinca rosea* Alkaloids 141 (1966).
188. Stecher G., Erlenmeier H., Banihaschemi A., *Mediz. Welt* **10**, 519 (1963).
189. Steam W. T., *Lloydia* **29**, 196 (1966).
190. Stolle K., Gröger D., Mothes K., *Chem. Industry* 2065 (1965).
191. Svoboda G. H., *J. Am. Pharm. Ass. Soc. Ed.* **47**, 834 (1958).
192. Svoboda G. H., Neuss N., Gorman M., *J. Am. Pharm. Ass. Sc. Ed.* **48**, 659 (1959).
193. Svoboda G. H., *Lloydia* **24**, 173 (1961).
194. Svoboda G. H., Gorman M., Neuss N., Barnes A. J. Jr., *J. Pharm. Sci.* **50**, 409 (1961).
195. Svoboda G. H., Johnson I. S., Gorman M., Neuss N., *J. Pharm. Sci.* **51**, 707 (1962).
196. Svoboda G. H., Gorman M., Barnes A. J. Jr., Oliver A. T., *J. Pharm. Sci.* **51**, 518 (1962).
197. Svoboda G. H., *Lloydia* **26**, 243 (1963).
198. Svoboda G. H., Oliver A. T., Bedwell D. R., *Lloydia* **26**, 141 (1963).
199. Svoboda G. H., *Lloydia* **27**, 299 (1964).
200. Svoboda G. H., Barnes A. J. Jr., *J. Pharm. Sci.* **53**, 1227 (1964).
201. Svoboda G. H., Tust R. H., Gorman M., *Lloydia* **27**, 203 (1964).
202. Svoboda G. H., Gorman M., Root M., *Lloydia* **27**, 361 (1964).
203. Svoboda G. H., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem.—*Vinca rosea* Alkaloids 9 (1966).
204. Thomas R., *Tetrahedron Letters* 544 (1961).
205. Vaitkevicius V. K., Tabley R. W., Tucker J. L., Brennon M. J., *Cancer* **15**, 294 (1962).
206. Valeriote F. A., Bruce W. R., *J. Nat. Canc. Inst.* **35**, 851 (1965).
207. Viala J. J., Reval L., Croirat P., Proc. I Symp. Europ. Canc. Chem.—*Vinca rosea* Alkaloids 114 (1966).
208. Warwick O. H., Darte J. M., Brown T. C., *Cancer. Res.* **20**, 1032 (1960).
209. Warwick O. H., Darte J. M., Olin J. S., Proc. IV Can. Canc. Res. Conf. 373 (1961).
210. Warwick O. H., Alison R. E., Darte J. M., *Can. Med. Ass. J.* **85**, 579 (1961).
211. Wenkert E., *Experientia* **15**, 165 (1959).

212. Wenkert E., Wickberg B., Leicht C. I., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 5037 (1961).
213. Wenkert E., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 98 (1962).
214. Wilson C. B. et al., *Canc. Chem. Rept.* **9**, 44 (1965).
215. Woodward R. B., *Angew. Chemie* **68**, 13 (1956).
216. Witte S., *Folia haemat. N. F.*, **8**, 10 (1963).
217. Zipf K., *Arzneimittel-Forsch.* **7**, 625 (1957).

JOLANTA BARAŃSKA*

Współzależności metaboliczne pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w organizmie zwierzęcym

Relationship in the Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids in Animals

Recent research on metabolic relations in biosynthesis of polyunsaturated fatty acids is reviewed. Competitive inhibition seems to operate between fatty acids of the oleate, linoleate and linolenate families. The pathways of biosynthesis of members of these families are given.

Uważa się na ogół, że zwierzęta nie są zdolne do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych; dla kwasów tych wprowadzono nawet nazwę witaminy (witamina F) jako dla substancji niezbędnych do prawidłowego rozwoju organizmu i doprowadzanych z pokarmem. Jest to jednak słuszne w odniesieniu do niektórych tylko kwasów wielonienasyconych tłuszczowych, zdolność bowiem do biosyntezy tych związków jest cechą charakterystyczną dla wszystkich żywych organizmów zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. Wyjątek stanowią jedynie bakterie, które zawierają kwasy nienasycone o jednym tylko podwójnym wiązaniu (1).

Procesy prowadzące do powstawania nienasyconych kwasów tłuszczowych są wciąż słabo poznane, jednak badania z lat ostatnich rzuciły nieco światła na te zagadnienia.

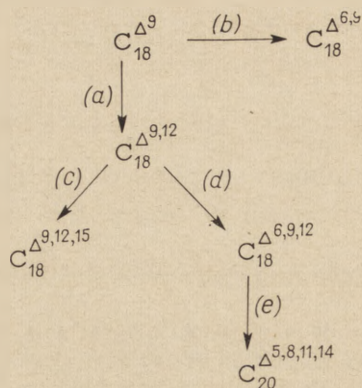
Stwierdzono, że w organizmach zwierzęcych wprowadzenie każdego podwójnego wiązania do cząsteczki kwasu tłuszczowego wymaga obecności tlenu atmosferycznego i NADP zredukowanego, oraz że proces ten zachodzi we frakcji mikrosomowej komórki (2, 3). Wydaje się jednak, że układy enzymatyczne katalizujące reakcje desaturacji kwasów nasyconych i nienasyconych są różne (1).

Najczęściej spotykanymi w świecie roślinnym kwasami wielonienasyconymi są: kwas linolenowy ($C_{18}^{\Delta 9,12,15}$) i kwas linolowy ($C_{18}^{\Delta 9,12}$), natomiast w świecie zwierzęcym — kwasy typu kwasu arachidonowego ($C_{20}^{\Delta 5,8,11,14}$).

Wprowadzenie drugiego podwójnego wiązania do mononienasyconych kwasów tłuszczowych (Δ^9) zachodzić może albo w kierunku grupy metylowej, albo w kierunku grupy karboksylowej (schemat 1). U roślin wy-

* Dr, adiunkt Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

stępuje zazwyczaj desaturacja w kierunku grupy metylowej (13, 35). Powoduje to przekształcenie kwasu oleinowego ($C_{18}^{\Delta 9}$) w kwas linolowy ($C_{18}^{\Delta 9,12}$) (schemat 1a).



Schemat 1. Drogi biosyntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. U roślin przekształcenia zachodzą zgodnie z (a) i (c), u zwierząt zgodnie z (d) i (e) bądź (b); przekształcenie drogą (a) u zwierząt nie zachodzi.

Zwierzęta zasadniczo utraciły zdolność desaturacji kwasu oleinowego do kwasu linolowego, który zatem jest dla nich związkiem egzogennym (23). Jednak w warunkach skrajnego wygłodzenia, lub przy podawaniu pokarmu beztłuszczowego, kręgowce mają zdolność wprowadzenia drugiego podwójnego wiązania do kwasu oleinowego (7, 8). Wiązanie to pojawia się wówczas bliżej karboksylowego końca cząsteczki, prowadząc do powstania nie kwasu linolowego, ale jego analogu, mianowicie kwasu ($C_{18}^{\Delta 6,9}$) (schemat 1b). W przeciwieństwie do kwasu linolowego, analog ten jest fizjologicznie bezużyteczny, ponieważ nie może być przekształcony w kwas arachidonowy, niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania organizmów zwierzęcych.

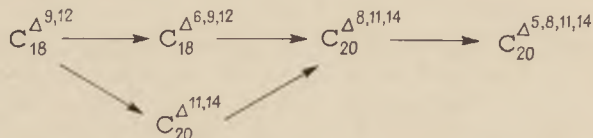
U roślin kwas linolowy przez wprowadzenie następnego podwójnego wiązania bliżej grupy metylowej przekształca się w kwas α -linolenowy ($C_{18}^{\Delta 9,12,15}$) (schemat 1c) (9, 36).

Dla zwierząt kwas α -linolenowy jest również związkiem egzogennym. U zwierząt bowiem proces desaturacji egzogennego kwasu linolowego zachodzi w kierunku grupy karboksylowej (schemat 1d), w wyniku czego powstaje kwas γ -linolenowy ($C_{18}^{\Delta 6,9,12}$), który ulegając dalszym przekształceniom (schemat 1e) może przejść w kwas arachidonowy.

I. Przekształcenia kwasów wielonienasyconych w organizmie zwierzęcym

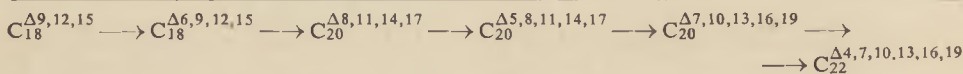
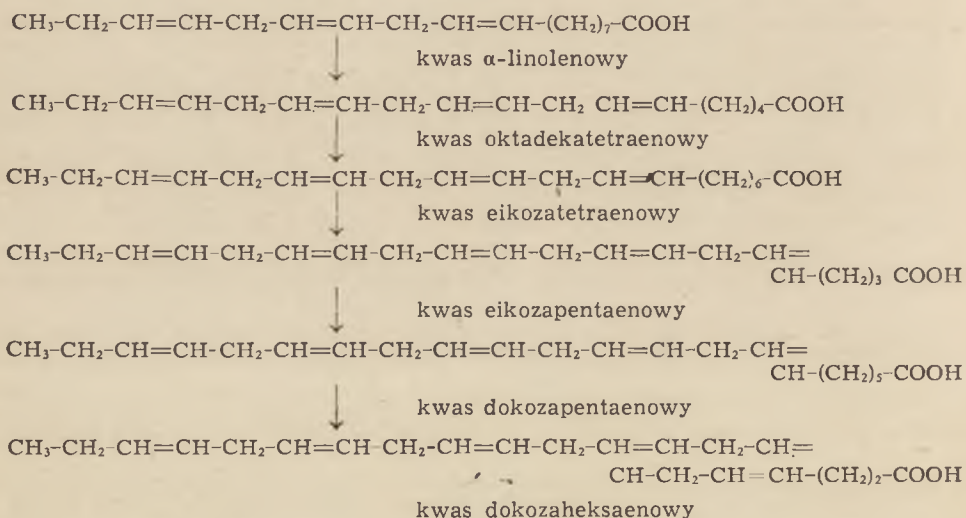
Stwierdzenie, że głównym wielonienasyconym kwasem tłuszczowym u zwierząt jest kwas arachidonowy nasuwało przypuszczenie, że niektóre kwasy wielonienasycone mogą być jednak w organizmie zwierzęcym syntetyzowane. Nunn i Smedley-MacLean w 1938 r. (28) na

(6), Holmana (30) i Korna (16) wynika, że kwas linolowy może przyłączając dwuwęglowy fragment przejść w kwas dwudziestowęglowy ($C_{20}^{\Delta 11,14}$), który następnie ulega odwodorowaniu i przechodzi w kwas homo- γ -linolenowy, a następnie w kwas arachidonowy, zgodnie ze schematem 3.



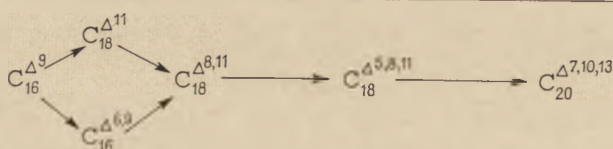
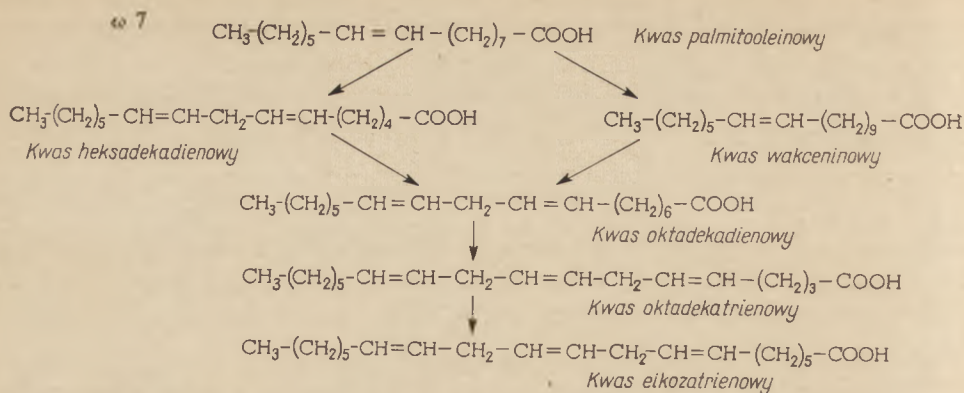
Schemat 3. Powstawanie kwasu arachidonowego z kwasu linolowego (wg 6, 16, 30).

Następnie Mead i wsp. (22, 34) badali, jakim przekształceniom ulega u zwierząt podany w pokarmie roślinny kwas α -linolenowy. Po jednorazowym podaniu szczurowi będącemu na diecie beztłuszczowej linoleianu metylu przeprowadzono chromatograficzną analizę kwasów tłuszczowych z jego tkanek. Na podstawie otrzymanych wyników Mead zaproponował hipotetyczny przebieg przekształceń kwasu α -linolenowego, przedstawiony na schemacie 4.



Schemat 4. Przekształcenia kwasu α -linolenowego w organizmie zwierzęcym (wg. 24).

Badania Klenka i Mohrhauera (14) potwierdziły przebieg wielu z tych reakcji. Okazało się, że z kwasu α -linolenowego powstaje w organizmie zwierzęcym nie kwas arachidonowy, ale kwas 20-węglowy o 5-ciu podwójnych wiązaniach i kwas 22-węglowy o 6-u podwójnych wiązaniach.



Schemat 6. Przekształcenia kwasu palmitooleinowego w organizmie zwierzęcym (wg 24).

$\omega 3$	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	rodzina kwasu α -linolenowego
$\omega 6$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-$	rodzina kwasu linolowego
$\omega 7$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-$	rodzina kwasu palmitooleinowego
$\omega 9$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-$	rodzina kwasu oleinowego

Schemat 7. Typy budowy czterech rodzin kwasów wielonienasyconych.

Według Meada przekształcenia kwasów wielonienasyconych w organizmie zwierzęcym zachodzą tylko w obrębie danej rodziny. Kierunek przemian prowadzi przy tym od kwasów mniej do bardziej nienasyconych w szeregu nieodwracalnych reakcji (24, 34). Podanie kwasu nienasyconego w pokarmie powodowałoby wzrost zawartości w tkankach jedynie kwasów wielonienasyconych należących do tej samej rodziny co podany kwas.

Badania lat ostatnich prowadzą jednak do odmiennych wniosków.

II. Współzależności między rodzinami kwasów wielonienasyconych

W kilku różnych pracowniach (15, 20, 21, 27, 29) wykazano zgodnie, że podawanie zwierzętom egzogennych kwasów tłuszczowych jako składników pokarmowych prowadzi nie tylko do wzrostu zawartości kwasów wielonienasyconych należących do tej samej rodziny co podany kwas, lecz ponadto powoduje zmniejszenie zawartości kwasów należących do innych rodzin.

W celu bliższego zbadania tego zjawiska, Mohrhauer i Hol-

man (26) podawali szczurom (uprzednio trzymanym na diecie beztłuszczowej) kwas linolowy i α -linolenowy w różnych stężeniach przez okres 87 dni, po czym analizowali kwasy tłuszczowe z tkanek za pomocą chromatografii gazowej. Stwierdzili, że podwyższenie w diecie zawartości kwasu linolowego ($\omega 6$) powoduje w wątrobie wzrost zawartości kwasów wielonienasyconych należących do rodziny $\omega 6$, oraz obniżenie zawartości kwasu oleinowego i eikozatrienowego (rodzina $\omega 9$). Zmiany zawartości kwasów należących do rodziny kwasu α -linolenowego ($\omega 3$) były nieznaczne. Natomiast wyższe dawki kwasu linolenowego ($\omega 3$) powodują w wątrobie przy każdej z 3 różnych dawek kwasu linolowego ($\omega 6$):

1. wzrost zawartości kwasów należących do tej samej rodziny,
2. obniżenie zawartości kwasów należących do rodziny kwasu linolowego,
3. zmniejszenie zawartości kwasu eikozatrienowego (rodzina $\omega 9$).

Na podstawie tych badań autorzy wysuwają hipotezę, że w procesach metabolicznych kwasu linolowego i α -linolenowego zachodzi pewna kompetycja. Przekształcenia jednego z tych kwasów (linolenowego) wpływają hamująco na przekształcenia drugiego z nich (linolowego).

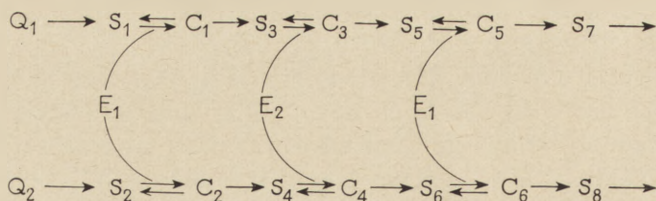
Z dalszych prac Holmana i wsp. (11, 30) wynikało, że hamujący wpływ kwasu linolowego na przekształcenia w obrębie rodziny kwasu linolenowego pojawia się dopiero po podaniu kwasu linolowego w stosunkowo bardzo dużych stężeniach. Natomiast kwas linolenowy już w stężeniach wielokrotnie niższych silnie hamuje wszystkie przekształcenia w obrębie rodziny kwasu linolowego.

Holman i Mohrhauer wykazali również, że podawanie zwierzęciu kwasu linolowego w wysokich stężeniach powoduje nie tylko powstanie kwasu arachidonowego, ale prowadzi do powstawania dalszych homologów dwudziestodwuwęglowych rodziny $\omega 6$, a mianowicie kwasu dokozatetraenowego (czteronienasyconego) oraz kwasu dokozapentaenowego (pięcionienasyconego), co potwierdzili również Davis i Goniglio (4).

Badania Dhopeshwarkara i Meada (5) nad wpływem kwasu oleinowego na przemiany kwasów należących do innych rodzin wykazały, że podanie świnkom morskim (uprzednio pozbawionym pokarmu) dużych ilości kwasu oleinowego powoduje wzrost zawartości w wątrobie i tkance tłuszczowej dwudziestowęglowego kwasu trójnienasyconego ($\omega 9$). Jednocześnie obserwuje się hamujący wpływ kwasu oleinowego na przekształcenie kwasu linolowego w arachidonowy ($\omega 6$). Zatem między metabolizmem kwasu oleinowego a linolowego zachodzi także pewna współzależność. Lowry i Tinsley (18, 19) stwierdzili, że kwas oleinowy wpływa na przekształcenia kwasu linolowego tylko wówczas, gdy podany jest w bardzo dużym stężeniu i gdy poziom kwasu linolowego jest niewysoki (na przekształcenia kwasu linolenowego kwas oleinowy nie miał wpływu). Natomiast podanie kwasu linolowego wyraźnie hamuje przekształcenia kwasu oleinowego.

Te wszystkie fakty pozwoliły Holmanowi i Mohrhauerowi (11) wyciągnąć wniosek, że pomiędzy poszczególnymi rodzinami kwasów wielonienasyconych zachodzą wyraźne współzależności; wzrost intensywności przemian w obrębie jednej rodziny wpływa hamująco na przekształcenia zachodzące w obrębie pozostałych rodzin. Wyszuli oni hipotezę, że przemiany metaboliczne różnych kwasów wielonienasyconych uzależnione są od tych samych układów enzymatycznych. Pomędzy poszczególnymi kwasami zachodzi wobec tego kompetycja o enzym, przy czym powinowactwo różnych kwasów nienasyconych do danego enzymu jest różne. Wydaje się, że powinowactwo to uzależnione jest od odległości pierwszego podwójnego wiązania od grupy metylowej w cząsteczce kwasu (zatem od przynależności do określonej rodziny). Najsilniejsze powinowactwo do enzymu wykazuje grupa kwasów $\omega 3$ (rodzina kwasu α -linolenowego). Ten zatem kwas najsilniej wiąże się z enzymem, uniemożliwiając dostęp do centrów aktywnych kwasom należącym do pozostałych grup $\omega 6$ i $\omega 9$. Słabsze powinowactwo do układów enzymatycznych przejawia kwas linolowy ($\omega 6$), a najsłabsze kwas oleinowy ($\omega 9$). Z tego względu kwas α -linolenowy ($\omega 3$) hamuje przekształcenia w obrębie wszystkich pozostałych rodzin, a kwas linolowy ($\omega 6$) hamuje przekształcenia kwasu oleinowego, ale nie wpływa na przekształcenia kwasu α -linolenowego. Dopiero podanie kwasu linolowego w bardzo dużych stężeniach, wpływa hamująco na przekształcenia kwasu linolenowego. Aby stwierdzić hamujący wpływ kwasu oleinowego na przekształcenia kwasów należących do innych rodzin należy go podać w jeszcze większych stężeniach. Hipoteza Holmana bardzo dobrze tłumaczy, między innymi, znany fakt pojawiania się kwasu eikozatrienowego ($\omega 9$) w tkankach zwierząt z objawami niedoboru egzogennych kwasów tłuszczowych. Gdy brakuje bowiem kwasu linolowego i linolenowego, kwas oleinowy ma łatwiejszy dostęp do układów enzymatycznych i łatwiej ulega desaturacji i wydłużaniu. Natomiast nie może on współzawodniczyć z kwasem linolowym i α -linolenowym i w ich obecności dalszym przekształceniom nie ulega, toteż w normalnych warunkach odżywiania nie obserwuje się powstawania kwasu eikozatrienowego w tkankach zwierzęcych.

Opierając się na dotychczasowych danych doświadczalnych, Lindström i Tinsley (17) zaproponowali model kompetycyjnych współzależności w obrębie różnych rodzin (schemat 8).



Schemat 8. Model kompetycyjnych współzależności w syntezie kwasów wielonienasyconych (wg 17).

Q_1 i Q_2 oznaczają określone dwa nienasycone kwasy tłuszczowe podawane w diecie; S_1 i S_2 to te same kwasy odnajdywane w tkankach, po przyswojeniu Q_1 i Q_2 przez organizm. Kwasy te ulegają przekształceniom w procesach enzymatycznych prowadzących ostatecznie z S_1 do S_7 i z S_2 do S_8 poprzez odpowiednie serie kompleksów enzym-substrat (C_1-C_5 i C_2-C_6). Zakłada się, że przekształcenia te są nieodwracalne. E_1 i E_2 oznaczają odpowiednio układy enzymatyczne, przy czym E_1 oznacza enzym ograniczający w procesie odwodorowania, a E_2 odpowiedni enzym ograniczający w procesie wydłużenia łańcucha. Podstawą modelu jest założenie, że te same enzymy E_1 i E_2 uczestniczą w procesach przekształcenia zarówno S_1 jak i S_2 , zatem zajęcie centrów aktywnych enzymu przez jeden z kwasów (np. S_1) musi wpływać hamująco na przekształcenia drugiego kwasu (np. S_2).

Przedstawienie powstających produktów reakcji jako funkcji czasu i podanych ilości kwasów Q_1 i Q_2 pozwoliło autorom na analizę matematyczną, której wyniki dobrze zgadzały się z danymi doświadczalnymi zarówno ich własnych prac, jak i prac Holmana i współpracowników.

Trudno nie przyznać, że szereg znanych faktów dobrze tłumaczy się w świetle hipotezy Holmana i Mohrhauera. Nie należy jednak uważać, że zagadnienie jest już całkowicie wyjaśnione. Sami autorzy hipotezy nie negują i innej możliwości, mianowicie, że każda z trzech rodzin wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ma odrębny szlak metaboliczny, a czynnikiem hamującym przemiany w obrębie jednej rodziny są produkty powstające w wyniku przekształceń kwasów należących do innych rodzin.

LITERATURA

1. Bagdasarian G., Hulanicka D., *Post. Biochem.* **11**, 179 (1965).
2. Bloch K., w *The Control of Lipid Metabolism*, red. J. K. Grant, Academic Press, London—New York, 1963, str. 1.
3. Bloomfield D. K., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **235**, 337 (1960).
4. Davis J., Goniglio J. G., *J. Biol. Chem.* **241**, 610 (1966).
5. Dhopeswarkar G. A., Mead J. F., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **6**, 297 (1961).
6. Ervin J., Hulanicka D., Bloch K., *Comp. Biochem. Physiol.* **12**, 191 (1964).
7. Fulco A. J., Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **234**, 1411 (1959).
8. Fulco A. J., Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **235**, 3379 (1960).
9. Harris R. V., James A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 456 (1965).
10. Hill E. G., *J. Nutr.* **89**, 465 (1966).
11. Holman R. T., Mohrhauer H., *Acta Chem. Scand.*, Suppl. **1**, 84 (1963).
12. Howton D. R., Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **235**, 3385 (1960).
13. James A. J., w *The Control of Lipid Metabolism*, red. J. K. Grant, Academic Press, London, New York, 1963, str. 17.
14. Klenk E., Mohrhauer H., *Z. Physiol. Chem.* **320**, 218 (1960).
15. Klenk E., Oette K., *Z. Physiol. Chem.* **318**, 86 (1960).
16. Korn E. D., *J. Biol. Chem.* **239**, 396 (1964).

17. Lindstrøm T., Tinsley J., *J. Lipid Res.* **7**, 758 (1966).
18. Lowry R. P., Tinsley J., *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 398 (1966).
19. Lowry R. P., Tinsley J., *J. Nutr.* **88**, 26 (1966).
20. Machlin L. J., *Nature* **194**, 868 (1962).
21. Marco G. J., Machlin L. J., Emery E., Gordon R. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 115 (1961).
22. Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **227**, 1025 (1957).
23. Mead J. F., w *Lipid Metabolism*, red. K. Bloch, New York, 1960, str. 41.
24. Mead J. F., *Fed. Proc.* **20**, 952 (1961).
25. Mead J. F., Howton D. R., *J. Biol. Chem.* **229**, 575 (1957).
26. Mohrhauer H., Holman R. T., *J. Nutr.* **81**, 67 (1963).
27. Mohrhauer H., Holman R. T., *J. Lipid Res.* **4**, 151 (1963).
28. Nunn L. C. A., Smedley-McLean J., *Biochem. J.* **32**, 2178 (1938).
29. Privett O. S., Pusch F. J., Holman R. T., *Arch. Biochem. Biophys.* **57**, 156 (1955).
30. Rahm J., Holman T., *J. Nutr.* **84**, 15 (1964).
31. Rieckehoff J. G., Holman R. T., Burr G. O., *Arch. Biochem. Biophys.* **20**, 331 (1949).
32. Sewell R. F., Miller J. L., *J. Nutr.* **88**, 171 (1966).
33. Steinberg G., Slaton W. H., Howton D., Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **220**, 257 (1956).
34. Steinberg G., Slaton W. H., Howton D., Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **224**, 841 (1957).
35. Stumpf P. K., w *The Control of Lipid Metabolism*, red. J. K. Grant, Academic Press, London, New York, 1963, str. 29.
36. Stumpf P. K., James A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 20 (1963).

WOJCIECH ROSZKOWSKI *

Wpływ częstotliwości podawania pożywienia na przemianę materii

The Effect of Feeding Frequency on Metabolic Processes

Recent views on the effect of feeding frequency upon the metabolic processes are presented

Zagadnieniem dotychczas mało zbadanym w nauce żywienia jest wpływ czasu podawania posiłku (ich regularność lub częstotliwość) na organizm i jego przemiany. Dotychczas badano tylko wpływ zmian ogólnej ilości kalorii przyjmowanych w pożywieniach lub zmian w jakościowym zestawie posiłku na wzrost albo przedłużenie życia doświadczalnych zwierząt.

Pierwsze doświadczenia bezpośrednio związane z wpływem czasu podawania pożywienia (6, 19, 33) wykazały, że u zwierząt karmionych nieregularnie występują zmiany anatomiczne a także zmienia się nasilenie przemiany materii.

Szereg badań nad wpływem koncentracji ilości pożywienia w jednostce czasu na przemianę materii u zwierząt i ludzi wykonano w Pradze w Instytucie Żywienia. Na zainteresowanie tym zagadnieniem wpłynęła zapewne częstość występowania otyłości na terenie Czechosłowacji: według Mařka (23) około 50% ludności Pragi cierpi na tę dolegliwość, która poza innymi przyczynami jest również wynikiem nieregularności przyjmowania posiłków.

W doświadczeniach tych używano jako zwierząt laboratoryjnych kurcząt, królików, psów, małp i szczurów, przy czym najbardziej przydatne okazały się te ostatnie z uwagi na ich zdolność do przyjmowania pożywienia w krótkich odstępach czasu i łatwość przystosowania się do zmian w systemie żywienia. Podobne badania przeprowadzono na ludziach (3) i otrzymano podobne wyniki jak u zwierząt. Najczęściej stosowano następujące układy doświadczalne: I — grupę kontrolną otrzymującą pożywienie *ad libitum* porównywaną z grupą żywioną w ograniczonym czasie, stosowano tak zwane periodyczne głodowanie, to znaczy dni

* Mgr inż., Katedra Technologii i Higieny Żywienia Człowieka Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa.

swobodnego dostępu do pożywienia, na przemian z 1—3-dniowym pełnym głodowaniem (11), lub karmienie przez 1—2 godz. dziennie za pomocą na przykład sondy żołądkowej (6), II — grupę kontrolną otrzymującą pożywienie izokalorycznie w małych ilościach i w krótkich odstępach czasu porównywano z grupą otrzymującą tę samą ilość pokarmu, ale podawaną rzadziej, w większych porcjach. Czas trwania doświadczeń wynosił od 2 tygodni (5) do 3 lat (12).

I. Adaptacja przewodu pokarmowego do zmian w systemie podawania pożywienia

Pierwszymi zmianami występującymi pod wpływem nieregularności w przyjmowaniu pożywienia jest hiperfagia, czyli wzmożone łaknienie (17). Według M a y e r'a (24) hiperfagia może być wywołana nie tylko przez czynniki zewnętrzne środowiska, ale i przez czynniki genetyczne lub urazy chirurgiczne, chemiczne, hormonalne i psychiczne.

Zwierzęta stopniowo przyzwyczajane do I systemu żywienia zjadały w czasie swobodnego dostępu do pokarmu około trzy razy więcej pożywienia na dzień niż grupa kontrolna karmiona *ad libitum*, przy czym w ciągu dwóch pierwszych godzin po podaniu pokarmu zjadały go nawet pięć razy więcej niż zwierzęta grupy kontrolnej. Mimo to pobrany pokarm pokrywał tylko 60—80% ogólnego zapotrzebowania kalorycznego okresowo głodzonych zwierząt, co wywoływało ostatecznie opóźnienie lub zahamowanie ich wzrostu.

Periodyczna hiperfagia wywołuje szereg zmian w przewodzie pokarmowym (20). Już po upływie kilku tygodni następuje hipertrofia żołądka, który zamienia się w rodzaj magazynu pożywienia na okres głodu, co wykazały badania P u t i l i n a i S t a r i t s k i e j (30) nad wpływem częstotliwości karmienia na wydzielnicze funkcje żołądka i ich regulację u psów. U szczurów przy dłuższym czasie doświadczenia wynoszącym około 6 miesięcy zaobserwowano także występowanie hipertrofii jelita cienkiego, którego całkowity ciężar był od 20 do 40% wyższy w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy ciężar ciała zwierząt był o 30% niższy (9). Podobne wyniki otrzymał F i s h e r (12) u kurcząt.

Badania układów enzymatycznych odpowiedzialnych za aktywny transport metabolitów przez ścianki jelita (19) stały się podstawą obserwacji F a b r y' e g o (7), że funkcjonalnym następstwem przedstawionych powyżej zmian w sposobie żywienia jest zwiększone wchłanianie glukozy i tłuszczu w błonie śluzowej jelita cienkiego.

G r u n o w i w s p. (13) stwierdzili, że zmianom morfologicznym i funkcjonalnym przewodu pokarmowego towarzyszą również zmiany mikroflory jelita cienkiego.

II. Zmiany w przemianach węglowodanowej i tłuszczowej

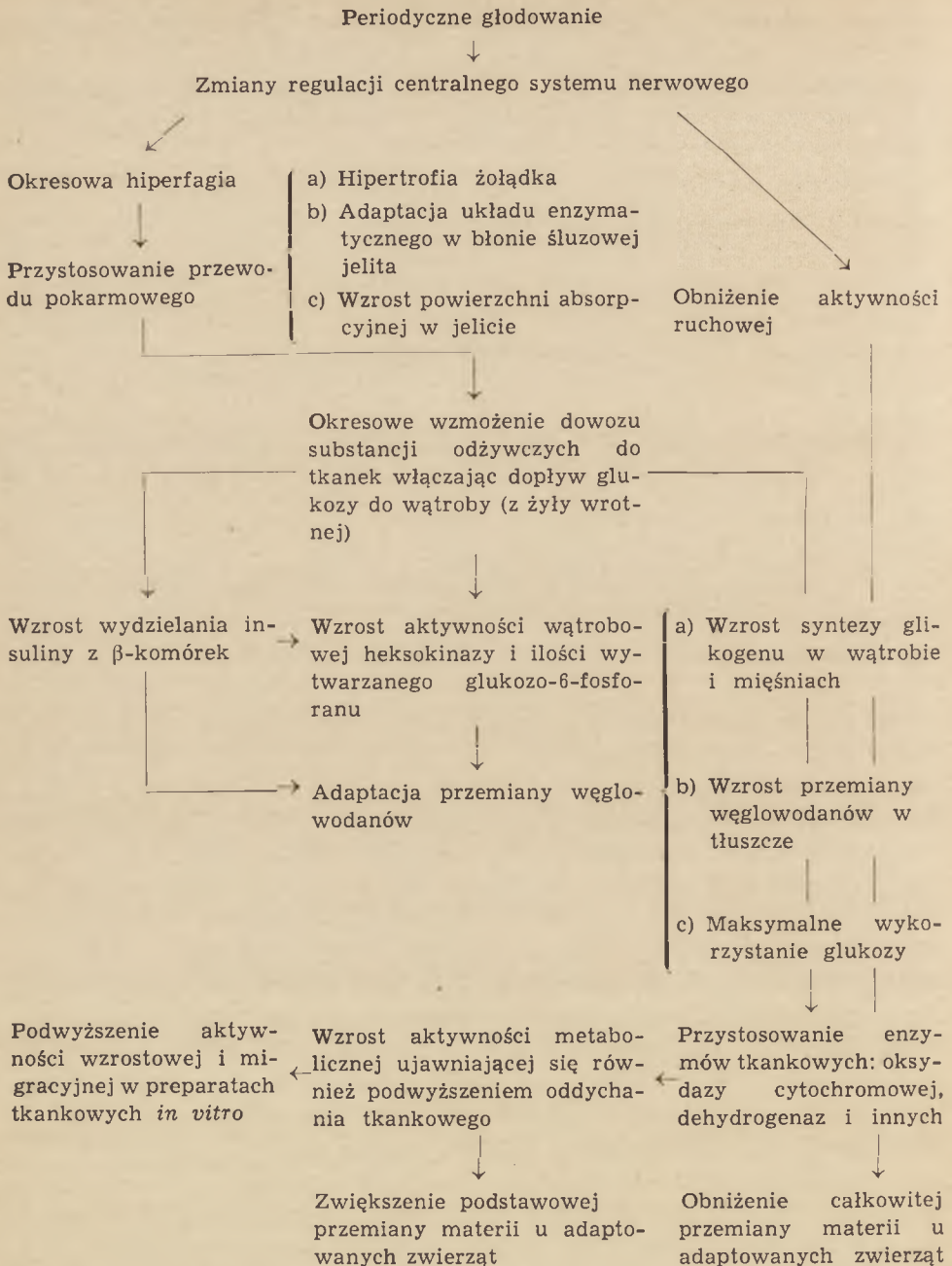
Zwiększone wchłanianie cukrowców u okresowo głodujących zwierząt wywołuje zmiany w ich przemianie węglowodanowej. Petrassek (29) stwierdziła, że aktywność heksokinazy, katalizującej fosforylację glukozy, wzrasta u tych zwierząt około 5-ciokrotnie. W wątrobie i mięśniach okresowo głodzonych zwierząt znaleziono też zwiększone ilości glikogenu, który powstaje z glukozy-6-fosforanu (28).

W surowicy okresowo głodzonych zwierząt rośnie też poziom insuliny. Jednocześnie ilość insuliny, którą wyekstrahowano z trzustki badanych szczurów była około 85% mniejsza niż u grupy kontrolnej, a wzajemny stosunek ilości α i β komórek wysepek Langerhansa był również zmieniony (10).

U okresowo głodujących zwierząt zwiększa się przemiana węglowodanów w tłuszczce, co stwierdzono mierząc zmianę ilorazu oddechowego (I.O.) (11) oraz nasilenie lipogenezy badane za pomocą ^{14}C znakowanych substratów (14). Fabry (11) wykazał, że u okresowo głodujących zwierząt IO wynosi 0,96, podczas gdy dla grupy kontrolnej jest on równy 0,82. Taki wzrost ilorazu oddechowego świadczy o przemianie cukrowców na kwasy tłuszczowe, ponieważ przy przechodzeniu związków bardziej utlenionych w mniej utlenione organizm dysponuje pewną ilością endogennego tlenu. Dla określenia szybkości lipogenezy oznaczono włączanie atomu węgla ^{14}C z różnych substratów w kwasy tłuszczowe (21, 22). U zwierząt karmionych z mniejszą częstotliwością w porównaniu do grupy kontrolnej jedzącej *ad libitum* zauważono szybszą syntezę kwasów tłuszczowych zawierających ^{14}C , przy jednoczesnym wzroście zawartości tłuszczu w organizmie, mimo obniżonego ciężaru ciała (1, 6, 27). Potwierdza to lipostatyczną teorię regulacji ciężaru ciała (25), według której ilość odłożonego tłuszczu zależy od typu zwierzęcia, rodzaju otluszczenia, typu diety, aktywności ruchowej i temperatury otoczenia. Ponieważ przemiany tłuszczów i węglowodanów są współzależne, być może zjawiska te są związane również z mechanizmem glukostatycznym.

Petrassek (29) określiła także aktywność poszczególnych enzymów tkankowych uczestniczących w dalszych przemianach węglowodanowych i tłuszczowych. Zaobserwowała ona wzrost aktywności w wątrobie i nerkach oksydazy cytochromowej i dwu enzymów cyklu Krebsa: dehydrogenazy mleczanowej i bursztynianowej. Przy przyjęciu aktywności tych enzymów w grupie kontrolnej za 100%, w grupie okresowo głodującej aktywność dehydrogenazy bursztynianowej wynosiła w wątrobie 175% a w nerkach 180%, zaś dehydrogenazy mleczanowej w wątrobie 300% a w nerkach 250%.

Wszystkie zmiany w gospodarce węglowodanów i tłuszczów charakteryzujące się maksymalnym wykorzystaniem substancji pokarmowych i tworzeniem rezerw, znalazły odbicie w przemianach energetycznych



Schemat 1. Adaptacja organizmu do periodycznego głodowania, według Fabry'ego (11).

zwierząt okresowo głodujących. Stwierdzono wzrost zapotrzebowania na tlen w stosunku do ciężaru ciała lub powierzchni ciała zwierząt (29). Jeszcze wyraźniejsze różnice tego typu zaobserwowano w doświadczeniach *in vitro* z homogenatami wątroby, mięśnia sercowego i przepony. Dane te dowodzą, że powtarzające się w dłuższych odstępach czasu okresowe przyjmowanie większych ilości pożywienia prowadzi do przyspieszenia procesów utleniania tkankowego. Przyspieszenie tych procesów jest związane nie tylko z długością okresu dostępu do pokarmu, kiedy to tkanki zawierają nadmiar substratów. Występuje ono również przy powtórным dostarczeniu substancji odżywczych i po pewnym czasie wysoki poziom przemian ustala się mimo niższej podaży kalorii. Okresowo głodujące zwierzęta kompensują zwiększone utlenianie tkankowe objawiające się wzrostem podstawowej przemiany materii, obniżeniem aktywności ruchowej.

Omówione powyżej zmiany funkcjonalne, morfologiczne i metaboliczne w warunkach adaptacji do okresowego głodowania przedstawił schematycznie F a b r y i wsp. (11) (schemat 1).

III. Wpływ zmian systemu żywienia na przebieg niektórych chorób

Okresowe głodzenie lub inaczej przyjmowanie większych ilości pożywienia w dłuższych odstępach czasu wpływa również na przebieg niektórych chorób związanych z zaburzeniami metabolizmu. W doświadczeniach przeprowadzonych na ptakach i ssakach (3, 34) udowodniono, że częstotliwość podawania posiłków wpływa na regulację poziomu cholesterolu w surowicy oraz na cofanie się doświadczalnej miażdżycy (*atherosclerosis*). C o h n (3) wykazał, że u kurcząt i królików, którym w ciągu 2 godzin dziennie udostępniano pokarm z cholesterolem, podwaja się poziom cholesterolu w surowicy oraz pojawia się 4—7 razy więcej uszkodzonych sklerotycznie naczyń w porównaniu do zwierząt jedzących ten sam pokarm *ad libitum* i to w ilościach o 30% większych. Również W o l y n s k i j i M i k u s z k i n (35) stwierdzili, że przy otluszczeniu wywołanym przedjedzeniem podnosił się poziom cholesterolu w wątrobie, jelicie cienkim i nadnerczach u królików.

Mechanizm tego zjawiska jest skomplikowany i dotychczas nie wyjaśniony. Przypuszczamy, że częstotliwość karmienia może wpływać na absorpcję cholesterolu z przewodu pokarmowego i cyrkulację wewnątrz wątroby.

IV. Wpływ zmian częstotliwości posiłku na organizm człowieka

Duży procent ludzi, szczególnie w miastach odżywia się podobnie jak w przedstawionych powyżej doświadczeniach. Spożywają oni jednora-

zowo około 50—70% całodziennej racji pokarmowej, podczas gdy energia i substancje odżywcze powinny być dostarczone organizmowi równomiernie w ciągu całego dnia.

Przy przeprowadzeniu doświadczeń na ludziach badano wpływ częstotliwości podawania posiłku na organizm i jego przemiany. Badania tego rodzaju wykonano w internatach (16), szpitalach (18) oraz na drodze ankietowej (7).

Interesujące są badania F a b r y' e g o i wsp. (7) nad ludnością jednej z dzielnic Pragi. W grupach klasyfikowanych według ilości przyjmowanych posiłków określono ilość osobników z nadwagą, hipercholesterolemią i obniżoną tolerancją glukozy. Za wartość graniczną przyjęto 10% nadwagi (ustalonej dla odpowiedniego indeksu wzrostowo-wagowego), 260 mg% cholesterolu w surowicy i 120 mg% glukozy w surowicy w 2 godziny po przyjęciu glukozy w ilości 1 g/kg ciężaru ciała. Stwierdzono, że zmniejszenie częstotliwości przyjmowania posiłków powoduje zwiększenie procentowego udziału osobników z nadwagą, hipercholesterolemią i obniżoną tolerancją glukozy.

H e j d a i wsp. (15) w badaniach tego typu zastosowali wskaźnik Brocasy ($100 \times$ ciężar w kg: wzrost powyżej 100 cm) i stwierdzili, że jest on wyższy u grupy badanych mężczyzn jedzących poniżej 4 posiłków dziennie niż u grupy jedzących częściej.

W innych badaniach wpływu częstotliwości posiłku na organizm człowieka (8) mierzono grubość fałdu skórniego na rękę i plecach i stwierdzono, że wielkość ta jest proporcjonalna do zwiększania się nadwagi i stanowi dobry wskaźnik dla określenia ilości tkanki tłuszczowej w organizmie. K u d l i c k a i wsp. (18), badając reakcję dzieci w 3 internatach na różne rozłożenie posiłków w czasie (3, 5 i 7 posiłków dziennie, izokalorycznie) zastosowali ten wskaźnik i stwierdzili, że obniżenie częstotliwości spożycia prowadzi do nadwagi i występowania dysproporcji w budowie ciała dzieci.

Również prace C o h n'a (3) dotyczące stężenia cholesterolu i fosfolipidów w surowicy krwi ludzkiej potwierdzają te obserwacje. Istotne znaczenie rozłożenia całodziennej racji pokarmowej na częstsze i mniejsze posiłki przy równoczesnym uwzględnieniu urozmaicenia każdego posiłku podkreśla również N o r t o n (26).

Z przytoczonego piśmiennictwa wynika, że przy ocenie żywienia należy uwzględnić nie tylko ilość czy jakość przyjmowanego pożywienia, ale i sposób rozdziału jego w czasie. Człowiek z natury przystosowany jest do spożywania częściej małych porcji pożywienia, jednak pod wpływem różnych czynników zewnętrznych (warunki życia, pracy, przyzwyczajenia itp.) zmienia swój system żywienia i w ciągu dnia spożywa kilka bardziej obfitych posiłków. Zmiany te zdaniem C o h n'a (2) mogą być istotne w patogenezie niektórych chorób związanych z zaburzeniem

metabolizmu: otyłość (*adipositas, obesitas*), cukrzyca (*diabetes mellitus*), marskość wątroby (*cirrhosis hepatis*) i wzrost zawartości cholesterolu we krwi (*hipercholesterolemia*), lub wpływać na ich przebieg, co może jednocześnie wiązać się z zaburzeniami hormonalnymi (4, 31). Dlatego też zagadnienie to wydaje się szczególnie ważne dla nauki o żywieniu i wymaga dalszych badań.

LITERATURA

1. Braun T., Fabry P., Kazdova L., VIIth Internatl. Congr. of Nutr., Absts. of Papers, Hamburg 1966, str. 149.
2. Cohn C., *J. Am. Diet. Assoc.* **38**, 433 (1961).
3. Cohn C., *Fed. Proc.* **23**, 73 (1964).
4. Cohn C., Joseph D., *Am. J. Clin. Nutr.* **8**, 682 (1960).
5. Cohn C., Joseph D., Bell L., Oler A., *Fed. Proc.* **21**, 403 (1962).
6. Cohn C., Joseph D., Shrago E., *Metab.* **6**, 381 (1957).
7. Fabry P., *Wopr. Pitan.* **24**, 6 (1965).
8. Fabry P., Braun T., Petrasek R., *Physiol. Bohemoslov.* **13**, 333 (1964).
9. Fabry P., Kujalova V., *Acta Anat.* **43**, 264 (1960).
10. Fabry P., Petrasek R., Krulich L., *Physiol. Bohemoslov.* **10**, 362 (1961).
11. Fabry P., Petrasek R., Kujalova V., Holeckova E., *Adaptace na zmeneny prijem potravy*, Státni Zdravotnické Nakladatelstvi, Praha 1962.
12. Fisher H., *Fed. Proc.* **23**, 88 (1964).
13. Grunow C., Pose G., Fabry P., *Nahrung* **9**, 393 (1965).
14. Hanson R. W., Leville G. A., VIIth Internatl. Congr. of Nutr., Absts. of Papers, Hamburg 1966, str. 148.
15. Hejda S., Fabry P., *Nutr. et Dieta* **6**, 216 (1964).
16. Hejda S., Fabry P., Osancova K., VII-th Internatl. Congr. of Nutr., Absts. of Papers, Hamburg 1966, str. 150.
17. Holeckova E., Fabry P., *Brit. J. Nutr.* **13**, 260 (1959).
18. Kudlicka V., Fabry P., Dobersky P., Kudlickova V., VIIth Internatl. Congr. of Nutr., Absts. of Papers, Hamburg 1966, str. 150.
19. Kujalova V., Fabry P., *Physiol. Bohemoslov.* **7**, 142 (1958).
20. Kujalova V., Fabry P., *Physiol. Bohemoslov.* **9**, 35 (1960).
21. Leveille G. A., *J. Nutr.* **91**, 25 (1967).
22. Leveille G. A., Hanson R. W., VIIth Internatl. Congr. of Nutr., Absts. of Papers, Hamburg, 1966, str. 148.
23. Mašek J., Problemy adaptacji i pitanje nasielenija, w Problemy biochemicznej adaptacji, red. Pokrowski A., Medicina, Moskwa 1966, str. 34.
24. Mayer J., *Postgrad. Med.* **25**, 631 (1959).
25. Mayer J., Regulation of food intake, w Nutrition I, red. Beaton G. H., McHenry E. W., London 1964.
26. Norton M., *J. Am. Diet. Assoc.* **48**, 6 (1966).
27. Pawan L. G. S., Kekwick A., VIIth Internatl. Congr. of Nutr., Absts. of Papers, Hamburg 1966, str. 146.
28. Petrasek R., *Nature* **183**, 329 (1959).
29. Petrasek R., *Wopr. Pitan.* **25**, 5 (1966).
30. Putilin N. J., Staritskaja L. N., *Wopr. Pitan.* **21**, 4 (1962).
31. Stobnicka-Szczygłowa H., *Roczn. Państw. Zakł. Hig.* **14**, 287 (1963).

32. Tepperman H. N., Tepperman J., *Fed. Proc.* 23, 76 (1964).
33. Tepperman J., Brobeck J. R., Long C. N. H., *Yale J. Biol. Med.* 15, 855 (1943).
34. Wells W. W., Quan-Ma R., Cook C. R., Anderson S. C., *J. Nutr.* 76, 41 (1962).
35. Wolynskij Z. M., Mikuszkin M. K., *Wopr. Pitan.* 26, 1 (1967).

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT *, JOANNA RYTKA **

Allosteryczna kontrola aktywności biologicznej niektórych białek

Allosteric Control of Biological Activity of Some Proteins

Some allosteric mechanisms controlling the biological activity of different proteins are reviewed.

Aktywność białek enzymatycznych *in vivo* warunkują takie czynniki, jak stężenie i dostępność substratów i koenzymów, *pH*, temperatura, stężenie poszczególnych jonów oraz siła jonowa. W wielu procesach enzymatycznych końcowy produkt całego ciągu reakcji hamuje, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, aktywność pierwszego z szeregu enzymów czynnych w jego syntezie. Enzym ten, zwany regulacyjnym, przestaje wówczas katalizować syntezę określonego intermediatu, co z kolei reguluje ilość tworzonego produktu. Związek z odmienną strukturze przestrzennej od właściwego substratu, hamujący działanie enzymu regulacyjnego, nazywany jest allosterycznym inhibitorem. Obecnie każdy związek, który wpływa na aktywność biologiczną enzymu regulacyjnego hamująco lub aktywująco, określa się jako allosteryczny ligand, białka zaś wrażliwe na działanie ligandu — białkami allosterycznymi *.

Próby wyjaśnienia kinetyki reakcji łączenia się białek z ligandami opierają się na założeniu, że przyłączenie małej cząsteczki substratu, inhibitora lub aktywatora, wywołuje zmiany konformacji cząsteczki białkowej (11, 13, 19, 32, 39, 40). Zjawiskiem allosterii można tłumaczyć między innymi przebieg krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny (6, 41, 45).

I. Hemoglobina jako model białka allosterycznego

Reakcja wiązania tlenu z hemoglobiną jest dogodnym modelem do badań nad kinetyką łączenia ligandu z białkiem allosterycznym. Komplex hemoglobina-tlen jest bowiem analogiczny do kompleksu enzym-

* Dr, adiunkt Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

** Dr, st. asystent Zakładu Biochemii Akademii Medycznej, Warszawa.

* Ogólne własności białek allosterycznych, jak również biologiczne znaczenie kontroli allosterycznej były już omówione w artykule L. Pużyńskiej, zamieszczonym w *Postęпах Biochemii* (48).

-substrat i w obu przypadkach połączenie z białkiem powoduje zmiany w strukturze elektronowej ligandu (tlenu, substratu) (30, 44). Trwałość oksyhemoglobiny sprzyja badaniu własności fizykochemicznych kompleksu, a dość liczne dane o strukturze czwartorzędowej hemoglobiny ułatwiają interpretację wyników.

Krzywą reakcji hemoglobiny z tlenem opisuje równanie Hilla (25)

$$\ln \frac{y}{1-y} = n \ln x + \ln k \quad 1$$

gdzie k oznacza stałą równowagi, x — cząstkowe ciśnienie tlenu, n — ilość cząsteczek tlenu związanych przez cząsteczkę hemoglobiny, zaś $y = \frac{kx^n}{1+kx^n}$ — stopień nasycenia hemoglobiny tlenem. Wartość n można wyliczyć podstawiając dane doświadczalne do wzoru 2 (68), bądź też wyznaczyć graficznie z nachylenia prostej przedstawiającej zależność

$\ln \frac{y}{1-y}$ od $\ln x$.

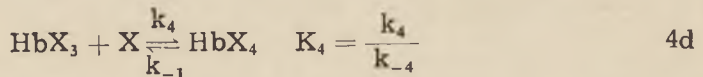
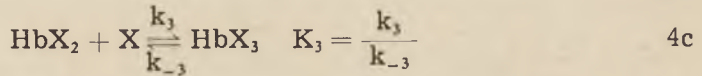
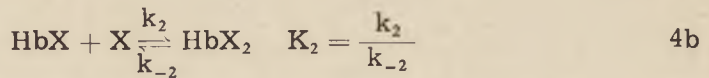
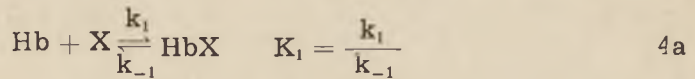
$$n = \frac{1}{y(1-y)} \frac{dy}{d(\ln x)} \quad 2$$

Wartość parametru n w równaniu Hilla jest funkcją liczby centrów wiążących ligand (2), zależy ona również od wielkości swobodnej energii wzajemnego oddziaływania między centrami (68). Zmianę energii swobodnej ΔF_{XX} wywołaną przyłączeniem cząsteczki ligandu X do wiążących ten ligand centrów białka można wyznaczyć na podstawie równania (3), w którym R oznacza stałą gazową, T — temperaturę w skali Kelvina, a n i y są parametrami z równania Hilla.

$$F_{XX} = \frac{RT}{y(1-y)} \left(1 - \frac{1}{n}\right) \quad 3$$

Gdy $n = 1$, przyłączeniu ligandu nie towarzyszy zmiana wolnej energii ($\Delta F_{XX} = 0$). Tak jest w reakcji łączenia się tlenu z mioglobina, która zawiera jedną cząsteczkę hemu na jedną cząsteczkę białka. Tak samo jednak jest i wtedy, gdy cząsteczka białka zawiera dwa lub więcej centra wiążące ligand, które są identyczne i reagują niezależnie od siebie (53, 68). Reakcja przyłączania ligandu zachodzi wówczas według prawa działania mas. W ten sposób przebiega na przykład wiązanie tlenu przez hemoglobiny pewnych mięczaków, zawierające więcej niż jeden hem na jedną cząsteczkę białka (27, 38). Zarówno dla mioglobiny jak i dla tych hemoproteidów mięczaków, wykres zależności stopnia nasycenia białka tlenem (y) od cząstkowego ciśnienia tlenu jest równoramienną hiperbolą. Natomiast sigmoidalna krzywa obrazująca nasycenie tlenem hemoglobiny ssaków jest charakterystyczna dla procesu łączenia ligandu z białkiem o identycznych lecz wzajemnie zależnych centrach wiążących ligand. Przyłączenie się tlenu do jednego z hemów hemoglobiny, zmienia na

skutek oddziaływania pomiędzy centrami wiążącymi ligand powinowactwo pozostałych trzech hemów do tlenu. W tym przypadku $n > 1$, a co za tym idzie $\Delta F_{XX} > 0$. Reakcję łączenia się każdej kolejnej cząsteczki ligandu z białkiem charakteryzuje inna stała równowagi. Ilustruje to równanie 4 a-d.



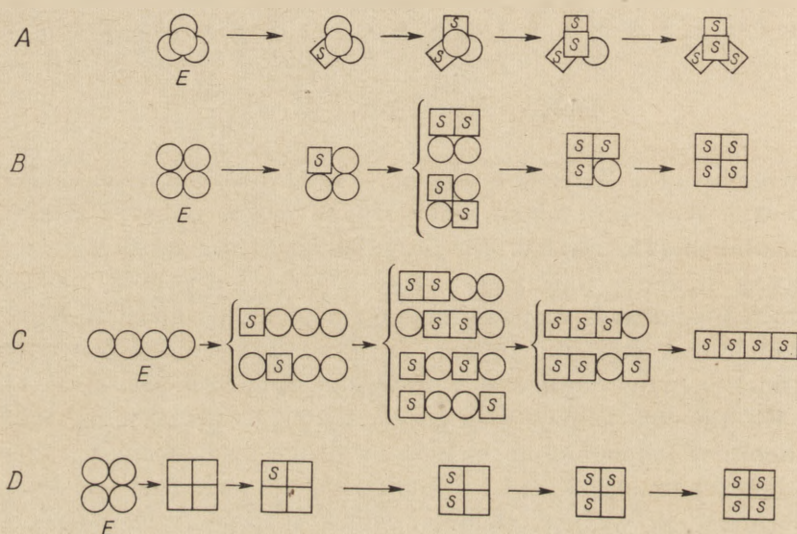
W równaniu 4a-d X oznacza ligand, k — stałe kinetyczne, a K — stałe równowagi. Wartości stałych kinetycznych można obliczyć z danych doświadczalnych (15, 16, 53). Na przykład szybkość dysocjacji pierwszej cząsteczki ligandu można oznaczyć mierząc szybkość zastępowania ligandu X ligandem Z w mieszaninie o znanych stężeniach HbX_4 i ligandu Z a zmiennym stężeniu ligandu X (22). Założenie o równoważności wszystkich hemów wyjaśnia wprawdzie sigmoidalność krzywej nasycenia Hb tlenem, jednak niektórzy autorzy uważają je za niesłuszne. Dwa hemy w hemoglobinie ssaków związane są bowiem z polipeptydowymi łańcuchami α , a dwa z łańcuchami β . Riggs (51) i Lumry (34) sądzą zatem, że w hemoglobinie centra wiążące ligand są nie tylko zależne ale i nieidentyczne.

Występujące w jednej cząsteczce białkowej centra wiążące ligand nie tylko mogą reagować niezależnie od siebie, ale ponadto każde centrum może mieć inne powinowactwo do ligandu. Na przykład hemoglobiny niektórych ryb (*Myxina glutinosa*), zawierające więcej niż jeden hem na cząsteczkę białka, zachowują się w reakcji z tlenem jak mieszanina kilku cząstek białka o różnym powinowactwie do tego ligandu. W takim przypadku zależność stopnia nasycenia tlenem od jego ciśnienia cząstkowego wyrażona jest krzywą dzwonową (38, 67), a wyznaczona z równania Hilla wartość n jest mniejsza od jedności.

II. Teoretyczny model białka allosterycznego

Dla wyjaśnienia mechanizmu działania enzymów regulacyjnych zaproponowano kilka systemów modelowych, z których dotychczas najdokładniej są opracowane model Koshlanda, Nemethygo i Filmera

(ang. *sequential model*) (30, 32) oraz model Monod'a, Wyman'a i Changeux (ang. *symmetry model*) (30, 40). Dla uproszczenia rozważań matematycznych założono, że modelowe białko allosteryczne składa się z identycznych czterech podjednostek — protomerów, z których każde zawiera jedno miejsce receptorowe zdolne do wiązania jednego rodzaju ligandu. Zdaniem Koshlanda i wsp. (30, 31) każdy z protomerów może występować przynajmniej w dwóch stanach konformacyjnych, przy czym każda zmiana konformacji jednego protomeru pod wpływem przyłączenia ligandu nie musi powodować zmian konformacji pozostałych protomerów. Przy takim założeniu Koshland zaproponował dla tetramerycznego enzymu cztery modele wiązania ligandu S z protomerami (rysunek 1).

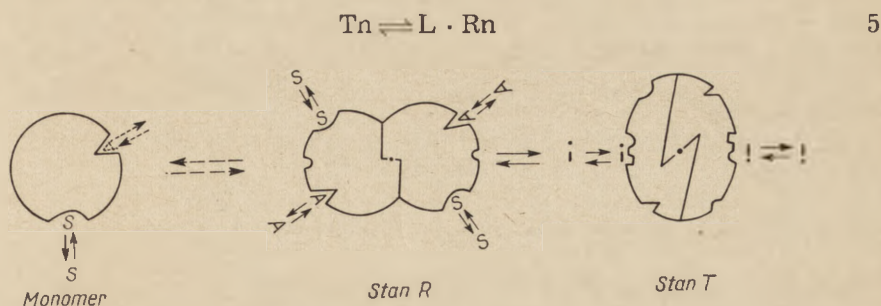


Rys. 1 Cztery modele możliwości wiązania ligandu S z tetramerycznym enzymem. Jako kwadrat przedstawiono konformację enzymu zdolną do wiązania ligandu (29). Modele: A — tetraedryczny; B — kwadratowy; C — linearny; D — równoczesny (ang. *concerted*).

W modelach: tetraedrycznym (A), kwadratowym (B) i linearnym (C) kolejne przyłączanie cząsteczek ligandu zmienia konformację odpowiednich protomerów. W przypadku modelu równoczesnego (ang. *concerted*) (D) ligand działa równocześnie na wszystkie protomery zmieniając ich konformację, po czym dopiero łączy się z białkiem o nowej konfiguracji przestrzennej.

Monod i wsp. (40) przyjmują, że w nieobecności ligandu białko allosteryczne występuje w dwóch stanach konformacyjnych rozluźnionym R i zbitym T (ang. *relaxed* i *tight*), będących w stanie równowagi (wzór 5). Zmianie konfiguracji przestrzennej białka (ze stanu R do T) nie towarzyszy zmiana symetrii cząsteczki (rysunek 2), co oznacza zarazem,

że nie może nastąpić zmiana konformacji tylko jednego protomeru. Z przedstawionych założeń wynika, że model *M o n o d* i wsp. odpowiada formie D modelu Koshlanda.



Rys. 2 Zmiana konfiguracji przestrzennej białka pod wpływem ligandów (8).

Interpretację matematyczną ograniczymy początkowo do rozpatrzenia hipotezy *M o n o d* i wsp. (40). We wzorze 5 n oznacza ilość protomerów, L zaś stałą równowagi przemiany stanu T w stan R , zwaną dalej stałą allosteryczną. Wartość stałej allosterycznej nie zależy od stężenia ligandów ani stężenia substratu, wskazuje jedynie na prawdopodobieństwo występowania białka w określonym stanie strukturalnym. Wartości stałych dysocjacji ligandu (ang. *microscopic dissociation constants*) związanego z miejscem stereospecyficznym białka w konformacji T lub R , oznaczone odpowiednio K_R i K_T , są miarą siły tych wiązań. Zdolność ligandu do wiązania się z białkiem tak w stanie T jak i w stanie R wskazuje na nieselektywność tego wiązania.

Analizując matematycznie oddziaływania identycznych ligandów (oddziaływanie homotropowe) *M o n o d* i wsp. (40) wyprowadzili funkcję \bar{Y}_F charakteryzującą stan nasycenia enzymu ligandem F . Funkcja ta (wzór 6) jest odpowiednikiem funkcji Y w równaniu Adaira określającej stan nasycenia hemoglobiny tlenem (1).

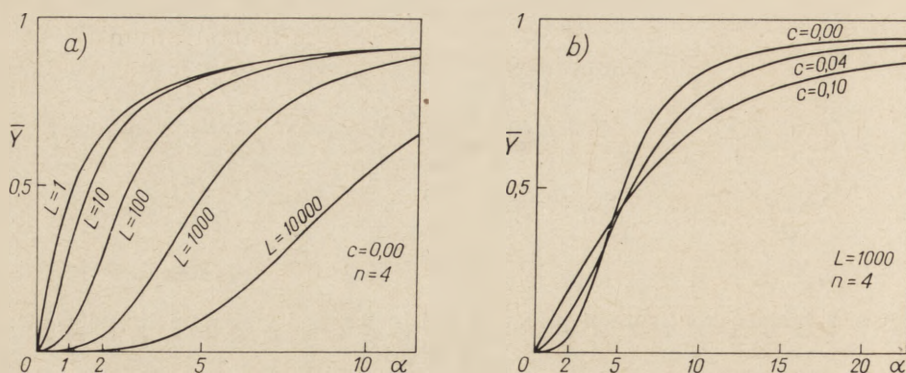
$$\bar{Y}_F = \frac{L_c \alpha (1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha (1 + \alpha)^{n-1}}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad 6$$

We wzorze tym $c = \frac{K_R}{K_T}$ oznacza różnicę w powinowactwie dwóch stanów konformacyjnych białka do ligandu F , n — ilość centrów wiążących ligand/mol białka, zaś współczynnik α — stosunek stężenia tego ligandu do jego K_R .

Według *F r i e d e n a* (16) funkcja \bar{Y}_F może być zastąpiona kinetycznym wyrażeniem $\frac{v_0}{n \cdot V}$ gdzie v_0 oznacza szybkość początkową a V — szybkość maksymalną reakcji.

Podobny wzór wyprowadzili też *K o s h l a n d* i wsp. (32). Dla określenia tetrameryczności białka allosterycznego wyznaczyli oni we

wzorze funkcję $N_S = 4\bar{Y}$, oznaczającą średnią ilość cząsteczek ligandu związanego z białkiem. Na rysunku 3a, b wykreślono teoretyczne krzywe dla \bar{Y}_F w funkcji α , przy różnych wartościach L i c .



Rys. 3a,b Teoretyczne krzywe funkcji nasycenia \bar{Y}_F przy różnych wartościach stałej allosterycznej L (a) i współczynnika c (b) (37)

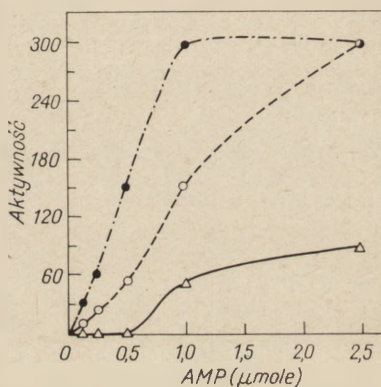
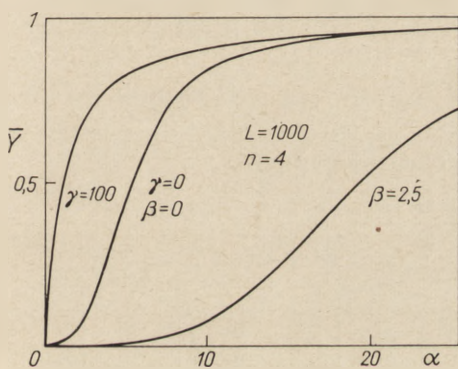
Wygięcie niższych części tych krzywych świadczy o kooperatywnym oddziaływaniu cząsteczek jednakowego ligandu na makrocząsteczkę białka: przyłączenie pierwszej cząsteczki ligandu obniża wolną energię niezbędną do związania następnej, a im większa jest różnica między ilością energii potrzebnej do wiązania pierwszej i następnych cząsteczek ligandu, tym większe jest wygięcie krzywej. Jak widać z rysunku 3, wygięcie krzywej jest większe dla stałych allosterycznych L o wyższej wartości, czyli wówczas, gdy równowaga pomiędzy $Tn \rightleftharpoons Rn$ przesunięta jest na korzyść stanu T . Podobny efekt obserwuje się przy niskich wartościach współczynnika c , gdy powinowactwa ligandu do białka w stanie R i T znacznie się różnią. Gdy natomiast powinowactwo ligandu jest jednokowe do białka w obu stanach ($c = 1$), a stała allosteryczna L jest niska, wówczas funkcja \bar{Y}_F przybiera postać analogiczną do równania Michaelisa-Mentena.

$$\bar{Y}_F = \frac{\alpha}{1 + \alpha} = \frac{F}{K_R + F} \quad 7$$

W przypadku kilku różnych ligandów, na przykład substratu (S) i aktywatora (A) charakteryzujących się powinowactwem do stanu R oraz inhibitora (I) wiążącego się jedynie z białkiem w stanie T , mówimy o oddziaływaniach heterotropowych. W tym przypadku każdy z ligandów wiąże się z białkiem tylko w jednym stanie konformacyjnym (54), a więc wiązaniami selektywnymi. Funkcja wyrażająca nasycenie enzymu jednym z ligandów (na przykład substratem) przyjmuje wówczas postać:

$$\bar{Y}_S = \frac{\alpha \cdot (1 + \alpha)^{n-1}}{\frac{(1 + \beta)^n}{(1 + \gamma)^n} + (1 + \alpha)^n} \quad 8$$

Współczynniki α , β i γ wyrażają stosunek stężenia ligandu do stałej dysocjacji jego połączenia z białkiem w stanie T (K_1) lub w stanie R (K_A i K_S); zatem $\alpha = \frac{S}{K_S}$; $\beta = \frac{I}{K_I}$; $\gamma = \frac{A}{K_A}$. Wpływ jednego allosterycznego ligandu (aktywatora lub inhibitora) na nasycenie białka innym ligandem allosterycznym przedstawiony jest na rysunku 4. Połączenie się aktywatora z białkiem w stanie R zwiększa ilość enzymu w konformacji zdolnej do wiązania substratu. Sigmoidalność krzywej zmniejsza się, a przy odpowiednim stężeniu aktywatora krzywa ta staje się typową hiperboliczną krzywą Michaelisa-Mentena. Natomiast inhibitor tworząc kompleks z białkiem w stanie nie wykazującym powinowactwa do substratu zwiększa sigmoidalność krzywej. Szybkość przebiegu reakcji enzymatycznej jest proporcjonalna do nasycenia białka ligandem. Zatem krzywe zależności szybkości reakcji od stężenia substratu wskazują w pewnym stopniu na mechanizm reakcji. Na przykład dla aminohydrolazy AMP z erytrocytów, ATP, działając jako allosteryczny aktywator, zmniejsza sigmoidalność krzywej, natomiast P, będący allosterycznym inhibitorem tego enzymu, znacznie ją powiększa (rysunek 5).



Rys. 4 Teoretyczna krzywa obrazująca wpływ allosterycznego aktywatora (współczynnik γ) i inhibitora (współczynnik β) na kształt krzywej funkcji nasycenia \bar{Y}_S (37).

Rys. 5 Wpływ allosterycznego aktywatora (ATP) i inhibitora (P) na aktywność dezaminazy AMP z erytrocytów (47).

Oznaczenia: o-o-o- bez efektora, ●-●-●- w obecności ATP, Δ - Δ - Δ - w obecności P.

Zdaniem Monoda i wsp., w pewnych przypadkach zahamowanie aktywności enzymatycznej spowodowane nadmiarem substratu można tłumaczyć mechanizmem allosterycznym a nie oddziaływaniem cząsteczek substratu w centrum aktywnym. Należy jednak wówczas założyć, że substrat może wiązać się z białkiem w obu stanach konformacyjnych, przy czym większe powinowactwo wykazuje białko katalitycznie nie-

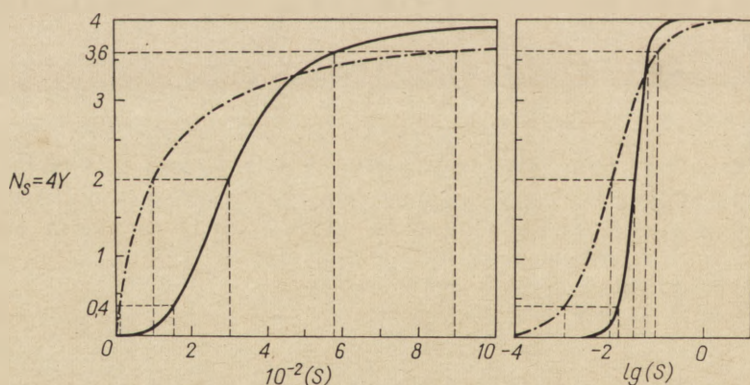
aktywne. Sytuację tę opisuje równanie:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{L \frac{S}{K_{SA}} \left(1 + \frac{S}{K_{SA}}\right)^{n-1}}{L \left(1 + \frac{S}{K_{SA}}\right)^n + \left(1 + \frac{S}{K_{SI}}\right)^n} \quad 9$$

W równaniu tym K_{SI} (stała dysocjacji substratu związanego z białkiem w stanie katalitycznie nieaktywnym) przybiera niższą wartość od K_{SA} (stała dysocjacji substratu związanego z białkiem w stanie aktywnym). Zdaniem Chaplaina (9, 10) taki właśnie przypadek stanowi o zahamowaniu ATPazy aktomiozynowej pewnych owadów przez nadmiar ATP.

O oddziaływaniu ligandu allosterycznego można wnioskować na podstawie kinetyki obserwowanej reakcji, zwłaszcza zaś zmian szybkości maksymalnej V i wprowadzonych przez Koshlanda (30, 32) parametrów kinetycznych $S_{0,5}$ i R_s . Parametry te pozwalają porównywać „krzywe nasycenia” enzymu ligandem, obrazujące zależność logarytmu stężenia ligandu (S) od średniej ilości cząsteczek ligandu związanych z białkiem ($N_s = 4Y$), z typowymi krzywymi Michaelisa-Mentena. Parametr $S_{0,5}$ oznacza także stężenie ligandu, przy którym wysyca on połowę miejsc wiążących w białku. Dla białek, w których przyłączenie ligandu nie wywołuje zmiany konformacji wartość $S_{0,5}$ jest liczbowo równa wartości stałej Michaelisa. Parametr R_s , zwany współczynnikiem kooperatywności opisuje równanie 10, gdzie $S_{0,9}$ oznacza stężenie ligandu przy 90%, a $S_{0,1}$ — przy 10% nasyceniu białka ligandem.

$$R_s = \frac{S_{0,9}}{S_{0,1}} \quad 10$$



Rys. 6 Porównanie sigmoidalnej krzywej nasycenia (—) z krzywą Michaelisa-Mentena (---) (29).

Współczynnik R_s wskazuje stromość przebiegu krzywej w układzie N_s względem $\log(S)$ (rysunek 6); krzywa ta będzie tym bardziej stroma, im mniejsza zmiana stężenia ligandu niezbędna jest do przejścia z 10% do

90% nasycenia. Dla krzywych przebiegających zgodnie z równaniem Michaelisa-Mentena R_S przybiera wartości $81 \cdot (S_{0,5})$. Gdy R_S jest mniejsze od 81, wówczas krzywa jest bardziej stroma aniżeli krzywa Michaelisa-Mentena. Dla większości enzymów określenie zmian $S_{0,5}$ i R_S oraz V_{max} pozwala nie tylko wnosić o oddziaływaniu ligandu allosterycznego ale i ustalić czy jest to oddziaływanie homotropowe czy heterotropowe.

Ligandy heterotropowe przesuwają równowagę pomiędzy dwoma stanami konformacyjnymi białka. Wpływ ligandów na konformację cząsteczki białka charakteryzuje w pewnym stopniu pozorna stała allosteryczna L' (równanie 11) związana z omawianą poprzednio stałą L (54).

$$L' = L \left(\frac{1 + \beta c_{inh}}{1 + \beta} \frac{1 + \gamma c_{akt}}{1 + \gamma} \right)^n \quad 11$$

We wzorze tym współczynniki c_{inh} i c_{akt} obrazują wpływ inhibitora i aktywatora na stan konformacyjny cząsteczki białkowej. Dla ligandów — inhibitorów $c_{inh} = \frac{K_n}{K_r}$ jest większy od 1, dla aktywatorów

$c_{akt} = \frac{K_n}{K_r}$ jest mniejszy od jedności. Dodanie inhibitora lub usunięcie aktywatora ze środowiska reakcji podwyższa wartość L' . Ocena tego parametru pozwala zatem na analizę efektów heterotropowych przy różnych kombinacjach ligandów wykazujących powinowactwo wyłącznie do określonego stanu białka, bądź też łączących się z białkiem w obu konformacjach.

Wartość pozornej stałej allosterycznej można obliczyć na podstawie wyników doświadczeń. Najłatwiej jest oznaczyć $\alpha_{0,5}$, to znaczy stężenie substratu wymagane do otrzymania 50% nasycenia nim białka w obecności heterotropowego ligandu, a wówczas wartość pozornej stałej allosterycznej wylicza się z równania 12:

$$L' = \frac{\alpha_{0,5} - 1}{1 - \alpha_{0,5}c} \left(\frac{1 + \alpha_{0,5}}{1 + \alpha_{0,5}c} \right)^{n-1} \quad 12$$

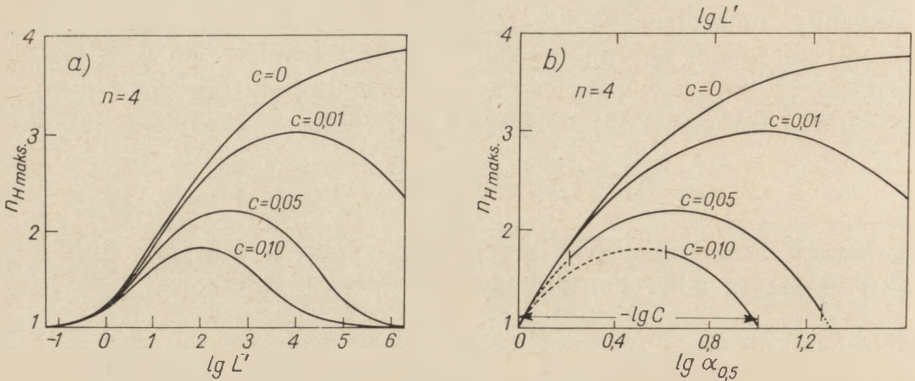
Miarą oddziaływań homotropowych jednakowych ligandów jest nachylenie krzywej wykreślonej według równania Hilla:

$$n_H = \frac{d \log[\bar{Y}_s + (1 - \bar{Y}_s)]}{d(\log \alpha)} \quad 13$$

gdzie n_H (współczynnik Hilla) oznacza współczynnik interakcji i może być liczbowo równy ilości centrów wiążących ligand (porównaj równanie 1). Natomiast wpływ ligandów heterotropowych na kooperatywność wiązania można wyrazić zależnością maksymalnej wartości n_H od pozornej stałej allosterycznej (L') lub stężenia $\alpha_{0,5}$ (rysunek 7a, b).

Gdy ligand wiąże się selektywnie tylko z białkiem w jednej, określonej konformacji, wówczas współczynnik c jest równy zeru. Dodanie aktywatora do środowiska reakcji zmniejsza oddziaływanie homotropowe

(40), co obniża wartość L' i wówczas $n_{H\max} = 1$. Dodanie inhibitora zwiększa efekt homotropowy i podwyższa wartość L' . W wypadku nie-selektywnego wiązania ligandu ($c > 0$) krzywe mają kształt dzwonowy, a wartość n_H osiąga maksimum przy określonej wartości L' . Wykreślając zależności n_H od $\alpha_{0,5}$ uzyskano analogiczne krzywe.



Rys. 7a,b Zależność maksymalnej wartości n_H (współczynnik Hilla) od stosunku powinowactwa ligandu do stanu R i T (współczynnik c) przy różnych wartościach pozornej stałej allosterycznej L' (a) i stężenia substratu wymaganego do 50% nasycenia $\alpha_{0,5}$ (b) (51).

Powinowactwo ligandu do obu stanów konformacyjnych białka ogranicza możliwości zmiany równowagi między tymi stanami. Ograniczenia te zależą od stosunku powinowactwa ligandu do białka w stanie R i T a także od wartości pozornej stałej allosterycznej. Określony stan konformacyjny białka opisuje funkcja stanu R, określona równaniem:

$$\bar{R} = 1 - \bar{T} = \frac{(1 + \alpha)^n}{(1 + \alpha)^n + L(1 + \alpha c)^n} \quad 14$$

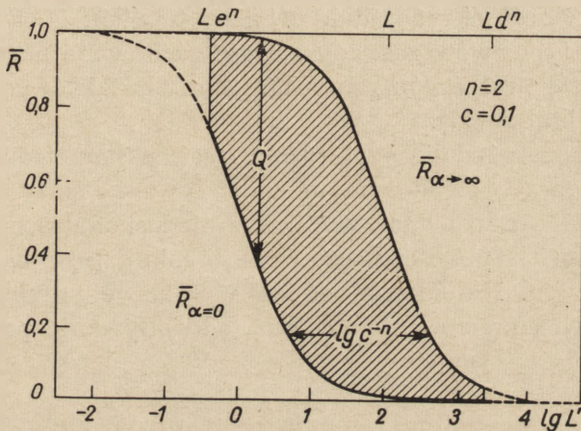
Różnicę wartości \bar{R} przy nieskończenie dużym oraz przy zerowym stężeniu ligandu określa się jako zakres allosteryczny (Q), będący do pewnego stopnia miarą możliwości zmian konformacyjnych białka.

$$Q = \bar{R}_{\alpha \rightarrow \infty} - \bar{R}_{\alpha=0} = \frac{L'(1 - c^n)}{(L' + 1)(L'c^n + 1)} \quad 15$$

Z wyliczeń teoretycznych wynika, że maksymalna wartość zakresu allosterycznego umożliwia maksymalną kooperatywność wiązania (54). Rysunek 8 przedstawia prawdopodobieństwo występowania stanów konformacyjnych białka allosterycznego w obecności szeregu ligandów (substratu, inhibitora, aktywatora). Na wykresie tym rzędna ilustruje wzajemne oddziaływania homotropowe, odcięta zaś — heterotropowe.

III. Model teoretyczny a dane doświadczalne

Omówiony model białka allosterycznego opracowany przez Monod i wsp. wskazujący na wzajemne oddziaływanie podjednostek, jak również na różnego typu oddziaływanie ligandów na białko, znajduje swoje potwierdzenie w wynikach badań wielu enzymów regulacyjnych, jak dezaminaza dezoksycytynowa zwierząt (58, 59), transkarbamylaza asparaginianowa z *E. coli* (18), kinaza dezoksytymidynowa z *E. coli* (43), oksydoreduktaza glutaminian: NADP (12, 62) oraz kilkanaście innych enzymów (17, 21, 26, 40).



Rys. 8 „Ograniczenia” przemian allosterycznych w obecności nieselektywnie wiązanych ligandów. Obszar zacieniony określa funkcję stanu \bar{R} przy nieskończonej i zerowym stężeniu substratu (51).

Jednym z głównych argumentów przeciwko uniwersalności modelu Monod i wsp. jest zdaniem Maeba i Sanwal (36) fakt, że aktywatory lub inhibitory wpływając na oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami substratu z centrami wiążącymi substrat nie zawsze zmieniają rządowość reakcji enzymatycznej (3). Na przykład dla fosfofruktokinazy z drożdży nachylenie krzywej przedstawiającej zależność $\log \frac{v'}{V-v}$ od stężenia substratu jest identyczne zarówno w obecności AMP (aktywator) jak i ATP (inhibitor). Wyniki te wskazują, że działaniu ligandu nie musi towarzyszyć zmiana oddziaływania pomiędzy centrami wiążącymi substrat. Podobne dane uzyskano dla fosfofruktokinazy z motyli wątrobowej (37) i mięśni królika (33) oraz dla oksydoreduktazy izocytrynian: NAD z drożdży (2). Za założeniem tym przemawiają także wyniki doświadczeń Gerharta i Schachmana (20) z transkarbamylazą asparaginianową z *E. coli*. Autorom udało się rozdzielić natywne białko globularne na dwa typy podjednostek. Podjednostki jednego rodzaju odznaczały się taką samą aktywnością enzymatyczną jak enzym natywny, ale pozbawione były całkowicie wrażliwości na działanie inhibitora CTP. Podjed-

nostki drugiego typu (tzw. regulatorowe) nie wykazywały aktywności enzymatycznej, a posiadały jedynie centrum wiążące inhibitor.

S a n w a l (55, 56, 57), C h a n (7) i M a e b a (36) wykazali również, że dane kinetyczne uzyskane przy badaniu oksydoreduktazy izocytrynian: NAD z *Neurospora* i *Aspergillus* oraz dezaminazy treoniny z *Salmonella typhimurium* znacznie łatwiej można interpretować przy założeniu obecności w cząsteczce enzymu dwóch miejsc wiążących substrat, z których jedno miałyby charakter regulatorowy. Pozostaje jednak nadal nie rozstrzygnięte zagadnienie, czy miejsca te zlokalizowane są na tym samym protomerze czy też na różnych podjednostkach (36). Stwierdzono ponadto, że aktywność oksydoreduktazy izocytrynian: NADP z *Neurospora* pojawia się tylko wówczas, gdy zostaje zachowana określona kolejność dołączania się poszczególnych reagujących związków do miejsc allosterycznych w białku (57).

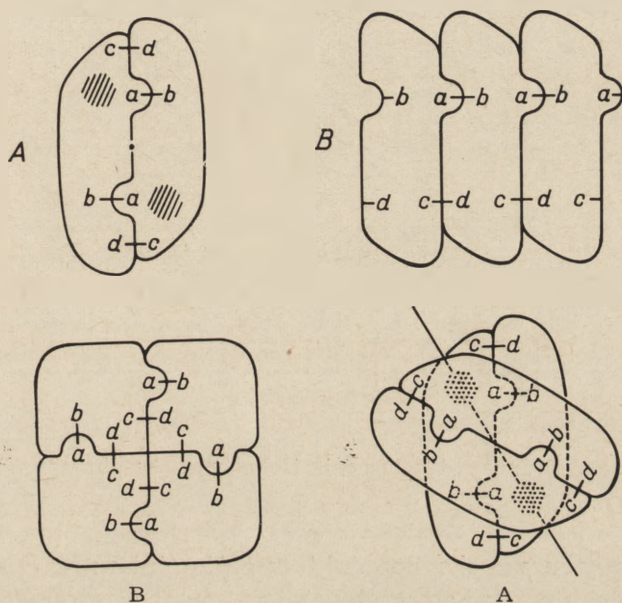
Dla szeregu enzymów nie stwierdzono reakcji homotropowych (substrat — substrat) przy równoczesnym oddziaływaniu substratu i modyfikatora (63, 42). Może to jednak wynikać z niedoskonałości metod stosowanych do pomiaru szybkości początkowej reakcji przy bardzo niskich stężeniach substratu. Nie można jednak wykluczyć przypuszczenia, że w przypadku tych enzymów nie zachodzi oddziaływanie pomiędzy podjednostkami.

IV. Struktura czwartorzędowa białek allosterycznych

Zgodnie z założeniami M o n o d a i wsp. białka allosteryczne są oligomerami zbudowanymi z identycznych podjednostek—protomerów. Połączenia protomerów ze sobą zapewniają symetrię cząsteczce oligomeru, przy czym wiązania między protomerami nie są typu kowalencyjnego. Według K o s h l a n d a (31) zdolność oligomerycznego białka do odwracalnej zmiany struktury czwartorzędowej zwiększa jego wrażliwość na działanie małej cząsteczki ligandu. Zmiany konformacyjne w cząsteczkach złożonych z podjednostek zasadniczo podobne są do zmian, które zachodzą (choć w mniejszym stopniu) w cząsteczce białkowej zbudowanej z jednego łańcucha polipeptydowego. W obu przypadkach końcowym efektem jest zmiana przestrzennej konfiguracji centrum aktywnego a więc aktywności katalitycznej. Na przykład łatwość, z jaką cząsteczka hemoglobiny ulega dysocjacji na podjednostki (bez hydrolizy czy też denaturacji białka), świadczy, że cztery łańcuchy polipeptydowe tej cząsteczki nie są połączone wiązaniami typu kowalencyjnego (6,63). Podjednostki hemoglobiny połączone są raczej przez wewnątrzpeptydowe wiązania typu soli i różnego rodzaju oddziaływania niejonowe. Tą ostatnią sugestią popiera także obserwacja, że większość polarnych ugrupowań w łańcuchach polipeptydowych α i β znajduje się na powierzchni cząstecz-

ki białkowej. Zdaniem Schlessingera w przypadku fosfatazy alkalicznej z *Escherichia coli* znaczną rolę w łączeniu protomerów odgrywiają wiązania wodorowe (60).

Struktura oligomerów jest stabilna i charakteryzuje się dużą specyficznością wiązania pomiędzy protomerami. Wymaga to ściśle określonej organizacji przestrzennej reszt aminokwasowych w poszczególnych protomerach, zapewniającej jedną i tylko jedną strukturę białka aktywnego. Zależnie od tego, czy ugrupowania na dwóch sąsiednich protomerach są identyczne czy też różne, połączenia protomerów są izologowe lub heterologowe (24, 40), (rysunek 9).



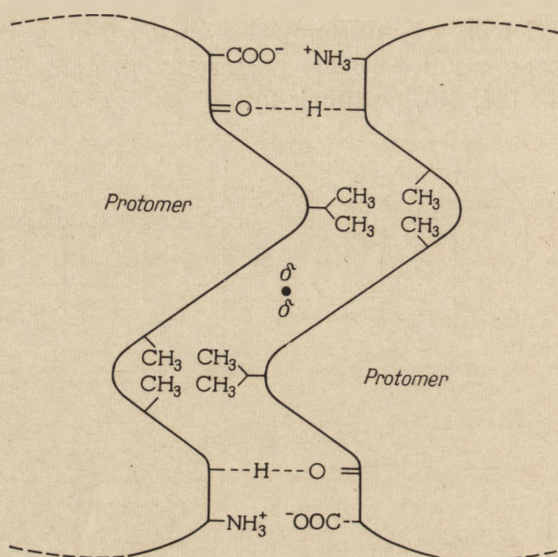
Rys. 9 Izologowe (A) i heterologowe (B) połączenia protomerów (37).

W połączeniach heterologowych nie ma elementu symetrii, a cząsteczki mają tendencję do tworzenia dużych polidispersyjnych agregatów. Natomiast wiązanie, w którym każdy protomer ma takie same ugrupowania wiążące (rysunek 10) zapewnia cząsteczce oligomeru przynajmniej jedną oś symetrii, dużą stabilność i wysoką specyficzność asocjacji.

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że najczęściej występującą formą izologowych oligomerów są tetramery o dwukrotnej osi symetrii (23, 46, 47).

Izologowy typ połączeń pomiędzy czterema podjednostkami obserwuje się między innymi w cząsteczce hemoglobiny. Komplementarność konfiguracji obszarów wiążących podjednostki pozwala na tworzenie połączeń nie tylko typu $\alpha_2 \beta_2$ ale i α_4 jak również β_4 . Powstawanie tego typu odmian hemoglobiny może być uwarunkowane występowaniem w łańcuchach polipeptydowych α i β obszarów o identycznych ugrupowaniach reszt aminokwasowych (5, 6, 52, 61). O własnościach allosterycznych

nych cząsteczki hemoglobiny decyduje jednakże zachowanie nienaruszonej, ściśle uporządkowanej struktury białka natywnego. Zmodyfikowana hemoglobina H, będąca tetramerem złożonym z β_4^A łańcuchów polipeptydowych wykazuje nieco odmienne własności od hemoglobiny normalnej ($\alpha_2^A \beta_4^A$) między innymi ulega zmianie krzywa dysocjacji oksyhemoglobiny (4). Podobnie zachowuje się hemoglobina α_4^A (49).



Rys. 10 Schemat połączenia izologowego w dimerze (8).

Regulacyjny enzym oksydoreduktaza glutaminian: NAD zredukowany z wątroby wołu (podobnie jak hemoglobina) jest również tetramerem złożonym z identycznych podjednostek (14) i (podobnie jak w przypadku hemoglobiny) aktywnym tylko przy zachowaniu niezmięnionej struktury czwartorzędowej. W roztworze enzymu ustala się równowaga pomiędzy stanem zasocjowanym i zdysocjowanym. Aktywator allosteryczny ADP zwiększa stałą tej równowagi stabilizując formę tetrameryczną enzymu, zaś inhibitor allosteryczny GTP przesuwa równowagę reakcji w kierunku stanu zdysocjowanego, a zatem katalitycznie nieaktywnego.

Oligomeryczna dezaminaza treoniny z *Clostridium tetanomorphum* po dysocjacji na podjednostki również jest nieaktywna (65). Substrat—treonina i aktywator allosteryczny —ADP, które stabilizują strukturę czwartorzędową enzymu, działają też ochraniająco na jego aktywność. Zmiany konformacji cząsteczki pod wpływem allosterycznego ligandu AMP wykazuje także zbudowana z identycznych podjednostek fosforylaza b (28, 35), wskutek czego wzrasta jej zdolność do wiązania lipofilnych ligandów (64). Zatem zachowanie oligomerycznej struktury enzymów regulacyjnych zapewnia prawidłowy przebieg reakcji enzymatycznej.

Tłumaczenie szeregu zjawisk obserwowanych w enzymologii mechanizmem allosterii pełniej wyjaśnia przebieg reakcji enzymatycznych. Wykazano bowiem, że nie tylko zmiany struktury czwartorzędowej białka wpływają na szybkość jego łączenia się z ligandem, ale co więcej, przyłączenie małej cząsteczki ligandu do białka również zmienia jego strukturę czwartorzędową.

LITERATURA

1. Adair G. S., *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
2. Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C., *J. Biol. Chem.* **240**, 2682 (1965).
3. Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 1 (1965).
4. Benesch R. E., Ranney H. H., Benesch R., Smith G. M., *J. Biol. Chem.* **236**, 2926 (1961).
5. Benesch R., Benesch R. E., Tyuma J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1268 (1966).
6. Braunitzer G., Hilse K., Rodloff V., Hilschmann N., *Adv. Protein Chem.* **19**, 1 (1964).
7. Chan M. F., Stachow C. S., Sanval B. D., *Can. J. Biochem.* **43**, 118 (1965).
8. Changeux J. P., *Brookhaven Symp. in Biology* **17**, 232 (1964).
9. Chaplain R. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 248 (1966).
10. Chaplain R. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 514 (1966).
11. Cohn E. J., Edsall J. T., *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Reinhold, New York (1943).
12. Colman R. F., Frieden C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 100 (1966).
13. Datta P., Gest H., Segal H. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 125 (1964).
14. Frieden C., *Brookhaven Symp. in Biology* **17**, 98 (1964).
15. Frieden C., *J. Biol. Chem.* **239**, 3522 (1964).
16. Frieden C., *J. Biol. Chem.* **242**, 4045 (1967).
17. Fritz P. J., *Science* **150**, 364 (1965).
18. Gerhart J. C., *Brookhaven Symp. in Biology* **17**, 222 (1964).
19. Gerhart J. C., Pardee A. B., *J. Biol. Chem.* **237**, 891 (1962).
20. Gerhart J. C., Schachman H. K., *Biochemistry* **4**, 1054 (1965).
21. Ghosh H. P., Preiss J., *J. Biol. Chem.* **241**, 4491 (1966).
22. Gibson Q. H., Roughton F. J. W., *Proc. Roy. Soc. B* **143**, 310 (1955).
23. Green D. W., Aschaffenburg R., *J. Mol. Biol.* **1**, 54 (1959).
24. Hanson K. R., *J. Mol. Biol.* **22**, 405 (1966).
25. Hill A. V., *J. Physiol. (London)* **40**, iv — vii (1910).
26. Hill R. L., Kanarek L., *Brookhaven Symp. in Biology* **17**, 80 (1964).
27. Keilin O., Wang Y. L., *Biochem. J.* **40**, 855 (1946).
28. Keller P. J., Con G. T., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 235 (1964).
29. Kendrew J. C., *Brookhaven Symp. in Biology* **15**, 216 (1962).
30. Kirtley M. E., Koshland D. E., jr., *J. Biol. Chem.* **242**, 4192 (1967).
31. Koshland D. E., *Brookhaven Symp. in Biology* **17**, 104 (1964).
32. Koshland D. E., Nemethy G., Filmer P., *Biochemistry* **5**, 365 (1966).
33. Lowry O. H., Passonneau J. V., *J. Biol. Chem.* **239**, 31 (1964).

34. Lumry R., *Biophysics (Japan)* **1**, 138 (1961).
35. Madsen N. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 390 (1964).
36. Maeba P., Sanwal B. D., *Biochemistry* **5**, 525 (1966).
37. Mansour T. E., Mansour J. M., *J. Biol. Chem.* **237**, 629 (1962).
38. Manwell C., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 194 (1960).
39. Monod J., Changeux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* **6**, 306 (1963).
40. Monod J., Wyman J., Changeux J. P., *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
41. Muirhead H., Perutz M. F., *Nature* **199**, 633 (1963).
42. Neufeld E. F., Hall C. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 456 (1965).
43. Okazaki R., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **239**, 275 (1964).
44. Pauling L., w Hemoglobin red. E. J. W. Roughton, J. C. Kendrew, Butleworths, London (1949), str. 57.
45. Perutz M. F., Proc. Arden, House Conf. Hemoglobin Harriman, New York (1962), str. 217.
46. Perutz M. F., Rossman M. G., Culles H. T., Muirhead H., Will G., North A. C. T., *Nature* **185**, 416 (1960).
47. Pickles B., Jeffery B. A., Rossman M. G., *J. Mol. Biol.* **9**, 598 (1964).
48. Pużyńska L., *Post. Biochem.*, **11**, 307 (1965).
49. Ranney H. M., Briehl R. W., Jacobs A. S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2442 (1965).
50. Razin A., Mager J., *Israel J. Med. Sci.* **2**, 614 (1966).
51. Riggs A., *J. Biol. Chem.* **236**, 1948 (1961).
52. Rossi-Fanelli A., Antonini E., *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 478 (1958).
53. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A., *Adv. Protein Chem.* **19**, 73 (1964).
54. Rubin M. M., Changeux J. P., *J. Mol. Biol.* **21**, 265 (1966).
55. Sanwal B. D., Maeba P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 194 (1966).
56. Sanwal B. D., Stachow C. S., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 28 (1965).
57. Sanwal B. D., Stachow C. S., Cook R. A., *Biochemistry* **4**, 410 (1965).
58. Scarano E., Geraci G., Polzella A., Campanile E., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 1556 (1963).
59. Scarano E., Geraci G., Rossi M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 239 (1964).
60. Schlesinger M. J., *Brookhaven Symp. in Biology* **17**, 66 (1964).
61. Schroeder W. A., *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 301 (1963).
62. Tomkins G. H., Yielding K. L., Curran J. F., Summers M. R., Bitensky M. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 3753 (1965).
63. Traut R. R., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **238**, 1213 (1963).
64. Ullmann A., Vagelos P. R., Monod J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 86 (1964).
65. Whiteley H. R., *J. Biol. Chem.* **241**, 4890 (1966).
66. Whithead E. P., *J. Theor. Biol.* **8**, 276 (1965).
67. Wyman J., *Adv. Protein Chem.* **4**, 407 (1948).
68. Wyman J., *Adv. Protein Chem.* **19**, 223 (1964).

JERZY KOWALCZYK* JERZY WARCHALEWSKI*

Automatyczne metody oznaczania aminokwasów oparte na kolumnowej chromatografii jonowymiennej

Automatic Methods of Amino Acid Determination Based on Column Ion-exchanger Chromatography

The review on the mentioned in the title methods of the determination of amino acids as well as other naturally occurring amino compounds with particular consideration of the recent progress in this field is given.

Automatyczne (44) analizatory aminokwasów oparte na systemie Spackmana, Steina i Moore'a (166, 167) lub na innych układach (61, 64, 140, 162) znalazły szerokie zastosowanie w biochemii a także w medycynie, farmacji, mikrobiologii, genetyce, rolnictwie, nauce o żywieniu i innych, czego wyrazem są między innymi specjalne bibliografie (178, 182). Od ostatnich publikacji przeglądowych z tego zakresu (19, 126) wprowadzono wiele wartościowych modyfikacji i ulepszeń. Zamierzeniem niniejszej pracy jest przedstawienie osiągniętego postępu metodycznego. W oparciu o wcześniej sformułowane podstawy teoretyczne kolumnowej chromatografii jonowymiennej (36, 52, 192) — których szersze omówienie zawierają monografie książkowe (27, 53, 67, 146) — oraz pionierskie prace Moore'a i Steina (120—124), Hamilton opracował szczegółowe kryteria rozdziału aminokwasów tą metodą. W badaniach swych uwzględnił wpływ rodzaju żywicy (57, 59), stopnia jej usieciowania (62), kształtu i średnicy cząsteczek jonitu (57, 58, 59, 60, 63), długości i średnicy kolumny (58, 62), pH i stężenia (Na^+) buforów eluujących (57, 59, 62), ciśnienia i szybkości elucji aminokwasów (60) a także wpływ dyfuzji (58). Hamilton i wsp. (58) podali ogólną zasadę, według której tylko takie dwa aminokwasy mogą być całkowicie rozdzielone, dla których zdolność rozdzielcza (ang. *resolution*, R_R) danego układu jest większa lub równa 2. Wartość R_R wynika z wzoru 1, w którym \bar{V}_a i \bar{V}_b są średnimi objętościami wypływu (przebiecia) dwóch rozważanych aminokwasów, odczytanymi z maksimów ich pasm wymywania**, natomiast δ_a

* Mgr, st. asystent Zakładu Biochemii Żywności, Katedry Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu.

** w pracy tej używano synonimowo określeń pasmo wymywania i szczyt.

i δ_b reprezentują względne szerokości tych pasm.

$$R_{II} = \frac{\bar{V}_a - \bar{V}_b}{\delta_a + \delta_b}$$

I. Systemy podstawowe

Analizatory aminokwasów, typowe analizatory złożone (196), zbudowane są z następujących podzespołów:

1) układu rozdzielczego, obejmującego jedną lub więcej termostatowo ogrzewanych kolumn jonowymiennych, pompy, zbiorniki buforów eluujących i odczynników regenerujących,

2) układu detekcyjnego, na który składa się system doprowadzający odczynnik ninhydrynowy, ogrzewana łaźnia reakcyjna i fotokolorymetr,

3) układu rejestrującego ze stabilizatorem i wzmacniaczem.

Układy te są połączone wężykami — zwykle tygonowymi lub teflonowymi, a całość podporządkowana jest zespołowi mechanizmów zegarowych, wyłączników oraz przyrządów wskazujących ciśnienie, temperaturę, szybkość elucji i inne.

Główne różnice pomiędzy podstawowymi systemami opracowanymi w latach 1956—1960 przedstawiono w tablicy I. Ponadto w systemie Pieza-Morrisa wykorzystuje się 9-ciokomorowy autograd (*varigrad*) konstrukcji Petersona i Sobera (134) do uzyskiwania gradientu Na^+ i pH buforu oraz stosuje odczynnik ninhydrynowy i bufor eluujący w stosunku 1:1, podczas gdy w pozostałych systemach — 1:2. W systemie Simmondsa, w przeciwieństwie do pozostałych gdzie eluat z kolumn nie jest dzielony, następuje kolejno: frakcjonowanie eluatu, wstrzykiwanie odczynnika ninhydrynowego, ogrzewanie — wywoływanie reakcji barwnej, rozcieńczanie, pomiar i usunięcie mierzonego roztworu z kiuwety kolorymetru. Operacje te odbywają się w pionowej rurce szklanej podzielonej na segmenty elektromagnetycznymi zaworami i na pewnych odcinkach wyposażonej w płaszcze grzejne i chłodzące. Kolejnością i czasem wykonywania poszczególnych czynności steruje mechanizm zegarowy. Ponieważ Simmonds rozdzielał aminokwasy według starszych metod Moore'a i Steina (122, 123), system ten był cztery razy wolniejszy od metody Spackmana i wsp. (167), lecz okazał się przydatny do konstrukcji wielokolumnowego, frakcjonującego analizatora (163, 164).

II. Systemy zmodyfikowane

1. Metody analizy przyspieszonej

Problem małej wydajności analizatorów działających w oparciu o systemy podstawowe rozwiązano dwoma sposobami:

Charakterystyka podstawowych systemów automatycznej analizy aminokwasów

System	Rozdział	Grupa aminokwasów	Parametry						Rok	Literatura*	Uwagi
			Kolumny i żywice	Bufory cytrynianowe	Czas w godz.	Temp. w °C	Dokładność i zakres				
Speckmana, Steina i Moore'a	Dwukolumnowy	obojętne i kwaśne	150 × 0,9 cm AMBERLITE IR- -120 × 8 31—45 μ	0,20 N (Na ⁺) pH 3,25 4,25	16	50	± 3% 0,1—3 μM aminokwasu	1956— —1958	167, 171 120, 122, 123, 124		
		zasadowe	15 × 0,9 cm AMBERLITE IR -120 × 8 25—30 μ	0,35 N (Na ⁺) pH 5,28	6	50			125, 114, 91, 102, 103		
Simmondsa**	Dwukolumnowy	obojętne i kwaśne	150 × 0,9 cm DOWEX 50 × 8 < 74 μ	0,20 N (Na ⁺) pH 3,25 4,25	72	50	± 3% 0,1—3 μM aminokwasu	1958— —1960	162, 163, 164	System frakcjonują-cy eluat. Dal-sze wyjaśnie-nie w tekście	
		zasadowe	15 × 0,9 cm AMBERLITE IR- -120 × 8 < 74 μ	0,35 N (Na ⁺) pH 5,28	24	50					
Hanniga	Dwukolumnowy	obojętne i kwaśne	130 × 0,9 cm DOWEX — 50 × 8 35 μ	0,20 N (Na ⁺) pH 3,10 5,10	16	50	± 4% 0,1—3 μM aminokwasu	1959	64, 77		
		zasadowe	50 × 0,6 cm AMBERLITE IRC -50 < 120 μ	0,20 N (Na ⁺) pH 7,00	—	40					
Piech-Morrissa	jednokolumnowy	obojętne i kwaśne	133 × 0,9 cm DOWEX — 50 × 12 20—30 μ	0,25—2,40 N (Na ⁺) pH 2,91	24	60	± 3% 0,05—4 μM aminokwasu	1960	140, 134, 138, 139		
	wy	zasadowe									

* Pozycje podkreślone stanowią literaturę podstawową — pozostałe są publikacjami uzupełniającymi

** Do rozdziału aminokwasów Simmonds zastosował metodę, która oparta jest na kilku pracach Moore'a i wsp. (122, 123, 125).

A. Zwiększono szybkość elucji aminokwasów przy utrzymaniu koniecznej ostrości rozdziału potrzebnej do zachowania pierwotnej dokładności metod (7, 8, 72, 168, 169, 180) wynoszącej $\pm 3^0/\text{o}$.

B. Zbudowano aparaty wielokolumnowe analizujące jednocześnie 4—9 próbek (17, 41, 66, 76, 94, 165) lub posłużono się techniką kolejnego nakładania w małych odstępach czasu kilku próbek na tę samą kolumnę (171). To ostatnie rozwiązanie ogranicza się jednak do bardzo prostych próbek jak na przykład hydrolizaty małych peptydów i to o specyficznej budowie.

Serię prac nad rozwiązaniem typu A zapoczątkował Spackman (168), który zmieniając kilka parametrów swojego poprzedniego systemu (167) uzyskał skrócenie czasu analizy z 22 do 6,5 godz. Czas analizy hydrolizatów białkowych można skrócić stosując mielone żywice polistyrenowe (79). Znaczne skrócenie czasu rozdziału uzyskano jednak dopiero po zastosowaniu wprowadzonych przez Hamiltona żywic sferycznych (59, 61, 62) o małej średnicy kuleczek (11—25 μ), które użyte do innych systemów (7, 8, 73, 170, 190) wykazały znacznie wyższą zdolność rozdzielczą od analogicznych żywic mielonych (69, 189). Dzięki temu a także zapewniając bardziej jednolite rozmiary ziarna żywic, systematycznie skracano czas rozdziału aminokwasów (zwykle spotykanych w kwasowych hydrolizatach białkowych) do 5 godzin (180), a następnie do 3 godzin (189) w jednokolumnowych systemach, w dwukolumnowym zaś do 4 godzin (7, 9, 169), a następnie do 2,5 godz. (135) lub nawet do około 2 godz. (172).

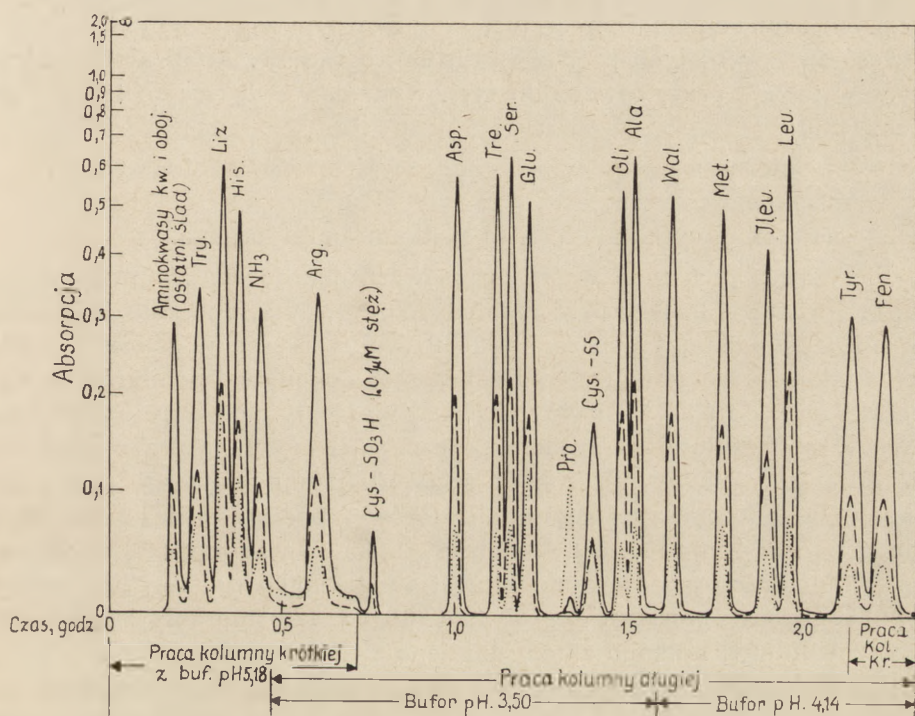
Do tego sukcesu, poza lepszymi żywicami, przyczyniło się też zmodyfikowanie buforów i skrócenie kolumn do około 55 cm (aminokwasy cbojętne i kwaśne) i 4—6 cm (aminokwasy zasadowe). Istotne znaczenie miało również zwiększenie szybkości elucji do 70 ml/godz. (7, 72), a nawet do 120 ml/godz. (7). Pociągało to za sobą wzrost ciśnienia z około 9 atm (7) do około 25 atm (72) oraz konieczność wydłużenia teflonowej spirali reakcyjnej z około 30 do 60 m aby zapewnić potrzebny do pełnego wywołania reakcji barwnej 15-to minutowy czas przepływu mieszaniny eluatu z odczynnikiem ninhydrynowym przez wrzącą łaźnię wodną.

Metody przyspieszone wymagały również stosowania szybkich rejestratorów pozwalających notować absorpcję co 2 s.

W systemie Hubbard (72) kwaśne i obojętne aminokwasy rozdzielone są na $52 \times 0,9$ cm kolumnie z żywicą PA-28, natomiast zasadowe na $4 \times 0,9$ cm kolumnie wypełnionej żywicą PA-35. Czas rozdziału typowych aminokwasów kwasowych hydrolizatów białkowych wynosił 2 godz. 7 min., a w przypadku obecności kwasu cysteinowego i tryptofanu kilka minut dłużej (rysunek 1).

Jak widać z rysunku 1 tak znaczne skrócenie czasu rozdziału było możliwe między innymi dzięki maksymalnemu wyeliminowaniu martwych, zerowych odcinków krzywej wymywania i przez częściowe zazębienie się

czasów pracy obydwu kolumn. Dzięki temu można przeprowadzić 5 kompletnych rozdzielnię hydrolyzatów białkowych podczas normalnego 8-godzinnego dnia pracy. Dokładność metody w zakresie od 0,025 do 0,25 μM wynosi $\pm 2\%$ między innymi dzięki zastosowaniu nowej kiuwey przepływowej skonstruowanej przez Hubbarda i Kremena (73). W celu polepszenia rozdzielania tyrozyny od fenyloalaniny Hubbard (72) wprowadził alkohol benzylový, a zwężenie pasm wymywania (ostrości szczytów) aminokwasów obojętnych oraz zaostrenia i rozsunięcia szczytów aminokwasów zasadowych uzyskał przez dodanie propanolu (3–5% obj.) wykorzystując dawne spostrzeżenie Moore'a i Steina (121).



Rys. 1. Chromatogram mieszaniny aminokwasów (0,10 μM każdego z wyjątkiem kwasu cysteinowego (rozdzielanej systemem Hubbarda (według 73)).

Wydajność analizatorów można zwiększyć także sposobem B wymagającym stosowania takiej ilości kolumn, a niekiedy także i układów wywołujących reakcję barwną (32, 41, 99), która odpowiadałaby liczbie próbek analizowanych jednocześnie.

W tych systemach istota zagadnienia leży w budowie układu fotokolorymetrycznego i rejestrującego. We wspomnianym już systemie Simmondsa i Rowlandsa (162, 163, 164) może pracować jednocześnie 8 kolumn, a 6 kompletnych analiz uzyskuje się w ciągu 48 godz. Wyloty wszystkich podzespołów frakcjonujących i reakcyjnych umieszczone są

w lejku połączonym z kiuwetą kolorymetru, dokąd spływają z nich kolejno przereagowane frakcje. Umożliwia to rejestrowanie eluatów z 8-miu lub w modyfikacji Inglisa (75, 46) 9-ciu kolumn rozdzielczych.

Dusi i wsp. (41) zwiększyli wydajność w inny, nie dla wszystkich dostępny sposób, łącząc dwa analizatory *Beckmana Model 120B* wyposażone dodatkowo w podwójne spirale reakcyjne, kolumny i pompy, z liniowym spektrofotometrem *Gilforda** (191) zaopatrzonym w automatyczny przełącznik kiuwet.

2. Metody w skali nanomolowej (10^{-9} M)

Dla wielu badań nad strukturą białek i polipeptydów lub badań klinicznych i mikrobiologicznych (69, 189), istotnym zagadnieniem jest możliwość analizy małych próbek rzędu mikrogramów. Analizatory aminokwasów można przystosować do tych wymagań zwiększając ich czułość przez (189):

- A. elektroniczne wzmocnienie sygnału wyjściowego z fotokomórek,
- B. wzmocnienie optyczne,
- C. zmniejszenie wymiarów całego systemu analitycznego.

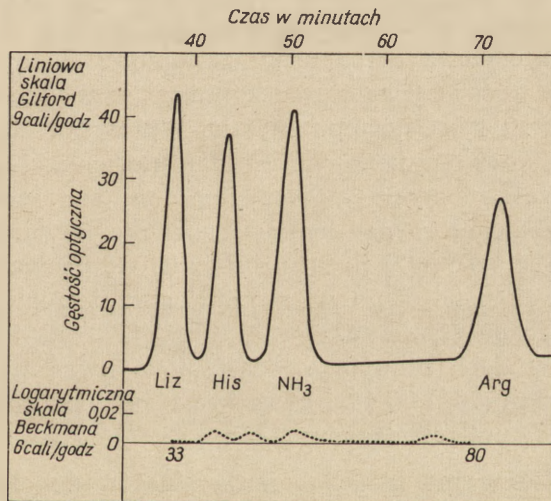
Pierwszą z tych możliwości zastosowano już do analizy przyspieszonej (41, 61, 62, 73). Rejestrator zmodyfikowano tak, aby cała jego skala zapisu odpowiadająca poprzednio 10 mV mieściła się w zakresie 1 mV. Przez takie rozszerzenie zakresu rejestrator dokonywał pomiarów w rozpiętości od 0 do 0,04 jednostek absorpcji dając 10-ciokrotny wzrost czułości. Wzrost czułości na drodze optycznej (B) uzyskano przez zwiększenie grubości warstwy mierzonego roztworu przepływającego przez kiuwety układu fotometrycznego analizatorów z początkowej 2,2 mm (167) poprzez około 4 mm (61, 62), 6—7 mm (73, 88, 89), 10 mm (41) do 15 mm (111, 189). Próby zastosowania kiuwet tubularnych (inaczej horyzontalnych) o grubości warstwy 20—50 mm (61, 83, 189) nie dały zadowalających rezultatów, szukano zatem dalszego zwiększenia czułości analizatorów łącząc wzmocnienie optyczne ze wzmocnieniem elektronicznym sygnału wyjściowego. W ten sposób Hamilton (61, 62) zdołał oznaczyć wszystkie podstawowe aminokwasy w stężeniu 0,01 μM z dokładnością $\pm 5\%$ przy granicy wykrywalności 0.1 nM (10^{-10}M), a Hubbard i Kremen w zakresie 0,002—0,25 μM z dokładnością $\pm 3\%$.

Trzeci sposób zastosowali Kirstenowie (88, 89) miniaturyzując 300-krotnie standardowy system Spackmana, Steina i Moore'a (167) i zastępując kolumny szklane teflonowym wężykiem, o średnicy wewnętrznej 0,5 mm. Aminokwasy obojętne i kwaśne rozdzielają się tym sposobem w czasie 24 godz., a zasadowe w ciągu 17,5 godz. Optymalna wielkość próbki wynosi $2 \times 10^{-9}\text{M}$ aminokwasu, a do pełnej analizy

* *Gilford Multiple Sample Absorbance Recording System 2000. Gilford Instrument Laboratories Inc. Oberlin, Ohio, USA.*

wystarcza 5 μ g hydrolizatu białka lub 30 μ l plazmy krwi. Do uzyskania tej dużej czułości przyczyniło się także zastosowanie ultramikrokiuwety przepływowej konstrukcji Ullricha i Hampela (183). Użycie fotometru „Eppendorf” (6) pozwoliło na planimetryczne, ilościowe oznaczanie aminokwasów białkowych ze względnym odchyleniem standardowym około $\pm 5\%$.

Dalszym krokiem w zwiększaniu czułości automatycznych analizatorów aminokwasów jest ultramikrometoda Hamiltona (63) pozwalająca wykrywać aminokwasy w stężeniu poniżej 10^{-11} M, a ilościowo oznaczać je z dokładnością $\pm 5\%$ w zakresie od 10^{-10} do 10^{-9} M. Stanowi to 500—1000-krotny wzrost czułości w stosunku do systemu (62) Spackmana i wsp. (167). W porównaniu do swego poprzedniego systemu Hamilton zastosował węższą kolumnę (125 \times 0,2 cm) oraz inny fotometr* (51) dający już liniową zależność proporcjonalną do stężenia aminokwasów. System ten pozwala dokonać analizy zawartości aminokwasów w 1 μ g hydrolizatu białka, 10 μ l plazmy lub 100 μ l płynu mózgowo-rdzeniowego.



Rys. 2. Porównanie czułości rejestracji systemu Gilforda i standardowego kolorymetru analizatora Beckmana — 120 B przy naniesieniu po 5 nM każdego z aminokwasów (według 41).

Wspomniany już system Dusa i wsp. (41) w niezwykle prosty, choć kosztowny sposób, łączy w sobie szybkość (5—6 godz.), wielokrotność (4 jednoczesne analizy), łatwość obliczeń (planimetrycznie) oraz przede wszystkim wysoką czułość pozwalającą na oznaczanie aminokwasów w zakresie 1—10 nanomoli. Uzyskany wzrost czułości ilustruje rysunek 2.

* Du Pont split beam process stream photometric analyzer.

3. Metody detekcji

Wśród wielu stosowanych w analizatorach możliwości wykrywania aminokwasów można wyróżnić 2 grupy:

- A. Metody kolorymetryczne — oparte na reakcjach: ninhydrynowej (26, 47, 55, 76, 87, 95, 120, 124, 140, 143, 144) lub innych (70, 147, 148, 149)
- B. Metody niekolorymetryczne na przykład polarograficzna (12, 31, 190) i termiczna (128, 129, 142).

A. W odczynniku ninhydrynowym (124) — przystosowanym do analizatorów (167) obecna jest hydrindantina. Jest ona wrażliwa na utlenianie i światło, a ponadto niezbyt dobrze rozpuszczalna. Jeśli jak w systemach opartych na metodzie Pieza-Morrisa (140), stosunek odczynnika do bardziej stężonych buforów wymywających wynosi 1:1, powoduje to powstawanie strąków blokujących kapilarne przewody analizatorów (87). Zastąpienie hydrindantyny przez $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (76, 140) również nie jest zadowalające (92).

Rosen i wsp. (145) zaproponowali zastosowanie do automatycznej analizy aminokwasów opracowanego poprzednio przez Rosena (143) odczynnika, w którym hydrindantynę zastąpiono śladowym stężeniem NaCN . Zapewnia to taką trwałość odczynnika, że zbędne jest jego przechowywanie pod N_2 i bez dostępu światła. Wprawdzie Grant doniósł (55), że bufor octanowo-cyjankowy również ulega rozkładowi, lecz inni (26, 87, 95) wykazali, że użycie 2-metoksy-etanolu (ang. *methyl cellosolve*) rzeczywiście pozbawionego nadtlenków zapewnia 6-ciomiesięczną trwałość. Ostatnio Eastoe (42) podał prostą metodę usuwania nadtlenków z 2-metoksy-etanolu i trwałego przed nimi zabezpieczenia przez łagodną alkalizację tego rozpuszczalnika.

W innych metodach ninhydrynę zastąpiono kwasem 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowym (70, 147, 149) kwasem naftochinonosulfonowym (147) lub 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzenem (148).

B. Polarograficzną metodę oznaczania eluatów z kolumn chromatograficznych zastosowali już dawno Kemula i Witwicki (82) a następnie Blaedel i Todd (12), lecz dopiero Corfield i Robson (31) oraz Winter (190) przystosowali ją do automatycznej analizy aminokwasów. Według Corfielda i Robsona (31) po rozdzieleniu aminokwasów na dwóch kolumnach żywicy Zeokarb 225 eluaty po doprowadzeniu pH do 9,2 są tłoczone pompą perystaltyczną przez dodatkową kolumnę ($10 \times 0,9$ cm) z fosforanem miedziowym, gdzie α -aminokwasy tworzą kompleksy z miedzią. Strumień N_2 unosząc rozpylony wyciek przepływa następnie przez specjalnie skonstruowaną komorę polarograficzną, a zmiany natężenia prądu stałego względem czasu notowane są przez rejestrator. Obraz elucji aminokwasów, dokładność i czułość w tej metodzie są analogiczne jak w metodzie ninhydrynowej (167).

W oryginalnym systemie Naono (128, 129, 142) wykorzystano zjawiska endo- i egzotermiczne towarzyszące przejściu próbki aminokwasu z fazy ciekłej eluentu do fazy stałej adsorbentu lub jonowymiennika i odwrotnie.

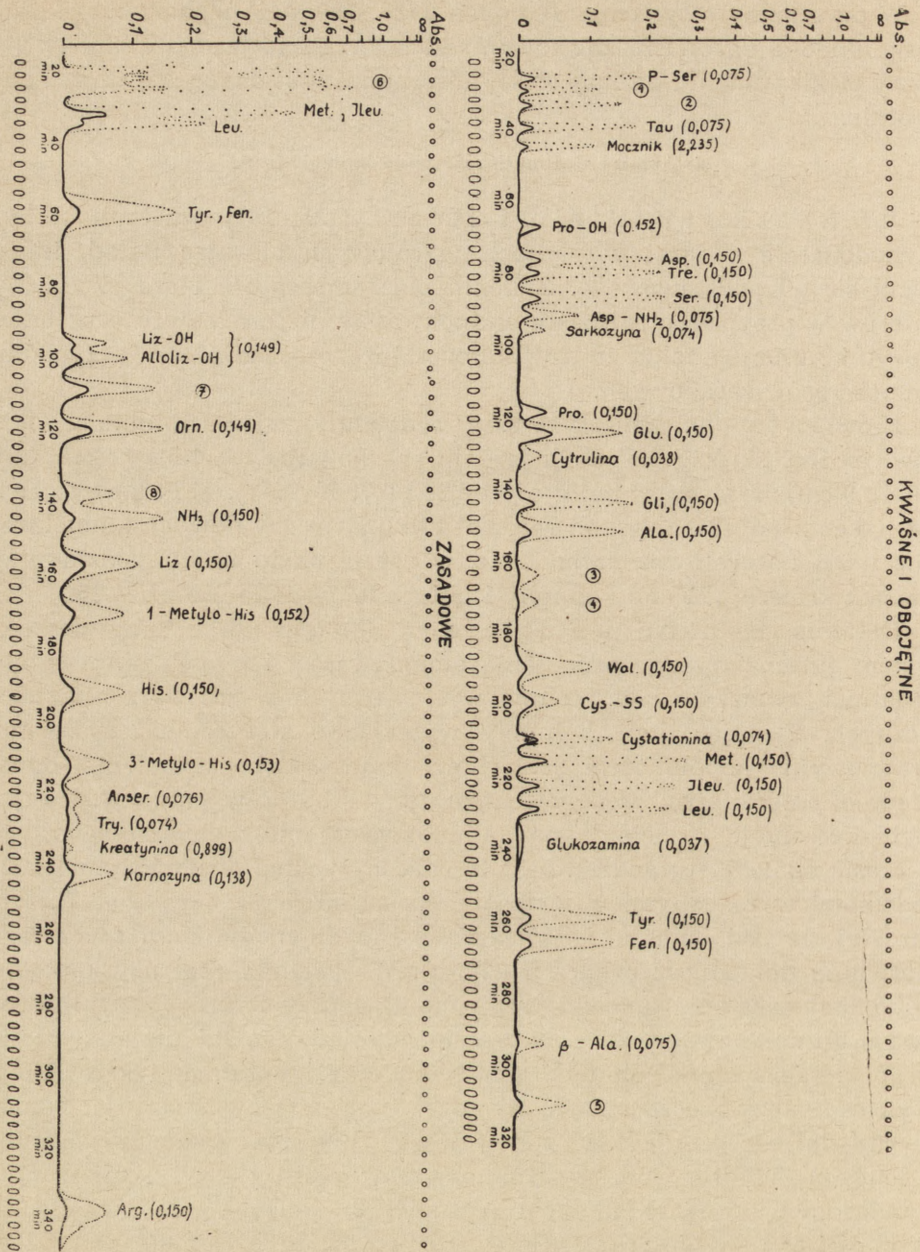
4. Analiza złożonych mieszanin biologicznych

Już Spackman, Stein i Moore (125, 167) oznaczali ninhydrynododatnie związki w płynach ustrojowych stosując układ, który różnił się od podstawowego. Zmienili oni temperaturę i czas wymiany buforów w przypadku rozdzielania aminokwasów niezasadowych oraz przedłużyli kolumny, a także zmienili temperaturę, czas i bufor w przypadku aminokwasów zasadowych.

Komintz (90) doniósł, że czas rozdzielania zasadowych amino-związków można skrócić do 6-ciu godzin, zachowując rozmiary kolumny (50×0,9 cm) ale stosując bufor o pH 5,28 i 0,70 N (Na⁺). Kirkpatrick i Anderson (87) uzyskali rozdział kilkunastu zasadowych aminokwasów i ich naturalnych pochodnych w czasie około 8-miu godzin przy pomocy krótszej (21 cm) kolumny i buforu 0,37 N (Na⁺) o pH 4,26.

Ostatnio Benson i Patterson (8) opracowali przyspieszony system automatycznego oznaczania aminokwasów i innych ninhydrynododatnich związków powszechnie występujących w roztworach fizjologicznych. Stosując dwie kolumny wypełnione sferycznymi żywicami, sulfonowym kopolimerem styrenowo-dwuwinylbenzenowym, odpowiednio programując zmiany temperatury i buforów oraz zwiększając szybkość elucji rozdzielili oni aminokwasy mieszanin biologicznych w czasie około 11-tu godzin. Jest to znaczny postęp w porównaniu z 44 godzinami wymaganymi w metodzie Spackmana i wsp. (167), tym bardziej, że podobnie jak w większości innych modyfikacji zachowano pierwotną dokładność oznaczeń ($\pm 3\%$). W systemie tym uzyskano nie tylko przyspieszenia analizy, lecz ponadto lepszy rozdział cytruliny od kwasu glutaminowego, kwasów α -aminoadypinowego i α -amino-*n*-masłowego, a także etanoloaminy i amoniaku oraz tryptofanu i kreatyniny. Wykres analizy moczu otrzymany przez tych autorów wskazuje jednak, że rozdział nie jest jeszcze zadowalający zwłaszcza pomiędzy cystyną a leucyną. Wykresy analizy aminokwasów plazmy krwi i mieszaniny standardowej z 44 składników (rysunek 3) świadczą, że zwiększenie szybkości analizy nie pogorszyło ostrości rozdzielania poszczególnych składników.

Na niedostateczny rozdział aminokwasów moczu składają się co najmniej dwie przyczyny. Jedną z nich jest fakt, że ninhydryna reaguje nie tylko ze związkami mającymi wolne grupy aminowe, ale także i z ketonami, ketokwasami, cukrami i laktonami (74, 150, 151, 194), co zresztą pobudziło do nowych badań nad mechanizmem i kinetyką reakcji ninhydrynowej (81, 131). Drugą przyczyną jest bardzo złożony skład moczu.



Rys. 3. Chromatogram syntetycznej mieszaniny aminokwasów oraz innych amino-
-związków występujących w płynach fizjologicznych (8).

Podane w nawiasach liczby odpowiadają μM naniesionego związku. 1. Glicerofosfoetanolamina (0,046). 2. Fosfoetanolamina (0,082). 3. Kwas α -aminoadypinowy (0,041). 4. Kwas α -amino-*n*-masłowy (0,038). 5. Kwas β -aminoizomasłowy (0,151). 6. Aminokwasy kwaśne i obojętne. 7. Kwas γ -aminomasłowy (0,143). 8. Etanolamina (0,143).

Stwierdzono w nim obecność ponad 70 związków ninhydryno-dodatnich, z których znaczna część pozostaje niezidentyfikowana (62, 84, 85).

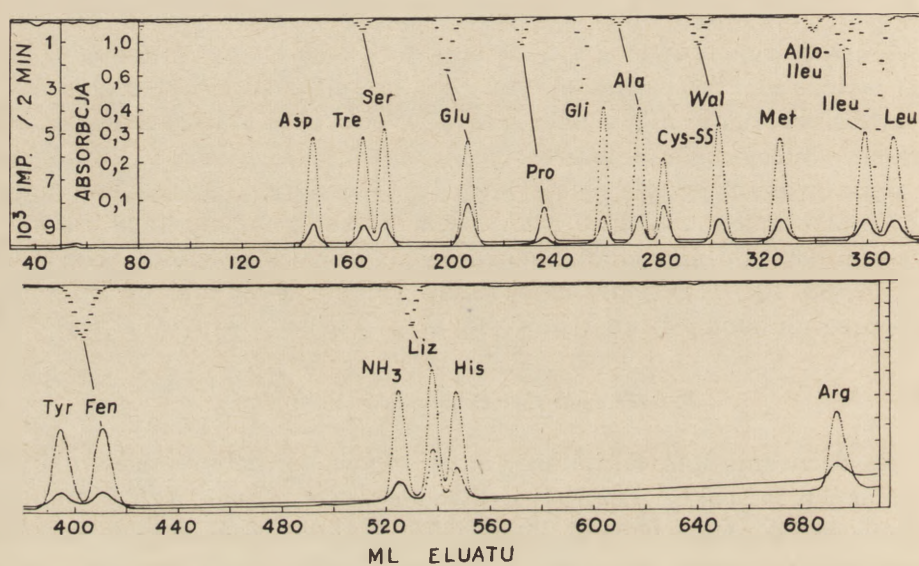
Nawet idealnie symetryczny szczyt (57, 195) nie jest wystarczającym dowodem obecności wyłącznie jednego tylko związku, na przykład taki szczyt tworzą glutamina i asparagina z seryną w standardowym systemie Spackmana i wsp. (167). Przy identyfikacji według Zachariusa i Talleya (195), którzy ustalili pozycje wpływu (objętość przebiecia) ponad 90-ciu związków często występujących w materiale roślinnym, pewne wskazówki co do homogenności pasma może dać porównanie stosunku stałej integracyjnej krzywej przy 440 i 570 m μ lub też zmiana temperatury czy momentu wprowadzenia na kolumnę następnego buforu eluującego. Jeżeli jednak taki powtórny rozdział nie daje pozytywnego wyniku, (jak to miało miejsce w przypadku sulfonu *S*-metylo-*L*-cysteiny i dwóch geometrycznych izomerów sulfotlenku *S*-metylocysteiny) konieczne jest wyodrębnienie wybranego pasma, odsolenie i poddanie wielokładowej chromatografii bibułowej. Pomocne są przy tym uprzednio już wyznaczone własności chromatograficzne związków (125, 167, 195) a zwłaszcza dane Hamiltona (62), który zbadał zachowanie się 186-ciu biologicznie interesujących ninhydryno-dodatnich związków w opracowanym przez siebie systemie analitycznym. Szczególnie zajęto się zachowaniem podczas przepływu przez kolumny analizatorów: cystyny (96, 119), innych aminokwasów siarkowych oraz ich pochodnych (34, 37, 38, 101, 165), jodoaminokwasów (14, 15), 6-cio aminocukrów (78, 185) oraz glutaminy i asparaginy (132).

5. Oznaczanie radioaktywnych aminokwasów

Zastosowanie lotnych buforów do wymywania aminokwasów ułatwia pomiar ich radioaktywności (104, 133). Po wprowadzeniu proszku antracenowego jako stałego scyntylatora (174) okazało się, że energia rozpadu promieniotwórczego najczęściej używanych w badaniach białek i aminokwasów izotopów ^{14}C i ^3H jest wystarczająca do pomiarów także w nie-lotnych buforach zwykle stosowanych do rozdzielania aminokwasów. Na tej podstawie Schram i Lombaert (155) wykorzystując poprzednie doświadczenia z plastikowymi scyntylatorami (152, 153, 48) oraz niezależnie Piez (137) skonstruowali komórki przepływowe z antracenowym wypełnieniem, umieszczonym w wężyku polietylenowym lub kwarcowej banieczce. Komórki te umieszczono u wylotu kolumny lecz przed miejscem wprowadzenia ninhydryny do eluatu, ponieważ wpływa ona niekorzystnie na pomiar radioaktywności tych słabych β -emiterów. Schram i Lombaert (155) używając fotopowielaczy uzyskali sprawność rzędu 55% dla ^{14}C oraz 2% dla trytu przy tle około 60 imp/min. Poziom radioaktywności odpowiadający podwójnemu tłu zapewnia stężenie 1—5 m $\mu\text{c/ml}$ dla ^3H i 0,05 m $\mu\text{c/ml}$ dla ^{14}C . Powtarzalność jest dobra,

a odczyty dla roztworów o wzrastającej radioaktywności, układają się liniowo. Aminokwasy znakowane ^3H i ^{14}C mogą być oznaczone w jednym doświadczeniu w różnych pasmach lub przy użyciu dwóch kanałów nawet w tym samym pasmie wymywania. Aktywność ^{14}C rzędu 1000 imp/min można oznaczać przy użyciu komórki *P i e z a* (137) z dokładnością $\pm 5\%$, a powyżej 3000 imp/min z dokładnością 1–3%. Do uzyskania podobnej dokładności dla trytu konieczna jest około czterdziestokrotnie wyższa aktywność. Wyniki można zapisywać na specjalnym rejestratorze *Sargent*, sprzężonym z przelicznikiem lub, po odpowiedniej adaptacji, na rejestratorach znajdujących się w standardowym wyposażeniu analizatorów aminokwasów (rysunek 4).

Szerszy przegląd zagadnień związanych z oznaczaniem wodnych roztworów związków znakowanych ^{14}C opracował *A u t r a t a* (3).



Rys. 4. Jednoczesny zapis kolorymetrycznego oznaczenia metodą ninhydrynową i oznaczenia radioaktywności na przystosowanym rejestratorze *Spedomax* (według 138).

6. Analiza DNP-aminokwasów

Opracowano szereg metod rozdzielania i ilościowego oznaczania DNP-aminokwasów techniką chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (11), polikaprolaktamie (68, 71, 174) i żywicach jonowymiennych (158). Dopiero jednak *Kesner* i wsp. (83) opracowali automatyczną metodę chromatograficznego oznaczania dwunitrofenylowych pochodnych aminokwasów, peptydów i amin na kolumnie (100×1 cm) wypełnionej ściśle standaryzowanym, odpowiednio uwodnionym i zakwaszonym

żelu krzemionkowym. Wymywanie przeprowadzono w gradiencie III rzędowego alkoholu amylowego i metyloetyloketonu w *n*-heptanie. Eluenty są odpowietrzane, wysycane wodą, a po ich przejściu przez kolumnę następuje ciągły pomiar absorpcji roztworu (przy 340 m μ) przepływającego przez komorę przystosowanego samopiszącego spektrofotometru *Beckman DU*. Ostrość rozdziału jest krytycznie zależna od właściwego uwodnienia żelu a następnie od temperatury, którą można programować zależnie od specyficznych potrzeb. Nie udało się jednak tą metodą rozdzielić DNP-leucyny od DNP-izoleucyny. Dla stężeń aminokwasów 0,06—0,2 μ M uzyskano względne odchylenie standardowe 2—9%. Rozdział DNP-pochodnych hydrolizatów białkowych w temperaturze 45°C przy użyciu *varigradu* Petersona i Sobera (134) oraz przy szybkości wypływu 100—150 ml/godz, można uzyskać już w ciągu 5 godz, natomiast rozdzielanie bardziej złożonych mieszanin wymaga 22 godzin.

III. Firmowe analizatory aminokwasów

Pomimo prostej zasady konstrukcji analizatorów aminokwasów, techniczna jej realizacja stawiająca wysokie wymagania wytrzymałościowe i niezawodności działania podzespołów — zważywszy ciągłą (często przez miesiące) pracę aparatów — sprawiła ustalenie się ceny podanych w tablicy 2 analizatorów w granicach 6—18 tysięcy dolarów (109, 110, 111).

Wśród dostępnych handlowo aparatów wyróżnić można 3 rodzaje:

1. Analizatory o najwyższych parametrach: szybkości, czułości i wydoby obsługi oraz umożliwiające podłączenie znacznego wyposażenia dodatkowego, co daje modele drogie, na przykład modele 120 C *Beckmana*, KLA-3 B *Hitachi-Perkin-Elmera* lub K-8000 C i K-8000 VG *Phoenixa*.

2. Modele stosunkowo tanie, nie ustępujące przy tym wiele czułością i szybkością modelom wymienionym w pkt 1, choć oczywiście o węższej skali możliwości, na przykład *Unichrom Beckmana* lub M-6800 *Phoenixa*.

3. Modele — zestawy wszechstronne, luźno ustawione podzespoły lub konstrukcje łatwe do adaptacji dla oznaczeń innych niż aminokwasów, na przykład *Technicon — Auto Analyzer*, *Unichrom Beckmana* i *Biolzyzer 3000 Phoenixa* (136).

Wszystkie wymienione w tablicy 2 aparaty (poza krótką kolumną analizatora *Aminomatu*) wyposażone są w sulfonowanie żywice polistyrenowe zawierające około 8% dwuwinylobenzenu. Są to w zdecydowanej większości żywice sferyczne o różnych firmowo zastrzeżonych nazwach (*Spherical*, *Spherix*, *Chromobeads Resins*), których bliższe oznakowanie informuje o średnicy (zwykle pomiędzy 11 a 25 μ) i możliwie maksymalnym wyrównaniu ziarna, które to czynniki warunkują zdolność rozdzielczą.

Charakterystyczne dane najczęściej używanych

Producent	Podstawowe typy	System	Metoda
<i>BECKMAN Instr. Inc. Spinco Division Palo Alto, Calif. USA</i>	120	Dwukolumnowy	Spackmana i wsp.
	120 B		Spackmana i jej modyfikacje
	<i>Unichrom</i>		„
	120 C		Hubbarda oraz Bensona i Patersona
BENDER u. HOBEIN München BRD	<i>Aminomat</i>		Modyfikacja met. Hanniga
EVANS ELECTROSELENIUM Ltd. Halstead, Essex, England			Spackmana i wsp.
HITACHI-PERKIN-ELMER Ltd. Tokyo, Japan	KLA-3	Dwukolumnowy	Spackmana i wsp. oraz firmowa
	KLA-3 B-1		Spackmana i jej modyfikacja
PHOENIX Precision Instr. Co Philadelphia, Pa. USA	K 8000	Jedno i dwukolumnowy	Spackmana i wsp.
	K 8000B		Spackmana
	K 8000C		Spackmana oraz jej modyfikacja
	K-8000VG		Modyfikacja metod Pieza-Morrisa i Spackmana
	VG-6000 VG-6000B M-6800		Modyf. Pieza-Morrisa „ „ Alternatywnie modyf. Pieza-Morrisa lub Spackmana
TECHNICON Chromatography Corp. Ltd. Chauncey N.Y. USA	<i>System Auto-Analyzer</i>	Jednokolumnowy	Pieza-Morrisa i jej modyfikacje

* Czas kompletnej analizy hydrolizatu białkowego.

Spośród podanych w tabeli 2 analizatorów tylko wszechstronny system *Technicon-Auto-Analyzer* różni się wyraźnie od macierzystej metody Pieza i Morrisa (140) zastosowaniem pomp dozujących, służących do przygotowania mieszanin reagentów oraz do stałego dzielenia połączonych strumieni banieczkami N₂, co ogranicza mieszanie się w spirali reakcyjnej rozdzielonych już na kolumnie związków.

Przykładem wszechstronności systemu *Technicon-Auto-Analyzer* mo-

Tablica 2

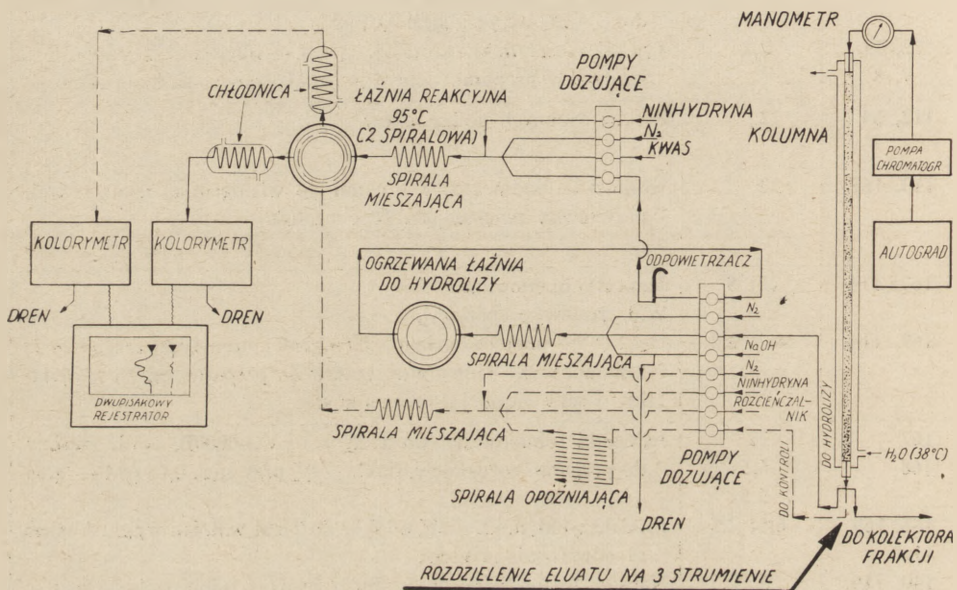
firmowych analizatorów aminokwasów

Literatura	Czas* w godz.	Uwagi
167	22	Pierwszy seryjny analizator. Tak jak i następne typy tej firmy jest obudowaną jednostką
168, 169, 109, 7, 8	6,5; 3	Wyposażenie dodatkowe (w.d.) — zestaw do preparatywnych rozdziałów
„	3	Model tańszy lekki i łatwo przystosowalny do innych oznaczeń, dokł. $\pm 2\%$ już przy stęż. $0,01 \mu\text{M}$
72, 73, 7, 8	2,2	Typ najszybszy, dokł. i czułość j.w., w.d. — integrator i zestawy do rozdziałów preparat., peptydów i znakowanych aminokwasów
112, 64	12	Zestaw osobnych podzespołów
113, 167	22	Jednostka obudowana, 8 kolumn do wielokrotnej analizy, w.d. przystawka zwiększająca $10 \times$ czułość
167, 114	22; 8	Jednostki obudowane.
169, 114	4,2; 2,2	W.d. zestaw preparatywny Dokł. $\pm 2\%$, poziom detekcji — $0,002 \mu\text{M}$, automatyczna regeneracja kolumn, w.d. — integrator, zestaw do preparatywnych rozdziałów i sekwencyjnej 4-krotnej analizy
167	22	Jednostki obudowane poza typem VG-6000B, w.d. zestaw do preparat. rozdziałów, dokł. $\pm 3\%$ przy stęż. $0,05 \mu\text{M}$ — $3 \mu\text{M}$
168	6,5	6,5
168, 169 110	6,5; 2,5	Model szybki, dokł. $\pm 3\%$ od $0,02$ do $2 \mu\text{M}$ w.d. jak wyżej: Analiza płynów fizjol. 11 godz.
140, 110, 169, 110	5; 2,5	Najwszechstronniejszy analizator tej firmy (w odniesieniu do analizy aminokwasów). duża czułość: $0,001 \mu\text{M}$ przy rozszerzonej skali
140, 110	5	Dokł. $\pm 3\%$. W zakresie od $0,02$ — $2 \mu\text{M}$ posiadają varigrad. zestaw luźnych podzespołów
„	5	
110	5 lub 2,5	Model tańszy, mały, szybki.
140, 110	21; 6; 4,5; 3	Jest to jeden z zestawów luźnych podzespołów tego wszechstronnego systemu. Czas jest zależny od rodzaju żywicy. Dokł. $\pm 3\%$ już w stęż. $0,01 \mu\text{M}$. W.d. — układ do 5-kolumnowej, sekwencyjnej analizy.

gą być z jednej strony zestawy zdolne do jednoczesnego oznaczania 8-miu (25) lub nawet 10-ciu związków (21, 179) w 1 ml surowicy krwi, a z drugiej zaś — opracowany przez C a t r a v a s a (29) system rozdziału i wstępnej charakterystyki peptydów (rysunek 5).

W metodzie tej enzymatyczny eluat hydrolizatu białka po kolumnowym rozdziale według metody S c h r o e d e r a i wsp. (156) zostaje następnie rozszczepiony na 3 strumienie, z których największy trafia do

kolektora frakcji, a dwa mniejsze do układów dozujących. Jeden z nich (strumień A) jest próbą kontrolną i po przeprowadzeniu reakcji ninhydrynowej rejestrator notuje jego absorpcję, natomiast strumień B poddawany jest w teflonowej spirali ogrzewaniu — hydrolizie alkalicznej, zobojętnianiu, a po wywołaniu reakcji barwnej, następuje pomiar absorpcji zhydrolizowanych peptydów i rejestrator notuje uzyskane wartości równoległe z odczytami próby kontrolnej. Porównanie rozmiarów nachodzących na siebie szczytów (przed i po hydrolizie) charakteryzuje wielkość rozdzielanych peptydów, a niekiedy pozwala identyfikować pojedyncze aminokwasy.



Rys. 5. Schemat rozdzielania i charakterystyki peptydów przez ich hydrolizę według Catravasa (według 29).

Jako wyposażenie dodatkowe szczególnie cenne są:

1. Integratory oferowane przez Beckmana (Model 125 Digital Integrator (109)) oraz Hitachi-Perkin-Elmera (Model 194 B Automatic Printing Integrator (114)), z pomocą których wynik analizy otrzymujemy w postaci drukowanej taśmy zawierającej scałkowane powierzchnie kolejnych szczytów danego chromatogramu.

2. Zestaw do preparatywnych rozdzielów z jednoczesnym normalnym zapisem (dzięki nierównemu rozszczepieniu strumienia eluatu) uzupełnionym zaznaczeniem pozycji odpowiadających kolejnym zebranych przez kolektor frakcjom.

Poza wymienionymi w tablicy dwiema firmami Japan Electron Optics Lab. Ltd, Tokyo (128, 129, 142), produkuje jeszcze analizatory aminokwasów, które charakteryzują się ze względu na swój uniwersalny, ter-

miczny system oznaczania wyjątkową wszechstronnością, umożliwiającą rozdział i oznaczanie poza aminokwasami i innymi związkami organicznymi także i związków nieorganicznych.

Ponadto w ZSRR (1) i Czechosłowacji (Warsztaty Prototypowe Czechosłowackiej Akademii Nauk (108)) podjęto w ograniczonej skali produkcję tych aparatów.

IV. Automatyczne obliczanie wyników

Obliczenie jednego 20-to aminokwasowego chromatogramu powszechnie stosowaną techniką (167) uproszczonego całkowania powierzchni szczytów tak zwaną metodą $H \times W$ (ang. *Height x Width*) wymaga około 2 godzin (24, 54). W okresie ostatnich 3 lat przedstawiono szereg metod automatycznego obliczania pasm wymywania (20, 46, 54, 80, 94, 141, 176, 193). W metodach tych można wyodrębnić dwa podejścia; jedno, w którym przekształcanie danych następuje po zakończeniu analizy (ang. *off-line system*) (54, 176) i drugie, w którym dane wyjściowe z analizatora przetwarzane są w chwili ich powstawania (ang. *on-line system*) (20, 46, 141, 193).

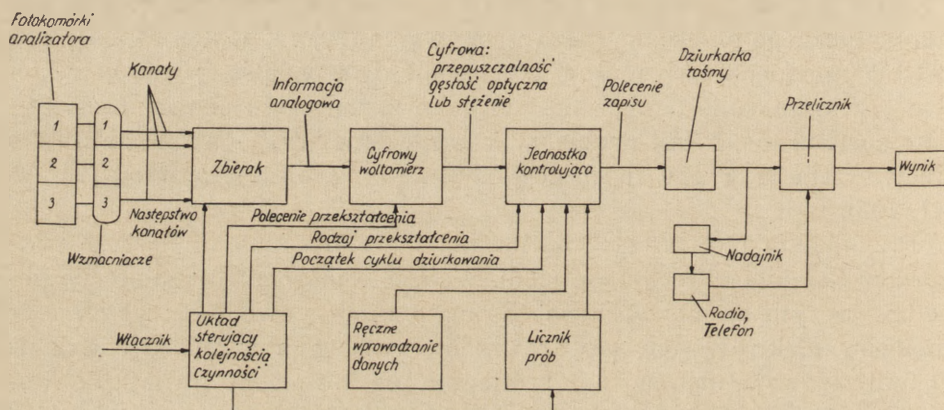
Przykładem pierwszego rozwiązania może być półautomatyczny *Integrator-Calculator Technicon* (176). Wodzenie piórem integratora po obwodzie szczytu aminokwasu na chromatogramie powoduje wytworzenie impulsów elektrycznych proporcjonalnie rosnących w miarę oddalania od linii zerowej. Impulsy te odpowiednio przekształcone trafiają do licznika notującego już bezpośrednio stężenie aminokwasu. W ciągu 15 minut otrzymuje się końcowe dane z dokładnością $\pm 1\%$ nie tracąc przy tym możliwości bezpośredniej kontroli na chromatogramie, co jest wskazane, szczególnie przy zaburzeniach pasma wymywania. Do tej samej grupy rozwiązań należy program opracowany przez *Grahama i Sheldricka* (54). Program ten napisany w systemie ALGOL (130) pozwala uzyskać dla każdego zidentyfikowanego aminokwasu dane wyrażone w μM , ilości reszt na 1000 μg N całkowitego oraz w $\%$ N aminokwasu w stosunku do N całkowitego próbki.

Realizując myśl bezpośredniego przetwarzania danych *Porter i Talley* (141) skonstruowali układ, który przekształca miliwoltowe sygnały analogowe z trzech fotokomórek analizatora na dane cyfrowe zapisane na taśmie dziurkowanej takim systemem kodowania, aby mogła być odczytana przez przelicznik *IBM-1600* (*International Business Machine Co., Philadelphia*). Podobną cyfrową metodę obliczania szczytów wyrażających stężenia aminokwasów, wykorzystującą taśmę perforowaną odczytywaną następnie przez szybki przelicznik *Merlin* przedstawili *Yonda i wsp.* (193). Układ ten jest zdolny do całkowania krzywych nawet w przypadku znacznych zmian linii zerowej lub niesymetrycznych

i źle rozdzielonych szczytów. Porównując maszynową metodę z ręcznym sposobem obliczeń Yonda i wsp. (193) dochodzą do wniosku, że jest ona co najmniej równie dokładna.

Krichewsky, Schwartz i Mage (94) opracowali konstrukcję wykorzystującą cyfrowy woltomierz (ang. *digital voltmeter*) do przekształcania danych bezpośrednio z obwodu liniowego spektrofotometru i zapisywaniu ich na taśmie perforowanej.

Rysunek 6 obrazuje zaprezentowany przez Brooksa (20) blokowy schemat rozwiązania tego zagadnienia (i możliwości jego stosowania), w którym przyjmowane przez zbierak (ang. *scanner*) i wzmacnione sygnały analogowe zostają przekształcone przez cyfrowy woltomierz i skierowane do układu kontrolującego kod wychodzących z niego danych cyfrowych, wybijanych następnie przez dziurkarkę na papierowej taśmie.



Rys. 6. Blokowy schemat programowanego cyfrowego integratora wraz z możliwościami zastosowania (według 20).

Całość jest podporządkowana układowi sterującemu (ang. *timing and control logic*). W metodzie tej podobnie jak i w innych (20, 193) przewidziano możliwość ręcznego wprowadzenia na taśmę dodatkowych danych identyfikacyjnych. Przez zmianę połączeń wewnętrznych można dostosować kod danych wyjściowych do wymagań przetwarzających je maszyny matematycznych. W przypadku braku lokalnego przelicznika pozostaje możliwość automatycznego przekazywania drogą telefoniczną lub radiową (a także odwrotnego otrzymywania) danych z dziurkarki do centralnego ośrodka obliczeniowego.

V. Uwagi końcowe

Porównując zalety i wady dwóch najszerzej stosowanych systemów automatycznego oznaczania aminokwasów: dwukolumnowego — Spackmana, Steina i Moore'a (167) oraz jednokolumnowego systemu

Pieza i Morrissa (140) Hirs (69) stwierdził, że ten ostatni charakteryzuje się zmianami linii zerowej w regionie lizyny. Natomiast zaletą tego systemu jest stosowanie pojedynczej kolumny, a więc nanoszenie o połowę mniejszej próbki przy tej samej czułości metody, a także możliwość rozdzielenia nieco bardziej złożonych mieszanin zasadowych aminozwiązków, bez zmian standardowych warunków analizy. Metoda jednokolumnowa (140) jest jednak bardziej podatna na kłopotliwe blokowanie się kapilarnych przewodów łączących podzespoły z powodu stosowania bardziej stężonych buforów do elucji aminokwasów (87). Pomimo korzyści, jakie daje jednoczesna analiza 8 lub 9 próbek w systemach Simmondsa i Rowlandsa (163, 164) oraz Iglisa (75), analizatory te mają szereg wad, które wobec opracowania szybkich systemów ograniczają ich rozpowszechnienie (75).

Większość przedstawionych metod deklaruje powtarzalność wyników w zakresie $\pm 1-3\%$, lecz jak wykazała międzynarodowa ankieta koordynowana przez Matthiasa i Wagnera (116) oraz nasze własne spostrzeżenia (93) odchylenia w wartościach bezwzględnych dla tych samych próbek analizowanych w różnych laboratoriach mogą być większe. Głównie składają się na to: złe ustalenie stałych integracyjnych dla poszczególnych aminokwasów, zmiana stosunku odczynnika ninhydrynowego do eluatu z kolumn wskutek zapowietrzenia lub wadliwej regulacji pomp oraz złe odczynniki, na przykład zawierający nadtlenki 2-metoksy-etanol, nieodpowiednio czysty reduktant lub azot i inne.

Należy jednakże stwierdzić, że w ramach jednej serii oznaczeń przeprowadzonych na tym samym „załadowaniu” aparatu w odczynnik ninhydrynowy i bufor można rutynowo uzyskać deklarowaną dokładność $\pm 3\%$ (92), tym bardziej, że właściwą kontrolę ułatwiają: każdorazowe stosowanie standardu wewnętrznego (159, 186) jak np. norleucyny (54), β -2-tionyloalaniny lub kwasu β -guanidyno- α -aminopropionowego (170), stosunkowo częste analizowanie pełnej mieszaniny standardowej oraz fakt, że większość zaburzeń w pracy aparatu natychmiast uzewnętrznia się na wykresie pasm wymywania.

Chociaż analizatory oparte na cieczowej chromatografii kolumnowej zdecydowanie przewyższają inne metody ilościowej analizy aminokwasów (100), to jednak ostatnie osiągnięcia chromatografii gazowej aminokwasów i ich DNP lub PTH pochodnych (13, 35, 49, 56, 97, 98, 106, 160, 161) pozwalają przypuszczać, że ta wszechstronna, czuła i szybka metoda znajdzie szerokie zastosowanie w analizie aminokwasów.

Rozwój metod automatycznej analizy aminokwasów jest wymownym przykładem ostro rysującego się ogólnego dążenia do automatyzacji metod chemii i biochemii analitycznej (196). Automatyczne metody oznaczeń opracowane zostały już dla setek związków (10, 30, 111, 157, 178), spośród których przykładowo wymienimy kilka grup: oznaczanie azotu ogólnego (45, 107, 177), peptydów (16, 29, 156) wraz z ich automatyczną syntezą

(117, 118), automatyzację metod oznaczania białek (16, 33, 43, 50, 105, 145, 181), enzymów (10, 66, 157, 170), antybiotyków (18, 39), nukleotydów i kwasów nukleinowych (28, 127, 136, 188), witamin (40, 111), aminocukrów i ich pochodnych (4, 78, 175, 185), cukrów i pochodnych (2, 5, 187) oraz ogromnej większości rutynowych analiz klinicznych (25, 111).

Dynamiczny rozwój automatycznych metod analitycznych zwiększa tempo i szanse rozwiązywania wielu problemów biochemii i nauk pokrewnych.

Autorzy dziękują producentom analizatorów aminokwasów oraz wszystkim tym, którzy przesłali im wyczerpujące materiały dotyczące omówionego zagadnienia.

Addendum

Literatura w tym artykule została ujęta do połowy 1966 r. Już po napisaniu artykułu osiągnięto dalsze skrócenie czasu analizy aminokwasów, w płynach fizjologicznych do 6 godzin, a w hydrolizatach białkowych do 110 minut (D. H. Spackman, *Fed. Proc.* **25**, 198 (1966)). Zastosowanie w modelu 2 analizatora *Hitachi-Perkin-Elmer* typu *KLA 3B* (114), zmodyfikowanego mechanizmu wymiany pomiędzy osadzonymi na żywicy jonami Zn^{2+} a rozdzielanymi aminokwasami pozwala na rozdział w ciągu 105 min. (Arikawa Y., Makino I., *Fed. Proc.* **25**, 786 (1966)).

Opracowano także szybką (7,5 godz.) metodę rozdziału peptydów (Benson J. V., Jr., Jones R. T., Cormick J., Patterson J. A., *Anal. Biochem.* **16**, 91 (1966)), tryptofanu (90 min.) Robel E. J., *Anal. Biochem.* **18**, 406 (1967)), tyrozyny i fenyloalaniny (Mechanic G., Efron M. L., Skih V. E., *Anal. Biochem.* **16**, 420 (1966)), waliny, alloizoleucyny i leucyny a także homocystyny i cystyny oraz homocytruliny i cytruliny w ciągu 15–60 min. (Benson J. V., Jr., Cormick J., Patterson J. A., *Anal. Biochem.* **18**, 481 (1967)).

Ponadto wyprodukowano specjalny analizator (*Phoenix PKU Micro Analyzer*) dla celów diagnostyki zaburzeń metabolizmu aminokwasów (110).

LITERATURA

1. Aleksejenko P., w *Sowremiennoje Miedoty w Biochimii*, tom I, red. W. N. Orechowicz, Moskwa 1964, str. 129.
2. Arwidi B., Samuelson O., *Svensk Kemisk Tidskrift* **77**, 84 (1965).
3. Autrata R., *Chemicke Listy* **58**, 381 (1964).
4. Balazs E. A., Berntsen K. O., Karossa J., Swann D. A., *Anal. Biochem.* **12**, 559 (1965).
5. Balazs E. A., Berntsen K. O., Karossa J., Swann D. A., *Anal. Biochem.* **12**, 547 (1965).
6. Beisenherz G., Boltze H. J., Bücher Th., Czok R., Garbade K. H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G., *Z. Naturforschg* **8b**, 555 (1953).
7. Benson J. V., Patterson J. A., *Anal. Chem.* **37**, 1108 (1965).
8. Benson J. V., Patterson J. A., *Anal. Biochem.* **13**, 265 (1965).

9. Benson J. V., Patterson J. A., *Fed. Proc.* **23**, 371 (1964).
10. Bibliography of Automated Enzyme Research, TECHNICON Instr. Corp., Chauncey New York (1965).
11. Biserte G., Holleman J. W., Holleman-Dehove J., Sautiere P., *Chrom. Rev.* **2**, 59 (1960).
12. Blaedel W. J., Todd J. W., *Anal. Chem.* **33**, 205 (1961).
13. Blau K., Darbre A., *J. Chrom.* **17**, 31, 445 (1965).
14. Block R. J., Mandl R. H., *Biochem.* **81**, 37 (1961).
15. Block R. J., Mandl R. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 87 (1962).
16. Bonnafé M., *Chromatogr. Symp. Soc. Belg. Sci. Pharm.* **2**, 285 (1962).
17. Bonnafé M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**, 172 (1964).
18. Bomstein J., Evans W. G., Shepp J. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 589 (1965).
19. Braunitzer G., *Angew. Chemie* **12**, 485 (1960).
20. Brooks A., Technicon Int' l. Symp. Sept. 16—18 New York 1964.
21. Bryan D. J., Weame J. L., Vian A., Musser A. W., Schoonmaker F. W., Thiers R. E., *Clin. Chem.* **12**, 137 (1966).
22. Bulletin Beckman-Spinco S. B.—198 C (1966).
23. Bulletin Beckman-Spinco S. p (P-AAA E) 8. 65 (2.5 M (1965).
24. Bulletin Phoenix P. I. Co. K-8000-B (1964).
25. Bulletin N° MU 8—1 Technicon Multi-8-Auto Analyzer (1964).
26. Cadavid N. G., Paladini A. C., *Anal. Biochem.* **9**, 179 (1964).
27. Calmon C., Kressman T. R. E. Ion Exchangers in Organic and Biochemistry, Interscience, New York 1957.
28. Cantoni G. L., Gelboin H. V., Lubarsky S. W., Richards H. H., Singer M. F., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 354 (1962).
29. Catravas G. N., *Anal. Chem.* **36**, 1146 (1964).
30. Conference on Automation in Industrial Pharmaceutical Process and Quality Control. Jan. 6—8 (1965), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 487—858 (1965).
31. Corfield M. C., Robson A., *Biochem. J.* **84**, 146 (1962).
32. Coulson R. A., Hernandez Th., Byers V., *Anal. Biochem.* **10**, 159 (1965).
33. Cowley L. V., *Clin. Chim. Acta* **11**, 386 (1965).
34. Crawhall J. C., Thompson J. C., Bradley K. H., *Anal. Biochem.* **14**, 405 (1966).
35. Cruickshank P. A., Sheehan J. C., *Anal. Chem.* **36**, 1191 (1964).
36. Davies C., *Biochem. J.* **45**, 38 (1949).
37. DeMarco C., Coletta M., Cavallini D., *J. Chrom.* **20**, 500 (1965).
38. De Marco C., Mosti R., Cavallini D., *J. Chrom.* **18**, 492 (1965).
39. Dewart R., Naudts F., Lhoest W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 686 (1965).
40. Down N. E., Killard A. M., Pazdera H. J., Ferrari A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 558 (1965).
41. Dus K., Dekker M., Smith R. M., *Anal. Biochem.* **11**, 312 (1965).
42. Eastoe J. E., *Chem. Ind.* **25** (1966).
43. Failing J. F., Buckley M. W., Zak B., *Am. J. Med. Technol.* **27**, 177 (1961).
44. Fennell T. R., *Microchem. J.* **10**, 103 (1966).
45. Ferrari A., Catanzaro E., Russo-Alesi F., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 602 (1965).
46. Frazer R. D. B., Inglis A. S., Miller A., *Anal. Biochem.* **7**, 247 (1964).
47. Fryer E. H., Doniesienie osobiste (1965).

48. Funt B. L., Hetherington A., *Science* **129**, 1429 (1959).
49. Gehrke W., Shahrokhi F., 150-th Amer. Chem. Soc. Natl. Meeting, Anal. Div., Atlantic City Sept. 12—17 (1965).
50. Gerke J. R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 722 (1965).
51. Glasser L., Ganzler R. J., Troy D. J., *Rev. Sci. Inst.* **33**, 1062 (1962).
52. Glueckauf E., *Trans. Faraday Soc.* **51**, 34 (1955).
53. Glueckauf E., *Ion Exchange and Its Applications*, Soc. Chem. Ind. London 1955.
54. Graham G. N., Sheldrick B., *Biochem. J.* **96**, 517 (1965).
55. Grant D. R., *Anal. Biochem.* **6**, 109 (1963).
56. Hagen P. B., Blacke W., *Canad. J. Biochem.* **43**, 309 (1965).
57. Hamilton P. B., Anderson R. A., *Anal. Chem.* **31**, 1504 (1959).
58. Hamilton P. B., Bogue D. C., Anderson R. A., *Anal. Chem.* **32**, 1782 (1960).
59. Hamilton P. B., *Anal. Chem.* **30**, 914 (1958).
60. Hamilton P. B., *Anal. Chem.* **32**, 1779 (1960).
61. Hamilton P. B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 55 (1962).
62. Hamilton P. B., *Anal. Chem.* **35**, 2055 (1963).
63. Kesner L., Muntwyler E., Griffin G. E., Abrams J., *Anal. Chem.*
64. Hannig K., *Clin. Chim. Acta* **4**, 51 (1959).
65. Harubraens L., *Svensk. Kem. Tids.* **75**, 638 (1963).
66. Hazen G. G., Hause J. A., Hubicki J. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 761 (1965).
67. Helfferich F., *Ionenaustauscher t. I*, Verlag Chemie, Weinheim, 1959.
68. Hille E., *Biochem. Z.* **133**, 269 (1960).
69. Hirs C. H. W., *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 597 (1964).
70. Hochstrasser H., *TECHNICON Int'l Symp.* New York Sept. 16—18 (1964).
71. Hörmann H., Portatius H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie* **315**, 141 (1959).
72. Hubbard R. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 679 (1965).
73. Hubbard R. W., Kremen D. M., *Anal. Biochem.* **12**, 593 (1965).
74. Hu C. L., Rending V. V. McComp E. A., *J. Chrom.* **19**, 512 (1965).
75. Inglis A. S., *Anal. Biochem.* **7**, 168 (1964).
76. *Instruction Manual for the operation of the Phoenix Amino Acid Analyzer.* Phoenix Prec. Instr. Co., Philadelphia (1962).
77. Ischii S., *J. Biochem.* **43**, 531 (1956).
78. Jacobs S., *Biochem. J.* **87**, 30 P (1963).
79. Janicki J., Kowalczyk J., Warchalewski J., *Chem. Anal.* **12**, 115 (1967).
80. Johnson D. F., Francois D., Riggle G. C., Ramsden Ch. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 792 (1965).
81. Kasai T., Obata Y., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **39**, 319 (1965).
82. Kemula W., Witwicki J., *Roczn. Chemii* **29**, 1153 (1955).
83. Kesner L., Muntwyler E., Griffin G. E., Abrams J., *Anal. Chem.* **35**, 83 (1963).
84. King J. S., (Jr.), *Clin. Chim. Acta* **9**, 441 (1964).
85. King J. S. (Jr.), *TECHNICON Int'l Symp.*, New York Sept. 16—18 (1964).
86. Kirkpatrick Ch. H., Anderson R. A., *J. Chrom.* **14**, 295 (1964).
87. Kirschenbaum D. M., Podwyszyński E., *Anal. Biochem.* **12**, 189 (1965).
88. Kirsten E., Kirsten R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 76 (1962).
89. Kirsten E., Kirsten R., *Biochem. Z.* **339**, 287 (1964).
90. Komintz D. R., *J. Chrom.* **9**, 253 (1962).

91. Kowalczyk J., Materiały II Ogólnopolskiej Konferencji Chromatograficznej, Lublin 13—14.IX.1963, str. 113.
92. Kowalczyk J., Warchalewski J., dane nie publikowane.
93. Krampitz G., Wieneke J., *Z. Tierphysiol. Tierernährung, Futtermittelk.* **18**, 129 (1963).
94. Krichewsky M. J., Schwartz J., Mage M., *Anal. Biochem.* **12**, 94 (1965).
95. Krishnaswamy P. R., Rao D., Ananthaswamy H. N., *Anal. Biochem.* **11**, 582 (1965).
96. Kutzman Ch., Smith P. Jr., Snyder D. G., *Anal. Biochem.* **12**, 282 94 (1965).
97. Lamkin W. M., Gehrke C. W., *Anal. Chem.* **37**, 383 (1965).
98. Landowne K. A., Lipsky S. R., *Nature* **199**, 141 (1963).
99. Larsen I., *Science Tools* (The LKB Instr. J.) **12**, 24 (1965).
100. Latimer R. A., VIII-th Int. Congress of Microbiology, Montreal, Canada (1962). Recent Progress in Microbiology. VIII Univ. of Toronto Press, str. 347 (1962).
101. Levis O. A. M., *Nature* **209**, 1239 (1966).
102. Leyko W., *Post. Biochem.* **8**, 305 (1962).
103. Lipiński B., *Post. Biochem.* **9**, 353 (1963).
104. Maleknia N., Padieu P., Thireau A. M., Abstr. VI Intern. Congr. Biochem., New York 1964, II-122.
105. Mandl R. H., *Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq.* **9**, 81 (1961).
106. Marcucci F., Mussini E., Poy F., Gagliardi P., *J. Chrom.* **18**, 487 (1965).
107. Marten J. F., Catanzaro E., *Analyst* **91**, 42 (1966).
108. Materiały prospektowe firmy Vyvojove Dilny, CSAV, Praha 1965.
109. Materiały prospektowe firmy Beckman Instr. Inc., Spinco Division (1961—1967).
110. Materiały prospektowe firmy: Phoenix Prec. Instr. Co. (1961—1967).
111. Materiały prospektowe firmy: Technicon Chromatography Corp. (1962—1966).
112. Materiały prospektowe firmy Bender und Hobein (1965).
113. Materiały prospektowe firmy: Evans Electro Selenium Ltd. (1965).
114. Materiały prospektowe firmy: Hitachi-Perkin-Elmer (1966—1967).
115. Matthias W., *Protides Biol. Fluids, Proc. Colloq.* **8**, 74 (1960).
116. Matthias W., Wagner J., *J. Chrom.* **26**, 4 (1967).
117. Merrifield B., *Science* **150**, 178 (1965).
118. Merrifield B., Stewart J. M., *Nature* **207**, 522 (1965).
119. Moore S., *J. Biol. Chem.* **238**, 235 (1963).
120. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **176**, 367 (1948).
121. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **178**, 53 (1949).
122. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **192**, 663 (1951).
123. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 893 (1954).
124. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 907 (1954).
125. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H., *Anal. Chem.* **30**, 1185 (1958).
126. Moore S., Stein W. H., *Methods in Enzymology*, tom VI, red S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1963, str. 819.
127. Munro H. N., Fleck A., *Analyst* **91**, 78 (1966).
128. Naono T., Pittsburg Conf. of Analyt. Chem. and Applied Spectroscopy, March 3, 1964.
129. Naono T., A Method of Liquid Column Chromatography Automatic Recording—materiały otrzymane z Japan Electron Optics Laboratory Co. Ltd. (JEOL) Tokyo (1965).

130. Naur P., *Comput. J.* **5**, 349 (1963).
131. Orr J. C., *Nature* **205**, 1008 (1965).
132. Oreskes I., Cantor F., Cupfer S., *Anal. Chem.* **37**, 1720 (1965).
133. Padieu P., Maleknia N., Thireau A. M., *Bull. Soc. Chim. France* **12**, 2960 (1963).
134. Peterson E. A., Sober H. A., *Anal. Chem.* **31**, 857 (1959).
135. Phoenix Instrumentation Data Sheet 8813—10064 (1965).
136. Phoenix Biolyzer 3000. *Fed. Proc.* **24**, 40a (1965).
137. Piez K. A., *Anal. Biochem.* **4**, 444 (1962).
138. Piez K. A., Eagle H., *J. Biol. Chem.* **231**, 533 (1958).
139. Piez K. A., Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 24 (1959).
140. Piez K. A., Morris L., *Anal. Biochem.* **1**, 187 (1960).
141. Porter W. L., Talley E. A., *Anal. Chem.* **36**, 1692 (1964).
142. Prospekt JEOL—Japan, 1418 Nakagami, Akishima, Tokyo.
143. Rosen H., *Archiv. Biochem. Biophys.* **67**, 10 (1957).
144. Rosen H., Bernard C. W., Levenson S. M., *Anal. Biochem.* **4**, 213 (1962).
145. Roubal W. T., Tappel A. L., *Anal. Biochem.* **9**, 211 (1964).
146. Samuelson O., *Jonity w chemii analitycznej* (tł. z ang.) PWN, Warszawa 1958.
147. Satake K., Matsuo A., TECHNICON Symp. on Auto Analysis Tokyo, Feb. 15 (1965).
148. Satake K., Matsuo A., Take T., *J. Biochem.* **58**, 90 (1965).
149. Satake K., Take T., Matsuo A., Takazi K., Hiraga Y., *J. Japan Biochem. Soc.* **36**, 669 (1964).
150. Schilling E. D., Burchill P. I., Coffman J. R., Clayton R. A., *Chem. Eng. News* **26**, 36 (1961).
151. Schilling E. D., Burchill P. I., Clayton R. A., *Anal. Biochem.* **5**, 1 (1963).
152. Schram E., Lombaert R., *Anal. Chim. Acta* **17**, 417 (1957).
153. Schram E., Lombaert R., *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* **68**, 845 (1960).
154. Schram E., Lombaert R., *Anal. Chem.* **33**, 1134 (1961).
155. Schram E., Lombaert R., *Anal. Biochem.* **3**, 68 (1962).
156. Schroeder W. A., Jones R. T., Cormick J., McCalla K., *Anal. Chem.* **34**, 1570 (1962).
157. Schwartz M. K., Bodansky, *Methods Biochem. Anal.* **11**, 211 (1963).
158. Seki T., *J. Biochem.* **47**, 253 (1960).
159. Siegel F. L., Roach M. K., *Anal. Chem.* **33**, 1628 (1961).
160. Sikorski Z., *Chromatografia Gazowa w Analizie Żywności*, WPL, Warszawa 1964.
161. Sikorski Z., *Przem. Spoż.* **19**, 19 (1965).
162. Simmonds D. H., *Anal. Chem.* **30**, 1043 (1958).
163. Simmonds D. H., Rowlands R. J., *Anal. Chem.* **32**, 256 (1960).
164. Simmonds D. H., Rowlands R. J., *Anal. Chem.* **32**, 259 (1960).
165. Skodak F. I., Wong F. F., White L. M., *Anal. Biochem.* **14**, 71 (1966).
166. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., *Fed. Proc.* **15**, 358 (1956).
167. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
168. Spackman D. H., *Fed. Proc.* **22**, 244 (1963).
169. Spackman D. H., *Fed. Proc.* **23**, 371 (1964).
170. Stefanye D., Spero L., *Anal. Biochem.* **8**, 265 (1964).
171. Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **176**, 337 (1948).
172. Stein H. H., Glasky A. J., Roderick W. R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **130**, 751 (1965).

173. Steinberg D. *Anal. Biochem.* **1**, 23 (1960).
174. Steuerle H., Hille E., *Biochem. Z.* **331**, 220 (1959).
175. Swann D. A., Balazs E. A., *Anal. Biochem.* **12**, 565 (1965).
176. TECHNICON Integrator-Calculator (TJC) Prospect (1965).
177. Tefft M. L., Gustin M. G., *Microchem. J.* **10**, 175 (1966).
178. The Technicon Auto-Analyzer Bibliography, Chauncey, New York 1964.
179. Thiers R. E., Bryan J., Oglesby K., *Clin. Chem.* **12**, 120 (1966).
180. Thomson A. R., Miles B. J., *Nature* **203**, 483 (1964).
181. Toporek M., Philipp L. J., *J. Chrom.* **20**, 299 (1965).
182. Typical Applications of the Automatic Amino Acid Analyzer, Beckman Instruments Inc.—Spinco Division, Palo Alto, California 1964.
183. Ullrich K. J., Hampel A., *Pflügers Archiv.* **268**, 177 (1958).
184. Wainer A., *J. Chrom.* **21**, 126 (1966).
185. Walbourg E. F. (Jr.), Cob III B. F., Adams-Mayne M., Ward D. N., *Anal. Biochem.* **6**, 367 (1963).
186. Walsch K. A., Brown J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 596 (1962).
187. Weber P., Bornstein I., Winzler R. J., *Anal. Biochem.* **14**, 100 (1966).
188. Weinstein L. H., Bozarth R. F., Porter C. A., Mandl R. H., Tweedy B. C., *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **22**, 389 (1964).
189. Winter G. D., Technicon Intl. Symp. Sept. 16—18 1964. New York.
190. Winter G., Technicon Symp. on Auto Analysis Tokyo, Feb. 15 (1965).
191. Wood W. A., Gilford S. R., *Anal. Biochem.* **2**, 589, 601 (1961).
192. Van Deemter J. J., Zuiderweg F. J., Klinkenberg A., *Chem. Eng. Sci.* **5**, 271 (1956).
193. Yonda A., Filmer D. L., Pate H., Alonzo N., Hirs C. H. W., *Anal. Biochem.* **10**, 53 (1965).
194. Zacharius R. M., Talley E. A., *J. Chrom.* **7**, 51 (1962).
195. Zacharius R. M., Talley E. A., *Anal. Chem.* **34**, 1551 (1962).
196. Zagórski Z. P., Automatyzacja w chemii analitycznej, W. N. T., Warszawa 1966.

TADEUSZ KORZYBSKI*

Porównanie klasyfikacji i terminologii enzymów Międzynarodowej Unii Biochemicznej z poprzednią klasyfikacją i terminologią

The Comparison of Enzyme Classification and Nomenclature of the International Union of Biochemistry with Previous Classification and Nomenclature

A comparison is made between the modern enzyme nomenclature and classification of the International Union of Biochemistry with previous group names of enzymes that have been accepted as trivial ones.

Komisja Enzymowa Międzynarodowej Unii Biochemicznej (I.U.B.) stworzyła w 1961 roku nową systematykę enzymów (1, 4), całkowicie związaną z jednocześnie stworzonymi zasadami systematycznej nomenklatury enzymów. Systematyka ta została uzupełniona w 1964 roku (5, 6). Poprzednio posługiwano się nazwami, które Komisja Enzymowa najczęściej zakwalifikowała jako potoczne. Te ostatnie tylko częściowo pokrywają się z nową systematyką. Poprzednie nazwy klasyfikowano w pewne grupy, np. dehydrogenazy, reduktazy, oksydazy itd. Przetłumaczenie tych dawnych nazw na nowe systematyczne, jest równoznaczne z przyporządkowaniem poszczególnych enzymów do nowych grup systematycznych, lub ze znalezieniem miejsca danego enzymu w nowej systematyce (2, 3). Przy próbach przetłumaczenia dawnych nazw napotyka się na pewne trudności, których nie usuwają nawet alfabetyczne wykazy enzymów. Z zasady nazwy systematyczne nie informują o stwierdzonym doświadczalnie kierunku reakcji. Odnosi się to zwłaszcza do klas 1 i 4, co precyzuje reguła 12 Komisji Enzymowej (5, 6). W wykazie enzymów (załącznik E) Międzynarodowej Unii Biochemicznej (5, 6) kierunku tego nie uwidoczniło również w sposobie formułowania reakcji katalizowanych przez enzymy. Dla każdej bowiem klasy enzymów przyjęto jednolity kierunek katalizowanych reakcji, niezależnie od kierunku stwierdzonego doświadczalnie. Jedynie nazwy potoczne, więc dawne, informują o doświadczalnie stwierdzonym kierunku reakcji. Jest to specjalnie ważne dla enzymów klas oksydoreduktaz (Klasa 1) i liaz (Klasa 4). Wszystko to stwarza pewne trudności w opanowaniu obecnej systematyki i nomenklatury przy konfrontacji z nomenklaturą uprzednią. Przedstawione w obecnej publikacji tablice uwidoczniają istotne cechy reakcji katalizowanych przez nowe grupy enzymów, podano dla nich także nazwy potocz-

* Prof. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa.

ne, lub poprzednio używane. Tablice ponadto zawierają zestawienia nazw enzymów według nowych i dawnych grup systematycznych.

Tablica 1

Klasa I
OKSYDOREDUKTAZY

Klasyfikacja *I.U.B.* według donatorów wodoru (podklasy) i akceptorów wodoru (pod-podklasy)

Podklasy	Donatory wodoru	Uwagi
1.1.-.- 1.2.-.- 1.3.-.-	CH-OH { CHO CO CH-CH	grupy bez N
1.4.-.- 1.5.-.- 1.6.-.- 1.7.-.-	CH-NH ₂ C-NH { NAD zred. NADP zred. grupa z N	grupy z N
1.8.-.- 1.9.-.- 1.10.-.-	grupa z S hem (Fe ²⁺) dwufenol	grupy z S, Fe i inne
1.11.-.- 1.12.-.- 1.13.-.- 1.14.-.-	AKCEPTOREM WODORU jest H ₂ O ₂ H ₂ jeden donator, włącza tlen (oksygenazy) dwa donatory, jeden z nich włącza tlen (hydroksylazy)	inne grupy chemiczne
Pod-podklasy	Akceptory wodoru	Uwagi
1.-.1.-	{ NAD NADP	Dla enzymów pod-podklas 1.11.1- (od 1.11.1.3 do 9), 1.12.1.- i 1.13.1.9 akceptorem wodoru nie jest NAD(P).
1.-.2.- 1.-.3.- 1.-.4.- 1.-.5.- 1.-.6.- 1.-.99.-	cytochrom O ₂ -S-S- (np. liponian) chinon, lub związek pokrewny grupa z N inne	Produktem reakcji jest najczęściej H ₂ O ₂ , z wyjątkiem enzymów 1.8.3.2, 1.9.3.1 i 2, 1.10.3.1, 2 i 3.

Tablica 2

Klasa 1

OKSYDOREDUKTAZY

Podklasy z charakterystycznymi dla nich donatorami wodoru i rozmieszczenie w nich enzymów według grupowych dawnych nazw, obecnie potocznych*

Klasyfikacja I.U.B.			Liczby enzymów									
			Grupowe nazwy potoczne, klasyfikacja poprzednia									
Podklasy	Donatory wodoru		Dechydrogenazy	Reduktazy	Oksydazy	Hydroksylazy	Oksygenazy	Peroxysydazy	Katalazy	Transhydrogenazy	Hydrogenazy	Jodinyzy
	stan zredukowany	stan utleniony										
Grupy bez N												
1.1.-.-	CH-OH	CO	62	17	9	—	—	—	—	—	—	—
1.2.-.-	CHO	COOH	24	—	4	—	—	—	—	—	—	—
	CO	np. acyl										
1.3.-.-	CH-CH	C=C	9	3	—	—	—	—	—	—	—	—
Grupy z N												
1.4.-.-	CH-NH ₂ (+H ₂ O)	CO (+NH ₃)	5	1	6	—	—	—	—	—	—	—
1.5.-.-	CH-NH	C=N	3	2	3	—	—	—	—	—	—	—
1.6.-.-	NAD zred.	NAD	4	13	—	—	—	—	—	1	—	—
	NADP zred.	NADP										
1.7.-.-	grupa z N	grupa z N o wyższym stopniu utlenienia	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—
Grupy z S, Fe i inne												
1.8.-.-	grupa z S, np. SH	grupa z S o wyższym stopniu utlenienia np. -S-S-	1	3	2	—	—	—	—	1	—	—
1.9.-.-	hem (Fe ²⁺)	hem (Fe ³⁺)	—	1	2	—	—	—	—	—	—	—
1.10.-.-	dwufenol i inne	chinon i inne	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—
Inne grupy chemiczne												
1.11.-.-	AKCEPTOREM WODORU jest H ₂ O ₂	H ₂ +H ₂ O ₂ =2H ₂ O	—	—	—	—	6	1	—	—	—	1
1.12.-.-	H ₂ (cząsteczkowy)	włączanie H ₂ do akceptora	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
1.13.-.-	jeden donator	włączanie tlenu	—	—	—	—	13	—	—	—	—	—
1.14.-.-	dwa donatory	włączanie tlenu do jednego z nich	—	—	—	14	—	—	—	—	—	—
Razem 221 enzymów			108	43	32	14	13	6	1	2	1	1

* W systematyce Międzynarodowej Unii Biochemicznej wyłącznie nazwy potoczne informują o doświadczalnie stwierdzonym kierunku reakcji (patrz tekst)

Tablica 3

Klasa 1
OKSYDOREDUKTAZY

Rozmieszczenie enzymów o różnych grupowych dawnych nazwach, dziś potocznych, w poszczególnych podklasach i pod-podklasach

Podklasy 1.x.-.-	Liczby enzymów						
	Pod-podklasy						
	1.x.1.-	1.x.2.-	1.x.3.-	1.x.4.-	1.x.5.-	1.x.6.-	1.x.99.-
1.1.-.-	d:53 r:17	d:3	o:9	—	—	—	d:6
1.2.-.-	d:19	d:2	o:4	d:2	—	—	d:1
1.3.-.-	d:2 r:3	d:1	d:1	—	—	—	d:5
1.4.-.-	d:5 r:1	—	o:6	—	—	—	—
1.5.-.-	d:3 r:2	—	o:3	—	—	—	—
1.6.-.-	t:1	r:1	—	d:1 r:3	r:1	r:7	d:3 r:1
1.7.-.-	—	—	o:3	—	—	—	r:3
1.8.-.-	r:1	—	o:2	r:1 t:1	d:1	r:1	—
1.9.-.-	—	—	o:2	—	—	r:1	—
1.10.-.-	—	—	o:3	—	—	—	—
1.11.-.-	(6 peroksydaz, 1 katalaza, 1 jodinaza)						
1.12.-.-	(1 hydrogenaza)						
1.13.-.-	(13 oksygenaz)						
1.14.-.-	h:11	h:2	h:1	—	—	—	—

Grupowe dawne nazwy, dziś potoczne i użyte skróty

d — dehydrogenaza

r — reduktaza

o — oksydaza

h — hydroksylaza

t — transhydrogenaza

Tablica 4

Klasa 1
OKSYDOREDUKTAZY

Rozmieszczenie oksydoreduktaz w podklasach i pod-podklasach.
Liczby enzymów o różnych kombinacjach donatorów i akceptorów wodoru

Podklasy	Donatory wodoru	Pod-podklasy							Razem
		1.-.1.-	1.-.2.-	1.-.3.-	1.-.4.-	1.-.5.-	1.-.6.-	1.-.99.-	
		Akceptory wodoru							
		NAD NADP	cyto- chrom	O ₂	-S-S-	chinon lub zw. pokrewny	grupa z N	inne	
1.1.-.-	CH-OH	70	3	9	—	—	—	6	88
1.2.-.-	{CHO CO	19	2	4	2	—	—	1	28
1.3.-.-	CH-CH	5	1	1	—	—	—	5	12
1.4.-.-	CH-NH ₂	6	—	6	—	—	—	—	12
1.5.-.-	C-NH	5	—	3	—	—	—	—	8
1.6.-.-	{NAD zred. NADP zred.	1	1	—	4	1	7	4	18
1.7.-.-	grupa z N	—	—	3	—	—	—	3	6
1.8.-.-	grupa z S	1	—	2	2	1	1	—	7
1.9.-.-	hem (Fe ²⁺)	—	—	2	—	—	1	—	3
1.10.-.-	dwufenol	—	—	3	—	—	—	—	3
1.11.-.-	AKCEPTO- REM WO- DORU jest H ₂ O ₂	(8*)	—	—	—	—	—	—	8
1.12.-.-	H ₂ (cząstecz- kowy)	(1*)	—	—	—	—	—	—	1
1.13.-.-	jeden donator włączy- wanie tlenu	(13*)	—	—	—	—	—	—	13
1.14.-.-	dwa donato- ry, do jed- nego z nich włączanie tlenu	11	2	1	—	—	—	—	14
	Razem	118 (+22)	9	34	8	2	9	19	221**

* Enzymy tych pod-podklas nie używają NAD lub NADP jako akceptorów wodoru.

** Ogólna suma oksydoreduktaz 221 nie jest sumą poszczególnych podklas, ponieważ enzymy podklas 1.11.-.- 1.13.-.- nie zostały zaliczone do żadnej z wymienionych pod-podklas.

Tabela 5

 Klasa 1
 TRANSFERAZY

 Klasyfikacja I.U.B. według przenoszonej grupy wyrażonej ogólnie (podklasy) i szczegółowej (pod-
 -podklasy)

Podklasy	Przenoszona grupa	Liczba enzymów w podklasie	Pod-podklasy	Przenoszona grupa szczegółowej	Liczba enzymów w podpodklasie
2.1.--	Fragmenty je dnowęgłowe	22	2.1.1.-	-CH ₃	11
			2.1.2.-	-CH ₂ OH -CHO i inne	6
			2.1.3.-	-COOH -CO-NH ₂	4
			2.1.4.-	-C(NH ₂) = NH	1
2.2.--	Ugrupowanie zawierające grupę aldehydową lub ketonową	2	2.2.1.-	R-CHO R-CO-R'	2
2.3.--	Acyl	21	2.3.1.-	R-CO-	20
			2.3.2.-	aminoacyl	1
2.4.--	(Glik)ozydy	43	2.4.1.-	Heksozyl	29
			2.4.2.-	Pentozyl	14
2.5.--	Alkil i inne	6	2.5.1.-	Alkil i inne	6
2.6.--	Grupy zawierające N	20	2.6.1.-	-NH ₂	19
			2.6.2.-	= NOH	1
2.7.--	Grupy zawierające P	108	2.7.1.-	AKCEPTOREM grupa alkoholowa	51
			2.7.2.-	AKCEPTOREM grupa karboksylowa	6
			2.7.3.-	AKCEPTOREM grupa zawierająca N	6
			2.7.4.-	AKCEPTOREM grupa zawierająca P	10
			2.7.5.-	Grupa zawierająca P, odtworzenie donatora	4
			2.7.6.-	Grupa pirofosforanowa	2
			2.7.7.-	Grupa nukleotydylowa	26
			2.7.8.-	Inna grupa zawierająca substytuowany fosfor	3
2.8.--	Grupy zawierające S	12	2.8.1.-	Atom S	2
			2.8.2.-	-SO ₃ H	5
			2.8.3.	CoA	5
Ogólna liczba transferaz					232

Tablica 6

Klasa 2
TRANSFERAZY

Rozmieszczenie enzymów o różnych grupowych dawnych nazwach, dziś potocznych w poszczególnych pod-podklasach klasyfikacji *I.U.B.*

Pod-podklasy	Nazwy pod-podklas (<i>I.U.B.</i>)	Liczba enzymów w pod-podklasie	Dawne grupowe nazwy, dziś potoczneTRANSFERAZY	Liczba enzymów w grupie
2.1.1.-	Metylotransferazy (Transmetylazy)	11	Metylo-	11
2.1.2.-	Hydroksymetylotransferazy Formylotransferazy	6	Hydroksymetylo- Formylo-	1 3
2.1.3.-	Karboksylotransferazy Karbamoilotransferazy	4	Formimino- Karboksylo- (Transkarboksylazy) Karbamoilo- (Transkarbamoilazy)	2 2 2
2.1.4.-	Amidynotransferazy	1	Amidyno-	1
2.2.1.-	2	Transketolaza Transaldolaza	1 1
2.3.1.-	Acylotransferazy (Transacylazy)	20	Acylo- Acetylo-	4 16
2.3.2.-	Aminoacylotransferazy	1	(Aminoacylo)-	1
2.4.1.-	Heksozylotransferazy	29	Glukozylo- Glikozylo- Fruktozylo- Galaktozylo- Glukuronylo- Transglukozylaza	17 3 2 2 1 1
2.4.2.-	Pentozylotransferazy	14	Fosforylaza Fosforylaza Rybozylo- Dezoksyrybozylo- Fosforybozylo-	3 5 1 1 7
2.5.1.-	6	Tiaminaza Pirofosforylaza Cyklo- Inne	1 1 1 3

dalszy ciąg tablicy 6

Pod- podklasy	Nazwy pod-podklas (I.U.B.)	Liczba enzymów w pod- podklasie	Dawne grupowe nazwy, dziś potoczne TRANSFERAZY	Liczba enzymów w grupie
2.6.1.-	Aminotransferazy (Transaminazy)	19	Transaminazy = Amino-	19
2.6.3.-	Oksiminotransferazy	1	Oksimino-	1
2.7.1.-	Fosfotransferazy z gru- pą alkoholową jaką akceptorem	50	Kinazy (Glukozylokinazy Fosfoglucozylokinazy)	48
			Fosfodysmutaza	1
			Fosfotransferaza	1
2.7.2.-	Fosfotransferazy z gru- pą karboksylową jako akceptorem	6	Kinazy	6
2.7.3.-	Fosfotransferazy z gru- pą zawierającą azot jako akceptorem	6	Kinazy	6
2.7.4.-	Fosfotransferazy z grupą fosforową jako akceptorem	10	Kinazy	10
2.7.5.-	Fosfotransferazy od- tworzące donatory	4	Mutazy (Fosfomutaza Fosfoglukomutaza Fosfogliceromutaza Dwufosfogliceromutaza)	4
2.7.6.-	Pirofosfotransferazy	2	Pirofosfokinazy	2
2.7.7.-	Nukleotydylotransfe- razy	26	(Grupa przenoszona) transferaza Rybonukleazy Pirofosforylaza	22
			(Grupa przenoszona) fosfotransferaza	3
2.7.8.-	Transferazy innych podstawionych grup fosforowych	3		1
				3
2.8.1.-	Siarkotransferazy	2	Siarko-	2
2.8.2.-	Sulfotransferazy	5	Sulfo-	5
2.8.3.-	CoA-transferazy	5	CoA-transferazy	5

Ogólna liczba enzymów klasy 2

233

Tablica 7

Klasa 3
HYDROLAZY
Klasyfikacja *I.U.B.* według typu wiązania ulegającego hydrolizie

Podklasy	Wiązania ulegające hydrolizie	Liczba enzymów w podklasie	Pod-podklasy	Wiązania ulegające hydrolizie w związkach	Liczba enzymów w podklasie
3.1.--	Estrowe	62	3.1.1.-	Estry karboksylowe	19
			3.1.2.-	Estry tiolowe	9
			3.1.3.-	Monoestry fosforanowe	19
			3.1.4.-	Diestry fosforanowe	8
			3.1.5.-	Monoestry kwasu trójfosforowego	1
			3.1.6.-	Estry kwasu siarkowego	6
3.2.--	Glikozyłowe	45	3.2.1.-	Glikozydy	38
			3.2.2.-	Związki N-glikozyłowe	6
			3.2.3.-	Związki S-glikozyłowe	1
3.3.--	Fterowe	1	3.3.1.-	Tioetery	1
3.4.--	Peptydowe	39	3.4.1.-	Aminoacylopeptydy	4
			3.4.2.-	Peptydyloaminokwasy	3
			3.4.3.-	Dwupeptydy	7
			3.4.4.-	Peptydy, białka	25
3.5.--	C-N niepeptydowe	46	3.5.1.-	Amidy łańcuchowe	18
			3.5.2.-	Amidy cykliczne	7
			3.5.3.-	Amidyny łańcuchowe	6
			3.5.4.-	Amidyny cykliczne	12
			3.5.5.-	Cyjanki	1
			3.5.99.-	Inne związki z wiązaniem C-N	2
3.6.--	Bezwodników kwasowych	12	3.6.1.-	Bezwodniki zawierające grupę fosforylową	12
3.7.--	C-C	3	3.7.1.-	Związki ketonowe	3
3.8.--	Wiązanie halogenków	2	3.8.1.-	Związki C-halogenek	1
			3.8.2.-	Związki P-halogenek	1
3.9.--	Wiązanie P-N	1	3.9.1.-	Związki zawierające wiązanie P-N	1
Ogólna liczba hydrolaz					211

Tablica 8

Klasa 3

HYDROLAZY

Rozmieszczenie enzymów o różnych grupowych dawnych nazwach, dziś potocznych w poszczególnych pod-podklasach klasyfikacji *I.U.B.*

Pod-podklasy	Nazwy pod-podklas	Dawne grupowe nazwy, dziś potoczne	Liczba enzymów danej grupy
3.1.1.-	Hydrolazy estrów karboksylowych esterazy	9
3.1.2.-	Hydrolazy tioloestrów	(substrat)azy	10
		Hydrolazy	8
	 esterazy	1
3.1.3.-	Hydrolazy monoestrów fosforanowych	Fosfatazy	15
		(substrat)azy	4
3.1.4.-	Hydrolazy diestrów fosforanowych esterazy	2
		(substrat)azy	6
3.1.5.-	Hydrolazy monoestrów kwasu trójfosforowego	(substrat)aza	1
3.1.6.-	Hydrolazy estrów kwasu siarkowego	(substrat) sulfataza	6
		Sulfataza (substratowa)	
3.2.1.-	Hydrolazy glikozydów	(substrat)azy	38
3.2.2.-	Hydrolazy związków N-glikozylowych	Nukleozydazy	5
		(substrat)aza	1
3.2.3.-	Hydrolazy związków S-glikozylowych	Tioglukozydaza	1
3.3.1.-	Hydrolazy tioeterów	(substrat)aza	1
3.4.1.-	Hydrolazy α -aminoacylopeptydów	Aminopeptydazy (Imino-)	4
3.4.2.-	Hydrolazy peptydyloaminokwasów	Karboksypeptydazy	3
3.4.3.-	Hydrolazy dwupeptydów	Dipeptydaza (Imino, lub Imido-)	7
3.4.4.-	Hydrolazy peptydylopeptydów	Nazwy własne historyczne	17
	 peptydaza	7
		(substrat)aza	1
3.5.1.-	Hydrolizujące niepeptydowe wiązania C-N w amidach łańcuchowych	(substrat)azy	18
3.5.2.-	Hydrolizujące niepeptydowe wiązania C-N w amidach cyklicznych	(substrat)azy	7
3.5.3.-	Hydrolizujące niepeptydowe wiązania C-N w łańcuchowych amidynach	(substrat)aza	4
		Deiminaza	2
3.5.4.-	Hydrolizujące niepeptydowe wiązania C-N w cyklicznych amidynach	Dezaminazy	9
		Cyklohydrolazy	2
		(substrat)aza	1
3.5.5.-	Hydrolizujące niepeptydowe wiązania C-N w cyjankach	Nitrylaza	1
3.5.99.-	Hydrolizujące niepeptydowe wiązania C-N w innych związkach	(substrat)azy	2

dalszy ciąg tablicy 8

Pod-podklasy	Nazwy pod-podklas	Dawne grupowe nazwy, dziś potoczne	Liczba enzymów danej grupy
3.6.1.-	Działające na bezwodniki zawierające grupę fosforylową	Pirofosfatazy Polifosfatazy (endo-, egzo-) fosfatazy (substrat)azy Apiraza	3 2 2 5 1
3.7.1.-	Działające na związki ketonowe	(substrat)azy	3
3.8.1.-	Działające na wiązania halogenków	(substrat)aza	1
3.9.1.-	Działające na wiązania P-N	(substrat)aza	1

Tablica 9

Klasa 3

HYDROLAZY

Substraty i produkty hydrolaz charakterystyczne dla poszczególnych pod-podklas

Pod-podklasy	Związki ulegające hydrolizie	Produkty hydrolizy
3.1.- ESTRY		
3.1.1.-	$R'-CO-OR$	$R'-COOH$ $HO-R$
3.1.2.-	$R'-CO-SR$	$R'-COOH$ $HS-R$
3.1.3.-	$\begin{array}{c} OH \\ \\ HO-P-OR \\ \\ O \end{array}$	$\begin{array}{c} OH \\ \\ HO-P-OH \\ \\ O \end{array}$ $HO-R$
3.1.4.-	$\begin{array}{c} OH \\ \\ R'O-P-OR \\ \\ O \end{array}$	$\begin{array}{c} OH \\ \\ R'O-P-OH \\ \\ O \end{array}$ $HO-R$
3.1.5.-	$\begin{array}{c} OH \quad OH \quad OH \\ \quad \quad \\ HO-P-O-P-O-P-OR \\ \quad \quad \\ O \quad O \quad O \end{array}$	$\begin{array}{c} OH \quad OH \quad OH \\ \quad \quad \\ HO-P-O-P-O-P-OH \\ \quad \quad \\ O \quad O \quad O \end{array}$ $HO-R$
3.1.6.-	HSO_3-OR	H_2SO_4 $HO-R$

dalszy ciąg tablicy 9

3.2.-.- GLIKOZYDY		
3.2.1.-	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{OR} \\ \\ \text{(O-glikozyd)} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{(cukier)} \\ \\ \text{O} \end{array} \quad \text{HO}-\text{R}$
3.2.2.-	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{N}- \\ \quad \\ \text{(N-glikozyd)} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{(cukier)} \\ \\ \text{O} \end{array} \quad \text{NH}-$
3.2.3.-	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{S}- \\ \quad \\ \text{(S-glikozyd)} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{(cukier)} \\ \\ \text{O} \end{array} \quad \text{HS}-$
3.3.-.- TIOETERY		
3.3.1.-	$\text{R}'-\text{S}-\text{R}$	$\text{R}'-\text{OH} \quad \text{HS}-\text{R}$
3.4.-.- PEPTYDY		
3.4.1.-	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{peptyd} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \quad (\text{H}_2\text{N}) \text{ peptyd}$
3.4.2.-	$\begin{array}{c} \text{peptydylo}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{peptyd(COOH)} \quad \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$
3.4.3.-	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{R} \quad \quad \text{R}_1 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \quad \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{R} \quad \quad \quad \text{R}_1 \end{array}$
3.4.4.-	peptydy, białka	peptydy
3.5.-.- NIEPEPTYDOWE ZWIĄZKI ZAWIERAJĄCE WIĄZANIE C-N		
3.5.1.-	$\text{R}'-\text{CO}-\text{N}-\text{R}$	$\text{R}'-\text{COOH} \quad \text{HN}-\text{R}$
3.5.2.-	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CO} \\ \\ \text{R}'-\text{N}- \\ \text{amidy cykliczne} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{COOH} \\ \\ \text{R}'-\text{NH}- \end{array}$
3.5.3.-	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \backslash \\ \text{NH}_2 \\ \text{amidyny liniowe} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ // \\ \text{C} \\ \backslash \\ \text{NH}_2 \end{array}$
3.5.4.-	$\begin{array}{c} \text{N} \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \backslash \\ \text{NH}_2 \\ \text{amidyny cykliczne} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ // \\ \text{R}-\text{C} \\ \backslash \\ \text{OH} \end{array} \quad \text{NH}_3$
3.5.5.-	$\text{R}-\text{CN}$	$\text{R}-\text{COOH} \quad \text{NH}_3$
3.5.99.-	różne	różne

dalszy ciąg tablicy 9

3.6.-- BEZWODNIKI KWASOWE			
	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{O}-\text{acyl} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	kwasy
3.7.-- KETONY			
3.7.1.--	$\text{R}'-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{R}$	$\text{R}'-\text{COOH}$	$\text{H}_3\text{C}-\text{R}$
3.8.-- HALOGENKI			
3.8.1.--	$-\text{C}-\text{chlorowiec}$	$-\text{C}-\text{OH}$	H-chlorowiec
	$\begin{array}{c} \text{OR}' \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{chlorowiec} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{OR}' \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	H-chlorowiec
3.9.-- ZWIĄZKI ZAWIERAJĄCE WIĄZANIE P-N			
	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{NH}- \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\text{H}_2\text{N}-$

Tablica 10

Klasa 4

LIAZY

Klasyfikacja I.U.B

Według typu wiązania ulegającego niehydrolytycznemu rozszczepieniu (podklasy) i rodzaju grupy odszczepianej (podpodklasy)

Podklasy	Typ wiązania ulegającego niehydrolytycznemu rozszczepieniu	Liczba enzymów w podklasie	Podpodklasy	Nazwa podpodklasy	Liczba enzymów w podpodklasie
4.1.--	C-C	66	4.1.1.-- 4.1.2.-- 4.1.3.--	Karboksy-liazy Aldehydo-liazy Ketokwaso-liazy	39 17 10
4.2.--	C-O	34	4.2.1.-- 4.2.99.--	Hydro-liazy Inne liazy wiązania C-O	28 6
4.3.--	C-N	8	4.3.1.-- 4.3.2.--	Amoniaکو-liazy Amidyno-liazy	6 2
4.4.--	C-S	6	4.4.1.--	Liazy węgiel-siarka	6
4.5.--	C-chlorowiec	1	4.5.1.--	Liazy węgiel-chlorowiec	1
4.99.--	Inne	1	4.99.1.--	Inne	1
Ogólna liczba liazy					116

Tablica 11

Klasa 4

LIAZY

Roźmieszczenie enzymów o róznych grupowych dawnych nazwach, dziś potocznych, w poszczególnych pod-podklasach klasyfikacji *I.U.B.*

Pod-pod-klasy	Nazwy PODKLAS Nazwy pod-podklas	Liczba enzymów w pod-klasie	Dawne grupowe nazwy, dziś potoczne *	Liczba enzymów w grupie
4.1.-.- LIAZY WĘGIEL-WĘGIEL				
4.1.1.-	Karboksy-liazy	39	Dekarboksylazy Karboksylazy	37 2
4.1.2.-	Aldehydo-liazy	17	Aldolazy Ketolazy	14 1
4.1.3.-	Ketokwaso-liazy	10	Liazy Liazy Syntazy	2 5 5
4.2.-.- LIAZY WĘGIEL-TLEN				
4.2.1.-	Hydro-liazy	28	Dehydratazy Hydratazy Syntazy	20 4 4
4.2.99.-	Inne liazy wiązania C-O (poza hydro-liazami)	6	Liazy Syntaza	5 1
4.3.-.- LIAZY WĘGIEL-AZOT				
4.3.1.-	Amoniako-liazy	6	Amoniako-liazy Cyklodezaminaza	5 1
4.3.2.-	Amidyno-liazy	2	Liazy	2
4.4.-.- LIAZY WĘGIEL-SIARKA				
4.4.1.-	Liazy węgiel-siarka	6	Liazy Desulfhydrazy Detiometylaza	3 2 1
4.5.-.-	LIAZY WĘGIEL-HALOGENEK	1	1
4.99.-.-	INNE LIAZY	1	1
Ogólna liczba liaz				116

* Tylko nazwy potoczne informują o stwierdzonym doświadczalnie kierunku reakcji.

Tablica 12

Klasa 4

LIAZY

Związki biorące udział w równaniach reakcji katalizowanych przez enzymy poszczególnych pod-
podklas

Pod-podklasy	Związki stojące po stronie syntezy*, lub ulegające rozpadowi niehydrolitycz- nemu	Związki stojące po stronie rozpadu* (niehydrolitycznego)			
		Odszczepiana grupa	Pozostały związek zawie- rający (najczęściej) podwój- ne wiązanie		
4.1.1.-	KARBOKSY-LIAZY R—COOH	CO ₂	RH		
4.1.2.-	ALDEHYDO-LIAZY $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{C}-\text{R}' \\ \\ \text{H} \end{array}$			R—CHO	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{R}' \\ \end{array}$
4.1.3.-	KETOKWASO-LIAZY $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{R} \\ \\ -\text{C}- \\ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{C} \\ \\ -\text{C}- \\ \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{R} \\ \end{array}$		
4.2.1.-	HYDRO-LIAZY $\begin{array}{c} \text{OH} \ \text{H} \\ \ \ \\ \text{R}-\text{C}-\text{C}-\text{R}' \\ \ \ \\ \text{H} \ \ \text{H} \end{array}$	H ₂ O	R—CH=CH—R'		
	$\begin{array}{c} \text{OH} \ \text{OH} \\ \ \ \\ \text{R}-\text{C}-\text{C}-\text{R}' \\ \ \ \\ \text{H} \ \ \text{H} \end{array}$			H ₂ O	R—CO—CH ₂ —R'
	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{OH} \end{array}$			H ₂ O	CO ₂
4.2.99.-	INNE LIAZY WIĄZANIA C-O				

* Tylko nazwy potoczne informują o stwierdzonym doświadczalnie kierunku reakcji (rozpadu, syntezy)

dalszy ciąg tablicy 12

4.3.1.-	AMONIAKO-LIAZY $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C} - \text{C}- \\ \quad \end{array}$	NH_3	$-\text{C}=\text{C}-$
4.3.2.-	AMIDYNO-LIAZY	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \\ \text{(Kwas argininobursztynowy)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \\ \text{(Arginina)} \end{array}$
4.3.2.2	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{NH}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{C} \quad \text{CH}_2 \\ // \quad \\ \text{N} \quad \text{COOH} \\ \text{(Kwas adenilobursztynowy)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \\ \text{N} \quad \text{COOH} \\ \text{(Kwas adenilowy)} \\ \text{(AMP)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \\ \text{(Kwas fumarowy)} \end{array}$
4.4.1.-	LIAZY WĘGIEL-SIARKA $\text{C}-\text{C}-\text{S}-\text{R}$	$\text{HS}-\text{R}$	$\text{C}=\text{C}$
4.5.1.-	LIAZY WĘGIEL-HALOGENEK $\text{C}-\text{C}-\text{Cl}$	HCl	$\text{C}=\text{C}$

Tablica 13

Klasa 5
IZOMERAZY

Klasyfikacja *I.U.B.* według typu izomeryzacji (podklasy) i charakteru przekształcenia (pod-podklasy)

Podklasy	Typ izomeryzacji	Liczba enzymów w podklasie	Pod-podklasy	Charakter przekształcenia	Liczba enzymów w podpodklasie
5.1.--	Zmiana konfiguracji węgla asymetrycznego	19	5.1.1.--	Zmiany konfiguracji węgla asymetrycznego w aminokwasach	8
			5.1.2.--	Zmiany konfiguracji węgla asymetrycznego w hydroksykwasy i pochodnych	3
			5.1.3.--	Zmiany konfiguracji węgla asymetrycznego w węglowodanach	7
			5.1.99.--	Zmiany konfiguracji węgla asymetrycznego w innych związkach	1
5.2.--	Izomeryzacja <i>cis-trans</i>	4			4
5.3.--	Oksydoredukcja wewnątrzcząsteczkowa	18	5.3.1.--	Aldozy-ketozy	14
			5.3.2.--	Keto-Enolo-	1
			5.3.3.--	Przemieszczanie podwójnych wiązań	3
5.4.--	Przemieszczanie wewnątrzcząsteczkowe	4	5.4.1.--	Przemieszczanie acyli	1
			5.4.2.--	Przemieszczanie rodnika fosforylowego	1
			5.4.99.--	Przemieszczanie innych grup	2
5.5.--	Liazy wewnątrzcząsteczkowe				1
5.99.--	Inne rodzaje izomeryzacji				1

Tablica 14

Klasa 5
IZOMERAZY

Rozmieszczenie enzymów o różnych grupowych dawnych nazwach, dziś najczęściej potocznych,
w poszczególnych pod-podklasach klasyfikacji *I.U.B.*

Pod-podklasy	Charakter przekształcenia	Liczba enzymów w pod-podklasie	Dawne grupowe nazwy, potoczne	Liczba enzymów w grupie
5.1.-- ZMIANA KONFIGURACJI WĘGLA ASYMETRYCZNEGO (19 enzymów)				
5.1.1.--	$\begin{array}{ccc} & R & R \\ & & \\ X-C & -Y & Y-C-X \\ & & \\ & R' & R' \end{array}$	8	Racemazy	6
	w aminokwasach		Epimerazy	2
5.1.2.--	w hydroksykwasach	3	Racemazy	2
			Epimerazy	1
5.1.3.--	w węglowodanach	7	Epimerazy	6
			Mutarotaza	1
5.1.99.--	w innych związkach	1	Racemaza	1
5.2.-- IZOMERYZACJA CIS-TRANS			Izomerazy	4
5.3.-- OKSYDOREDUKCJA WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWA (18 enzymów)				
5.3.1.--	Aldozy-Ketozy	14	Izomerazy	14
5.3.2.--	Keto- Enolo-	1	Tautomeraza	1
5.3.3.--	Przemieszczanie podwójnych wiązań	3	Izomerazy	3
5.4.-- PRZEMIESZCZENIE WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWE (4 enzymy)				
5.4.1.--	Przemieszczanie acyli	1	Acylomutaza	1
5.4.2.--	Przemieszczanie rodnika fosforowego	1	Fosfomutaza	1
5.4.99.--	Przemieszczanie innych grup	2	Mutazy	2
5.5.-- LIAZY WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWE (Cykloizomeraza)				1
5.99.-- INNE IZOMERAZY			Izomeraza	1

Tablica 15

Klasa 6

LIGAZY

Klasyfikacja *I.U.B.* według typu powstałego wiązania (podklasy) i rodzaju powstałego związku (pod-podklasy) w reakcjach syntezy z nieodzownym udziałem ATP lub związku podobnego, według równania $A + B + ATP = AB + ADP + P$ (lub: $AB + AMP + PP$)

Podklasy	Typ powstałego wiązania	Liczba enzymów w podklasie	Pod podklasy	Rodzaj powstającego związku	Liczba enzymów w podklasie
6.1.--	C-O	12	6.1.1.-	Aminoacylo-sRNA	12
6.2.--	C-S	7	6.2.1.-	Acylotiol	7
6.3.--	C-N	23	6.3.1.-	Amidy	3
			6.3.2.-	Peptydy	11
			6.3.3.-	Związki pierścieniowe	1
			6.3.4.-	Różne związki	5
			6.3.5.-	Przeniesienie amidowej grupy NH_2 z glutaminy na akceptor	3
6.4.--	C-C	4	6.4.1.-	wiązanie CO_2	4
Ogólna liczba ligaz					46

Tablica 16

Klasa 6

LIGAZY

Rozmieszczenie enzymów o różnych grupowych dawnych nazwach, dziś (najczęściej) potocznych, w poszczególnych pod-podklasach klasyfikacji *I.U.B.*

Pod-podklasy	Rodzaje powstającego związku	Liczba enzymów w podklasie	Dawne grupowe nazwy, potoczne	Liczba enzymów w danej grupie
6.1.-- TWORZENIE WIĄZANIA C-O (12 enzymów)				
6.1.1.-	Aminoacylo-sRNA	12	Syntetazy	12
6.2.-- TWORZENIE WIĄZANIA C-S (7 enzymów)				
6.2.1.-	Acylotiol	7	Syntetazy	7
6.3.-- TWORZENIE WIĄZANIA C-N (23 enzymy)				
6.3.1.-	Amidy	3	Syntetazy	3
6.3.2.-	Peptydy	11	Syntetazy	11
6.3.3.-	Związki pierścieniowe	1	Syntetaza	1
6.3.4.-	Różne związki	5	Syntetazy	5
6.3.5.-	Przeniesienie amidowej grupy z glutaminy na akceptor	3	Syntetazy	3
6.4.-- TWORZENIE WIĄZANIA C-C (4 enzymy)				
6.4.1.-	Wiązanie CO_2	4	Karboksylazy	4

Tablica 17

Klasa 6

LIGAZY

Związki biorące udział w reakcjach syntezy katalizowanych przez enzymy poszczególnych podklas

We wszystkich przypadkach nieodzowny jest rozkład ATP na ADP lub AMP

Pod- podklasy	Związki wyjściowe	Produkty syntezy
6.1.1.-	Aminokwas + sRNA	Aminoacylo-sRNA
6.2.1.-	Kwas + HS-CoA	Acylo-CoA
6.3.1.-	Aminokwas + H ₂ N-R	Amid aminokwasu
6.3.2.-	(Amino)kwas' + aminokwas''	N-Acylo'-aminokwas'' (lub peptyd)
6.3.3.1.	5'-fosforybozylo-formyloglicynamidyna (FGAM)	5'-fosforybozylo-5-aminoimidazol (zamknięcie pierścienia imidazolowego)
6.3.4.-	Różne	Różne
6.3.5.-	Glutamina + akceptor (przeniesienie NH ₂ amidowego glutaminy na akceptor)	Kwas glutaminowy + akceptor-NH ₂
6.3.5.3	$\begin{array}{ccc} \text{FGAR} & \xrightarrow{\quad} & \text{FGAM} \\ \left\{ \begin{array}{l} \text{Glu-NH}_2 \\ \text{ATP} \end{array} \right. & \xrightarrow{\quad} & \left\{ \begin{array}{l} \text{Glu} \\ \text{ADP + P} \end{array} \right. \end{array}$	
6.4.1.-	$\begin{array}{ccc} \text{CO}_2 & \xrightarrow{\quad} & \text{grupa karboksylowa} \\ \text{RH} + \text{CO}_2 & \xrightarrow{\quad} & \text{R-COOH} \\ \text{ATP} & \xrightarrow{\quad} & \text{ADP + P} \end{array}$	

LITERATURA

1. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. Pergamon Press, Oxford 1961, str. 159.
2. Korzybski T., Podstawy klasyfikacji i terminologii enzymów. *Post. Biochem.* 8, 261 (1962).
3. Korzybski T., Identyfikacja polskich nazw enzymów według obowiązującej międzynarodowej systematyki. *Post. Hig. Med. Dośw.* 16, 559 (1962).
4. Enzymy. Sprawozdanie Komisji Enzymowej Międzynarodowej Unii Biochemicznej. 1961. Część I. Zasady nomenklatury i klasyfikacji enzymów. Tłumaczenie z angielskiego. PWN Warszawa 1963, str. 100.
5. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes, together with their Units and Symbols of Enzyme Kinetics. Brisbane 1964, str. 235.
6. Enzymy. Nomenklatura i Klasyfikacja. Zalecenia Międzynarodowej Unii Biochemicznej z roku 1964 dotyczące nomenklatury i klasyfikacji enzymów wraz z ich jednostkami i symbolami kinetyki enzymatycznej. Tłumaczenie z angielskiego pod redakcją T. Korzybskiego. PWN, Warszawa 1967, str. 221.

WŁODZIMIERZ NIEMIERKO*

Znaczenie odkryć Marii Skłodowskiej-Curie dla biochemii

The Role of Discoveries of Maria Skłodowska-Curie for Biochemistry

The lecture shows how the splendid discoveries of Maria Skłodowska-Curie have given to biochemistry the powerful method of tracer elements and have provided a new insight in the dynamic state of living structures and body constituents.

PANIE PRZEWODNICZĄCY!
SZANOWNI SŁUCHACZE!

W ciągu ostatnich lat trzydziestu obserwujemy niezwykle bujny rozwój biochemii — nauki, która bada procesy życiowe od ich strony chemicznej. Ten rozkwit, jak zobaczymy dalej, biochemia w dużej mierze zawdzięcza pracom Marii Skłodowskiej-Curie i Piotra Curie nad promieniotwórczością, pracom, które rozpoczęte w ostatnich latach ubiegłego stulecia już w kilka lat później pozwoliły tym uczonym odkryć, wyodrębnić i zbadać pierwiastki radioaktywne polon i rad i wykryć w ten sposób zupełnie nowy rodzaj zjawisk fizycznych. Badania te prowadzone dalej przez licznych badaczy w konsekwencjach swoich doprowadziły, jak wiemy, do zrewolucjonizowania całej fizyki i chemii, do nowego poglądu na budowę materii, do poznania struktury atomu i jego jądra, do wykrycia izotopów i sztucznej promieniotwórczości oraz do możliwości przekształcania jednych pierwiastków w drugie.

I właśnie te wspomniane przed chwilą konsekwencje badań naszej wielkiej rodaczki, po latach jak gdyby inkubacji, dały w ręce biochemii, w sposób niemal nagły i zupełnie nie oczekiwany, całkowicie nowe możliwości badawcze, które z kolei zrewolucjonizowały biochemię i zmusiły nas, jak postaram się wykazać, do patrzenia innymi oczyma na procesy chemiczne zachodzące w organizmach żywych.

Przypominają mi się w tym miejscu prorocze słowa Marcelego Nenckiego: „nie wątpię, mówił, że nasze zamiary przez nowe pokolenia ba-

* Prof. dr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

Referat wygłoszony podczas V Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 28 września 1967 r. w Krakowie na Uroczystej Sesji Naukowej poświęconej Marii Skłodowskiej-Curie z okazji setnej rocznicy jej urodzin.

daczy zostaną osiągnięte i że nasi następcy będą mieli cele, których my obecnie nie przeczuwamy”. Słowa te wypowiedziane były przez Nenckiego w czasie jego odczytu wygłoszonego właśnie tu w Krakowie w roku 1900, na rok przed śmiercią; w tym więc okresie, w którym Maria Skłodowska-Curie dopiero rozpoczynała swoje prace.

Nie bylibyśmy jednak sprawiedliwi, gdybyśmy chcieli pomniejszyć ogromny wysiłek niezliczonej rzeszy uczonych, którzy od wielu dziesiątków lat, i nawet jeszcze dużo wcześniej, usiłowali poznawać procesy życiowe, a w tym, jeżeli tak się można wyrazić, i chemię życia. I sądzę nawet, że jedynie wówczas, gdy dobrze uświadomimy sobie wspaniałe w istocie, chociaż zarazem nie wystarczające, osiągnięcia badaczy lat minionych, dopiero wówczas będziemy mogli lepiej ocenić i podziwiać zdobycze biochemii współczesnej.

Już na początku ubiegłego stulecia, w roku 1804 Jędrzej Śniadecki w klasycznym dziele swoim pt.: „Teoria jestestw organicznych” tak charakteryzował procesy życiowe: „Organizm znajduje się w stanie ciągłej zmienności. Jakkolwiek postać zewnętrzna istoty, budowa i skład każdego organu przez długi przeciąg czasu nie ulega zmianie, ale materia, z jakiej organizm się składa, odmienia się co chwila. Indywidua żyjące odmieniając ciągle materię, która je składa, formują się z coraz innej — lubo zawsze z tych samych nawet pierwiastków i w tej samej nawet proporcji. Więc wszystkie jestestwa żyjące organizują się bezprzestannie; czyli, co na jedno jest, całe życie jest jednym i nigdy nieustającym procesem organicznym, jest ciągłą przemianą formy, w danej zaś formie ciągłą przemianą materii”.

Te niemal nowocześnie brzmiące sformułowania Śniadeckiego o przeszło sto lat wyprzedziły panujące wówczas, i długo jeszcze później, poglądy biologów, fizjologów i chemików. Poglądy Śniadeckiego oparte były raczej na genialnej intuicji i wnikliwej spostrzegawczości niż na materiale faktycznym, który wówczas był niezmiernie nikły. Dopiero daleka przyszłość wykazała całą słuszność tych poglądów; niezwykle zaś ich trafność można było w pełni ocenić jedynie w czasach współczesnych, gdy zastosowanie metodyki izotopowej, obok oczywiście innych technik, doprowadziło biochemię do eksperymentalnego stwierdzenia stanu dynamicznego wszystkich, a przynajmniej znacznej większości składników ciała i struktur biologicznych, na poziomie całego organizmu, jego narządów, tkanek i komórek, na poziomie struktur subkomórkowych i na poziomie molekularnym.

Jakżeż długa i trudna była droga, która doprowadziła do tych wyzyn współczesnej biochemii. Droga ta wiodła, jak zawsze to bywa, poprzez kręte ścieżki wiedzy, poprzez szczęśliwe przypadki, które jednak, jak ktoś powiedział, sprzyjają tylko temu, kto wie, jak starać się o ich względy, poprzez wzloty i upadki, ale zawsze i być może przede wszystkim poprzez wytrwałą i ciężką pracę.

Biochemia w jej obecnym rozumieniu za czasów Śniadeckiego właściwie jeszcze nie istniała. Trudno było więc mówić o procesach chemicznych w organizmach żywych, gdy dopiero w czasach znacznie późniejszych, zaczynały pojawiać się i stopniowo gromadziły się dane o podstawowych składnikach chemicznych organizmów żywych: tłuszczach, węglowodanach, białkach, kwasach nukleinowych; a obok tego — wiadomości o istnieniu i wytwarzaniu w organizmie setek, a nawet tysięcy, różnorodnych drobnocząsteczkowych związków organicznych, o których roli i znaczeniu przez długie lata niewiele się wiedziało.

Ten dział biochemii, tak zwana statyka biochemiczna, traktujący o składnikach ciała, ogromnie się rozwijał w ciągu całego XIX wieku; nowsze zaś, już współczesne, badania doprowadziły obecnie do niemal całkowitego wyjaśnienia struktury ogromnej większości nawet najbardziej złożonych substancji, jakimi są białka i kwasy nukleinowe.

Aby należycie ocenić wielkość tych osiągnięć wystarczy zacytować zdanie wybitnego biochemika wiedeńskiego O. Fürtha z jego pięknego, najpiękniejszego jaki znam, podręcznika chemii fizjologicznej, który ukazał się w dwudziestych latach bieżącego wieku. „Każdy biochemik, pisze Fürth, wierzy, że przyjdzie dzień, w którym cząsteczka białkowa poznana będzie tak dalece, że każdy z tysięcy atomów, który wchodzi w jej skład, znajdzie w niej swoje ściśle określone miejsce. Ale każdy z nas wie zarazem, dodaje ten autor, że tego dnia się nie doczeka”. A jednak i te marzenia, aczkolwiek na razie tylko dla kilku najprościej zbudowanych białek, już zaczęły się spełniać. Wykorzystując zdobycze wielu nauk — jak fizyka, chemia, histologia, cytologia, histochemia — i stosując najróżnorodniejsze metody badawcze, z których część, na przykład metody autoradiograficzne i mikroskopia elektronowa, zawdzięczają swoje powstanie właśnie odkryciu promieniotwórczości, posiadamy obecnie bogatą wiedzę nie tylko o budowie chemicznej substancji wchodzących w skład organizmów żywych, lecz często znamy ponadto dokładne rozmieszczenie tych substancji w poszczególnych strukturach i mikrostrukturach biologicznych.

A jednak statyka biochemiczna, nawet tak szeroko pojęta, jak to przed chwilą podałem, stanowi zaledwie wstęp do głównego zadania biochemii, jakim jest poznanie całokształtu procesów chemicznych zachodzących w organizmie żywym, poznanie ich wzajemnego powiązania ze sobą i ich roli i znaczenia w poszczególnych zjawiskach życiowych. Ta obszerna dziedzina, nazywana dynamiką biochemiczną, okazała się o wiele, wiele trudniejszą do opanowania; niemniej jednak już od bardzo dawna usiłowano równoległe prowadzić systematyczne prace również i w tym kierunku.

Już dawniejsze badania wskazywały na to, że pokarm przyjmowany przez organizm zwierzęcy, i bez którego organizm nieuchronnie ginie śmiercią głodową, spełnia dwojakiego rodzaju zadania. Z jednej strony

dostarcza on materiału budulcowego, co szczególnie wyraźne jest w przypadku organizmu rosnącego; z drugiej zaś strony, dostarcza on energii zawartej w pokarmowych związkach organicznych; energii wykorzystywanej przez ustrój w procesach utlenienia i przekształcaniej w inne formy energii potrzebnej organizmowi, jak energia kinetyczna ruchu, ciepło itd. Już Lavoisier sądził, że oddychanie jest spalaniem i przy pomocy nader prostych, lecz bardzo pomysłowych metod mógł zmierzyć ilość ciepła wyprodukowanego przez zwierzę. W końcu XIX wieku i na początku bieżącego stulecia dzięki badaniom głównie Rubnera, Benedicta i Atwatera przy pomocy o wiele bardziej skomplikowanej, lecz bardziej precyzyjnej techniki kalorymetrii bezpośredniej i pośredniej oraz respirometrii udało się nie tylko dokładnie zmierzyć ogólną produkcję energii w różnych stanach fizjologicznych człowieka, psa i innych zwierząt, lecz ponadto można było, oznaczając jedynie ilość pobranego w czasie oddychania tlenu i wydalonego CO_2 , H_2O oraz związków azotowych w moczu, obliczyć ilości białek, tłuszczów i węglowodanów, które zostały w organizmie spalone.

I tu napotykaemy od razu na ogromną trudność zrozumienia tych procesów. Wspomniane substancje pokarmowe są poza organizmem bardzo stabilne; aby rozłożyć je *in vitro*, a cóż dopiero aby je spalić, musielibyśmy zastosować najbardziej drastyczne środki chemiczne i bardzo wysoką temperaturę. Tymczasem w ustroju zwierzęcym substancje te ulegają całkowitemu rozpadowi bardzo szybko i gładko w środowisku obojętnym, w temperaturze zwykle poniżej 40° , u zwierząt zaś zmienności cieplnych często w temperaturze jeszcze znacznie niższej.

Już od dawna wykryto w organizmach żywych swoiste czynniki, pod których wpływem w tak odmienny sposób i tak szybko mogą zachodzić różnorodne procesy chemiczne. Czynniki te są wytwarzane w ustroju enzymy — potężne katalizatory, które w sposób bardzo specyficzny ogromnie przyspieszają i jak gdyby inicjują przebieg poszczególnych reakcji chemicznych. Pomimo wieloletnich badań nad enzymami, aż do dwudziestych lat bieżącego stulecia natura chemiczna enzymów pozostawała zupełną tajemnicą.

Wysuwano co prawda już dawno przypuszczenia, że enzymy są jakimiś białkami, lecz pierwsze dowody przemawiające za słusznością tego poglądu uzyskano dopiero wówczas, gdy w roku 1926 badaczowi amerykańskiemu Sumnerowi udało się wyizolować i otrzymać w formie krystalicznej ureazę, enzym rozkładający mocznik na amoniak i dwutlenek węgla: enzym ten okazał się białkiem. Od tego czasu wyodrębniono, oczyszczono i scharakteryzowano, około dwustu różnych enzymów, niemal połowę z nich udało się uzyskać w stanie krystalicznym; i wszystkie bez wyjątku z poznanych dotychczas enzymów okazały się białkami.

Niewątpliwie, jedną z głównych przyczyn tego, że w ciągu tylu lat natura enzymów pozostawała nieznaną, było to, że nader często są one

obecne w organizmach żywych w ilościach znikomo małych, katalityczna zaś ich aktywność jest zdumiewająco wielka. Tak na przykład, pod wpływem jednej cząsteczki enzymu — katalazy w ciągu zaledwie jednej minuty może ulec rozpadowi kilka milionów cząsteczek wody utlenionej na wodę i tlen. Enzym ten występuje w różnych tkankach zwierzęcych, a między innymi — we krwi. Zapewne każdy z nas miał możliwość zobaczyć działanie katalazy: roztwór wody utlenionej nalany na najdrobniejszą krwawiącą ranę natychmiast zaczyna się pienić na skutek ogromnej ilości wydzielających się drobniutkich pęcherzyków tlenu.

Wyświetlenie mechanizmu działania poszczególnych enzymów stanowi obecnie jeden z najważniejszych działów współczesnej biochemii; zastosowanie izotopów promieniotwórczych i izotopów trwałych odgrywa w tych badaniach pierwszorzędną rolę.

Fakt występowania w organizmach żywych tak dużej ilości różnorodnych enzymów, katalizujących wielką ilość różnorodnych procesów chemicznych, nasuwa przypuszczenie, że procesy te muszą, a przynajmniej mogą zachodzić również i w samym organizmie. Tymczasem, wbrew oczekiwaniom, w ustroju jak gdyby prawie nic nie ulegało zmianie. Analiza chemiczna ciała zwierzęcia znajdującego się w stanie równowagi fizjologicznej wykazuje, że skład chemiczny jego narządów, tkanek, krwi itd. pozostaje niemal zawsze taki sam.

I pomimo tego, że możemy — jak wspomniałem — w dość prosty sposób zbadać, jaka ilość białek, tłuszczów i węglowodanów w danym okresie czasu uległa w ciele przemianom, nie wiemy jednak, bez zastosowania jakichś specjalnych zabiegów, jakimi drogami te przemiany zaszły. Gdy zwierzę przyjmuje pokarm, mamy jeszcze poniekąd możliwość śledzenia za tym, co się dzieje z tym pokarmem w przewodzie pokarmowym pod wpływem soków trawiennych. Na ten temat posiadamy zresztą cały szereg ciekawych, aczkolwiek niekompletnych, danych uzyskanych już w dość odległych czasach. Lecz z chwilą gdy strawiony pokarm zostaje wchłonięty i znika z przewodu pokarmowego, znika on jak gdyby również i z oczu badacza.

Wiemy obecnie, że dzieje się tak dlatego, że w organizmie żywym panuje jakaś niezwykła harmonia: wszystkie procesy życiowe, które obserwujemy w ustroju, są ściśle ze sobą powiązane i podporządkowane całości. Harmonia ta dotyczy również procesów chemicznych, których przebieg jest w subtelny sposób regulowany i kontrolowany przez układ nerwowy i przy pomocy mechanizmów natury chemicznej. Wskutek tej doskonałej koordynacji procesy chemiczne przebiegają w ustroju tak sprawnie, że niemal nie zostawiają po sobie żadnego uchwytnego śladu; dlatego też zaobserwować możemy łatwo jedynie ostateczne, końcowe produkty przemian: a więc CO_2 , H_2O , mocznik i niektóre inne związki.

W ciągu wielu ostatnich dziesiątków lat wysiłki badaczy skierowane

były na to, aby w jakiś sztuczny sposób zmienić, zakłócić lub nawet przewrócić harmonijny przebieg procesów chemicznych i doprowadzić w ten sposób do nagromadzenia się właśnie przejściowych produktów przemiany, co — jak można było sądzić — pozwoliłoby niejako odtworzyć przebyte drogi. Badano więc na przykład organizm pozbawiony jakiegoś ważnego narządu, bądź same narządy izolowane, na przykład wątrobę, lub mięśnie, bądź jedynie skrawki z tych narządów, w których zachowane były jeszcze nieuszkodzone komórki; badano również oddzielone ze zniszczonych komórek poszczególne struktury subkomórkowe, i wreszcie, badano wyodrębnione i oczyszczone enzymy.

W ten sposób, schodząc coraz to niżej po szczeblach hierarchii organizacyjnej ustroju, badacze uzyskiwali coraz to nowe, aczkolwiek fragmentaryczne dane o poszczególnych przejściowych etapach reakcji chemicznych i o zjawiających się przelotnie substancjach, których obecność dawała możliwość jak gdyby zrekonstruować to wszystko, co się dzieje i w normalnym ustroju jako całości i w poszczególnych jego strukturach.

Na podstawie tego rodzaju doświadczeń powstał w pierwszych dziesiątkach lat bieżącego stulecia wspaniały dział biochemii, dotyczący przemian pośrednich. Przemiany te zachodzą poprzez długi ciąg szybko po sobie następujących reakcji chemicznych; zostały one mniej lub więcej dobrze poznane zarówno od strony towarzyszących im procesów energetycznych, jak i od strony enzymów biorących w nich udział; poznana została również lokalizacja niektórych procesów chemicznych w komórce. Wszystko to razem wzięte dawało badaczom wgląd w powiązania pomiędzy strukturami biologicznymi a ich funkcjami.

W stosunku do opisanej powyżej metodyki można jednak postawić dwojakiego rodzaju zastrzeżenia. Po pierwsze, schodząc, jak to zaznaczyłem, coraz to niżej w hierarchii organizacyjnej ustroju coraz to bardziej oddalamy się od normalnego przebiegu zjawisk, które zachodzą w ustroju jako całości; dlatego też nie możemy mieć całkowitej pewności, czy procesy, któreśmy odtworzyli, rzeczywiście zachodzą w organizmie, czy tylko mogłyby zachodzić, i czy wskutek tego nasze rozumowania nie doprowadzą nas do wręcz błędnych wniosków. Znany jest na ten temat żartobliwy przykład przytaczany przez jednego z biochemików: jeżeli jakiś zdolny mechanik znajdzie połamany na kawałeczki samochodzik, czy coś innego w tym rodzaju, będzie on mógł, nie wiedząc o co tu chodziło, wybudować sobie z tych kawałeczków jakiś zupełnie inny przyrząd. Po drugie, należy pamiętać ponadto o jeszcze innej trudności w badaniach biochemicznych: gdy powstają w przebiegu jakiejś reakcji chemicznej cząsteczki tych lub innych substancji, natychmiast mieszają się one z innymi już obecnymi uprzednio w organizmie, i my nie jesteśmy w stanie rozróżnić cząsteczek jednych od drugich i poznać, z czego jaka substancja powstała i w co została przekształcona.

I w tym właśnie momencie wkraczamy w zupełnie nowy okres rozwoju badań biochemicznych, okres będący właśnie konsekwencją badań Marii Skłodowskiej-Curie, w którym przy użyciu izotopów po raz pierwszy otrzymujemy możliwość rozróżniania poszczególnych cząsteczek, możliwość śledzenia bezpośrednich przekształceń jednych substancji w drugie i badania ich wędrówek w obrębie organizmu.

Jak dobrze wiadomo, izotopy danego pierwiastka posiadają różny ciężar atomowy, ale jednakową ilość protonów w jądrze i jednakową ilość elektronów wokół jądra. Stąd też właściwości chemiczne poszczególnego pierwiastka i jego izotopu są praktycznie biorąc identyczne.

Jeżeli wprowadzimy do cząsteczki jakiegoś związku chemicznego zamiast zwykłego pierwiastka jego izotop, nie zmienimy własności chemicznych tej substancji, nie będziemy nawet mogli odróżnić tej cząsteczki przy pomocy metod chemicznych od innych cząsteczek, i co ważniejsze — jak się okazuje — i organizm nie odczuje żadnej różnicy. Związek ten będzie się zachowywał w ustroju jak związek normalny, będzie on jednak jak gdyby oznakowany obecnością tego izotopu.

Za pomocą określonych metod fizycznych mamy możliwość wykryć ten izotop w ustroju, w którymś z jego narządów, w jego tkankach i komórkach; i jeżeli stwierdzimy jego obecność w jakimś innym związku niż ten, w którym się znajdował — możemy sądzić, że nowy związek wytworzył się w organizmie ze znakowanego związku podanego.

Po raz pierwszy zastosował metodę izotopową w badaniach na organizmach żywych biochemik pochodzenia węgierskiego, Hevesy; lecz chyba największe, przełomowe i najistotniejsze zdobycze osiągnął w tej dziedzinie Schoenheimer, który w latach 1935 do 1941 (roku jego przedwczesnej śmierci) ogłosił ze swymi współpracownikami piękną serię prac z tego zakresu. Badania te nie tylko wykazały, że nowa metoda jest dla biochemii niezwykle płodna, lecz co ważniejsze, doprowadziły wkrótce do całkowitych i rewolucyjnych zmian w naszych poglądach na charakter procesów biochemicznych.

Nie mam obecnie możliwości bliższego zatrzymania się na tym fascynującym okresie, który przeżywała w owych czasach biochemia, okresie, który tak żywo pamiętam i który trwa właściwie i nadal. Dlatego też spróbuję jedynie w krótkich słowach i jak najbardziej ogólnie, i w sposób oczywiście bardzo uproszczony, scharakteryzować powstający wówczas przed nami obraz.

Według dawniejszych poglądów ciało zwierzęcia jest jak gdyby maszyną. Narządy i tkanki, z których jest ono zbudowane, są czymś trwałym; zużywają się one bardzo powoli i tylko stopniowo są odnawiane. Pokarm jest paliwem; zawarta w nim energia chemiczna utrzymuje „maszynę zwierzęcą” w stanie czynności i ruchu. W organizmie dorosłym tylko nieznaczna część pokarmu służy do celów budulcowych, to jest do odnawiania powoli zużywających się tkanek. Przy wzmożonej czynności

organizm wymaga dodatkowych źródeł energii, w czasie zaś spoczynku przemiany zachodzą w nim w skali nieznacznej.

Jakżeż inny jest obecny pogląd na te sprawy. Wszystkie bez wyjątku składniki chemiczne ciała znajdują się, jak to określił Schoenheimer, „w stanie dynamicznym”. Żywy organizm jest chemicznie czynny stale, bez najmniejszej przerwy. W ciele ludzkim i w ciele zwierząt, a również i w innych organizmach żywych, tylko pozornie niewiele się dzieje. Badania współczesne wykazują, że mniej lub więcej intensywne przemiany zachodzą nie tylko w takich czynnych narządach jak mięśnie, serce, wątroba, nerka, mózg, lecz i w takich pozornie inertnych — jak ścięgna, kości, skóra. Przy pomocy techniki izotopowej uwidoczniają się przemiany chemiczne zachodzące w pojedynczych komórkach i w subtelnych strukturach subkomórkowych, dobrze stosunkowo poznanych w ostatnich latach za pomocą mikroskopii elektronowej i innych nowoczesnych metod. Dzięki temu zarysowuje się przed nami zupełnie nowy obraz komórki żywej, której wszystkie organelle znajdują się w stanie dynamicznym.

Jeżeli już dawniejsze badania wskazywały na nie spotykane nigdzie w świecie nieożywionym, niezwykle i swoiste cechy organizmu żywego, jako harmonijnie funkcjonującej całości, to w świetle nowszych poglądów biochemicznych (które starałem się tu Państwu w tak wielkim i uproszczonym skrócie przedstawić) te swoiste cechy organizmu żywego wydają się jeszcze bardziej zdumiewające. Jeżeli zaś uświadomimy sobie, że przynajmniej niektóre fragmenty tych procesów biochemicy współcześni już potrafiały odtworzyć poza organizmem, powinno to nas napawać dużą radością.

W niewielkiej, ciekawej książeczce angielskiego biologa Roystona Clowes'a, która dopiero co się ukazała pod nazwą „Struktura Życia”, w nagłówku ostatniego rozdziału zatytułowanego „Nowa Biologia”, umieszczone są jako motto następujące słowa Winstona Churchilla: „To nie jest koniec. To nie jest nawet początek końca. Być może jest to jednak koniec początku”.

Słowa te odnoszą się prawdopodobnie do okresu ostatniej wojny; jeżeli chciałoby się te słowa zastosować do współczesnej biochemii, sądzę, że należałoby je nieco zmienić: To nie jest jeszcze koniec, to nie jest nawet początek końca, ani koniec początku. Nie ulega jednak żadnej wątpliwości, że to, co dały nam badania nad promieniotwórczością, dało zarazem początek nowej ery w biochemii.

Niech mi wolno będzie na zakończenie referatu jeszcze raz zacytować słowa Marcelego Nenckiego: „Zadań czekających na rozwiązanie jest nieskończona ilość i pojedynczy badacz przepracowawszy całe swe życie widzi, jak jedne pokolenia po drugich kroczyć i pracować muszą, a końca badań nie ujrzą. Za to wiedza nasza będzie coraz obszerniejsza i głębsza — a korzyść praktyczna coraz większa”.

Przypuszczam, że bardzo duża ilość pracowników naukowych jest przekonana o tym, że proces zdobywania wiedzy może dawać większe zadowolenie niż jej zdobycie. Dlatego też słowa Marcelego Nenckiego powinny dodawać nam wielkiej otuchy, szczególnie wówczas, gdy mamy przed sobą obraz Marii Skłodowskiej-Curie, która swoim wielkim dziełem i przykładem całego swego wspaniałego i skromnego życia wskazała nam, jak należy i jak można służyć dla dobra ludzkości.

Sprawozdania

V Krajowe Sympozjum Biochemiczne w Krakowie

W dniach od 28 do 30 września 1967 roku odbywało się w Krakowie V Krajowe Sympozjum Biochemiczne. Obrady zostały otwarte uroczystą Sesją poświęconą Marii Skłodowskiej-Curie. Sesji tej przewodniczył prof. dr Kazimierz Zakrzewski. Znaczenie odkryć Marii Skłodowskiej-Curie omówili prof. dr Bogdan Kamieński, prof. dr Włodzimierz Niemierko, prof. dr Henryk Niewodniczański i doc. dr Tadeusz Szczepkowski.

W czasie Sympozjum odbyły się dwa kolokwia — pierwsze poświęcone enzymom metabolizmu związków siarki, drugie dotyczyło enzymów nukleolitycznych. Równolegle toczyły się obrady w dwu sekcjach, na których przedstawiono komunikaty z różnych dziedzin obrazujące całokształt prac biochemicznych prowadzonych obecnie w Polsce. Ogółem zgłoszono 12 referatów kolokwialnych i 120 doniesień na tematy różne. W Sympozjum wzięło udział 297 osób. Liczba komunikatów nadesłanych przez poszczególne ośrodki wynosiła: Warszawa 33, Kraków 17, Poznań 15, Gdańsk 12, Toruń 10, Łódź 9, Zabrze-Rokitnica 8, Wrocław 7, Lublin 7, Białystok 4, Gliwice 3, Szczecin 3, Olsztyn 1, zagranicznych 3 komunikaty. Zorganizowano również wystawę firmy *Pharmacia* z Uppsali i wystawę Instytutu Surowic i Szczepionek z Pragi.

Ogólnie biorąc komunikaty były na dobrym poziomie a szereg z nich było bardzo dobrych i wywołujących żywe zainteresowanie. Dyskusje były ożywione oraz rzeczowe i zdaniem przewodniczących sekcji świadczyły one o ogólnie dobrym przygotowaniu uczestników. W czasie trwania Sympozjum odbyło się zebranie towarzyskie, które umożliwiło wzajemne zbliżenie i nawiązanie kontaktów.

W części towarzyskiej Sympozjum uczestnicy mieli możliwość zobaczyć Kabalet w Jamie Michalikowej oraz wzięli udział w wycieczce do Pieskowej Skały i doliny Prądnika, szczególnie malowniczej o tej porze roku.

Gospodarze Sympozjum uważają, że goście swoim miłym nastawieniem zostawili jak najbardziej przyjemne wspomnienia. Organizatorzy pragną w tym miejscu skorzystać z okazji i podziękować Przewodniczącym i Sekretarzom poszczególnych sekcji za ich wkład w sprawny przebieg obrad. Pragniemy także podziękować bezpośrednim organizatorom przyjęcia towarzyskiego za ich bezinteresowną pracę.

za Komitet Organizacyjny
Doc. dr T. Szczepkowski
Dr Z. Żak

Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1965—1967

(Sprawozdanie Zarządu Głównego przedstawione na V Walnym Zebraniu w Krakowie w dniu 29 września 1967 r.)

Polskie Towarzystwo Biochemiczne liczy 11 Oddziałów, to jest tyle co w roku 1965. We wszystkich ośrodkach, w których wyższe uczelnie mają katedry biochemii, Towarzystwo posiada swoje oddziały. Wyjątek stanowi Toruń.

Liczba członków z 672 w roku 1965 wzrosła do 797 w roku 1967. Najlichniejszym Oddziałem jest nadal Oddział w Warszawie (259 członków), drugim z kolei Poznań (89 członków), a dalej Łódź (64 członków), Kraków i Szczecin (po 58 członków), Oddział Górnośląski (54 członków), Lublin (50 członków), Wrocław (44), Gdańsk (43), Białystok (42) i Olsztyn (31).

Budżet Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zamykał się po stronie kosztów w roku 1965 kwotą 575 784,85 zł, a w roku 1966 — kwotą 879 734,63 zł. Wydatki były zrównoważone dochodami ze składek i ze sprzedaży publikacji oraz przez dotację otrzymywaną z Polskiej Akademii Nauk. Dotacja stanowiła w budżecie Towarzystwa w roku 1965 — 55% dochodów, a w roku 1966 — 38%. Wzrost kosztów roku 1966 był związany z zorganizowaniem w Warszawie III Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Koszty te jednak zostały z nadwyżką pokryte przez wpływy, co znalazło swój wyraz w zmniejszonym udziale dotacji w ogólnych dochodach w roku 1966. Wśród wydatków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego największą pozycję stanowiły nakłady na wydawnictwa (około 50%). Koszty administracyjne PTBioch. kształtują się na bardzo niskim poziomie, około 3% całości. Działalność statutowa, tj. koszty zebrań w Oddziałach, koszty kursów i konferencji, delegacje prelegentów itp. stanowią około 40% budżetu Towarzystwa.

Założenia ogólne działalności

Do tego ażeby można było prowadzić efektywną pracę naukową, konieczne jest dopełnienie dwóch warunków pierwotnych: muszą istnieć dobrze wyposażone laboratoria i aktywne intelektualnie środowisko, w którym wyniki badań będą dyskutowane w sposób kompetentny. Dopiero wtedy, gdy warunki te są dopełnione, powstaje możliwość osiągnięcia wysokiego poziomu kadry naukowej. Jest rzeczą oczywistą, że kadra nie wytworzy się automatycznie i że jej szkolenie wymaga odpowiedniego wkładu pracy organizacyjnej i nakładów finansowych. Ale nawet najlepiej wyszkolony personel naukowy nie jest w stanie twórczo i wydajnie pracować, jeżeli nie ma do dyspozycji odpowiednich warunków technicznych i nie znajduje grona kolegów, z którymi przedyskutuje rezultaty swych badań.

Cel działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zdefiniowany jest w statucie jako „popieranie rozwoju biochemii”. Wychodząc z przesłanek sformułowanych powyżej, działalność PTBioch. w minionej kadencji Zarządu Głównego została skoncentrowana przede wszystkim na umożliwieniu dyskusji prac naukowych, aczkolwiek rozwijano działalność również i w dziedzinie szkolenia i w dziedzinie popularyzacji biochemii. Nie podejmowano natomiast żadnej akcji odnośnie wyposażenia laboratoriów, uważając, że należy to do gestii czynników administracyjnych i gospodarczych.

Zebrania naukowe w Oddziałach

Podstawową platformą dla dyskusji są zebrania naukowe w Oddziałach. Zebrania te mają dosyć dawną tradycję, ale na przestrzeni ostatniego roku dała się stwierdzić zmiana ich charakteru. Jeszcze do niedawna na zebraniach głównie przedstawiano referaty przeglądowe, a obecnie coraz częściej w programie figurują doniesienia z prac własnych. Częstotliwość zebrań nieco zmalała; w latach ubiegłych w każdym Oddziale przeciętnie odbywało się jedno zebranie na miesiąc, ostatnio — przeciętnie raz na sześć tygodni. Na zebraniach zaczyna jednak rozwijać się bardziej ożywiona dyskusja, podobnie jak bardziej ożywionymi dyskusjami cechowało się V Sympozjum PTBioch. odbyte na zakończenie obecnego okresu spra-

wozdawczego, w porównaniu do Sympozjów poprzednich. Do zwiększenia atrakcyjności naukowej zebrań w Oddziałach przyczyniła się również zwiększona wymiana prelegentów między Oddziałami, umożliwiona przez powiększenie kredytów na ten cel.

Konferencje, sympozja i zjazdy

Celem zebrań naukowych w Oddziałach jest wymiana poglądów między uczestnikami. Dla omawiania jednak problemów specjalistycznych, a zwłaszcza tych, nad którymi badania są dobrze zaawansowane, konieczne są konferencje odbywane w bardziej ograniczonym zespole. Cztery takie konferencje odbyły się w okresie sprawozdawczym. Oddział PTBioch. we Wrocławiu zorganizował naradę biochemików z elektronikami, mającą na celu omówienie perspektyw i możliwości wytwarzania aparatury elektronicznej, użytkowej i unikalnej, potrzebnej dla zakładów biochemii (grudzień 1965 roku, z udziałem 10 osób). Nowo utworzona Komisja Fotobiologii PTBioch. zorganizowała sympozjum w Krakowie w maju 1966 roku z udziałem 50 osób.

Oddział w Poznaniu zorganizował w grudniu 1966 konferencję na temat biochemii ściany naczyniowej, z udziałem 12 osób. Oddział w Warszawie zorganizował w styczniu 1967 roku konferencję na temat mitochondriów, z udziałem około 20 osób.

Najszerzą platformą dla dyskusji są zjazdy międzynarodowe, na nich bowiem jest możliwość konfrontacji swoich wyników z wynikami osiągniętymi w innych ośrodkach, a zwłaszcza w tych, z którymi kontakt polskich biochemików jest ograniczony głównie do korespondencji. Dlatego też Zarząd Główny w całym okresie sprawozdawczym czynił wiele wysiłków, by udział polskiej biochemii w zjazdach był możliwie jak najliczniejszy. Szczególne znaczenie dla rozwoju kontaktów zagranicznych miał III Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, odbyty w kwietniu 1966 roku w Warszawie. Zjazd ten był najliczniejszym ze wszystkich zjazdów naukowych, jakie odbyły się w Polsce do owego czasu. Ponad 1000 uczestników z zagranicy reprezentowało znaczną część najwybitniejszych ośrodków biochemii z całego świata. Dla wielu polskich biochemików, a zwłaszcza dla młodej kadry, III Zjazd FEBS stanowił pierwszą okazję do przedstawienia swych prac na forum międzynarodowym. Sprawozdanie z III Zjazdu FEBS ukazało się w *Postęпах Biochemii*, tom 12 Nr 4, str. 601, rok 1966.

Z pomyślnymi wynikami, zarówno naukowymi jak prestiżowymi, III Zjazdu FEBS Zarząd Główny łączył nadzieję na możliwość utrwalenia zwyczaju wysyłania dużej i reprezentatywnej grupy biochemików na następne zjazdy FEBS, zwłaszcza, że delegacje zagraniczne w Warszawie liczyły po kilkadziesiąt a nawet sto osób. Niestety, wysłanie licznej delegacji na IV Zjazd FEBS w Oslo okazało się niemożliwe, pomimo zgody i poparcia władz państwowych, a to na skutek nieprzychylnego stosunku organizacji zajmujących się podróżami zagranicznymi.

Działalność szkoleniowa

Działalność szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego była w okresie sprawozdawczym bardziej różnorodna niż w okresach poprzednich. Wzorem lat ubiegłych zorganizowano Kurs Podstaw Biochemii (współ z Instytutem Antybiotyków w Warszawie). Kurs ten był przeznaczony dla pracowników różnych specjalności i miał na celu dostarczenie im wiadomości o najnowszych osiągnięciach we wszystkich właściwie dziedzinach biochemii. W kursie wzięło udział około 50 osób; wykłady, 1 raz na tydzień, trwały od listopada 1966 do maja 1967 roku. Prelegentami byli członkowie PTBioch. z różnych Oddziałów.

Dwa specjalistyczne kursy wykładowe zorganizował Oddział PTBioch. w Gdańsku. Pierwszy z nich, pt. *Biochemia Wirusów*, odbył się na przełomie roku 1965 i 1966 z udziałem około 100 słuchaczy. Drugi, pt. *Dziedziczenie i wrodzone wady metaboliczne*, odbył się w lutym 1967 roku z udziałem około 90 słuchaczy.

Komisja Fotobiologiczna PTBioch. zorganizowała w czerwcu 1967 roku w Warszawie „Szkołę Fotochemiczną” dla fotobiologów. Wykłady i zajęcia praktyczne trwały 5 dni i wzięło w nich udział 20 osób.

Ważnym odcinkiem szkolenia kadry naukowej stały się Szkoły Letnie Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Członkom PTBioch. zostały udostępnione stypendia Federacji, w wyniku czego jedna osoba mogła w roku 1965 wziąć udział w Szkole na temat „Fracjonowanie elementów subkomórkowych” w Louvain, zaś w roku 1966 jedna osoba wzięła udział w Szkole w Uppsali na temat „Fracjonowanie makromolekuł”, a trzy w Londynie w szkole na temat mechanizmu działania enzymów.

Stypendia naukowe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ciągle jeszcze nie są dostatecznie wykorzystywane. Stypendia te, pokrywające koszty pobytu i podróży na okresy około dwu tygodni, mają na celu umożliwienie młodym pracownikom nauki wykonanie eksperymentów lub nauczanie się technik doświadczalnych w innych ośrodkach na terenie kraju. Ze stypendiów krajowych w roku 1965 skorzystało 5 osób, a w roku 1966 zaledwie 2.

Zdając sobie sprawę z tego, że trudności w osiągnięciu wysokiego poziomu wykształcenia kadry naukowej są w znacznym stopniu spowodowane niedostatecznym przygotowaniem młodzieży szkolnej do studiów biologicznych, nawiązano kontakty z ośrodkami szkolenia nauczycieli w Warszawie, województwie warszawskim i w województwie gdańskim. W rezultacie, członkowie PTBioch. wygłosili kilkadziesiąt wykładów dla nauczycieli, omawiając najnowsze osiągnięcia biochemii w zakresie budowy i funkcji kwasów nukleinowych, białek, regulacji biologicznych, przemian energetycznych.

Działalność wydawnicza

Kwartalnik *Postępy Biochemii* ukazywał się regularnie, a jego objętość wynosząca w roku 1965 około 42 arkuszy, w roku 1966 wzrosła do prawie 47 arkuszy. Tym niemniej rosnący stale napływ artykułów sprawił, iż prace ukazywały się drukiem na ogół dopiero po 11–12 miesiącach od ich złożenia do redakcji. Ten stan rzeczy jest niezadawalający i niewspółmierny z potrzebami. Zasięg kwartalnika *Postępy Biochemii* jest duży. Dla pracowników wielu zakładów stanowią one podstawowe źródło informacji o postępie i o nowych kierunkach w biochemii, biofizyce i biologii molekularnej. Wydaje się, że jedyną możliwością skrócenia okresu zalegania artykułów w tece redakcyjnej jest zwiększenie objętości kwartalnika i zwiększenie częstotliwości jego ukazywania się.

Postępy Biochemii prenumeruje około 40% członków PTBioch. Bliższa jednak analiza tej pozornie zadawalającej liczby wskazuje, że w ośrodkach, które są stosunkowo lepiej zaopatrzone w czasopisma zagraniczne, również i *Postępy Biochemii* są prenumerowane przez większą ilość osób. W ośrodkach mniejszych natomiast odsetek prenumeratorów wśród członków PTBioch. jest stosunkowo niski, pomimo, że tam właśnie *Postępy Biochemii* mają szczególnie dużą rolę do spełnienia. Pewną poprawę sytuacji w porównaniu z latami ubiegłymi, przyniósł system stałych prenumerat, zachodzi jednak nadal konieczność podjęcia kroków mających na celu upowszechnienie czytelnictwa *Postępów Biochemii*.

Monografie Biochemiczne ukazywały się również regularnie. W roku 1965 opublikowano 4 tomy o łącznej objętości ponad 14 arkuszy, a w roku 1966 — 5 tomów o objętości 20 arkuszy. Obecnie wśród członków PTBioch. rozprowadza się 290 eg-

zemplarzy *Monografii*, a więc około 50% całego nakładu — znacznie więcej niż w poprzednim okresie sprawozdawczym. *Monografie Biochemiczne* ciągle jeszcze drukują przede wszystkim prace habilitacyjne; pierwsze specjalne opracowania monograficzne wpłynęły do teki redakcyjnej w roku 1966.

Dużym przedsięwzięciem wydawniczym w okresie sprawozdawczym było wydanie materiałów III Zjazdu FEBS. Na Zjazd przygotowano w dużym nakładzie program wstępny i program właściwy oraz tom streszczeń zjazdowych o objętości prawie 360 stron. Po Zjeździe ukazały się drukiem pełne teksty referatów przedstawionych na Sympozjum (*Genetic Elements — Structure and Function*) (str. 361) oraz na dwóch kollokwiach (*Biochemistry of Mitochondria* (str. 122) i *Biochemistry of Blood Platelets* (str. 191). Książki te zostały wydane wspólnie z PWN w Warszawie i *Academic Press* w Londynie w nakładzie po 3000 egz.

Posiedzenia i dyżury Zarządu Głównego

W okresie minionej kadencji odbyło się 13 plenarnych posiedzeń Zarządu Głównego, w tym 2 z udziałem przewodniczących Oddziałów terenowych Towarzystwa. Dyżury Zarządu Głównego odbywały się, zgodnie z tradycją, w każdy piątek tygodnia.

Prezes
Prof. dr K. Zakrzewski

Recenzje

Research in Protozoology vol. 1 wyd. Tze-Tuan Chen, Pergamon Press 1967

Praca pod tytułem „Research in Protozoology” pomyślana została jako dzieło czterotomowe. Jak stwierdza wydawca Tze-Tuan Chen, profesor zoologii Południowo Kalifornijskiego Uniwersytetu w Los Angeles, zespół autorów i konsultantów postawił sobie za zadanie zastąpić powszechnie znaną pracę Calkins'a i Summers'a „Protozoa in Biological Research”, która już przeszło ćwierć wieku służy protozoologom jako praca podręczna. Całość wydawnictwa obejmuje wszystkie dziedziny protozoologii: morfologię i morfogenezę, taksonomię, fizjologię, immunologię, rozmnażanie i genetykę, ekologię i wzrost, parazytologię itd. Tom I zawiera rozdziały poświęcone cytoplazmatycznym organeliom, zagadnieniu zachowania ruchowego, przemianie materii, regulacji jonowej i wydzielaniu, oraz odżywianiu i wzrostowi *Protozoa*.

Przeszło trzecią część objętości tomu zajmuje artykuł dwóch wybitnych specjalistów w dziedzinie fizjologii ruchu pierwotniaków z Zakładu Zoologii Uniwersytetu w Los Angeles T. L. Jahn'a i E. C. Bovee pod tytułem „Motile Behaviour of Protozoa”. Obszerny ten przegląd rozpoczyna się gruntownym omówieniem współczesnych osiągnięć w dziedzinie badań nad ruchowymi reakcjami protozoa na bodźce chemiczne, elektryczne, mechaniczne oraz inne bodźce fizycznej natury.

Specjalne zainteresowanie czytelnika zajmującego się biochemią wzbudzi niewątpliwie niewielki podrozdział w artykule Jahn'a i Bovee poświęcony analogii (a może homologii) między mechanizmami ruchowymi komórek pierwotniaczych a aktywnością mięśni. Autorzy podkreślają, że w organeliach ruchowych występują kompleksy proteinowe podobne do aktomiozyny, przy czym ATP odgrywa rolę źródła energetycznego skurczów, podczas gdy niektóre kationy (zwłaszcza Ca^{2+}) są czynnikiem pobudzającym reakcje ruchowe.

Około 70 stron poświęcono systematycznemu przeglądowi różnorodnych typów ruchu komórek pierwotniaczych. Bardziej wnikliwa klasyfikacja ruchów ameboidalnych daje autorom sposobność do zasugerowania bardzo istotnej rewizji taksonomicznej, której jednak większość taksonomistów nie akceptowała.

Rozdział pod tytułem „Contractile Vacuoles, Ionic Regulation, and Excretion” napisany przez brytyjskiego protozoologa J. A. Kitching'a badającego już przeszło 30 lat wodniczki tętniące, zajmuje się raczej podkreśleniem panujących w tej dziedzinie prądów aniżeli jakimś wyczerpującym przeglądem zagadnienia. Podkreśla się wielki postęp, jaki w ciągu ostatnich pięciu lat dokonał się w badaniach nad mikrostrukturą wodniczek tętniących i który doprowadził do wykrycia morfologicznego i fizjologicznego związku między wydzielniczą tak zwaną „plazmą nefridialną” *protozoa* a ich endoplazmatycznym *retikulum*. Omówiono też współczesne badania nad przepuszczalnością błony komórkowej, wewnątrzkomórkową koncentracją jonową oraz nad aktywnym transportem jonów u *Protozoa*. W toczącej się obecnie dyskusji nad wchłanianiem K^+ związanym z wydalaniem Na^+ , które to zjawisko zachodzi w komórkach pierwotniaczych na tej samej dro-

dze, jak zostało to ustalone dla komórek tkankowców, Kitching całkiem wyraźnie deklaruje się jako zwolennik słuszności teorii „pompy sodowej”.

Po zapoznaniu się z pracą W. F. Danforth'a pod tytułem „Respiratory Metabolism” dochodzi się do wniosku, iż olbrzymia część współczesnych osiągnięć w tej dziedzinie zalicza się do biochemii opisowej: identyfikacja szlaków przemian podłoża oraz ostatecznych produktów oddechowej przemiany materii w komórkach pierwotniaczych. Do tej pory nie stwierdzono, wbrew oczekiwaniu, odmiennych niż u innych organizmów mechanizmów procesów oddechowych u *Protozoa*.

Ostatni rozdział zatytułowany „Nutrition and Growth of Protozoa” napisany przez R. P. Hall'a zajmuje się głównie techniką kultur aksenicznych, a w szczególności wymogami pokarmowymi tego rodzaju kultur (źródła węgla i azotu, potrzeby mineralne). Szczegółowo omawia się znaczenie różnych witamin i innych czynników wzrostowych. Raczej praktyczne podejście do zagadnienia wyjaśnia istotne kierunki współczesnych badań, które w dużym stopniu są inspirowane potrzebą rozwoju aksenicznych kultur dla każdego masowego eksperymentu w dziedzinie biochemii pierwotniaków.

Ogólnie mówiąc należy podkreślić, iż wydany tom I „Research in Protozoology” powinien stać się cennym podręcznikiem zarówno dla protistologów jak i dla badaczy biologii komórkowej, pewne zaś jego rozdziały mogą wzbudzić wielkie zainteresowanie u specjalistów wielu innych dziedzin fizjologii i biochemii.

A. Grębecki

C. J. Duncan. The Molecular Properties and Evolution of Excitable Cells.
Pergamon Press 1967, str. XI+253

W książce, która stanowi 35-y tom *Zoology Division* z *International Series of Monographs in Pure and Applied Biology*, autor przedstawił swoje poglądy na mechanizm pobudzenia komórek nerwowych. Jak wiadomo, u podstaw procesów pobudzenia leżą zjawiska przenikania jonów przez błony komórkowe, dlatego też autor wiele miejsca w książce poświęcił zagadnieniom przepuszczalności błon dla kationów.

Podstawową hipotezą autora, którą stara się poprzeć zarówno wynikami własnych prac jak i odpowiednimi danymi z obszernie przytaczanego piśmiennictwa, jest następujący pogląd: komórki pobudliwe mają wspólny mechanizm regulujący przepuszczalność błon dla kationów; tym kontrolującym układem jest białko kurczliwe — ATP-aza, zlokalizowana w błonach; enzym ten podobny jest do ATP-azy zawartej w błonach mitochondriów, lecz odmienny od ATP-azy czynnej w aktywnym transporcie. Jego konfiguracja molekularna może ulegać modyfikacji zależnie od ilości ATP obecnego w układzie. Autor opierając się m.in. na doświadczeniach Goldacra za prototyp układu receptorowo-efektorowego uważa amebę; pierwotniak ten odpowiada ruchem na bodziec mechaniczny. Na skutek deformacji błony plazmatycznej, wywołanej tym bodźcem ulega modyfikacji konfiguracji ATP-azy, mieszczącej się w błonie ameby. Prowadzi to do zmiany interakcji enzymu z ATP i do zmian przekształcania solu w żel, zjawiska związanego z ruchem ameboidalnym. Opierając się między innymi na pracach Grundfesta, autor sprowadza organizację komórek nerwowych do trzech elementów: wejścia, przewodzenia i wyjścia i wykazuje, że choć w miarę ewolucji organizmów zwierzęcych zachodzi specjalizacja tych komórek, to jednak każda zachowała właściwości zarówno receptora jak i efek-

tora. Akson ze swoimi zdolnościami przewodzenia jest ewolucyjnie tworem późniejszym.

Podstawy funkcjonowania narządów zmysłów autor wyprowadza z modelu, za który, jak podano, przyjął amebę i omawia to zagadnienie z punktu widzenia wspólnego mechanizmu przetwarzania energii w tych narządach w inny rodzaj energii. Jednym z dowodów, że mechanizm, leżący u podstaw przetwarzania jednego rodzaju w drugi w narządach zmysłów (czy też ogólniej w komórkach pobudliwych), ma charakter enzymatyczny, jest wpływ temperatury na czynność narządów zmysłów.

Autor wyraża pogląd, że ATP-aza, kontrolująca przepuszczalność błon dla kationów, jest w jakiś bliżej jeszcze nie znany sposób powiązana z niespecyficzną esterazą cholinową. Esteraza ta miałaby być białkiem receptorowym dla wyzwalającej acetylocholinę. Połączenie acetylocholinę z enzymem modyfikowałoby cząsteczkę ATP-azy, co w konsekwencji prowadziłoby do zmian przepuszczalności błon dla kationów. Podobny mechanizm działałby również w dwóch pozostałych elementach (przewodzenia i wyjścia) narządu zmysłowego. Autor omawia także zjawiska występujące w płytce nerwowo-mięśniowej, podkreślając rolę kompleksu ATP-aza-esteraza cholinowa, zarówno kontrolującego przepuszczalność błon jak i uwalniania acetylocholinę.

Całość swoich poglądów autor przedstawił w postaci schematu, obrazującego zjawiska występujące: 1. w elementach wyjściowych (narządy zmysłów, błona postsynaptyczna), 2. w aksonie i 3. w elementach wyjściowych (sekrecja). Uwidoczniony jest również wpływ szeregu czynników na aktywność ATP-azy oraz esterazy cholinowej i acetylocholinowej.

Na podkreślenie zasługuje dobry układ książki. Każdy rozdział zakończony jest krótkim streszczeniem uwydatniającym główne tezy rozdziału. W licznych tabelach i rysunkach przedstawiony jest obfity materiał faktyczny, omawiany głównie z punktu widzenia hipotezy autora mającej wykazać jednolitość mechanizmów kontrolujących przepuszczalność dla kationów większości błon zwierzęcych.

Możliwe, że niektóre tezy autora ulegną w przyszłości pewnym zmianom, lecz książka pobudza do myślenia i winna zainteresować zarówno neurochemików jak neurofizjologów i neurofarmakologów.

S. Niemierko

**A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry, vol. IV,
wyd. P. Alexander i H. P. Lundgren, Pergamon Press, Oxford 1966**

Książka stanowi kontynuację dobrze znanej w laboratoriach biochemicznych serii, zapoczątkowanej przez wydawnictwo Pergamon Press w roku 1958. Obecny, czwarty tom liczy stron 233 i zawiera 6 monografii. Dla prac doświadczalnych najprzydatniejsze zapewne okażą się dwie pierwsze z nich: „Oznaczanie tioli i grup dwusiarczkowych” (S. J. Leach) oraz „Mikrotechniki oddzielania aminokwasów i peptydów przy pomocy elektroforezy wysokonapięciowej” (S. Blackburn), starannie opracowane i podające wiele szczegółów praktycznych. Bardziej wątpliwe jest, czy dla otrzymywania polimerów aminokwasowych szerzej będą wykorzystywane, przynajmniej w chwili obecnej, metody termicznej polikondensacji aminokwasów, opisane w interesującym rozdziale przez S. W. Fox'a i K. Harada. Wiele ważnych szczegółów techniki eksperymentalnej podaje D. A. Darcy w swoim rozdziale pod tytułem „Oznaczanie swoistych białek w mieszaninach przy pomocy precypitacji w żelu”. D. Rosen podaje zasady teoretyczne, sposób wykonywania pomiarów i wiele danych konstrukcyjnych dla aparatury do pomia-

rów stałej dielektrycznej w roztworach białek, pod nieco wprowadzającym w błąd tytułem „Pomiary dielektryczne białek”. W rozdziale pod tytułem „Skład aminokwasowy wybranych białek i polipeptydów” (W. H. Ward) zestawiono skład aminokwasowy dla około 80 różnych białek, wyrażając zawartość aminokwasów w niezbyt dogodny sposób, w mmolach/g. Autor podaje również strukturę kowalencyjną wielu białek i polipeptydów, według danych nieco przestarzałych, gdyż nie przekraczających roku 1964. Użyteczność tego rozdziału w podręczniku metod laboratoryjnych wydaje się być problematyczna.

Podręcznik jako całość stanowić może cenne uzupełnienie księgozbiorów zakładów biochemii, zarówno specjalizujących się w badaniach nad białkami jak i innych.

K. Zakrzewski

Komunikaty

Uchwała Sekcji Fizjologii Roślin Polskiego Towarzystwa Botanicznego w sprawie uzgodnienia nomenklatury i nazewnictwa dotyczącego związków regulujących wzrost i rozwój roślin

W ramach Sekcji Fizjologii Roślin, P.T.B. zorganizowano konferencję roboczą, na której przedyskutowano zagadnienie niejednolitego stosowania w polskiej literaturze naukowej nomenklatury dotyczącej związków regulujących wzrost i rozwój roślin. Konferencja, w której uczestniczyło 35 osób reprezentujących różne dyscypliny naukowe (fizjologia, biochemia, chemia) odbyła się w Instytucie Sadownictwa PAN w Skierniewicach w dniach 16 i 17 grudnia 1966. Opracowano propozycje, które zostały następnie przyjęte i zatwierdzone na plenarnym posiedzeniu Sekcji Fizjologii Roślin PTB w Poznaniu w dniu 13 września 1967 r.

Treść uchwały przedstawia się następująco:

Pojęcia naukowe nie są stałe. Ulegają one ewolucji w miarę postępu naszej wiedzy, a także kształtują się zależnie od indywidualnego odczucia poszczególnych badaczy. Stąd wynika właśnie potrzeba dyskusji. Jednakże podejmowanie jakichkolwiek decyzji i narzucanie ich ogółowi badaczy wydaje się być z góry skazane na niepowodzenie, zwłaszcza jeżeli miałyby one być podejmowane przez niewielkie tylko grono pracowników nauki. Dlatego też takie pojęcia jak wzrost i rozwój, które są ze sobą ściśle związane i od siebie uzależnione nie mogą być ujęte w jakąś ogólną definicję bez szerszej dyskusji w skali światowej. Istnieją jednak realne podstawy do ujednoczenia nomenklatury i nazewnictwa dotyczącego związków regulujących wzrost i rozwój roślin, w oparciu o najczęściej stosowaną terminologię w literaturze angielskiej. Literatura ta obejmuje bowiem największą ilość prac dotyczących tych zagadnień i posiada największe tradycje odnośnie interesującej nas terminologii. Z tych właśnie względów postanowiono przyjąć jako generalną zasadę oparcie się na terminologii i nazewnictwie angielskim oraz stosowanie skrótów nazw angielskich, wprowadzając jednocześnie objaśnienia polskie.

Dla określenia poszczególnych związków regulujących wzrost i rozwój roślin przyjęto następujące zalecenia.

Związki organiczne, które w małych ilościach wykluczających oddziaływanie troficzne, stymulują, hamują lub w inny sposób wpływają na procesy wzrostu i rozwoju rośliny nazywamy regulatorami wzrostu roślin (synonim — substancje wzrostowe). Termin ten ma najszerszy zakres i obejmuje związki naturalne (hormony roślinne lub fitohormony) jak też związki syntetyczne. Terminowi temu można nadać bliższe znaczenie określając proces fizjologiczny, w jakim uczestniczą dane związki. W ten sposób można mówić o regulatorach kwitnienia, owocowania itp. Stosując te terminy należy jednak uwzględnić fakt, że zasadniczo brak pomiędzy nimi wyraźnej granicy, ponieważ ta sama substancja może oddziaływać na szereg różnych procesów. Mimo, że terminy „regulator wzrostu roślin” i „substancja wzrostowa” są synonimami, celem ujednoczenia nomenklatury zaleca się używanie terminu „regulator wzrostu roślin”.

Naturalne regulatory wzrostu roślin (wytwarzane przez rośliny) określone zostały terminem hormonów wzrostu roślin („fitohormony”), naturalne regulatory kwitnienia — hormonami kwitnienia i w sposób analogiczny tworzyły się terminy odnośnie innych hormonów. Termin „hormon roślinny” nie odzwierciedla jednak w sposób jednoznaczny jego działania, dlatego też używanie tego terminu należy uznać za niewskazane. Termin „hormonizacja” mający oznaczać oddziaływanie na rośliny przy pomocy regulatorów wzrostu np. drogą oprysku, czy moczenia nasion należy uznać za niewłaściwy.

W literaturze poświęconej substancjom regulującym wzrost i rozwój roślin bardzo często stosuje się terminy „stymulatory”, „promotory” i „aktywatory”. Jednakże z uwagi na to, że ten sam związek może działać raz jako stymulator a raz jako inhibitor, należy tych terminów unikać w sensie ich kwalifikacji w obrębie regulatorów wzrostu i odnosić je wyłącznie do określonego działania w konkretnych przypadkach. To samo odnosi się do takich pojęć jak antagonistista czy synergista.

Auksyny — związki, które charakteryzuje zdolność wywoływania wzrostu elongacyjnego komórek pędu. Ich działanie jest podobne do tego, jakie wywołuje kwas 3-indoliloctowy (IAA). Związki te mogą wpływać także na inne procesy fizjologiczne, jednak, efekt, jaki wywierają na wydłużenie się komórek, uważa się za najbardziej charakterystyczny. Dla oznaczenia tych związków jako najbardziej specyficzny przyjmuje się test wygięciowy koleoptyli owsa.

Nazwę „heteroauksyna” używaną niekiedy dla określenia kwasu 3-indoliloctowego (IAA) należy uznać za niewłaściwą. Jednakże z uwagi na rozpowszechnienie tego terminu w niektórych krajach, termin ten należy uwzględnić w literaturze podręcznikowej i popularyzatorskiej z odpowiednią interpretacją.

Gibereliny — związki, których specyficzne działanie polega na wydłużaniu i stymulacji podziałów komórkowych (lub na pobudzaniu obu tych procesów), a które posiadają taki sam szkielet gibanu jak kwas giberelowy. Jako najbardziej specyficzne uważa się testy karłowatych mutantów kukurydzy. Związki te regulują także szereg innych procesów fizjologicznych.

Na określenie związków wykazujących tylko właściwości biologiczne gibereliny, przyjęła się w literaturze światowej nazwa substancje giberelinopodobne. Termin ten nie jest jednak dostatecznie sprecyzowany, dlatego też w piśmiennictwie polskim należałoby go raczej unikać i zastąpić formą opisową.

Dotychczas znane gibereliny są kwasami (kwas giberelinowy) i oznacza się je skrótem GA. Jeden z tych kwasów — giberelina A₃ nazwana jest kwasem giberelowym (GA₃).

Cytokininy — substancje, których najbardziej charakterystycznym efektem jest stymulacja podziałów komórkowych, choć regulują one także szereg innych procesów fizjologicznych. Ich działanie jest podobne do tego, jakie wywołuje kinetyna (6-furfuryloaminopuryna) oraz inne 6-podstawione pochodne adeniny. Spośród znanych obecnie testów najbardziej specyficzny jest tytoniowy Skooga i współpracowników.

Równoznacznymi terminami są „kininy” i „fitokininy”, jednak termin „cytokinina” wprowadzony przez odkrywców tej grupy związków został przyjęty przez większość badaczy i dlatego zaleca się stosowanie go w piśmiennictwie polskim.

Regulatory wzrostu hamujące wzrost i rozwój, a których działanie ma charakter odwracalny nazywamy inhibitorami wzrostu. Wśród tej grupy substancji wyróżniamy inhibitory naturalne wytwarzane przez rośliny oraz inhibitory syntetyczne.

Pojęcie inhibitora wzrostu można ograniczyć przez bliższe określenie funkcji biologicznej. W ten sposób można więc mówić o inhibitorach wzrostu, kiełkowania, kwitnienia itp. Stosując te terminy należy jednak uwzględnić fakt, że substancja ta może oddziaływać na szereg różnych procesów, a zatem wyraźnej granicy pomiędzy

nimi nie da się ustalić. Przykładem może być abscysyna, która reguluje zjawisko opadania i spoczynek.

Przedstawiony tu podział inhibitorów wzrostu oparty jest o zasadę funkcji lub efektu, a nie o zasadę mechanizmu działania na poziomie molekularnym. Należy zatem wyraźnie odróżnić znaczenie „inhibitora” w sensie fizjologicznym od pojęcia „inhibitora” używanego w biochemii lub chemii.

Retardanty wzrostu roślin — inhibitory syntetyczne hamujące wzrost elongacyjny pędu o działaniu przeciwnym niż gibereliny. Rośliny reagujące na retardanty poddane ich działaniu odznaczają się charakterystycznym pokrojem przejawiającym się w skróceniu pędu i uintensywnieniu zielonej barwy liści. Związkiem wywołującym typowe zmiany charakterystyczne dla działania retardantów jest chlorek chlo-rocholiny (CCC).

Prof. dr *Marian Michniewicz*
(Przewodniczący Sekcji Fizjologii Roślin PTB)

SPIS TREŚCI

J. Bryła, B. Frąckowiak — Współzależność oddychania mitochondrialnego i glikolizy cytoplazmatycznej	167
A. Gronowska-Senger — Współczesne poglądy na mechanizm konwersji β -karotenu do witaminy A	185
A. Szweykowska — Postępy badań nad cytokininami	193
M. Michniewicz — Przydatność metody mikrobiologicznej do badań nad regulatorami wzrostu roślin	201
S. Kohlmünzer — Alkaloidy <i>Catharathus roseus</i> G. Don — nowa grupa związków biologicznie czynnych	209
J. Barańska — Współzależności metaboliczne pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w organizmie zwierzęcym	233
W. Roszkowski — Wpływ częstotliwości podawania pożywienia na przemianę materii	243
B. Grzelakowska-Sztabert, J. Rytka — Allosteryczna kontrola aktywności biologicznej niektórych białek	251
J. Kowalczyk, J. Warchalewski — Automatyczne metody oznaczania aminokwasów oparte na kolumnowej chromatografii jonowymiennej.	267
T. Korzybski — Porównanie klasyfikacji i terminologii enzymów Międzynarodowej Unii Biochemicznej z poprzednią klasyfikacją i terminologią	293
W. Niemierko — Znaczenie odkryć Marii Skłodowskiej-Curie dla biochemii	313
V Krajowe Sympozjum Biochemiczne w Krakowie (T. Szczepkowski i Z. Zak)	323
Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1965—1967 (K. Zakrzewski)	323
Recenzje książek (A. Grębecki, S. Niemierko, K. Zakrzewski)	329
Uchwała Sekcji Fizjologii Roślin Polskiego Towarzystwa Botanicznego (M. Michniewicz)	333

W 3-cim zeszycie tego tomu ukażą się:

1. Fizjologiczna rola fibrynogenu i fibryny, A. L. Copley
2. Biochemia hemostazy, S. Niewiarowski
3. Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny, B. Lipiński
4. Aspekty biochemiczne niektórych funkcji leukocytów, J. Prokopowicz
5. Regulacja biosyntezy hemoglobiny, A. Mazanowska, O. Rosiek, Z. Kuratowska
6. Sprzężenie zwrotne w wewnątrzkomórkowej regulacji przemian, Z. Kuratowska
7. Struktura i własności makroglobuliny, M. A. Odrzywolska
8. Niektóre zagadnienia metabolizmu proliny, M. Jeleńska
9. Biochemiczne aspekty procesu mineralizacji kości, Z. Szot
10. Dziedziczne popromienne uszkodzenia zwierzęcych komórek somatycznych, J. Z. Beer

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1968

ARTICLES IN POLISH

Volume 14

Number 2

J. Bryła, B. Frąckowiak — Integration of Mitochondrial Respiration and Cytoplasmic Glycolysis (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	167
A. Gronowska-Senger — Present Knowledge of β -Carotene Conversion into Vitamin A (Dep. Techn. Hyg. Nutr. High. School Agricult., Warszawa)	185
A. Szweykowska — Recent Progress in Cytokinin Research (Dep. Gen. Bot. Univ., Poznań)	193
M. Michniewicz — The Microbial Test as a Method for Determination of Plant Growth Regulators (Dep. Plant Physiol. Univ., Toruń)	201
S. Kohlünzer — Alkaloids of <i>Catharanthus Roseus</i> G. Don. — New Group of Biologically active Compounds (Dep. Pharmacol. Pol. Acad. Sci., Kraków)	209
J. Barańska — Relationship in the Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids in Animals (Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	233
W. Roszkowski — The Effect of Feeding Frequency on Metabolic Processes (Dep. Techn. Hyg. Nutr. High School Agricult., Warszawa)	243
B. Grzelakowska-Sztabert, J. Rytka — The Allosteric Control of Biological Activity of Some Proteins (Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	251
J. Kowalczyk, J. Warchalewski — Automatic Methods of Amino Acid Determination Based on Column Ion-Exchanger Chromatography (Dep. Agricult. Techn. High School Agricult., Poznań)	267
T. Korzybski — The Comparison of Enzyme Classification and Nomenclature of the International Union of Biochemistry with Previous Classification and Nomenclature (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	293
W. Niemierko — The Role of Discoveries of Maria Skłodowska-Curie for Biochemistry (Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	313
Chronicle	323

Chemia Analityczna

KOMISJA CHEMII ANALITYCZNEJ PAN

Dwumiesięcznik. Prenumerata roczna 210 zł.

Redakcja: Warszawa, ul. Noakowskiego 3,
Politechnika Warszawska, Katedra Chemii
Analitycznej. tel. 28-33-39.

Publikuje prace referatowe (przeglądowe) z nowych działów chemii analitycznej, oryginalne prace naukowe z zakresu chemii analitycznej, jej podstaw teoretycznych, metodyk oraz zastosowań praktycznych i aparatury. Ponadto zawiera krótkie doniesienia informujące o przyczynkowych danych z zakresu chemii analitycznej, notatki laboratoryjne na temat możliwości zastosowania znanych już metod analitycznych, listy do Redakcji anonsujące nowe ciekawe dane z zakresu chemii analitycznej lub też będące zapowiedzią nowych prac badawczych, oraz bibliografię polskich prac analitycznych ukazujących się we wszystkich czasopismach krajowych. W osobnym dziale zamieszcza recenzje polskich i wybranych zagranicznych książek z zakresu chemii analitycznej. Prowadzi też kronikę ważniejszych wydarzeń i działalności Komisji Chemii Analitycznej PAN.

Streszczenia prac podawane są w języku angielskim.

Czasopismo przeznaczone dla pracowników naukowych wyższych uczelni oraz instytutów naukowo-badawczych, a także dla pracowników laboratoriów przemysłowych oraz studentów.

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.* 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., *Podręcznik Biochemii*, PZWL, Warszawa 1963. 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, Academic Press, New York 1957, str. 680.

29.6.68

SPIS TREŚCI

J. Bryła, B. Frąckowiak — Współzależność oddychania mitochondrialnego i glikolizy cytoplazmatycznej	167
A. Gronowska-Senger — Współczesne poglądy na mechanizm konwersji β -karotenu do witaminy A	185
A. Szweykowska — Postępy badań nad cytokininami	193
M. Michniewicz — Przydatność metody mikrobiologicznej do badań nad regulatorami wzrostu roślin	201
S. Kohlmünzer — Alkaloidy <i>Catharanthus roseus</i> G. Don — nowa grupa związków biologicznie czynnych	209
J. Barańska — Współzależności metaboliczne pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi w organizmie zwierzęcym	233
W. Roszkowski — Wpływ częstotliwości podawania pożywienia na przemianę materii	243
B. Grzelakowska-Sztabert, J. Rytka — Allosteryczna kontrola aktywności biologicznej niektórych białek	251
J. Kowalczyk, J. Warchalewski — Automatyczne metody oznaczania aminokwasów oparte na kolumnowej chromatografii jonowymiennej.	267
T. Korzybski — Porównanie klasyfikacji i terminologii enzymów Międzynarodowej Unii Biochemicznej z poprzednią klasyfikacją i terminologią	293
W. Niemierko — Znaczenie odkryć Marii Skłodowskiej-Curie dla biochemii	313
V Krajowe Sympozjum Biochemiczne w Krakowie (T. Szczepkowski i Z. Zak)	323
Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1965—1967 (K. Zakrzewski)	323
Recenzje książek (A. Grębecki, S. Niemierko, K. Zakrzewski)	329
Uchwała Sekcji Fizjologii Roślin Polskiego Towarzystwa Botanicznego (M. Michniewicz)	333