

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1968

tom 14

nr 3

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 „górze” i „dół”.

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1968
tom XIV
zeszyt 3

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. Pawełekiewicz (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 2070 (1893 + 127)	Oddano do składania 3.V.68.
Ark. wyd. 10,25, ark. druk. 9, wkł. kred.	Podpisano do druku we wrześniu.
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Zam. 790/68, N-38.
Cena zł 20.—	Druk ukończono we wrześniu 68 r.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

*Prace zawarte w tym zeszycie
poświęcone są pamięci
prof. dr Edwarda Kowalskiego
w pierwszą rocznicę Jego śmierci.*

REDAKCJA

*The articles in this issue
are dedicated to the Memory
of prof. dr Edward Kowalski
on the First Anniversary of His Descent.*

EDITOR

15 kwietnia 1967 roku był zwykłym dniem pracy. Odwiedziny w Pracowniach, rozmowy o bieżących doświadczeniach, dyskusja wyników, krótka narada robocza, jakieś sprawy administracyjne. Później, jak każdej soboty — Seminarium. Prowadził je jak zawsze krytyczny i dociekliwy, jak zawsze skupiony, uważnie wychwytyjący każdy nowy fakt i ideę, z tym tak dobrze nam znanym na poły drwiącym, a pełnym dobroci uśmiechem. Zmarł nagle w niespełną godzinę po zakończeniu tego seminarium, w połowie tego zwykłego dnia. W pół drogi.

Szedł po tej drodze niestrudzenie, zawsze pełen nowych idei. Zapoczątkował i czynnie brał udział w badaniach nad strukturą fibrynogenu i kolagenu, biochemią tkanki łącznej, układem krzepnięcia krwi i fibrynozylizy, metabolizmem hemu i porfiryn, układem erytropoezy, biochemią i funkcją krwinek płytkowych. Rozwinął szeroko badania nad wpływem promieniowania jonizującego na organizmy żywe, patogenezą choroby popromiennej, transplantacją komórek szpiku kostnego, wpływem skażeń wewnętrznych izotopami promieniotwórczymi i ochroną przed tymi skażeniami. Stał się współtwórcą nowoczesnej hematologii, twórcą polskiej radiobiologii, uczonym na miarę światową.

Piękno przyrody, wielkie dzieła muzyki, malarstwa czy literatury były dla Niego równie bliskie i zrozumiałe, równie podniecające jak piękno twórczej myśli w biologii, chemii, fizyce czy innych dyscyplinach nauki.

Zarażał Swym entuzjazmem wszystkich, z którymi się zetknął. W chwilach trudnych zawsze potrafił jednym krótkim powiedzeniem, dowcipem rozładować napięcie, ukazać prawdziwe proporcje danego problemu. Bezkompromisowo walczył z małością i fałszem. Wychowywał, uczył, wymagał rzetelnej pracy, a w każdych okolicznościach zachowania godności osobistej.

Był prawdziwym przyjacielem.

Zbigniew Latało

A. L. COPLEY *

Fizjologiczna rola fibrynogenu i fibryny

On the Physiological Roles of Fibrinogen and Fibrin

The concept of the thin layer of fibrin lining the endothelium of blood vessels is presented. According to this concept the fibrin-layer is controlled by homeostasis of continuous fibrinolysis and steady fibrin formation at the vessel site.

W ostatnich latach pojawiło się wiele nowych i ciekawych prac dotyczących chemizmu przemiany fibrynogenu w fibrynę i polimeryzacji monomerów fibryny. Celem niniejszego artykułu nie jest dyskusowanie wyników tych prac, ponieważ poświęcono im ostatnio kilka doskonałych opracowań przeglądowych (3, 24, 27). Chciałbym natomiast zapoznać Czytelnika z koncepcjami i pracami wychodzącymi z naszej pracowni, mając nadzieję, iż będzie to pomocne dla zajmujących się zagadnieniami związanymi z fizjologiczną rolą fibrynogenu i fibryny.

Zmarły niedawno mój dobry przyjaciel, Prof. Edward Kowalski, znał większość tych prac. Na międzynarodowych zjazdach i konferencjach prowadziliśmy szereg owocnych dyskusji, a także i wtedy, gdy miałem zaszczyt i przyjemność gościć Go w moich pracowniach w Paryżu, Londynie, Nowym Jorku i East Orange. Dotkliwy brak Prof. Kowalskiego odczuwam nie tylko ja sam, ale i całe nasze środowisko naukowe. Odszedł od nas Człowiek wielkiego serca, który był czołową postacią w naukach medycznych, i Jego pamięci poświęcam niniejszy artykuł.

W roku 1965 stwierdziłem, że fibrynogen wiąże się z zawiesiną sproszkowanej fibryny, z której potem można go eluować za pomocą roztworów soli (9). Razem z L u c h i n i m opublikowaliśmy szereg prac dotyczących tworzenia się kompleksów fibrynogenu z fibryną (16, 17, 28). Kompleksy takie tworzą się jako produkt zahamowania polimeryzacji określonego typu monomeru fibryny przez fibrynogen.

Co najmniej dwa typy monomerów fibryny tworzą się w procesie krzepnięcia fibrynogenu. Jednym z nich jest monomer fibryny, który tworzy się pod wpływem wysokich stężeń trombiny z odszczepieniem

* Prof. dr, Hemorrhage and Thrombosis Research Laboratories, Veterans Administration Hospital, East Orange, New Jersey, USA.

Część tej pracy została przedstawiona na 23 Międzynarodowym Kongresie Fizjologii Tokyo 1965.

zarówno fibrynopeptydu A jak i B. Drugi typ monomeru fibryny jest pozbawiony jedynie fibrynopeptydu A. Fibrynopeptyd ten uwalnia się pod wpływem małych stężeń trombiny, a także pod wpływem enzymu otrzymanego z jadu brazylijskiego węża *Botrops jararaca*. Enzym ten otrzymaliśmy w postaci wysoko oczyszczonego preparatu.

Uwagę naszą skierowaliśmy przede wszystkim na kinetykę uwalniania fibrynopeptydów, ponieważ tworzenie kompleksu fibrynogenu z fibryną zależy zarówno od rodzaju monomeru fibryny, jak i od szybkości odszczepiania fibrynopeptydu A. Kompleks tworzy się jeśli szybkość wytwarzania monomeru fibryny jest mała. Jeśli natomiast szybkość tej reakcji jest duża, to wtedy zachodzi polimeryzacja monomerów i tworzy się żel fibrynowy.

W roku 1964 opublikowaliśmy wraz z Luchinim metodę otrzymywania wysoko oczyszczonego monomeru fibryny pozbawionego fibrynopeptydu A (17, 28). Belitzer i Chodorowa (1) stwierdzili już w 1952 roku, że fibrynogen opóźnia znacznie polimeryzację monomerów fibryny. Chociaż autorzy ci nie otrzymywali monomerów pozbawionych fibrynopeptydu A, należy sądzić, iż ich preparat „monomeru fibryny F” musi zawierać znaczne ilości tych monomerów. Przy niskich stężeniach trombiny szybkość uwalniania fibrynopeptydu B jest stosunkowo niewielka w porównaniu z odszczepianiem fibrynopeptydu A, które zachodzi równoległe do tworzenia się kompleksu fibrynogenu z fibryną. Wykazaliśmy wraz z Luchinim, że uwalnianie fibrynopeptydu B z fibrynogenu ludzkiego poprzedzane jest odszczepieniem fibrynopeptydu A. Podobne wyniki otrzymał Blombäck (2) badając fibrynogen wołowy oraz Schainoff i Page z fibrynogenem króliczym (35). Kompleks opisany przez tych ostatnich autorów i nazwany krioprofibryną może być identyczny z frakcją wytrącającą się na zimno, scharakteryzowaną w pracowni Prof. Kowalskiego przez Niego i Jego współpracowników (25).

Ponieważ, najprawdopodobniej, niewielkie ilości trombiny powstają ciągle w krwiobiegu, tworzące się kompleksy fibrynogenu z monomerami fibryny mogą, między innymi, odgrywać istotną rolę w następujących procesach: 1) w odkładaniu fibryny prawdopodobnie na śródbłónkach i w błonie podstawowej, 2) w hamowaniu tworzenia się skrzepu, 3) w powstawaniu rezerwowego fibrynogenu, który może być udostępniony poprzez dysocjację, a jest albo zmagazynowany w śródbłonku, albo znajduje się w krążeniu, 4) w powstawaniu makromolekularnych kompleksów fibryny o kształcie i wielkości zbliżonych do pośrednich polimerów fibryny, opisanych w 1947 roku przez Ferry i Morrisona (23). Kompleksy takie mogą być odpowiedzialne za stosunkowo duże wahania lepkości krwi i osocza opisywane w literaturze.

Założenia prac przeprowadzonych w naszej pracowni wynikają z koncepcji fizjologicznej roli fibryny, którą po raz pierwszy przedstawiłem

w 1953 roku w czasie obrad 19-go Międzynarodowego Kongresu Fizjologicznego w Montrealu (4), a potem rozszerzyłem w dalszych pracach (7, 8, 10, 11).

Postulowałem, że cienka, submikroskopowa warstwa fibryny wyściela wewnętrzną powierzchnię ściany naczyń krwionośnych pozostając w bezpośrednim kontakcie z komórkami śródbłonka. Uważa się, iż ta warstwa fibryny zależy od homeostazy procesów ciągłego tworzenia się fibryny i fibrynolizy, przebiegających na ścianach naczyń krwionośnych. Na istnienie takiej warstwy fibryny wskazuje badanie hemoreologiczne *in vivo* przeprowadzone w moim poprzednim laboratorium w Londynie. Uzyskaliśmy wówczas dane bezpośrednio przemawiające za istnieniem więcej lub mniej nieruchomej osoczowej strefy w pobliżu ściany naczynia (21). Istnienie takiej strefy postulował po raz pierwszy Poiseuille w roku 1835 (34).

Stwierdziliśmy również przeciwskrzepliwie działanie fibryny (5, 22). Stefkowski i ja (10) potwierdziliśmy piękne doświadczenia dotyczące przeciwskrzepliwego działania fibryny, które J. Lister przedstawił w 1863 roku podczas *Cronian Lectures* na posiedzeniu Towarzystwa Królewskiego w Londynie (26).

Dalsze badania wykonane wspólnie z Scott Blairem dotyczą zwilżalności fibryny i żyjącego śródbłonka (7, 14). Wykazaliśmy obniżenie względnej lepkości w kapilarnych wiskozymetrach wysłanych fibryną, co nasuwa przypuszczenie, iż istnienie błony fibrynowej na komórkach śródbłonka może stanowić podstawowy czynnik wspomagający krążenie dzięki zmniejszeniu oporu dla przepływającej krwi (6, 20).

* Istnieje wiele pośrednich danych przemawiających za istnieniem takiej fizjologicznej warstwy fibrynowej. W związku z tym można dodać co następuje. Zastosowaliśmy technikę Coona w celu wykazania obecności fibryny na śródbłonku najmniejszych naczyń krwionośnych. Na podstawie jasnozielonej hyperfluorescencji wykazaliśmy obecność ściśle określonej, bardzo cienkiej, ciągłej warstwy fibryny wyścielającej powierzchnię światła najmniejszych naczyń krwionośnych w ludzkich i wołowych sercach i nerkach (10).

W badaniach elektronomikroskopowych nad przepuszczalnością kapilar Majno i Palade (31, 32) zaobserwowali w ścianie kapilarnych naczyń krwionośnych włókna fibryny, których nie można było dostrzec w tkance łącznej na zewnątrz błony podstawowej. Aż do chwili obecnej większość specjalistów w zakresie mikroskopii elektronowej zaprzeczała istnieniu warstwy fibrynowej wyścielającej naczynia krwionośne. Jednakże Luft zaobserwował w 1965 roku istnienie takiej cienkiej i delikatnej warstwy stosując nową technikę. Badacz ten stwierdził, że „okienka” śródbłonka zamknięte są cienką błoną (29). Luft sądził, że czerwień rutenowa zastosowana przez niego w tych doświadczeniach wiąże się z mukopolisacharydami zawartymi w wyścielisku śródbłonka (30). Ostat-

nio stwierdziliśmy (19), że czerwien rutenowa wiąże się nie tylko z aminowymi polisacharydami, ale także z różnymi białkami, na przykład z fibrynogenem, fibryną, elastyną, kolagenem i innymi.

Palade z Uniwersytetu Rockefellera pokazywał mi liczne zdjęcia podobnych cienkich błon. Stosując octan uranylu stwierdził on istnienie cienkich błon, które zamykają „okienka” śródbłonna kapilarnych naczyń trzewnych i otwórki pęcherzyków śródbłonna w naczyniach kapilarnych trzewnych i mięśniowych. Postuluje on, iż błony te stanowią część ciągłej, niezależnej warstwy uformowanej prawdopodobnie z białka, które pokrywa komórka *endotelium* zarówno od strony światła, jak i od strony tkanek (33).

Copley, Hanig, Luchini i Allen (15) stwierdzili, że fibrynopeptydy A i B zwiększają przepuszczalność kapilar, mierzoną ilościowo za pomocą testu z peroksydazą izolowaną z chrzanu. Wyniki tych badań dostarczają pośrednich dowodów na istnienie tak zwanej fibryny cementowej (10), która może otaczać komórki śródbłonna i znajdować się w błonie podstawowej. Uważa się, że fibryna cementująca składa się z typowej i nietypowej fibryny. Ta ostatnia zawiera produkty rozpadu fibryny powstałe na skutek fibrynolizy. Nagromadzenie materiału ziarnistego, który Majno i Palade (31) zaobserwowali w swych badaniach elektronomikroskopowych w przestrzeni pozaśródbłonkowej, pomiędzy komórkami śródbłonna a błoną podstawową może stanowić takie właśnie fragmenty fibryny. Autorzy ci sugerują również, że materiał ten może być fibryną na wczesnych etapach polimeryzacji (31). Inna nietypowa fibryna może pochodzić z fibrynogenu zmienionego w procesie fibrynolizy i zachowującego ciągle zdolność do przemiany w fibrynę pod wpływem trombiny (10, 12).

Stwierdzenie wzmoczonej przepuszczalności kapilar pod wpływem fibrynopeptydów i plazminopeptydów (13) rzuca nowe światło na fizjologię ściany kapilarnych naczyń krwionośnych. Ma to również duże znaczenie w zapaleniu i w odwracalnych postaciach wstrząsu. W takich warunkach dochodzi do stanu, w którym elementy morfotyczne krwi, a przede wszystkim erytrocyty, tworzą odwracalne agregaty i blokują naczynia kapilarne. Następstwem tego jest zwiększona przepuszczalność kapilar określana również terminem nieciągłości kapilarnej (13).

Kompleksy fibrynogenu z monomerami fibryny wpływają na powstawanie agregatów erytrocytów, a proces ten z kolei odgrywa istotną rolę w przepływie krwi. Obecność takich kompleksów wywiera wpływ na przepływ i na stabilność zawiesiny erytrocytów w osoczu i w roztworach oczyszczonego fibrynogenu. Badania lepkości wykonano przy szybkości przepływu w granicach od 230 do 5,75 s⁻¹. Porównano obserwacje mikroskopowe agregatów krwinek czerwonych z uwzględnieniem *rouleaux* z wynikami pomiarów lepkości i stabilności zawiesiny. Kompleksy fibrynogenu z monomerami fibryny zwiększały istotnie lepkość krwi w badanych

układach. Towarzyszy temu dwukrotny wzrost szybkości opadania krwinek. Nasze badania podkreślają konieczność poddania krytyce doniesień literaturowych, gdzie pierwotną rolę w agregacji krwinek czerwonych przypisuje się fibrynogenowi. Kompleksy fibrynogenu z fibryną są obecne w warunkach fizjologicznych, ponieważ trombina tworzy się ciągle w niewielkich ilościach w krwiobiegu. W sytuacjach, w których dochodzi do zwiększania ilości kompleksów fibrynogenu z fibryną w krążeniu, mogą mieć miejsce istotne zaburzenia przepływu krwi prowadzące do zmian patologicznych (18).

W licznych publikacjach przed wieloma laty zwracałem uwagę, że powstawanie monomerów fibryny i ich polimeryzacja są jakościowo różnymi fazami. A mianowicie pierwszą fazą jest powstawanie monomerów, a drugą — tworzenie żelu fibryny. Niektóre z tych prac były ostatnio przedmiotem opracowania przeglądowego (11). Opisałiśmy ponadto czynniki przyspieszające żelifikacje fibryny, tak zwane czynniki żeloplastyczne* jak na przykład jony wapnia, żeloplastyna osoczowa i tkankowa oraz czynniki antyżeloplastyczne i hamujące żelifikację fibryny. Praca nad tymi czynnikami jest obecnie przedmiotem badań w moim laboratorium przy współpracy Marylin Thaller, R. G. Kinga, B. W. Luchiniego i B. M. Scheithala. Wyniki tej pracy będą opublikowane gdzie indziej.

Tłumaczyli: S. Niewiarowski i B. Lipiński

LITERATURA

1. Belitzer V. A., Chodorowa J. L., *Biochimija* 17, 676 (1952).
2. Blomback B., *Arkiv. Kemi.* 12, 321 (1958).
3. Blomback B., w *Blood Clotting Enzymology*. W. H. Seegers (Editor), Academic Press, New York i Londyn, 1967, s. 143.
4. Copley A. L., *Abst. Communic. 19th Internat. Physiol. Congr. Montreal*, 1953, s. 280.
5. Copley A. L., *Proc. Europ. Soc. Haematol.*, London, 1959, II/2:672, S. Karger, Basel-New York, 1960.
6. Copley A. L., w: *Flow Properties of Blood and Other Biological Systems*, red. A. L. Copley and G. Stainsby, Pergamon Press, Oxford, Londyn 1960, str. 97.
7. Copley A. L., *Proc. 8th Internat. Haematol. Congr. Tokyo*, 1960, 3, 1648, Pan-Pacific Press, Tokyo 1962.
8. Copley A. L., *Hémostase*, Paris, 3, 13 (1963).
9. Copley A. L., *Federation Proc.* 22, 619 (1963).
10. Copley A. L., *Proc. 9th Congr. Int. Soc. Hemat. Mexico City* 1962. Mexico, D. F. Universidad Nacional Autonoma de Mexico 2, 367 (1964).
11. Copley A. L., *Pat. Fizjol. Experiment. Ter.* 8, 3 (1964).
12. Copley A. L., *Bibliotheca anatomica* 4, 3 (1964).

* Są one znane pod nazwą czynników fibrynoplastycznych (przypisek tłumaczy).

13. Copley A. L., *Bibliotheca anatomica* 7, 148 (1965).
14. Copley A. L., Glover F. A., Scott Blair G. W., *Biorheol.* 2, 29 (1964).
15. Copley A. L., Hanig J. P., Luchini B. W., Allen R. L., Jr., Proc. 4th Europ. Conf. on Microcirculation, Cambridge, 1966, red. H. Harders S. Karger, Basel, New York 1967, str. 475.
16. Copley A. L., Luchini B. W., *Federation Proc.* 23, 1522 (1964).
17. Copley A. L., Luchini B. W., *Life Sci.* 3, 1293 (1964).
18. Copley A. L., Luchini B. W., Whelan E. W. w: Hemorheology. Proc. 1 Internat. Conf., University of Iceland, 1966, red. A. L. Copley, Pergamon Press, Oxford 1968, str. 375.
19. Copley A. L., Scheinthal B. M., Polanskyj B. S. (w przygotowaniu do druku).
20. Copley A. L., Scott Blair G. W., Glover F. A., Thorley R. S., *Kolloid Z.* 168, 101 (1960).
21. Copley A. L., Staple P. H., *Biorheol.* 1, 3 (1962).
22. Copley A. L., Steichele D., Spradau M., Thorley R. S., *Nature* 183, 1683 (1959).
23. Ferry J. D., Morrison P. R., *J. Am. Chem. Soc.* 69, 388 (1947).
24. Laki K., *Federation Proc.* 24, 794 (1965).
25. Lipiński B., Budzyński A. Z., Latało Z. S., Kowalski E., *Acta Biochim. Polon.* 11, 527 (1964).
26. Lister J., *Lancet* s. 149 (Aug. 8); s. 179 (Aug. 15) 1863.
27. Lorand L., *Federation Proc.* 24, 784 (1965).
28. Luchini B. W., Copley A. L., *Federation Proc.* 24, 1425 (1965).
29. Luft J. H., *Anat. Record* 151, 380 (1965).
30. Luft J. H., *Federation Proc.* 25, 1773 (1966).
31. Majno G., Palade G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 571 (1961).
32. Palade G. E., *Circulation* 24, 368 (1961).
33. Palade G. E., w Hemorheology. Proc. 1 Internat. Conf. University of Iceland, 1966, red. A. L. Copley, Pergamon Press, Oxford, 1968, s. 703.
34. Poiseuille J. L. M., Académie des Sciences, Séance publique du 28 Décembre, 1835, Tome VII des Savants étrangers, Paris, Impr. Royale, 1839.
35. Shainoff J. R., Page I. R., *J. Exptl. Med.* 116, 687 (1962).

STEFAN NIEWIAROWSKI*

Biochemia hemostazy

Biochemistry of Hemostasis

The modern views on hemostasis with particular reference to the biochemical approach to this problem are discussed. The article includes following chapters — plasma clotting factors, the significance of fibrinolytic system, the role of blood platelets, the role of leukocytes and erythrocytes, local hemostasis (formation of hemostatic plug), continuous hemostasis. New schemes of typical hemostatic mechanism and of emergency hemostatic mechanism are given.

Hemostaza jest zespołem mechanizmów utrzymujących krew krążącą w stanie płynnym w łożysku naczyniowym w warunkach fizjologicznych oraz mechanizmów doprowadzających do zatamowania krwawienia po przerwaniu ciągłości naczyń. Mechanizmy utrzymujące płynność krwi w naczyniach i zapobiegające jej wynaczynieniu określamy mianem hemostazy ciągłej. Mechanizmy doprowadzające do zatrzymania krwawienia po uszkodzeniu naczynia nazywamy hemostazą lokalną. Krwawienie zatrzymuje się dzięki wytworzeniu czopu hemostatycznego, w skład którego wchodzi elementy morfotyczne i nitki włókniaka.

Skuteczność hemostazy zależy od prawidłowo przebiegającego procesu zkrzepnięcia krwi, od stanu naczyń krwionośnych, a przede wszystkim od sprawnie przebiegającej agregacji krwinek płytkowych i innych biologicznych funkcji tych komórek. Istotne znaczenie w hemostazie mają również układ fibrynolityczny osocza oraz leukocyty i erytrocyty.

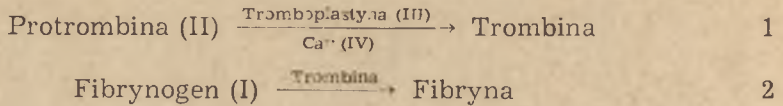
Zaburzenia hemostazy mogą doprowadzać z jednej strony do wzmożonych krwawień i skaz krwotocznych, z drugiej strony — do choroby zakrzepowej. Zakrzep — struktura analogiczna do czopu hemostatycznego — tworzy się na wewnętrznej stronie naczynia przy uszkodzeniu jego śródbłonna, ale przy zachowaniu ciągłości naczynia.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie niektórych osiągnięć w zakresie biochemii hemostazy oraz próba ich korelacji z obserwacjami klinicznymi i oceny znaczenia biologicznego omawianych mechanizmów hemostatycznych.

* Doc. dr, Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, Białystok.

I. Osoczowe krzepnięcie krwi

Klasyczny schemat krzepnięcia krwi zaproponowany w roku 1905 przez Morawitza (144) uwzględnia dwie reakcje



Czynniki biorące udział w tych reakcjach oznaczono — zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Komitetu Nomenklatury Czynn timer Krzepnięcia — cyframi rzymskimi. Na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat wykryto i scharakteryzowano osiem dalszych osoczowych czynników krzepnięcia (tablica 1 i 2).

Przynajmniej 10 spośród nich jest białkami. Tromboplastyna (III) jest czynnikiem tkankowym. Osoczowe czynn timer krzepnięcia, za wyjątkiem I i XIII, biorą udział w reakcjach aktywacji protrombiny do trombiny. Czynn timer XIII działa na fibrynę i powoduje stabilizację skrzepu.

Są dane doświadczalne (2, 14), że proces aktywacji może przebiegać w dwu układach: wewnątrzpochodnym (krzepnięcie tylko w obecności czynników osoczowych i płytek krwi) i zewnątrzpochodnym (krzepnięcie pod wpływem tromboplastyny tkankowej). W układzie wewnątrzpochodnym proces rozpoczyna się od aktywacji czynn timer XII przez kontakt z po-

Tablica 1.

Synonimy osoczowych czynników krzepnięcia.

Uwaga: Termin — Czynn timer VI wyszedł z użycia, ponieważ okazał się on identyczny z czynn timer V aktywnym.

Czynnik	Synonim
I	Fibrynogen
II	Protrombina (protrombina właściwa)
III	Tromboplastyna tkankowa
IV	Wapń
V	Czynnik chwiejny, proakceleryna, Ac-globulina
VI(?)	Aktywny czynn timer V, akceleryna
VII	Prokonwertyna, SPCA
VIII	Antyhemofilowa globulina (AHG), <i>antihemophilic factor</i> (AHF), czynn timer przeciwhemofilowy A
IX	Czynnik Christmаса (<i>Christmas Factor</i>), <i>plasma thromboplastin component</i> (PTC), czynn timer przeciwhemofilowy B
X	Czynnik Stuart-Prowera
XI	<i>Plasma thromboplastin antecedent</i> (PTA), czynn timer przeciwhemofilowy C, czynn timer Rosenthala
XII	Czynnik Hagemana
XIII	Stabilizator włóknika (FSF), LL factor, fibrynaza

T a b l i c a 2

Niektóre własności osoczowych czynników krzepnięcia

Czynnik	Obecność w osoczu po absorpcji BaSO ₄	Ciężar cząsteczkowy	Własności elektroforetyczne, globuliny (41)	Obecność w osoczu po podaniu cewkumarolu	Wrodzony niedobór czynnika u ludzi
I (fibrynogen)	+	340 000 (199)	β - γ	+	Afibrinogenemia
II (protombina)	-	68 500 (109)	α_1 - α_2	-	Hypoprotrombinemia
IIa (trombina)	0	30 000 (110)		0	
V (proakceleryna)	+	290 000 (51)	β - γ	+	Parahemofilia
VII (prokonwertyna)	-	60 000 (43)	α - β	-	Hypoprotekwerinemia
VIII (AHG)	+	200 000 (140)	α_2 (7)	+	Hemofilia A
IX (Christmasa)	-	110 000 (50)	α_2	-	Hemofilia B
X (Stuarta)	-	87 000 (50)	α	-	Hypostuartermia
Xa (aktywny Stuarta)	0	36 000 (50)		0	
XI (PTA)	+		β - γ	+	Hemofilia C
XII (Hagemana)	+	80 000 (63)	β - γ	+	Anomalia Hagemana
XIII (FSF)	+	350 000 (118)	α_2	+	Wrodzony niedobór FSF

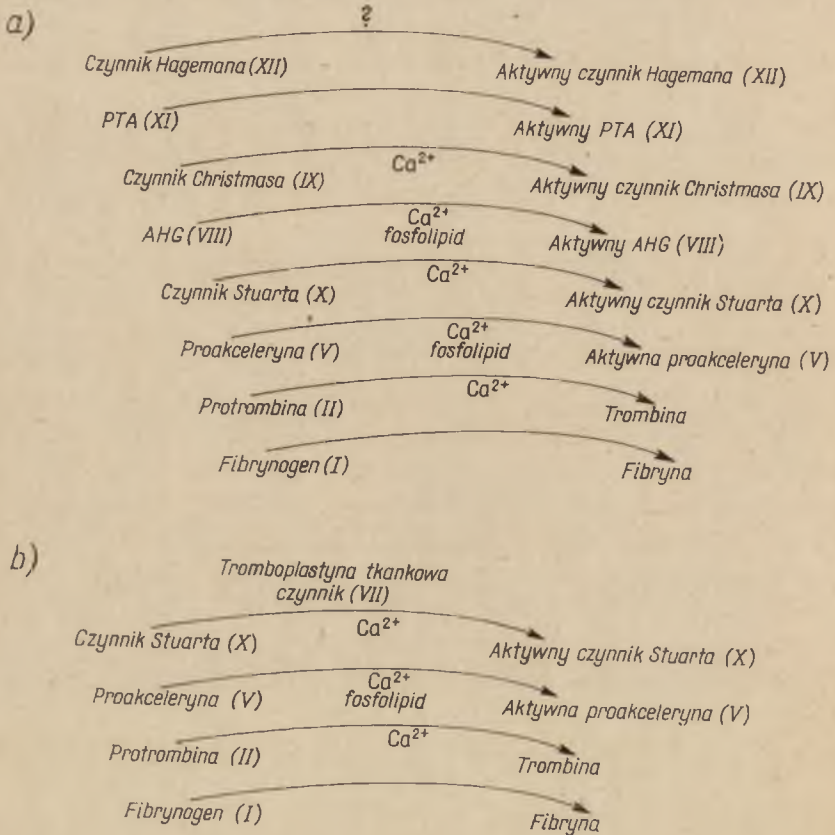
(+) obecny

(-) zmniejsza się lub znika

(0) w ogóle nie występuje w normalnym osoczu

wierzchniami (na przykład szkło, inne krzemiany) (68, 204), a dalsze reakcje przebiegają przy udziale czynników XI, IX, VIII, X i V oraz jonów wapnia i fosfolipidów płytkowych. W zewnątrzpochodnym układzie pierwszym etapem jest interakcja czynnika VII i tromboplastyny tkankowej, następne etapy warunkuje obecność czynnika V, X i jonów wapnia.

Wrodzony niedobór każdego spośród 10 osoczowych czynników krzepnięcia powoduje zaburzenia w hemostazie (159). Badania osoczy



Rys. 1. Kaskadowy schemat krzepnięcia:

a) mechanizm wewnątrzpochodny,

b) mechanizm zewnątrzpochodny (według Davie'ego i Ratnoffa) (40)

chorych z wrodzonymi skazami krwotocznymi pozwoliły wykryć większość czynników krzepnięcia, ustalić ich rolę oraz kolejność poszczególnych reakcji procesu aktywacji protrombiny. Na podstawie tych badań w 1964 r. zaproponowano schemat krzepnięcia, który Macfarlane (125) nazwał „kaskadowym”, a Davie i Ratnoff (40) „wodospadowym” (rysunek 1 a i b). W artykule tym używać będziemy określenia — kaskadowy.

Według schematu kaskadowego w wieloenzymatycznym układzie ma miejsce aktywacja szeregu proenzymów przy czym każdy proenzym jest substratem dla poprzednio zaktywowanego enzymu, a każdy enzym jest produktem reakcji. Przypuszcza się, że w sposób analogiczny działa także dwuetapowy mechanizm aktywacji enzymów trzustkowych oraz aktywacja poszczególnych składników komplementu (221).

Kaskadę krzepnięcia rozpoczyna aktywacja czynnika XII. *In vivo* rolę aktywującej powierzchni może pełnić kolagen (160, 162), który po uszkodzeniu ściany naczynia jest dostępny dla płynącej krwi. Aktywacja polega prawdopodobnie na zmianie wtórnej struktury czynnika XII, co odsłania jego grupy czynne (134). Zaktywowane cząsteczki czynnika XII ulegają następnie samorzutnej polimeryzacji (45).

Niektóre czynniki krzepnięcia są enzymami proteolitycznymi o dużej swoistości. Wykazano to dla oczyszczonych preparatów czynników: XII (158, 192), XI (96), X (50) i trombiny (197), chociaż są też prace nie potwierdzające tych danych o czynnikach XII (183) i X (123). Zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego obserwowane przy aktywacji czynnika II (194), V (174) i X (50) może zależeć od ograniczonej proteolizy.

Z kaskadowego schematu krzepnięcia wynika możliwość wzmacniania kolejnych, sprzężonych ze sobą reakcji enzymatycznych: jeżeli przyjmie my, że jedna cząsteczka enzymu reaguje z 10 cząsteczkami substratu, to w kaskadzie złożonej z sześciu etapów, jedna cząsteczka czynnika XII może zaktywować w stosunkowo krótkim czasie 10^6 cząsteczek protrombiny. Wałd (216) przyrównuje ten mechanizm do mechanizmu amplifikacji bodźców świetlnych w siatkówce.

Teoria kaskadowa dobrze tłumaczy niektóre obserwacje kliniczne wrodzonych skaz krwotocznych. Wywołujące te skazy niedobory poszczególnych czynników krzepnięcia rzadko jednak są całkowite. Niedobór czynnika XII przebiega zwykle bez objawów krwawień, a skaza krwotoczna z niedoboru czynnika XI jest zwykle łagodna. Prawdopodobnie niewielkie, wręcz niewykrywalne stężenia tych czynników obecne w osoczu chorych zapewniają jeszcze sprawne funkcjonowanie mechanizmu kaskadowego. Natomiast niedobory czynników VIII, IX, X i V dają o wiele cięższe skazy, co można by tłumaczyć niezbędną wyższymi stężeniami tych czynników do prawidłowego funkcjonowania kaskady. Nasilenie i częstość krwawień zależą od stopnia niedoboru rozpatrywanego czynnika krzepnięcia. Chorzy z niedoborem protrombiny wprawdzie zwykle nie mają ciężko przebiegającej skazy krwotocznej, jednak poziom protrombiny w osoczu chorych sięga 10—20% normy. Być może całkowity lub prawie całkowity niedobór protrombiny jest letalny. Występowanie krwawień zarówno u chorych z niedoborami czynników przeciwhemofilowych (VIII, IX, XI), jak i z niedoborami czynnika VII świadczy, że współdziałanie kaskady „wewnątrzpochodnej” i „zewnątrzpochodnej” jest niezbędne do prawidłowego wytwarzania czopu hemostatycznego.

Niektóre fakty doświadczalne nie mieszczą się jednak w schemacie kaskadowym.

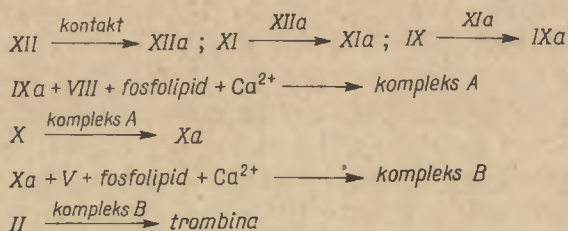
1) Nie tłumaczy on autokatalitycznego mechanizmu krzepnięcia: małe dawki trombiny przyspieszają znacznie proces krzepnięcia prawdopodobnie aktywując czynniki V (217, 174) i VIII (15) do bardzo nietrwałych produktów, a ponadto aktywując fosfolipidy płytkowe, spełniające istotną rolę na dwu etapach kaskady (82).

2) W schemacie kaskadowym nie mieszczą się niektóre czynniki, jak na przykład *Tatsumi Factor* (89, 100) i *Fletcher Factor* (73).

3) Istnieją poglądy, że czynnik XII nie działa enzymatycznie na XI, ale tworzy z nim kompleks zdolny do aktywacji czynnika IX (64, 204).

4) Najwięcej kontrowersji budzi ostatni etap kaskady. Jedni autorzy (28, 29) wykazują, że aktywny czynnik X aktywuje V, a ten z kolei zamienia protrombinę na trombinę, inni (9) uważają, że jedynie trombina może aktywować czynnik V, który działa jako aktywator czynnika X, jeszcze inni (92) przypuszczają, że fosfolipidy tworzą z jonami wapnia i czynnikiem V kompleks ułatwiający działanie aktywnego czynnika X na protrombinę, ponieważ fosfolipidy stanowią dogodną powierzchnię dla wzajemnego oddziaływania białek.

5) Hemker i Khan (76) postulują, że również czynnik VIII tworzy kompleks z aktywnym czynnikiem IX, fosfolipidami i jonami wapnia, który to kompleks aktywuje czynnik X (rysunek 2). Są też dane o reakcji kompleksowania między tromboplastyną tkankową a czynnikiem VII (149).

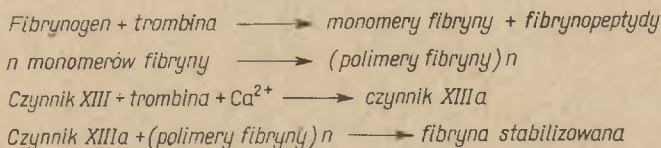


Rys. 2. Schemat aktywacji protrombiny według Hemkera i Kahna (76).
Aktywne czynniki krzepnięcia oznaczono literą a.

Zupełnie odmienny mechanizm aktywacji protrombiny postuluje Seegers i jego szkoła (194, 195, 196, 128). Według nich trzy czynniki krzepnięcia: autoprotrombina I (odpowiadająca czynnikowi VII), autoprotrombina II (odpowiadająca czynnikowi IX) i autoprotrombina C (aktywny czynnik X) są pośrednimi produktami konwersji protrombiny w trombinę. W doświadczeniach, na których opiera się ta teoria stosowano oczyszczone preparaty protrombiny, które wykazywały aktywności czynników VII, IX, X. Jest jednak sprawą sporną, czy są to aktywności preformowane, czy też czynniki te odszczepiają się z cząsteczki protrom-

biny w czasie jej aktywacji. Czynniki II, VII, X są do siebie podobne pod względem niektórych własności i struktury fizykochemicznej (43). Postuluje się ich wspólne pochodzenie od preprotrombiny (75), której biosyntezę warunkuje witamina K (75). Ostatnio Marciniak i wsp. (129, 130) uważają, że pierwotna cząsteczka protrombiny dysocjuje na właściwą protrombinę, inhibitor i autoprotrombinę III, która może ulegać aktywacji do czynnika X.

Mechanizm przejścia fibrynogenu w fibrynę i utworzenia nierozpuszczalnego skrzepu fibrynowego (rysunek 3) jest znacznie lepiej poznany z punktu widzenia biochemicznego. Trombina katalizuje swoiście hydrolizę określonych wiązań peptydowych między glicyną i arginina i odszczepia dwa fibrynopeptydy A i B od dwu podjednostek fibrynogenu; od trzeciej podjednostki fibrynogenu nie odszczepia się żaden peptyd (16, 18, 77). Powstanie niewielkich ilości nietypowych fibrynopeptydów AP i Y w czasie krzepnięcia krwi może być skutkiem mikroheterogenności fibrynogenu lub degradacji fibrynopeptydów A i B (19, 210).



Rys. 3. Przejście fibrynogenu w fibrynę.

Cząsteczki fibrynogenu, pozbawione fibrynopeptydów, tworzą tak zwane monomery fibryny i ulegają samorzutnej polimeryzacji, typu „bok do boku” lub „koniec do końca” (65). Prawdopodobnie poszczególne monomery w siatce włóknika powiązane są ze sobą poprzez wiązania wodorowe. Skrzep utworzony z oczyszczonego fibrynogenu i trombiny łatwo rozpuszcza się w roztworze mocznika. Dopiero stabilizacja czyni go opornym na rozpuszczanie w roztworze mocznika i w innych rozpuszczalnikach organicznych. Stabilizator włóknika (czynnik XIII) jest transpeptydazą o ciężarze cząsteczkowym zbliżonym do fibrynogenu (109, 118, 119). Ulega on aktywacji pod wpływem trombiny (32, 121). Mechanizm jego działania polega na utworzeniu dodatkowych wiązań amidowych w siatce włóknika w wyniku wymiany grup aminowych lizyny z amoniakiem związanym z grupą γ -karboksylową glutaminy lub β -asparaginy (56, 122). W czasie reakcji stabilizacji wyzwala się amoniak (120). Stabilizacja skrzepu zapewnia większą skuteczność hemostatyczną skrzepu i sprawne gojenie się ran (8).

Osoczone czynniki krzepnięcia można podzielić na trzy grupy:

- 1) Czynniki aktywowane przez kontakt z powierzchniami (XI i XII).
- 2) Czynniki „rodziny protrombiny” (II, VII, IX i X) są adsorbowane

siarczanem baru, ich biosynteza zależy od witaminy K, wykazują daleko idące podobieństwa strukturalne.

3) Czynniki „rodziny” fibrynogenu (I, V, VIII, XIII), o wysokim ciężarze cząsteczkowym (rzędu 300 000), są substratami dla trombiny i plazminy. O powiązaniu między czynnikiem VIII i fibrynohemem świadczą nietypowe zachowanie się w ultrawirówce fibrynogenu uzyskanego od pacjentów z wrodzonym niedoborem czynnika VIII (17). Ponadto aktywność zbliżoną do czynnika VIII znaleziono w produktach proteolizy fibryny (214). Do czynników „rodziny” fibrynogenu należy prawdopodobnie również czynnik v. Willebrandta, którego brak stwierdza się w hemofilii naczyniowej (167). Czynnikiem ten niezbędny do utrzymania prawidłowej adhezywności płytek *in vivo* (20) wypada wraz z fibrynohemem we frakcji I Cohna (169) oraz z osadem krioglobulin.

Zdaniem autora tego artykułu teoria Seegersa w oryginalnym brzmieniu jest trudna do przyjęcia, brak bowiem dostatecznych dowodów świadczących o pochodzeniu czynników VII, IX i X z protrombiny, a ponadto u chorych z niedoborami czynników VII, IX i X poziom i aktywność protrombiny są prawidłowe. Jednak wiele danych wskazuje, że zarówno czynniki „rodziny” protrombiny jak i czynniki „rodziny” fibrynogenu mogą pochodzić od wspólnych prekursorów.

Ostatnio wyniki niektórych badań nad wpływem witaminy K na biosyntezę czynników krzepnięcia w homogenatach i podfrakcjach komórkowych (6, 173, 209) wskazują, że działa ona w rybosomach na uformowany już uprzednio prekursor białkowy, być może ten, z którego powstają pod wpływem witaminy K czynniki II, VII, IX, X.

Niektóre obserwacje kliniczne wskazują, że w hemostazie proces tworzenia trombiny jest ważniejszy niż proces tworzenia fibryny. Trombina jest potrzebna nie tylko do tworzenia skrzepu, lecz także do agregacji płytek i uwalniania z nich różnych substancji działających na naczynia. Dotychczas opisano kilkadziesiąt przypadków wrodzonej afibrynogenemii. U niektórych chorych poziom fibrynogenu był poniżej granicy wykrywalności wynoszącej 0,001%, a chorzy ci wykazywali jedynie łagodną tendencję do krwawień (67, 157). Znacznie cięższy przebieg natomiast ma nabyta afibrynogenemia, uwarunkowana wewnątrznaczyniowym krzepnięciem i fibrynolizą. Przyczyną tego może być między innymi fakt, że w stanach tych dochodzi do uszkodzenia funkcji płytek. K o w a l s k i i wsp. (98, 102, 103) wykazali, że produkty rozpadu fibrynogenu hamują agregację płytek. Być może, we wrodzonej afibrynogenemii prawidłowa czynność płytek wyrównuje defekt hemostatyczny. Wiadomo jednak, że fibrynogen jest kofaktorem agregacji płytek przez ADP (37, 139), jest zatem możliwe, że funkcję fibrynogenu mogą zastąpić niektóre inne białka, bądź, że nawet ślady fibrynogenu wystarczają do zapewnienia minimum funkcji hemostatycznych.

Ostatnio (52) wyosobniono z jadu węża enzym o aktywności zbliżonej do trombiny, działający jednak tylko na fibrynogen, a nie działający na płytki ani na czynnik VIII. Przedłużone podawanie oczyszczonego jadu psom i ludziom powoduje całkowitą utratę zdolności krwi do krzepnięcia, a mimo to nie wywołuje żadnych objawów zakrzepów i krwawień.

Omówienie mechanizmu krzepnięcia krwi byłoby niezupełne gdybyśmy pominęli rolę naturalnych inhibitorów w osoczu. Ich znaczenie fizjologiczne polega na uniemożliwieniu rozprzestrzeniania się procesu krzepnięcia krwi. Dzięki ich aktywności 1 ml osocza może neutralizować 2000 jednostek trombiny, to znaczy ilość potrzebną do wykrzepienia 2 litrów fibrynogenu w 15 sekund (203).

Najważniejszą rolę odgrywają antytrombiny. Pod koniec lat pięćdziesiątych wyróżniano następujące antytrombiny (203): I — fibryna, adsorbuje trombinę, II — kofaktor heparyny, III — „progresywna”, jej oddziaływanie z trombiną wymaga czasu, IV — powstaje z protrombiny, jej istnienie podano ostatnio w wątpliwość (143), V — „natychmiastowa”, znajduje się we frakcji γ -globulinowej osocza niektórych chorych z dysproteinemią (117), VI — produkty rozpadu fibrynogenu (153, 154). Ostatnio stwierdzono (1), że 75% aktywności antytrombinowej osocza zawiera się w α_2 globulinie, o ciężarze cząsteczkowym 64 000. Białko to jest także kofaktorem heparyny. α_2 Makroglobulina osocza zawiera również aktywność antytrombinową, a jest wolna od aktywności kofaktorowej (208). Wydaje się, że szczególnie aktywne są inhibitory skierowane przeciwko czynnikowi XI i VII (184, 202). Ostatnio oczyszczono preparaty inhibitora czynnika XI z osocza ludzkiego (150). Być może, dzięki wysokiej aktywności tego inhibitora nie sposób jest doprowadzić do wewnątrzczyniowego wykrzepienia fibrynogenu u zwierząt nawet po dużych dawkach aktywnego czynnika XI (166) lub aktywatora czynnika XII, kwasu elaginowego (26, 59).

„Antytrombokinaza” osocza, której aktywność narasta w czasie krzepnięcia krwi (191) jest prawdopodobnie identyczna z inhibitorem pochodzącym z protrombiny (130, 193), a hamującym konwersję protrombiny w trombinę pod wpływem aktywnego czynnika X.

Kwaśny α_1 glikoproteid osocza jest aktywnym inhibitorem tromboplastyny tkankowej (168). Heparyna, potężny inhibitor krzepnięcia krwi, uzyskany z tkanek, jest w osoczu w śladowych ilościach (47) i nie odgrywa większej roli w warunkach fizjologicznej hemostazy.

II. Znaczenie układu fibrynolitycznego

Biochemię i fizjologię układu fibrynolitycznego omówiono ostatnio szczegółowo (97, 176, 219), na tym miejscu zwrócimy jedynie uwagę na znaczenie tego układu w hemostazie.

Fizjologiczna rola enzymów fibrynolitycznych polega na usuwaniu złożeń włóknika. Fibrynoliza uniemożliwia nadmierne narastanie skrzeplu, przyczynia się do znikania i wchłaniania czopu hemostatycznego oraz wywiera istotny wpływ na proces gojenia się ran. W procesach tych mogą brać udział enzymy fibrynolityczne osocza, leukocytów oraz aktywatory ze śródbłonek naczyń krwionośnych.

Układ fibrynolityczny osocza w czasie krzepnięcia krwi ulega aktywacji (106), której mechanizm nie jest wyjaśniony. Zaobserwowano, że w czasie krzepnięcia zmniejsza się aktywność inhibitorów fibrynolizy (107, 218). Do aktywacji procesu fibrynolizy dochodzi w czasie zetknięcia osocza z czynnymi powierzchniami, a w reakcji tej bierze udział czynnik XII (86, 156). Pewną rolę w aktywacji plazminogenu mogą odgrywać takie czynniki krzepnięcia, jak trombina (49) i czynnik X, które są proteazami. Ponadto aktywator plazminogenu łatwo adsorbuje się na skrzeplu (198). Trudno jednak wytłumaczyć potężną aktywację fibrynolizy *in vivo* w następstwie wzmożonego wewnątrznaczyniowego krzepnięcia. *In vivo* złoże włóknika powstałe po podaniu trombiny rozpuszczają się w ciągu kilku godzin (104).

Aktywacja fibrynolizy w następstwie krzepnięcia krwi stanowi istotny mechanizm sprzężenia zwrotnego w homeostazie hemostazy. Aktywna plazmina może nie tylko trawić fibrynogen i fibrynę i inaktywować niektóre czynniki krzepnięcia, lecz także uwalniać z fibrynogenu i fibryny produkty trawienia działające jako antykoagulanty. W r. 1957 Niewiarowski i Kowalski (152) opisali powstawanie aktywności antytrombiny VI w czasie proteolitycznego działania plazminy na fibrynogen. Niezależnie Triantaphyllopoulos (213) opisał antykoagulant tworzący się w czasie długotrwałej inkubacji roztworu fibrynogenu. Produkty degradacji fibrynogenu mają istotną aktywność antytrombinową (101, 153, 154) i antytromboplastyczną (112, 155) oraz, co ważniejsze, hamują polimeryzację monomerów fibryny tworząc z nimi rozpuszczalne kompleksy i zapobiegając w ten sposób powstaniu skrzeplu (114). Istotną rolę w hemostazie może grać opisane przez Kowalskiego i wsp. (98, 102, 103) hamowanie agregacji krwinek płytkowych przez produkty rozpadu fibrynogenu, dzięki czemu fibrynoliza może opóźniać tworzenie się czopu hemostatycznego.

III. Rola krwinek płytkowych

Krwinki płytkowe, najmniejsze, bezjądrzaste komórki krwi, których metabolizm i biochemię szczegółowo opisano (10, 131, 137, 178), pełnią w hemostazie bardziej podstawowe funkcje niż osoczowe mechanizmy krzepnięcia krwi. Krzepnięcie osoczowe pojawia się w rozwoju filogenetycznym, dopiero na szczeblu kręgowców, u większości bezkręgowców

zaś podstawowy mechanizm hemostazy stanowi agregacja specjalnych komórek, tak zwanych koaguloocytów (111).

W organizmie wyższych ssaków płytki spełniają liczne funkcje hemostatyczne: aktywację krzepnięcia krwi, agregację i adhezję (podstawowe mechanizmy warunkujące wytworzenie czopu hemostatycznego), retrakcję skrzepu oraz oddziaływanie na naczynia krwionośne.

Płytki zawierają swoiste czynniki krzepnięcia oraz wykazują zdolność adsorpcji różnych osoczowych czynników krzepnięcia na przykład czynników I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII (27, 88). Dzięki temu krzepnięcie krwi na powierzchni płytki przebiega o wiele intensywniej niż w osoczu. Zwrócił na to uwagę Roskam (186) wysuwając hipotezę „atmosfery osoczowej okołopłytkowej”, w której skupiają się osoczowe czynniki krzepnięcia, co potwierdzili później inni badacze. Wyjątkowo silnej adsorpcji na powierzchni płytek ulegają czynniki należące do rodziny fibrynogenu. Czynniki V zwany czynnikiem płytkowym 1, wykazuje po wypłukaniu z płytek pewne odrębne cechy fizykochemiczne (44).

Do typowych płytkowych czynników krzepnięcia należy fibrynogen płytkowy oraz czynniki płytkowe 2, 3 i 4.

Megakariocyty, komórki macierzyste płytek syntetyzują fibrynogen (61), nie ma jednak zależności pomiędzy poziomem ani metabolizmem fibrynogenu w osoczu i w płytkach (33). Nie ustalono ostatecznie, czy fibrynogen płytkowy i osoczowy są identyczne. Nie wiadomo też czy identyczne są osoczowy czynnik XIII i płytkowy stabilizator włókniaka (31).

Czynnik płytkowy 2, białko o niewielkim ciężarze cząsteczkowym aktywuje fibrogen, powodując odszczepienie nie zidentyfikowanych bliżej peptydów, co zwiększa podatność fibrynogenu na działanie trombiny (53).

Czynnik płytkowy 3 jest fosfolipidem aktywującym wewnątrzpochodny mechanizm tworzenia się trombiny. Aktywność biologiczną tego czynnika wykazuje izolowana fosfatydyloetanolamina, ale wpływają na nią również inne fosfolipidy oraz stan ich rozproszenia, a fosfatydyloseryna w wyższych stężeniach działa hamująco. Najwyższą aktywność wykazują lipoproteidy błon płytkowych (131, 132, 133). W czasie agregacji płytek zwiększa się dostępność czynnika płytkowego 3. Bardziej reaktywne stają się wówczas fosfolipidy na powierzchni płytek, a tylko niewielka część czynnika płytkowego 3 przechodzi do osocza (69, 70, 83).

Czynnik płytkowy 4, początkowo opisany jako czynnik antyhepatyczny (42, 215), został w naszym Zakładzie wyodrębniony w wysoko oczyszczonej postaci z płytek świni i okazał się substancją termostabilną o ciężarze cząsteczkowym około 10 000, zawierającą białko i cukry (53). Neutralizuje on antytrombinową aktywność produktów rozpadu fibrynogenu (161) i powoduje polimeryzację rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (164). Czynniki płytkowy 4 jest gwałtownie wyrzucany

z płytek w czasie ich agregacji (164, 165). Podany dożylnie królikom powoduje spadek liczby płytek, spadek fibrynogenu i skrócenie czasu krzepnięcia (54). Prawdopodobnie czynnik ten odgrywa istotną rolę w agregacji płytek i w ich przyleganiu do nitek włóknika.

Spośród innych hemostatycznie czynnych białek w krwiince płytkowej, można wymienić antyplazminę płytkową, różną od osoczowej (4, 93) i trombasteninę, kurczliwe białko o własnościach zbliżających je do aktomiozyny mięśniowej. Trombastenina (precypituje pod wpływem ATP i wykazuje czynność ATP-azową) gra istotną rolę w późniejszych etapach agregacji płytek i w retrakcji skrzepu (11, 12).

Agregacją nazywamy uwarunkowany swoistymi czynnikami proces wzajemnego przylegania płytek prowadzący do powstawania dużych skupisk. Substancje zwiększające agregację płytek zwiększają również ich adhezję, to znaczy przyleganie do różnych powierzchni, na przykład do ściany naczyń krwionośnych, szkła itp. Nie zawsze jednak istnieje korelacja pomiędzy wynikami różnych metod, które mierzą agregację lub adhezję (185).

Tablica 3 podaje zestawienie różnych substancji powodujących agre-

Tablica 3.

Niektóre substancje powodujące agregację płytek

A) Substancje „fizjologiczne”

Substancja	Stężenie powoduje agregację w osoczu bogato płytkowym	Inhibitor
ADP (57)	10^{-6} — 10^{-7} M	2-chloroadenozyna (22) Adenozyna (21, 22) AMP (21, 22) Cysteina (189) TAMe (189)
Trombina (55)	0,1—0,5 j/ml	Heparyna (34) Hirudyna (135) Produkty degradacji fibrynogenu (102)
Adrenalina (142)	10^{-6} — 10^{-7} M	Phentolamina (171) Imipramina (187)
Noradrenalina (142)	10^{-6} M	Phentolamina (171)
Serotonina (142)	10^{-6} M	Benadryl. Promethazine Ro-3-0837 (172)
Kolagen (146, 147) Oligomery fibryny (201) Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny i fibrynogenu (99)		Butapirazol (148)

B) Substancje „niefizjologiczne”: trypsyna (84), neuraminidaza (84), trójetylek cyny (170), jady węzów: *B. atrox*, *B. jararaca*, *T. purpureomaculata* (39), toksyny gronkowcowe (90), homocysteina (138), kwasy tłuszczowe (200).

gację i ich inhibitorów. Interesujące jest, że obok agregacji płytek trombina powoduje krzepnięcie fibrynogenu, a adrenalina, serotonina i nora-drenalina kurczą naczynia krwionośne. Najbardziej swoistym czynnikiem agregującym płytki jest ADP, a jego kofaktorem jest zapewne fibrynogen (12, 37).

W procesie agregacji płytek można wyróżnić dwie fazy (126, 141): pierwotną, odwracalną, charakteryzującą się jedynie wzajemnym przyleganiem płytek i drugą, nieodwracalną, której towarzyszy degranulacja komórek (175). Degranulacji towarzyszą reakcje „uwalniania” z płytek: ADP (62), adrenaliny (211), serotoniny (62), potasu (30), czynnika płytkowego 4 (164) i niektórych innych substancji. Nieodwracalna faza agregacji odpowiada w pewnym sensie zjawisku, określanemu dawniej mianem „lepkiej przemiany płytek” (220), a polegającemu na tworzeniu się bezkształtnych agregatów, w których granice pomiędzy poszczególnymi komórkami ulegają zatarciu przy obserwacji w mikroskopie fazowokontrastowym.

Ponieważ ADP uwalnia się przy różnych typach agregacji, przypuszczano, iż jest on mediatorem każdej agregacji (71, 72). Nie da się jednak pogodzić z tą teorią odmienność agregacji przez ADP i trombinę oraz synergistyczny efekt obu tych czynników (163). Ponadto ADP nie uwalnia się w czasie agregacji pod wpływem małych stężeń adrenaliny (126). Wydaje się bardziej prawdopodobne, że do agregacji mogą doprowadzać różne procesy powodujące zmiany na błonach komórkowych płytek, na przykład również zmiany pH lub dodanie naładowanych polimerów (34). Agregacja płytek pod wpływem zmian pH i pod wpływem ADP mają się do siebie zapewne tak, jak hydroliza białka przez gotowanie w kwasie i pod wpływem swoistego enzymu.

Celem wytłumaczenia agregacji płytek przez ADP sformułowano różne teorie. Gaarder i Laland (58) postulowali łączenie się płytek poprzez mostki utworzone przez ADP i jony wapnia. Spaet i Lejnicks (207) uważali, że ADP jest donatorem energii potrzebnej do agregacji płytek, a Salzman i wsp. (190) są zdania, że ADP zwiększa energię potrzebną do agregacji płytek hamując ATP-azę na ich powierzchni. Według Borna (24) ADP wiążąc się z białkami płytki modyfikuje ich konformację, co sprzyja zlepianiu się. Wydaje się, iż żadna z tych hipotez nie jest poparta dostatecznymi dowodami doświadczalnymi.

Mechanizm degranulacji i „uwalniania” jest również przedmiotem intensywnych badań. Według Grette'go (62) przyczyną tych zjawisk jest uszkodzenie błony komórkowej płytki. Kowalski i wsp. (105) wysunęli przypuszczenie, że trombina i inne czynniki powodujące „uwalnianie” działają na lizosomy płytek. Przemawiają za tym prace Mustarda i wsp. (148), którzy wiążą adhezję płytek z fagocytozą — procesem, w którym lizosomy odgrywają znaczną rolę. Płytki mogą fago-

cytować cząsteczki, do których przylegają, na przykład cząsteczki latexu (60) i wirusy (38).

Zjawiska degranulacji i „uwalniania” są bardzo złożone. Ostatnio wykazano, że w czasie agregacji płytki wyrzucają na zewnątrz charakterystyczne ziarnistości zawierające serotoninę (212).

Krwinka płytkowa może także pobierać z otoczenia szereg substancji, na przykład adenozyne (23), serotoninę (136), adrenalinę (25), potas (35). Stosując znakowane nukleotydy wykazano w płytkach dwie pule ADP: metaboliczną i nieczynną metabolicznie, ale uwalnianą z płytek w czasie agregacji (80, 81). Nasuwa to przypuszczenie, że uwolnienie ADP z płytek niekoniecznie musi upośledzać metabolizm wewnątrzkomórkowy tej substancji i doprowadzić do obumarcia komórki.

Wiadomo, że prawidłowa funkcja płytek warunkuje sprawną retrakcję skrzepu, jednakże mechanizm retrakcji na poziomie molekularnym nie jest wyjaśniony. Jak już wspomniano, podstawową rolę w tym procesie pełni trombastenina. Ostatnie dane (145) wskazują, że odszczepienie fibrynopeptydu B od fibrynogenu warunkuje proces retrakcji.

Pozostaje do omówienia wzajemny stosunek funkcji krwinki płytkowej i ściany naczyń krwionośnych. Podstawowym elementem uszkodzonej ściany naczynia, do którego przylegają płytki jest kolagen (205). Niektórzy autorzy uważają, iż przylegają one również do komórek śródbłonna (95) i błony podstawowej naczyń (212). Płytki utrzymują prawidłową funkcję śródbłonnów i jak wynika z badań Johnson i wsp. (94) płytki lub fragmenty płytek mogą się wcielać do komórek śródbłonnów.

Ściany naczyń krwionośnych zawierają waskulokinazę, enzym, który zamienia powoli fibrynogen na fibrynę, powodując przy tym odszczepienie peptydów różnych od fibrynopeptydów trombinowych (146, 147), jednak rola tego enzymu w agregacji płytek i tworzenia czopu hemostatycznego jest nieznaną.

Szereg substancji farmakologicznie czynnych, powodujących skurcz naczyń krwionośnych (na przykład serotonina, adrenalina) przyspiesza agregację płytek, natomiast różne substancje rozszerzające naczynia, na przykład adenozyne (22), papaweryna, nitrogliceryna (66), prostoglandyna (48) hamują agregację. W nadciśnieniu tętniczym dochodzi do istotnego wzrostu adhezywności płytek (181). Pozwala to domyślać się pewnych analogii na poziomie molekularnym pomiędzy agregacją płytek a skurczem mięśni gładkich.

IV. Rola leukocytów i erytrocytów

Znaczenie leukocytów w hemostazie wiąże się przede wszystkim z obecnością enzymów fibrynolitycznych w tych komórkach. Jak wynika z badań Prokopowicza (182) leukocyty mogą być źródłem plazmi-

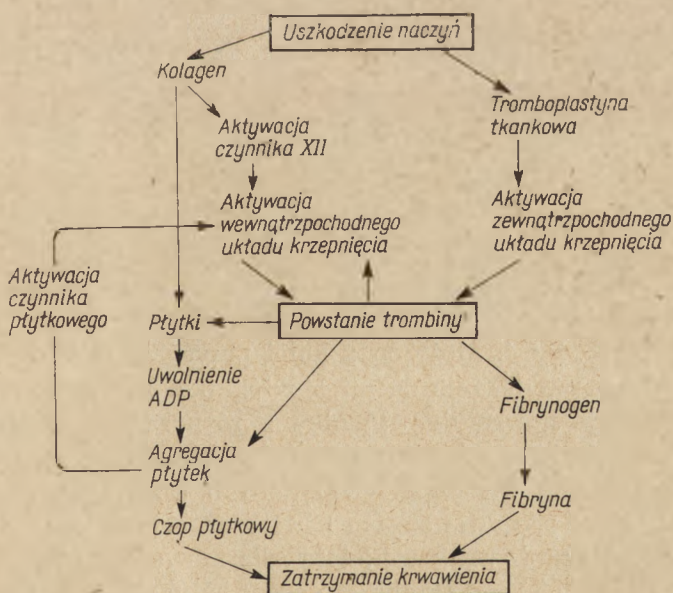
nogenu osoczowego. Rola tych komórek może się jednak nie ograniczać tylko do usuwania złogów włókniaka. Opisano występowanie w granulocytach antytrombiny (188) oraz substancji o własnościach tromboplastycznych (116) i antyheparynowych (115). Prawidłowa liczba leukocytów w ustroju warunkuje ponadto występowanie tak zwanego fenomenu Schwartzmana, którego istota polega na wewnątrznaczyniowym krzepnięciu (85).

Erytrocyty również wykazują aktywność antyheparynową (179) i tromboplastyczną (61, 190). Ponadto komórki te są źródłem ADP — czynnika agregującego krwinki płytkowe (57, 74, 144). Na rolę erytrocytów w hemostazie wskazywałaby niewielka hemoliza, towarzysząca zawsze krzepnięciu krwi. Często obserwuje się też gromadzenie włókniaka wokół erytrocytów w czopie hemostatycznym (177).

V. Hemostaza lokalna (powstawanie czopu hemostatycznego)

Na podstawie badań nad krzepnięciem krwi i agregacją płytek, oraz w oparciu o obserwacje mikroskopowe poszczególnych elementów morfotycznych po uszkodzeniu naczyń, podano szereg schematów tworzenia się czopu hemostatycznego.

Propozycję nowego schematu hemostazy przedstawiono na rysunku 4. Po uszkodzeniu ściany naczynia dochodzi do odsłonięcia kolagenu, który agreguje płytki i przyczynia się do aktywacji wewnątrzpochodnego mechanizmu krzepnięcia krwi. Jednocześnie wyzwala się tromboplastyna tkankowa, aktywująca zewnętrzny mechanizm krzepnięcia. Tworzą

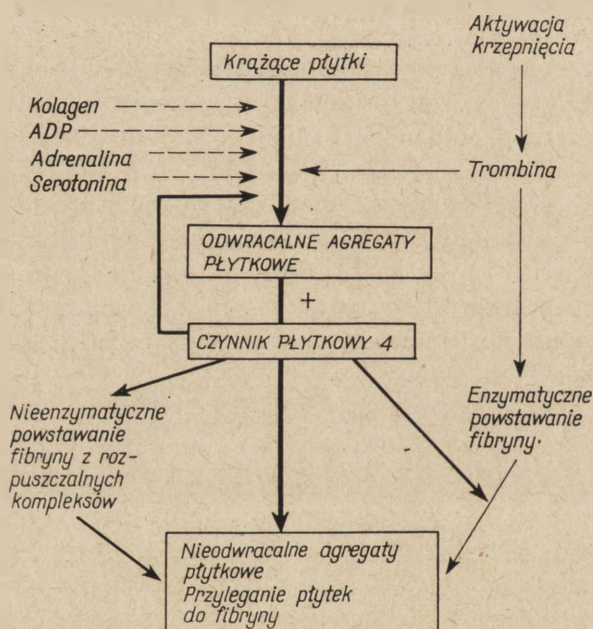


Rys. 4 Schemat hemostazy. Mechanizmy podstawowe.

się ślady trombiny powodujące agregację płytek i aktywujące autokatalitycznie mechanizm wewnątrzpochodny. Z płytek wyzwala się ADP nasilający proces agregacji. Czynniki płytkowy 3 staje się bardziej reaktywny na powierzchni płytek w czasie ich agregacji i przyspiesza tworzenie się trombiny. Powstanie większych stężeń trombiny doprowadza do kontrakcji agregatów płytkowych i do powstawania nitek włóknika. Dochodzi do zatrzymania krwawienia.

Oczywiście przedstawiony schemat nie uwzględnia szeregu istotnych dla hemostazy reakcji, na przykład działania inhibitorów krzepnięcia i enzymów fibrynolitycznych, roli ADP, które może uwalniać się z uszkodzonych tkanek i z erytrocytów, roli erytrocytów i granulocytów.

Alternatywny mechanizm hemostazy przedstawiony jest na rysunku 5. Pod wpływem różnych czynników (kolagenu, trombiny, ADP, serotoniny, katecholamin) dochodzi do agregacji płytek, w czasie której wyzwala



Rys. 5. Rola czynnika płytkowego 4 w hemostazie. Alarmowy mechanizm hemostazy.

się czynnik płytkowy 4. Może on z kolei przyspieszać agregację płytek i powodować ich przyleganie do nitek włóknika. Ponadto czynnik płytkowy 4 powoduje powstanie włóknika z rozpuszczalnych monomerów fibryny, skompleksowanych z produktami rozpadu fibrynogenu (parakoagulacja). Jeżeli, jak wskazuje wiele danych (112, 151), rozpuszczalne monomery fibryny znajdują się we krwi krążącej, to wyzwolenie czynnika płytkowego 4 może stanowić istotę „alarmowego mechanizmu hemostazy”, który doprowadza do szybkiego odkładania się włóknika w miejscu uszkodzenia naczyń krwionośnych, z ominięciem bardziej powolnej kas-

kady. Przyjęcie tego alarmowego mechanizmu tłumaczy obserwacje (127) wskazujące na pojawienie się włóknika już w 15 sekund po uszkodzeniu naczyń krwionośnych.

VI. Hemostaza ciągła

Poznanie mechanizmów utrzymujących krew płynną w naczyniach krwionośnych i zapobiegających jej wynaczynieniu stanowi jeden z najbardziej fascynujących problemów w badaniach nad hemostazą. Mimo licznych badań i spekulacji problem ten pozostaje dotychczas nie wyjaśniony.

W latach pięćdziesiątych Copley (36), Jensen (91) i Astrup (5) wysunęli teorię, według której w ustroju bezustannie zachodzi utajony proces krzepnięcia doprowadzający do powstania na wewnętrznej powierzchni naczyń krwionośnych cieniutkich błon fibrynowych, a te są z kolei rozpuszczane przez ustawicznie aktywowaną plazminę. Zachwianie równowagi między utajonym krzepnięciem i fibrynolizą doprowadza do krwawień lub do zakrzepów. Jednak niemal wszystkim danym doświadczalnym przemawiającym za tą teorią, można przeciwstawić inne, które jej przeczą. Na przykład istnienie szybkiej przemiany fibrynogenu i innych czynników krzepnięcia w ustroju podawano jako argument przemawiający za utajonym krzepnięciem, ale jako kontrargument można tu przytoczyć, że podanie zdrowym osobnikom inhibitorów krzepnięcia (dwukumarolu i heparyny) nie ma istotnego wpływu na przemianę fibrynogenu w ustroju. Wnikliwym dyskusjom tej teorii poświęcone są artykuły Hjorta i Hasselbacha (78) oraz Hjorta (78).

Inną teorię hemostazy wysunął Spaet (206). Jego zdaniem aktywacja krzepnięcia może przebiegać jedynie lokalnie, w miejscu uszkodzenia naczyń krwionośnych, doprowadzając do powstania ograniczonego czopu hemostatycznego. Nadmiernemu rozszerzaniu się krzepnięcia zapobiegają inhibitory. Ponadto aktywne czynniki krzepnięcia oraz oligomery fibryny są natychmiast usuwane z krwioobiegu przez komórki wątroby i układ sietczkowo-śródbłonkowy. Z teorii Spaeta nie wynika jednak, że mikrourazy nie mogą doprowadzać do wzmożonej aktywacji krzepnięcia oraz, że proces lokalnej hemostazy nie wpływa na krew krążącą. Jakkolwiek Spaet przyjmuje, iż uogólnione wewnątrznaczyniowe krzepnięcie ma miejsce jedynie w patologii, to można mu przeciwstawić kontrargument, iż trudno jest czasem znaleźć rozgraniczenie między stanem zdrowia i choroby. Warto wspomnieć, że wewnątrznaczyniowa aktywacja krzepnięcia i fibrynolizy pojawia się w różnych stanach emocjonalnych i po wysiłku fizycznym (87). Wyzwalająca się w tych stanach adrenalina powoduje agregację płytek (142), wzrost niektórych czynników krzepnięcia, na przykład czynnika VIII (46) i aktywację fibrynolizy (13).

Nowy aspekt w badaniach nad hemostazą ciągłą stwarza wykrycie rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (produktów rozpadu fibrynogenu) dokonane w Zakładzie Prof. Kowalskiego przed kilku laty (113, 114). Wydaje się, że dalsze badania nad występowaniem tych kompleksów w warunkach zdrowia i choroby mogą przyczynić się do wyświetlenia wielu problemów hemostazy ciągłej.

LITERATURA

1. Abilgaard U., *Scand. J. Lab. Invest.* **19**, 190 (1967).
2. Ackroyd F., *Brit. J. Haematol.* **2**, 397 (1956).
3. Adelson E., Rheingold J. J., Crosby W., *Blood* **17**, 767 (1961).
4. Alkjaersig N., *Blood Platelets* (wyd. S. A. Johnson i wsp.) Little Brown et Co, Boston, 1961, str. 329.
5. Astrup T., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **2**, 347 (1958).
6. Babior B. M., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 606 (1966).
7. Barkhan P., Lai M., Stevenson M., *Brit. J. Haematol.* **9**, 499 (1963).
8. Beck E., Duckert F., Ernst M., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 485 (1961).
9. Bergsagel D. E., Nockolds E. R., *Brit. J. Haematol.* **11**, 395 (1965).
10. Bettex-Galland M., Maupin B., *Hemostase* **1**, 375 (1961).
11. Bettex-Galland M., Portzehl H., Lüscher E. F., *Helv. Chim. Acta* **46**, 1595 (1963).
12. Bettex-Galland M., Lüscher E. F., *Advan. Prot. Chem.* **20**, 1 (1965).
13. Biggs R., Macfarlane R. G., Pilling J., *Lancet* **1**, 402 (1947).
14. Biggs R., Macfarlane A. G., *Human Blood Coagulation and its Disorders*, Scient. Publ. Oxford, Blackwell 1957.
15. Biggs R., Macfarlane R. G., Denson K. W., Ash B. J., *Brit. J. Haematol.* **11**, 276 (1965).
16. Blomback B., Yamaskina I., *Arkiv Kemi.* **12**, 299 (1958).
17. Blomback B., Blomback M., Laurent T. C., Persson H., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 171 (1965).
18. Blomback B., Blomback M., Grondahl N. J., Holmberg E., *Arkiv Kemi* **25**, 411 (1966).
19. Blomback B., Blomback M., Edman P., Hersel B., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 371 (1966).
20. Borchgrevink C. F., *Acta Med. Scand.* **170**, 231 (1961).
21. Born G. V. R., Cross M. J., *J. Physiol.* **168**, 178 (1963).
22. Born G. V. R., *Nature* **202**, 95 (1964).
23. Born G. V. R., *Nature* **206**, 1121 (1965).
24. Born G. V. R., *Federation Proc.* **26**, 115B (1967).
25. Born G. V. R., Sympozjum „Platelets in Hemostasis”, Miemo, Włochy, wrzesień 1967 (Karger w druku)
26. Botti R. E., *Diffuse Intravascular Clotting*, F. K. Schattauer, Stuttgart 1965, str. 49.
27. Bounameaux Y., *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.* **2**, 52 (1957).
28. Breckenridge R. T., Ratnoff O. D., *J. Clin. Invest* **44**, 302 (1965).
29. Breckenridge R. T., Ratnoff O. D., *Blood* **27**, 527 (1966).
30. Buckingham S., Mayner E. W., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **143**, 332 (1964).

31. Buluk K., *Pol. Tyg. Lek.* **10**, 191 (1955).
32. Buluk K., Januszko T., Olbromski J., *Nature* **191**, 1093 (1961).
33. Castaldi P. A., Caen J., *J. Clin. Pathol.* **18**, 579 (1965).
34. Clayton S., Cross M. J., *J. Physiol.* **169**, 82P (1963).
35. Cooley M. H., Cohen P., *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 69 (1967).
36. Copley A. L., I Intern. Conf. on Thrombos. and Embolism. Benno Schwabe, Basel 1954, str. 452.
37. Cross M. J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 524 (1964).
38. Danon D., Jerushalmy Z., De Vries A., *Virology* **9**, 719 (1959).
39. Davey M. G., Luscher E. F., *Nature* **207**, 730 (1965).
40. Davie E. W., Ratnoff O. D., *Science* **145**, 1310 (1964).
41. Davie E. W., Ratnoff O. D., w Proteins, wyd. H. Neurath, Academic Press. New York and London, 1965, str. 360.
42. Deutsch F., Wawerisch E., Franke G., *Tromb. Diath. Haemorrhag.* **1**, 406 (1957).
43. Deutsch E., Irsigler K., Lechner K., Schmer G., XI-th Congress of the Intern. Society of Haematology, Sydney sierpień 1966, str. 281.
44. Deutsch E., Lechner K., Biochemistry of Blood Platelets, red. E. Kowalski i S. Niewiarowski, Academic Press, PWN London-Warszawa 1967, str. 23
45. Donaldson V. H., Ratnoff O. D., *Science* **150**, 754 (1965).
46. Egeberg O., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **15**, 539 (1963).
47. Eiber H. B., Danishefsky I., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **94**, 801 (1957).
48. Emmons P. R., Hampton J. R., Harrison M. J. G., Honour A. J., Mitchell J. R. A., *Brit. Med. J.* **2**, 468 (1967).
49. Engel A., Alexander B., Pechet L., *Biochemistry* **5**, 1543 (1966).
50. Esnouf M. P., Williams W. J., *Biochem. J.* **84**, 62 (1962).
51. Esnouf M. P., Jobin F., *Biochem. J.* **102**, 660 (1967).
52. Esnouf M. P., Tunnah G. W., *Brit. J. Haematol.* **13**, 581 (1967).
53. Farbiszewski R., Niewiarowski S., Popławski A., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 397 (1966).
54. Farbiszewski R., Lipiński B., Niewiarowski S., Popławski A., *Experientia* **24**, 578 (1968).
55. Fonio A., *Schweiz. Med. Wochschr.* **69**, 952 (1939).
56. Fuller G. M., Doolittle R. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 694 (1966).
57. Gaarder A., Jonsen J., Laland S., Hellem A., Owren P. A., *Nature* **192**, 531 (1961).
58. Gaarder A., Laland S., *Nature* **202**, 909 (1964).
59. Girolami A., Clifton E. E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **17**, 166 (1967).
60. Glynn M. F., Movat H. Z., Murphy E. A., Mustard J. F., *J. Lab. Clin. Med.* **65**, 179 (1965).
61. Gocken M., Yunis E., *Nature* **200**, 590 (1963).
62. Grette K., *Acta Physiol. Scand.* **56**, suppl. 195 (1962).
63. Haanen C., Morselt G., Schoenmakers J., Maters M., Braams R., *Scand. J. Haematol.* **2**, 248 (1965).
64. Haanen C., Morselt G., Schoenmakers J., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **17**, 308 (1967).
65. Hall C. E., Slayter H. S., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 11 (1959).
66. Hampton J. R., Harrison M. J. G., Honour A. J., Mitchell J. R. A., *Cardiovascular Res.* **1**, 101 (1967).
67. Hardisty R. M., Pinniger J. L., *Brit. J. Haematol.* **2**, 139 (1956).
68. Hardisty R. M., Margolis J., *Brit. J. Haematol.* **5**, 203 (1959).
69. Hardisty R. M., Hutton R. A., *Brit. J. Haematol.* **11**, 258 (1965).

70. Hardisty R. M., Huttch R. A., *Brit. J. Hematol.* **12**, 764 (1966).
71. Haslam R. J., *Nature* **202**, 765 (1964).
72. Haslam R. J., XIV Ann. Symp. on Blood, Detroit 1966, str. 10.
73. Hathaway W. E., Belhasen L. P., Hathaway H. S., *Blood* **26**, 522 (1965).
74. Hellem A. J., The Adhesiveness of Human Blood Platelets In Vitro, Oslo University Press, 1960.
75. Hemker H. C., Veltkamp J. J., Hensen A., Loeliger E. A., *Nature* **200**, 589 (1963).
76. Hemker H. C., Kahn M. J. P., *Nature* **215**, 1201 (1967).
77. Henschen A., *Arkiv Kemi* **22**, 1 (1963).
78. Hjort P. F., Hasselback R., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 580 (1961).
79. Hjort P. F., Diffuse Intravascular Clotting, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1966, str. 15.
80. Holmsen H., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**, 239 (1965).
81. Holmsen H., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**, 537 (1965).
82. Horowitz H. I., First Internat. Sympos. on Blood Platelets, Buenos Aires, Argentina, 1965.
83. Horowitz H. I., Papayoanou M. F., *J. Lab. Clin. Med.* **69**, 1003 (1967).
84. Hovig T., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**, 84 (1965).
85. Humprey J. H., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **36**, 268 (1955).
86. Iatridis S. G., Ferguson J. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 411 (1961).
87. Iatridis S. G., Ferguson J. H., *J. Appl. Physiol.* **18**, 337 (1963).
88. Iatridis P. G., Ferguson J. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**, 114 (1965).
89. Ioshida K., Fukui H., Kamisue M., Adachi T., XI-th Congress of the Intern. Society of Haematology, Sydney sierpień 1966, str. 282.
90. Jeliaszewicz J., Niewiarowski S., Popławski A., Bławat L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 69 (1966).
91. Jensen H., *Exptl. Med. Surg.* **14**, 189 (1956).
92. Jobin F., Esnouf M. P., *Biochem. J.* **102**, 666 (1967).
93. Johnson S. A., Smathers W. M., Schneider C. L., *Am. J. Physiol.* **170**, 631 (1952).
94. Johnson S. A., Balboa R. S., Dessel B. H., Monto R. W., Siegesmund K. A., Greenwalt T. J., *Exptl. Mol. Pathol.* **3**, 115 (1964).
95. Jorgenson L., Borochoegrevink C. F., *Acta Path. Microb. Scand.* **57**, 427 (1963).
96. Kingdon H. S., Davie E. W., Ratnoff O. D., *Biochemistry* **3**, 166 (1964).
97. Kopeć M., Fibrynoliza utajona i jej znaczenie w patologii i klinice. PWN, Warszawa 1963.
98. Kopeć M., Budzyński A., Stachurska J., Węgrzynowicz Z., Kowalski E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 476 (1966).
99. Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Budzyński A. Z., Latałło Z. S., Lipiński B., Kowalski E., Sympozjum: Platelets in Hemostasis Mimo, Włochy, wrzesień 1967 (Karger — w druku).
100. Kosaki G., Tanaka K., Inoshita K., XI-th Congress of the Intern. Soc. of Haematology, Sydney sierpień 1966, str. 283.
101. Kowalski E., New Blood Clotting Factors Suppl. do *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **4**, 211 (1960).
102. Kowalski E., Kopeć M., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **10**, 406 (1964).
103. Kowalski E., Budzyński A. Z., Kopeć M., Latałło Z. S., Lipiński B., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **12**, 69 (1964).

104. Kowalski E., Budzyński A. Z., Kopeć M., Lipiński B., Latało Z. S., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**, 12 (1965).
105. Kowalski E., Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Hurwic M., Budzyński A. Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **16**, 164 (1966).
106. Kowarzyk H., Buluk K., *Post. Hig. Med. Dośw.* **2**, 1 (1950).
107. Kowarzyk H., Rechnic M., *Sang.* **27**, 475 (1956).
108. Laki K., Lorand L., *Science* **108**, 286B (1948).
109. Lamy F., Waugh D. F., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **2**, 188 (1958).
110. Lanchantin G. F., Friedmann J. A., Hart D. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 2491 (1967).
111. Lechler E., Gross R., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **8**, 355 (1962).
112. Lipiński B., Kowalski E., *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. biol.* **9**, 251 (1961).
113. Lipiński B., Budzyński A. Z., Latało Z. S., Kowalski E., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 527 (1964).
114. Lipiński B., Węgrzynowicz Z., Budzyński A. Z., Kopeć M., Latało Z. S., Kowalski E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **17**, 65 (1967).
115. Lisiewicz J., *Pol. Tyg. Lek.* **1150**, 21 (1965).
116. Lisiewicz J., *Acta Physiol. Polon.* **17**, 617 (1966).
117. Loeliger A., Hers J. F., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **1**, 499 (1957).
118. Loewy A. G., Dunathan K., Krieb R., Wolfinger H. L. Jr., *J. Biol. Chem.* **236**, 2634 (1961).
119. Loewy A. G., Gallant J. A., Dunathan K., *J. Biol. Chem.* **236**, 2648 (1961).
120. Loewy A. G., Maticic S., Darnell J. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 435 (1966).
121. Lorand L., Konishi K., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 58 (1964).
122. Lorand L., Ong H. H., Lipiński B., Rule N. G., Downey J., Jacobson A., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **25**, 629 (1966).
123. Lundblad R. L., Davie E. W., *Biochemistry* **4**, 113 (1965).
124. Lüscher E. F., *Brit. J. Haematol.* **13**, 1 (1967).
125. Macfarlane R. G., *Nature* **202**, 498 (1964).
126. Macmillan D. C., *Nature* **211**, 140 (1966).
127. Marr J., Barboriak J. J., Johnson S. A., *Nature* **205**, 259 (1965).
128. Marciniak E., *Post. Hig. Med. Dośw.* **18**, 1 (1964).
129. Marciniak E., Seegers W. H., *Nature* **209**, 621 (1966).
130. Marciniak E., Murano G., Seegers W. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **18**, 161 (1967).
131. Marcus A. J., Zucker M. B., *The Physiology of Blood Platelets*, Grune and Stratton, New York i London 1965.
132. Marcus A. J., *Adv. Lipid Res.* **4**, 1 (1966).
133. Marcus A. J., Zucker-Franklin D., Safier L. B., Ullman H. L., *J. Clin. Invest.* **45**, 14 (1966).
134. Margolis J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **104**, 133 (1963).
135. Markwardt F., *Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus Blutsaugenden Tieren*, VEB Gustaw Fischer Verlag, Jena 1963.
136. Markwardt F., *Biochemistry of Blood Platelets*, red. E. Kowalski i S. Niewiarowski, Acad. Press i PWN, London—Warszawa 1967, str. 105.
137. Maupin B., *Hemostase* **1**, 29 (1961).
138. McDonald L., Bray C., Field C., Love F. Davies B., *Lancet* **1**, 745 (1964).
139. McLean J. R., Maxwell R. E., Hertler D., *Nature* **202**, 605 (1964).
140. Michael S. E., Tunnach G. W., *Brit. J. Haematol.* **12**, 115 (1966).
141. Mills D. C. B., Roberts G. C. K., *Nature* **213**, 35 (1967).

142. Mitchell J. R. A., Sharp A. A., *Brit. J. Haematol.* **10**, 78 (1964).
143. Monkhouse F. C., Milojevic S., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **43**, 819 (1965).
144. Morawitz P., *Ergeb. Physiol.* **4**, 307 (1905).
145. Morse E. E., Jackson D. P., Conley C. L., *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 106 (1967).
146. Murray M., Chadwick M., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 338 (1962).
147. Murray M., Gray L., *Nature* **194**, 681 (1962).
148. Mustard J. F., Glynn M. F., Murphy E. A., Packham M. A., Nishizawa E., Hirsh J., Hovig T., Jorgenson L., *Biochemistry of Blood Platelets*, red. E. Kowalski i S. Niewiarowski, Academic Press i PWN London—Warszawa 1967, str. 133.
149. Nemerson Y., Spaet T. H., *Blood* **23**, 657 (1964).
150. Niemetz J., Nossel H. L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **17**, 336 (1967).
151. Niewiarowska M., Obrębski T., Lipiński B., *Praca nie opublikowana*.
152. Niewiarowski S., Kowalski E., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **5**, 169 (1957).
153. Niewiarowski S., Kowalski E., *Rev. Hematol.* **13**, 320 (1958).
154. Niewiarowski S., Kowalski E., Stachurska J., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 43 (1959).
155. Niewiarowski S., Latałło Z., Stachurska J., *Revue d'Hematologie* **14**, 118 (1959).
156. Niewiarowski S., Prou-Wartelle O., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **3**, 593 (1959).
157. Niewiarowski S., Kozłowska J., Gulmantowicz A., Pelczarska-Kasperska E., *Hemostase* **2**, 191 (1962).
158. Niewiarowski S., Stachurska J., Węgrzynowicz Z., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **7**, 514 (1962).
159. Niewiarowski S., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **35**, 5 (1965).
160. Niewiarowski S., Bańkowski E., Rogowicka I., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **14**, 387 (1965).
161. Niewiarowski S., Farbiszewski R., Popławski A., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **14**, 490 (1965).
162. Niewiarowski S., Stuart R. K., Thomas D. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **123**, 196 (1966).
163. Niewiarowski S., Thomas D. P., *Nature* **212**, 1544 (1966).
164. Niewiarowski S., Popławski A., Lipiński B., Farbiszewski R., *Symposium — Platelets in Hemostasis*, Miemo, Włochy, wrzesień 1967 (Karger — w druku).
165. Niewiarowski S., Lipiński B., Farbiszewski R., Popławski A., *Experientia* **24**, 343 (1968).
166. Niewiarowski S., Rogowicka-Gorzelał I., Worowski K., Myśliwiec M., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. VI*, **15**, 599 (1968).
167. Nilsson I. M., Blomback M., Jorpes E., Johanson S. A., *Acta Med. Scand.* **159**, 179 (1957).
168. Nilsson I. M., Yamashina I., *Nature* **181**, 711 (1958).
169. Nilsson I. M., Blomback M., Blomback B., *Acta Med. Scand.* **164**, 263 (1959).
170. O'Brien J. R., *J. Clin. Pathol.* **16**, 223 (1963).
171. O'Brien J. R., *Nature* **200**, 763 (1963).
172. O'Brien J. R., *J. Clin. Pathol.* **17**, 275 (1964).
173. Olson J. P., Miller L. L., Troup S. B., *J. Clin. Invest.* **45**, 690 (1966).

174. Papahadjopoulos D., Hougie C., Hanahan D. J., *Biochemistry* **3**, 264 (1964).
175. Parmeggiani A., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 517 (1961).
176. Pechet L., *New England J. Med.* **273**, 966, 1024 (1965).
177. Pedersen H. J., Tebo T. H., Johnson S. A., *Am. J. Clin. Pathol.* **48**, 62 (1967).
178. Popławski A., *Post. Biochem.* **11**, 47 (1965).
179. Popławski A., Niewiarowski S., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**, 149 (1965).
180. Popławski A., Worowski K., *Acta Physiol. Polon.* **16**, 430 (1965).
181. Popławski A., Niewiarowski S., *J. Atheroscl. Research* (w druku).
182. Prokopowicz J., *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 91 (1968).
183. Ratnoff O. D., Kontakt osobisty.
184. Ratnoff O. D., Rosenblum J. M., *Am. J. Med.* **25**, 160 (1958).
185. Rosenberg M. C., Stormorken H., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **19**, 82 (1967).
186. Roskam J., *Arch. Int. Physiol.* **20**, 241 (1923).
187. Rysanek K., Svehla C., Spankova H., Mjelnkova M., *Experientia* **22**, 320 (1966).
188. Saba H. I., Roberts H. R., Herion J. C., *J. Clin. Invest.* **46**, 580 (1967).
189. Salzman E. W., Chambers D. A., *Nature* **204**, 698 (1964).
190. Salzman E. W., Chambers D. A., Neri L. L., *Nature* **210**, 167 (1966).
191. Schimpf K., Brieger G., Mühlhausler W., Teupel R., Turk A., *Acta Haematol.* **28**, 359 (1962).
192. Schoenmakers J., Matze R., Haanen C., Zilliken F., *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 433 (1964).
193. Seegers W. H., Ulutin O. N. *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **6**, 270 (1961).
194. Seegers W. H., Prothrombin, Harvard Univ. Press. Cambridge 1962.
195. Seegers W. H., *Federation Proc.* **23**, 749 (1964).
196. Seegers W. H., *Thromb. Diath. Haemorrhag* **14**, 213 (1965).
197. Sherry S., Troll W., *J. Biol. Chem.* **208**, 95 (1954).
198. Sherry S., Fletcher A. P., Alkjaersig N., *Physiol. Rev.* **39**, 343 (1959).
199. Shulman S., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5846 (1953).
200. Soloff C. A., Wiedeman M. P., *Nature* **199**, 497 (1963).
201. Solum N. O., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **18**, 577 (1966).
202. Soulier J. P., Wartelle O., Menache D., *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* **3**, 263 (1958).
203. Soulier J. P., *Sang* **30**, 262 (1959).
204. Soulier J. P., Wartelle O., Menache D., *Brit. J. Haematol.* **5**, 121 (1959).
205. Spaet T. H., Zucker M. B., *Am. J. Physiol.* **206**, 1267 (1964).
206. Spaet T. H., *Blood* **28**, 12 (1966).
207. Spaet T. H., Lejniaks I., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 36 (1966).
208. Steinbuch M., Blatrix C., Josso F., XI-Congress of the Intern. Society of Haematology, Sydney, 1966, str. 7.
209. Suttie J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 166 (1967).
210. Teger-Nielsson A. C., Blomback B., *Acta Chem. Scand.* **21**, 307 (1967).
211. Thomas D. P., *Nature* **215**, 298 (1967).
212. Tranzer J. P., Baumgartner H. R., Studer A., Sympozjum Platelets in Hemostasis, Miemo. Włochy, wrzesień 1967 (Karger, w druku).
213. Triantaphyllopoulos D. C., *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**, 249 (1958).
214. Triantaphyllopoulos D. C., Triantaphyllopoulos E., *Life Science* **6**, 601 (1967).

215. VanCreveld S., Paulssen M. M. P., *Lancet* **2**, 242 (1951).
216. Wald G., *Science* **150**, 1028 (1965).
217. Ware A. G., Seegers W. H., *Am. J. Physiol.* **152**, 567 (1948).
218. Wehr H., Niewiarowski S., *Acta Physiol. Polon.*, **4**, 141 (1953).
219. Wołosowicz N., Jaroszewicz L., Niewiarowski S., *Post. Biochem.* **14**, 3 (1968).
220. Wright J. H., Minot G. R., *J. Exptl. Med.* **26**, 395 (1917).
221. Yachnin S., *New England J. Med.* **274**, 140 (1966).

BOGUSŁAW LIPIŃSKI

Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny

Soluble Fibrin Monomer Complexes

Mechanisms of formation of different types of soluble fibrin monomer complexes are discussed. Some physico-chemical as well as biological properties are described with special emphasis on their role in hemostasis and platelet functions.

Monomery fibryny są strukturalnymi jednostkami skrzepu fibrynowego formowanego z fibrynogenu pod wpływem trombiny powstającej podczas krzepnięcia krwi.

Fizykochemiczne własności fibrynogenu omówiono szczegółowo w artykule opublikowanym poprzednio (11). W ostatnich latach osiągnięto znaczny postęp w poznaniu struktury podjednostek fibrynogenu (1, 2, 7) i produktów jego degradacji powstałych pod działaniem plazminy (4, 19).

1. Przemiana fibrynogenu w fibrynę

W celu wyjaśnienia mechanizmu powstawania rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (RKMF) należy prześledzić poszczególne etapy powstawania skrzepu fibrynowego.

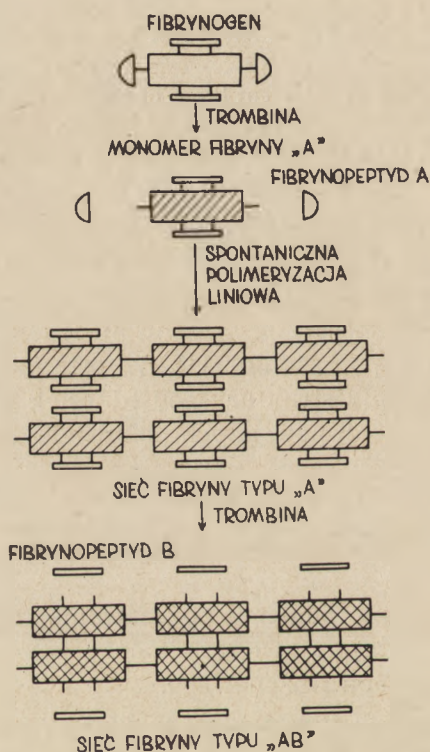
Badania nad przemianą fibrynogenu w fibrynę ujawniły, iż trombina odszczepia od cząsteczki fibrynogenu co najmniej dwa typy fibrynopeptydów (2 mole fibrynopeptydu A i B na mol fibrynogenu). Kinetyka odszczepiania tych peptydów jest różna: najpierw uwalnia się fibrynopeptyd A, a potem, znacznie wolniej — B. Do wytworzenia skrzepu wystarczy odszczepienie fibrynopeptydu A, co ma miejsce na przykład w przypadku działania reptilazy, enzymu otrzymanego z jadu węża *Bothrops jararaca* (3, 6). Natomiast enzymatyczne uwolnienie fibrynopeptydu B odgrywa istotną rolę w retrakcji skrzepu (5). Schematycznie

* Dr, Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Wykaz stosowanych skrótów: RKMF — rozpuszczalny kompleks monomerów fibryny, FDP — produkty degradacji fibrynogenu, FSF — stabilizator fibryny

proces przemiany fibrynogenu w fibrynę pod wpływem trombiny przedstawia rysunek 1.

W pierwszym etapie działania trombiny powstają monomery fibryny typu „A”, które pozbawione są tylko fibrynopeptydu A. Monomery takie spontanicznie polimeryzują liniowo tworząc skrzep fibrynowy typu „A”. Dalsze działanie trombiny powoduje odszczepienie fibrynopeptydu B już po wytworzeniu skrzepu, przemieniając go na typ „AB”. W takim skrzepie poszczególne monomery połączone są między sobą i liniowo, i bocznie.



Rys. 1. Schemat przemiany fibrynogenu w fibrynę pod wpływem trombiny

2. Rozpuszczalne pośrednie polimery fibryny i kompleksy fibrynogenu z monomerem A

Dokonane w mikroskopie elektronowym obserwacje procesów zachodzących w czasie wykrzepiania oczyszczonego fibrynogenu trombiną wykazały, że wytworzenie przestrzennej sieci fibryny poprzedzane jest pojawieniem się rozpuszczalnych pośrednich polimerów monomeru fibryny (10). Shainoff i Page (22) wykazali, że w pierwszym etapie powstawania sieci fibryny tworzą się rozpuszczalne kompleksy fibryno-

geny z monomerem fibryny typu A. Kompleks taki pod wpływem dalszego działania trombiny przekształca się całkowicie na monomery polimeryzujące w końcu do skrzepu fibrynowego. Wyodrębniony kompleks ma stałą sedymentacji $24 S_{20}$ w porównaniu z $8 S_{20}$ dla oczyszczonego fibrynogenu (21). W pH 5,3 taki kompleks ulega dysocjacji na fibrynogen i część monomerową, które spontanicznie polimeryzują tworząc, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, nierozpuszczalny włóknisty osad.

Chociaż autorzy sugerują, iż w takim kompleksie 1 cząsteczka fibrynogenu połączona jest z jednym monomerem A, bardziej prawdopodobne wydaje się połączenie trójskładnikowe. W takim kompleksie na trzy mole fibrynogenu przypadająby 4 odszczepione fibrynopeptydy A.

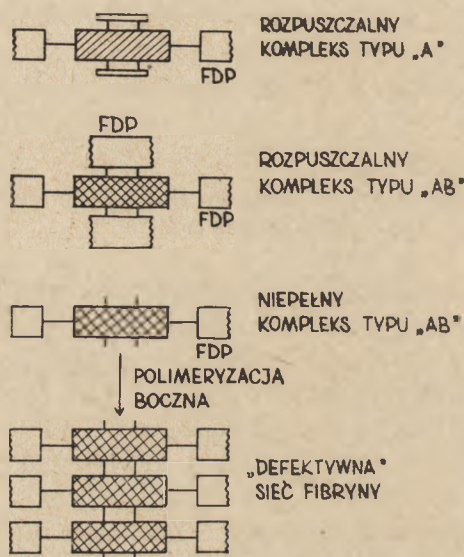
3. Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny z produktami degradacji fibrynogenu (FDP)

Inną klasę rozpuszczalnych kompleksów stanowią połączenia między monomerami fibryny a FDP. Kompleksy takie powstają w układzie, w którym trombina odszczepia monomery z fibrynogenu w obecności wczesnych lub późnych produktów degradacji fibrynogenu plazminą. Wydajność kompleksowania zależy od stężenia FDP i jest największa, gdy FDP dodać do pełnej świeżo pobranej krwi przed jej spontanicznym skrzepnięciem.

Podobne rozpuszczalne kompleksy tworzą się w układzie FDP, osocze, trombina, lub FDP, fibrynogen i trombina (15). W tym ostatnim przypadku wydajność kompleksowania zależna jest od szybkości powstawania monomerów fibryny z fibrynogenu pod wpływem trombiny. Zasadniczą cechą tego typu kompleksów jest ich niewykrzepialność po dodaniu trombiny.

Rozpuszczalne kompleksy można również otrzymać mieszając FDP z preparatem monomeru fibryny w moczniku. Wydajność kompleksowania jest bardzo niska, jeśli użyty monomer fibryny pozbawiony jest obu fibrynopeptydów A i B wskutek wyczerpującego działania trombiny na fibrynogen. Natomiast z monomerem typu „A”, otrzymanym przez działanie reptilazą, kompleksowanie zachodzi niezwykle wydajnie (9). Efektywne kompleksowanie monomeru typu A tłumaczy się tym, iż FDP blokują centra polimeryzacji odsłonięte przez odszczepiony fibrynopeptyd A (rysunek 2), a obecny na cząsteczce monomeru fibrynopeptyd B uniemożliwia polimeryzację boczną. W przypadku monomeru fibryny typu AB rozpuszczalny kompleks powstaje tylko wtedy, gdy wszystkie centra polimeryzacji będą zablokowane przez nadmiar FDP. Przy niedostatecznym stężeniu FDP w stosunku do monomerów AB powstaje „niepełny” kompleks, który poprzez polimeryzację boczną wytwarza „defektywną” sieć fibryny.

Ostatnio wykazano (8), że przy wykrzepianiu fibrynogenu w obecności FDP bakteryjnym trombinopodobnym enzymem, zwanym koagulazą gronkowcą, wydajność kompleksowania jest znacznie mniejsza niż przy analogicznym wykrzepianiu trombiną. Prawdopodobnie koagulaza gronkowca przekształca fibrynogen w monomer fibryny typu AB i powstają niepełne kompleksy typu AB zdolne do wytworzenia opisanej wyżej defektywnej sieci fibryny.



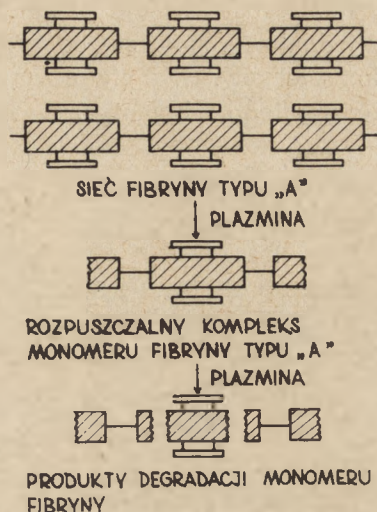
Rys. 2. Różne formy rozpuszczalnych kompleksów w zależności od typu monomeru fibryny

4. Rozpuszczalne kompleksy monomeru fibryny powstające w czasie lizy skrzepu fibrynowego

Jeszcze inny rodzaj rozpuszczalnych kompleksów powstaje w czasie proteolitycznego rozpadu fibryny pod wpływem plazminy (12). Powstają one tylko w przypadku upłynniania świeżego skrzepu złożonego głównie z monomerów typu A. Rozpuszczalne kompleksy składają się z monomeru fibryny oraz związanych z nim fragmentów sąsiednich monomerów (rysunek 3). W czasie dalszej proteolizy plazminą następuje degradacja kompleksów z wytworzeniem fragmentów monomerów fibryny.

Jeżeli poddać działaniu plazminy skrzep fibrynowy, którego sieć zbudowana jest z monomerów typu AB, to jego liza będzie przebiegać od razu z wytworzeniem drobnocząsteczkowych fragmentów fibryny. Boczna asocjacja monomerów AB w sieci fibrynowej uniemożliwia bowiem uwalnianie rozpuszczalnych kompleksów (rysunek 3). Również zacho-

dząca pod wpływem plazminy liza skrzepów otrzymanych w wyniku działania koagulazy gronkowcowej, przebiega bez uwalniania RKMF. Jest to prawdopodobnie także wynikiem bocznej asocjacji koagulazowych monomerów w sieci skrzepu.



Rys. 3. Hipotetyczny mechanizm powstawania rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny w czasie lizy skrzepu fibrynowego pod wpływem plazminy.

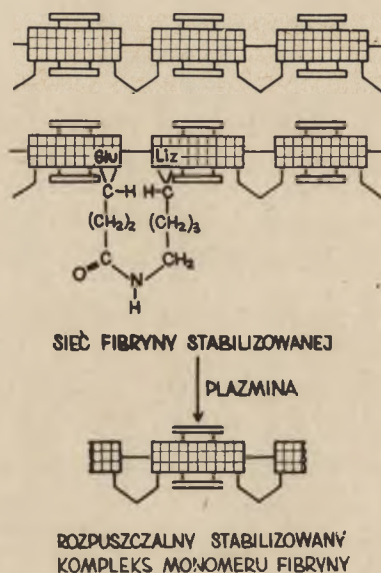
5. Rola stabilizatora fibryny (FSF) w powstawaniu rozpuszczalnych monomerów fibryny

Czynnikiem, który powoduje zasadniczą zmianę własności RKMF jest stabilizacja fibryny. Fibryna utworzona pod wpływem trombiny z oczyszczonego fibrynogenu składa się z monomerów związanych między sobą wiązaniami wodorowymi i być może hydrofobowymi. Wiązania takie ulegają rozerwaniu w środowisku kwaśnym lub w roztworach stężonego mocznika, co powoduje rozpuszczenie skrzepu. Otrzymany w ten sposób roztwór monomerów fibryny może być ponownie przeprowadzony w skrzep po usunięciu mocznika.

Jeśli skrzep fibryny wytwarza się w obecności aktywnego czynnika stabilizującego fibrynę, to powstały polimer nie rozpuszcza się ani w środowisku kwaśnym, ani w roztworach stężonego mocznika. Jest to spowodowane tym, iż poszczególne monomery fibryny w takim skrzepie związane są między sobą wiązaniami kowalencyjnymi, tworząc przestrzenną sieć stabilizowanej fibryny. Należy podkreślić, iż właśnie taki stabilizowany skrzep tworzy się w warunkach fizjologicznego krzepnięcia krwi. Ostatnio wykazano, że FSF jest transamidazą katalizującą powsta-

nie wiązania pomiędzy ϵ -aminową grupą reszty lizynowej jednego monomeru fibryny a γ -karboksylem reszty kwasu glutaminowego sąsiedniego monomeru (18).

Proteoliza stabilizowanego skrzepu plazminą prowadzi również do powstania rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (12). Kompleksy takie w wyniku dalszego trawienia plazminą dają produkty degradacji fibryny, które jednakże różnią się od produktów otrzymanych z nie stabilizowanych kompleksów. Sieć stabilizowanej fibryny oraz jej lizę przez plazminę przedstawiono schematycznie na rysunku 4.



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie sposobu łączenia się poszczególnych monomerów fibryny w sieci stabilizowanego skrzepu oraz uwalnianie rozpuszczalnego kompleksu pod wpływem plazminy

Kompleks wyizolowany z lizatu fibryny nie stabilizowanej ulega dysocjacji w moczniku w środowisku kwaśnym i w czasie elektroforezy na żelu skrobiowym dzieli się na trzy frakcje. Natomiast rozpuszczalny kompleks otrzymany z lizatu stabilizowanej fibryny stanowi w tych warunkach niedysocjującą całość.

6. Ogólne własności rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny

Charakterystyczną cechą wszystkich typów rozpuszczalnych kompleksów, zawierających jako podstawowy składnik monomer fibryny, jest ich zdolność do nieodwracalnego wytwarzania włóknistych osadów pod wpływem szeregu czynników parakoagulujących. Należą do nich siarczan protaminy, β -naftol oraz ostatnio opisany czynnik płytkowy 4 (20). Po-

nadto parakoagulację można wywołać przez zakwaszenie do pH 5,8, oziębienie do $+4^{\circ}C$, lub przez rozcieńczenie wodą destylowaną. Zjawisko parakoagulacji polega na zdysocjowaniu rozpuszczalnego kompleksu na monomery i FDP, co prowadzi do spontanicznej nieodwracalnej polimeryzacji monomerów fibryny. Taki para-skrzep zawiera pewną część skopolimeryzowanych FDP i ma strukturę inną niż czysta fibryna (13).

RKMF można podzielić na dwie zasadnicze grupy: wykrzepialną i nie wykrzepialną pod wpływem trombiny. Z kompleksów monomerów z fibrynogenem trombina odszczepia dalsze fibrynopeptydy doprowadzając do wytworzenia jednolitego skrzepu fibrynowego. Wykrzepialne trombiną kompleksy są zatem przejściowym produktem przemiany fibrynogenu w fibrynę. W przeciwieństwie do nich, kompleksy monomerów fibryny z FDP oraz kompleksy uwalniane w czasie proteolizy skrzepu nie mogą tworzyć przestrzennej sieci fibryny z racji ich specyficznej budowy.

Z reakcją parakoagulacji wiąże się zjawisko zlepiania gronkowców oraz agregacji płytek przez RKMF. Zlepianie gronkowców obserwowane w osoczu, surowicy oraz roztworach oczyszczonego fibrynogenu, zależne jest od obecności specyficznego czynnika, którym okazały się rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny powstałe w wyniku lizy skrzepu (14). Drugim niezbędnym czynnikiem do wywołania reakcji zlepiania gronkowców jest obecność w ich ścianie komórkowej substancji o własnościach parakoagulujących. Podobnie tłumaczy się agregację płytek krwi przez rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny tak z fibrynogenem, jak i z FDP (9). W przypadku płytek krwi czynnikiem parakoagulującym jest czynnik płytkowy 4 odznaczający się niezwykle specyficzną. Parakoagulująca aktywność tego czynnika przewyższa 100-krotnie aktywność siarczanu protaminy (20).

W związku z badaniem własności zlepiania przez kompleksy stwierdzono, iż pewne formy kompleksów wykazują charakterystyczną termostabilność w $56^{\circ}C$. Fibrynogen ogrzewany przez 3 min. w tej temperaturze ulega całkowicie nieodwracalnej precypitacji. Kompleksy stabilne w $56^{\circ}C$ ulegają jednakże denaturacji przy ogrzewaniu w $60^{\circ}C$ przez 3 min.

7. Znaczenie rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny w hemostazie

Stosując opracowany ostatnio test z siarczanem protaminy wykazano, że w osoczu ludzi zdrowych znajduje się stosunkowo stała ilość rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny, która wynosi około 10% krążącego fibrynogenu (16). Poziom RKMF dramatycznie zwiększa się w pewnych stanach patologicznych, na przykład przy zawale serca, w którym stwierdza się nadkrzepliwość innymi metodami. W doświadczeniach na królikach stwierdzono, iż wzrost RKMF w osoczu można wywoływać nie

tylko dożylnym wstrzyknięciem trombiny, ale również podawaniem kwasu ϵ -aminokapronowego, znanego związku antyfibrynolitycznego (17). Z drugiej strony aktywacja fibrynolizy *in vivo* prowadzi do spadku poziomu tych kompleksów.

Wyniki tych badań wskazują na istnienie ciągłego, wewnątrznaczyniowego wykrzepiania prowadzącego do powstania RKMF. Gromadzenie się nadmiaru kompleksów fibryny równoważne jest, w myśl naszych obserwacji, skutecznie działającym układem fibrynolitycznym, rozkładającym RKMF na produkty o odmiennych własnościach. Potwierdzeniem istnienia pewnej równowagi między wewnątrznaczyniowym wykrzepianiem a fibrynolizą jest obecność w osoczu zdrowych ludzi i zwierząt czynnika powodującego zlepianie gronkowców (14). Nagromadzenie RKMF w krążącej krwi u królików po podaniu endotoksyny bakteryjnej jest również wynikiem zahamowania fibrynolizy, co jest charakterystyczne dla pierwszej fazy uogólnionego fenomenu Sch w a r t z m a n a (17).

Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny mogą odgrywać istotną rolę w mechanizmach hemostazy ciągłej i lokalnej. W przypadku lokalnego uszkodzenia ściany naczyniowej zachodzi agregacja płytek przez odsłonięty kolagen i wydzielenie czynnika płytkowego 4. Czynniki te wywołując natychmiastową parakoagulację monomerów fibryny znajdujących się w otoczeniu płytek prowadziłyby do wytworzenia pierwotnego czopu hemostatycznego bez konieczności aktywacji całego układu krzepnięcia. Czynniki płytkowy 4 może również, na zasadzie reakcji parakoagulacji, ułatwiać przyleganie płytek krwi do włókien fibryny wytworzonych już w procesie enzymatycznego działania trombiny na fibrynogen.

Reasumując należy podkreślić niezwykle różnorodność form rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny, jakie powstają z jednego prekursora fibrynogenu, pod wpływem działania trombiny i plazminy. Jeżeli uwzględnić działanie FSF to różnorodność ta jeszcze się zwiększa. Jest prawdopodobne, że niektóre z takich niewykrzepialnych trombiną kompleksów, które należą do białek o ciężarze większym niż 340 000, mogą reprezentować pewne makroglobulinowe frakcje surowicy (12).

LITERATURA

1. Blombäck B., Blombäck M., Hessel B., Iwanaga S., *Nature* **215**, 1445 (1967).
2. Blombäck B., Blombäck M., Laurent T. C., Perfoft H., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 560 (1966).
3. Blombäck B., Blombäck M., Nilson I. M., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **1**, 3 (1957).
4. Budzyński A. Z., Stahl M., Kopeć M., Latałło Z. S., Węgrzynowicz Z., Kowalski E., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 313 (1967).
5. Colman R. W., Osbahr A. J., *Nature* **215**, 292 (1967).
6. Copley A. L., Luchini B. W., *Life Sci.* **3**, 1296 (1964).

7. Iwanaga S., Henschen A., Blomback B., *Acta Chem. Scand.* **20**, 1183 (1966).
8. Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Budzyński A. Z., Jeliaszewicz J., Latałło Z. S., Lipiński B., Kowalski E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **18**, 475 (1967).
9. Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Budzyński A. Z., Latałło Z. S., Lipiński B., Kowalski E., Conference „Platelet in Hemostasis”, Miemo, Włochy, 1967 (Karger, w druku).
10. Koppel G., Abstr. 7-th Europ. Congr. Hematology, London 1959, s 234.
11. Lipiński B., *Post. Biochem.* **7**, 243 (1961).
12. Lipiński B., (dane nie publikowane).
13. Lipiński B., Budzyński A. Z., Latałło Z.S., Kowalski E., *Acta Biochim Polon.* **11**, 527 (1964).
14. Lipiński B., Hawiger J., Jeliaszewicz J., *J. Exptl. Med.* **126**, 979 (1967).
15. Lipiński B., Węgrzynowicz Z., Budzyński A. Z., Kopeć M., Latałło Z. S., Kowalski E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **17**, 65 (1967)
16. Lipiński B., Worowski K., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* (w druku).
17. Lipiński B., Worowski K., Jeliaszewicz J., Niewiarowski S., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* (w druku).
18. Lorand L., Ong H. H., Lipiński B., Rule N. G., Downey J., Jacobsen A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 629 (1966).
19. Mills D. A., Coyne R., Pollara B., Von Korff R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 527 (1964).
20. Niewiarowski S., Popławski A., Lipiński B., Farbiszewski R., Conference „Platelets in Hemostasis” Miemo, Włochy, 1967 (Karger, w druku).
21. Sasaki T., Page I. H., Shainoff J. R., *Science* **152**, 1069 (1966).
22. Shainoff J. R., Page I. H., *J. Exptl. Med.* **116**, 687 (1962).

Komunikat

Komitet organizacyjny wyłoniony w czasie Europejskiego Zjazdu Przeciwrakowego w Wiedniu w lipcu 1967 roku na posiedzeniu w dniu 9 stycznia 1968 roku w Amsterdamie powołał do życia Europejskie Towarzystwo Badań nad Rakiem (*European Assotiation for Cancer Research*).

Towarzystwo zamierza organizować zjazdy naukowe co dwa lata. Pierwszy zjazd odbędzie się we wrześniu 1969 roku w Szwajcarii.

Członkami Towarzystwa mogą być osoby posiadające stopień akademicki lub równoznaczny i które były zatrudnione aktywnie w badaniach nad rakiem przynajmniej przez trzy lata albo w innych pracach badawczych przez okres pięciu lat z czego dwa lata w badaniach nad rakiem.

Formularze zgłoszenia członkowstwa i dalsze informacje można otrzymać w sekretariacie towarzystwa:

Dr. G. J. V. Swaen
Academisch Ziekenhuis
Wilhelmina Gasthuis
Pathologisch-Anatomisch Laboratorium
A m s t e r d a m — O u t W e s t
Eerste Helmersstraat 104
Holandia

Składka członkowska, którą należy wpłacać skarbnikowi Towarzystwa wynosi około 20 guldenów holenderskich rocznie. Czynnione są starania, by członkowie z Polski mogli opłacać składkę w walucie polskiej.

JAN PROKOPOWICZ*

Aspekty biochemiczne niektórych funkcji leukocytów

Biochemical Aspects of Some Granulocyte Functions

The role of the enzymes of granulocyte in the phagocytosis, kinin formation and destruction, vascular permeability, hemostasis, thrombolysis and fibrin digestion has been presented.

Wśród krwinek białych wyróżniamy trzy grupy komórek: granulocyty, limfocyty i monocyty. Badania cytofizjologiczne z zastosowaniem mikroskopu elektronowego i fazowo-konrastowego pozwoliły wyróżnić w leukocytach następujące cytoplazmatyczne struktury (102): 1) ziarnistości specyficzne (lizosomy), 2) mitochondria, 3) centrosomy, 4) siateczkę endoplazmatyczną, 5) wodniczki, 6) jądra, 7) rybosomy, 8) aparat siateczkowy Golgiego. Leukocyt pełni wiele różnorodnych funkcji. Dobrze znana jest podstawowa rola leukocytów w mechanizmach odpornościowych ustroju i w fagocytozie. Ponadto leukocyty są miejscem powstawania kinin, mających różnorakie działanie biologiczne oraz substancji powodujących wzrost przepuszczalności naczyń. Leukocyty odgrywają również ważną rolę w trombolizie i hemostazie.

Leukocyty wykazują wysoką aktywność metaboliczną. Enzymy aktywujące aminokwasy i warunkujące syntezę białka są w leukocytach w znacznie większym stężeniu niż w erytrocytach (48). Leukocyty około 100—1000-krotnie szybciej wbudowują ^{14}C -octan do lipidów niż erytrocyty (12,50). W leukocytach, w których znaleziono specyficzne elementy układu cytochromowego, zachodzą intensywne procesy oddechowe (17). Mają one też enzymy warunkujące przebieg glikolizy tlenowej i beztlenowej (6, 7, 8, 99), oraz cyklu pentozowego. Ponadto w leukocytach stwierdzono aktywność „esteraz” i lipaz (10,41), arginazy (92), RN-azy i DN-azy (3, 21), kwaśnej i zasadowej fosfatazy (9), katalazy, peroksydazy (103, 104) i licznych dehydrogenaz, na przykład izocytrynianowej (1), jabłczanowej (76).

Własności proteolityczne leukocytów opisał wielu badaczy (3, 27, 39, 69). Weiss i Czarnetzky (105) przypuszczali, że leukocyty wielo-

* Dr med., Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

jądrzaste zawierają pepsynę, katepsynę i trypsynę, której obecności zaprzeczają jednak inni autorzy (70). W roku 1960 M o u n t e r i A t i y e h (65) wykazali, że leukocyty człowieka zawierają proteazy, działające w pH 3,0; 6,0 i 8,0. Badacze ci postulują, że proteaza zasadowa pochodzi z leukocytów wielojądrzastych. Z moich badań wynika, że zarówno proteaza kwaśna, jak i zasadowa jest przede wszystkim zlokalizowana w ziarnistościach specyficznych granulocytów (71). Pierwsza informacja o fibrynolitycznych własnościach leukocytów pochodzi z 1904 roku od R u l o t (81), który stwierdził, że rozpuszczanie fibryny było znacznie przyspieszone, jeżeli znajdowały się w niej leukocyty. Wielu badaczy potwierdziło nie tylko własności fibrynolityczne (15, 16, 52) tych komórek, ale również wykazało obecność w nich proenzymu o charakterze plazminogenu (16, 71), proaktywatora (88) i aktywatora plazminogenu (52, 71). B a r n h a r t i R i d d l e (5) zlokalizowały plazminogen w ziarnistościach specyficznych leukocytów kwasochłonnych. W naszej pracy stwierdziliśmy, że plazminogen znajduje się we wszystkich postaciach granulocytów ludzkich, a jego aktywność zależy od stopnia dojrzałości komórek (75). Jest on rozmieszczony równomiernie w poszczególnych podfrakcjach komórkowych granulocytów (71). Dalsze badania wykazały, że leukocyt zawiera plazminogen w dwukrotnie większym stężeniu w porównaniu z osoczem, jednakże aktywność tego enzymu jest zamaskowana dzięki obecności potężnego inhibitora aktywacji. Opracowano także metodę otrzymywania wysoko oczyszczonych preparatów plazminogenu granulocytarnego (72). Porównanie ich własności z preparatem z osocza pozwala przypuszczać, że oba proenzymy mogą być identyczne (73). Ponieważ pewne dane doświadczalne wskazują, że plazminogen jest syntetyzowany w granulocytach (74), wysunięto przypuszczenie, że mogą one być źródłem plazminogenu osoczowego.

W leukocytach stwierdzono również obecność antyurokinazy (71, 93) antystreptokinazy i antyplazminy (71).

1. Fagocytoza

Mimo wieloletnich badań, zapoczątkowanych w 1882 roku przez M i e c z n i k o w a (64), dokładny mechanizm fagocytozy nie jest poznany. Wyróżnia się dwa mechanizmy fagocytozy (11): zależy od opsonin znajdujących się w surowicy i niezależny od opsonin.

Interakcję pomiędzy komórką fagocytującą i fagocytową cząsteczką dzielimy na dwie fazy: I — wchłonięcie cząsteczki, II — zniszczenie cząsteczki. Obserwacje morfologiczne procesu fagocytozy i fagocytów pozwalają na wyodrębnienie dwu zjawisk:

1) wędrówki komórki fagocytującej w kierunku cząsteczki mającej ulec fagocytozie;

2) adhezji tej cząsteczki do ściany fagocytu oraz wysunięcia wypustek protoplazmatycznych i wchłonięcia cząsteczki do wnętrza fagocytu.

Na procesy te wpływają następujące czynniki fizyczne — napięcie powierzchniowe, siły elektrostatyczne; chemiczne — hemotaksja; immunologiczne — opsonizacja. Dokładny mechanizm działania tych czynników nie jest poznany.

W fazie wchłaniania cząsteczki przez leukocyt zwiększa się oddychanie (85), wzrasta glikoliza o 20% (30), jak również synteza lipidów (54). Uzyskana energia jest niezbędna do wchłaniania bakterii i innych cząstek. *Karnovsky* (53) obliczył, że do wchłonięcia cząsteczki o objętości 1×10^{-10} μ l leukocyt zużywa 1×10^9 cząsteczek ATP.

Druga faza fagocytozy polega zasadniczo na strawieniu wchłoniętej cząsteczki. Podstawową rolę w tym procesie spełniają ziarnistości specyficzne leukocytów (45). Liczni badacze (21, 23) wykazali, że te struktury cytoplazmatyczne odpowiadają lizosomom komórkowym. Znajdują się w nich liczne enzymy (21, 22, 23, 26, 46, 68) między innymi katepsyny, proteazy, fagocytyna, lizozym i rybonukleaza.

Wielu badaczy wykazało, że w czasie fagocytozy lizosomy zlewają się z trawiącym materiałem w obrębie wodniczki trawiącej (66, 98), co prowadzi do degranulacji leukocytów (98). Zawartość enzymatyczna lizosomów może być również wyrzucana do wakuoli trawiącej (20, 21). Proces ten można obserwować od początku fagocytozy (20, 21). Według *de Duve* (22) trawienie fagocytowanej cząsteczki może być zapoczątkowane przez proteazy zasadowe, a następnie w wyniku szeregu zmian metabolicznych i zakwaszenia środowiska możliwe jest działanie kwaśnych proteaz i katepsyn.

Znany jest fakt, że w czasie fagocytozy wzrasta wytwarzanie kwasu mlekowego (84, 87) co warunkuje bardzo znaczne obniżenie *pH* do około 3—5 w wodniczce trawiącej (80, 89). W tych warunkach łatwo pękają ziarnistości specyficzne i uwalniają się enzymy, a między innymi DN-aza (84), która może powodować przynajmniej częściową depolimeryzację jądrowego DNA. Obok niszczącego działania enzymów proteolitycznych *Sbarr* (83) sugeruje, że H_2O_2 może mieć udział w niszczeniu sfagocytowanych bakterii. Może ona powstawać przez utlenianie zredukowanego NADP, którego ilość dość znacznie wzrasta w związku ze zwiększoną aktywnością oddechową leukocytów w czasie fagocytozy.

Rola enzymów proteolitycznych w procesie fagocytozy nie jest do tychczas wyjaśniona. W badaniach naszych (74) wykazaliśmy, że 10-krotne zmniejszenie aktywności zasadowej proteazy nie wpływa w sposób znamieny na indeks fagocytozy. Można przypuszczać, że w warunkach prawidłowych istnieje znaczny nadmiar enzymów w stosunku do potrzeb komórki w procesie fagocytozy. Stwierdzono (74), że spadek aktywności niektórych enzymów fibrynolitycznych, na przykład plazminogenu, prawie do wartości zerowych, nie wpływa na indeks fagocytozy.

Nieznana jest również rola mechanizmu krzepnięcia w procesach fagocytozy. Lockwood i Allison (60) znaleźli na zewnątrz fagocytykujących leukocytów nie zidentyfikowany materiał, który mógł być częściowo spolimeryzowaną formą fibryny. Brak jest jednak bezpośredniego dowodu wpływu mechanizmu krzepnięcia na zlepianie się leukocytów.

2. Tworzenie i niszczenie kinin

Dość ważną funkcję spełniają leukocyty w tworzeniu i niszczeniu kinin. Wielu autorów stwierdziło, że leukocyty są zdolne do tworzenia kinin (19, 37, 63). Dalsze badania wykazały, że proces ten może być uzależniony od proteaz lub katepsyn znajdujących się w lizosomach leukocytów w obecności odpowiednich substratów (108). Tworzenie kinin może zachodzić tylko przy zachowanej biosyntezie białka i RNA oraz przy prawidłowym cyklu glikolitycznym (63). Fluorek sodu, puromycyna i aktynomycyna hamują częściowo wytwarzanie kinin przez granulocyty (63). Proces ten jest prawie całkowicie hamowany przez kortyzol, zaś znacznie słabiej przez dezoksykortykosteron i progesteron w porównywalnych stężeniach (19, 63). Interesujący wydaje się fakt, że w osoczu pacjentów otrzymujących prednizon granulocyty uwalniały znacznie mniej kinin niż w osoczu osób zdrowych (19). Wysłunięto hipotezę, że przeciwwzapalny efekt adrenokortykosteroidów może być uwarunkowany hamowaniem uwalniania kinin z osocza (19). Dalsze badania wykazały, że enzymy współdziałające w syntezie kinin znajdują się w osadzie lub supernatancie podfrakcji granulocytów uzyskanych po wirowaniu przy 8 200 g, przy czym optymalną aktywność tych enzymów znaleziono przy pH 3,0—5,0 (38).

Leukocyty obok zdolności do syntezy kinin posiadają również możliwość ich niszczenia. Kininazy w leukocytach wykrył po raz pierwszy Schwab (86) w 1962 roku. Fakt ten potwierdziło następnie wielu badaczy (37, 38, 63, 109). Według Erdős i wsp. (28, 29) kininazy należą do karboksypeptydaz. Aktywność tych enzymów, podobnie jak enzymów syntetyzujących kininy, znajduje się w supernatancie granulocytów uzyskanym po wirowaniu przy 8 200 g (38). Kininaza z granulocytów wykazuje optimum działania przy pH 7,0—7,4 (63), zmiana pH nawet do 6,0 tylko nieznacznie zmniejsza jej aktywność (109). Puromycyna i kortyzol nie wpływają na aktywność kininazy, zaś fluorek sodu tylko częściowo ją hamuje (63). Pod wieloma względami kininaza granulocytarna różni się od kininazy osoczowej. Stwierdzono, że inhibitory kininazy osoczowej (EDETA i kwas ϵ -aminokapronowy) nie mają wpływu na kininazę granulocytarną (109). Enzymowi temu przypisuje się

dość ważną rolę w degradacji kinin w tkankach w stanie zapalnym, bowiem może on działać w środowisku o obniżonym pH (109), podczas gdy kininaza osoczowa jest bardzo wrażliwa na obniżanie się pH (24).

3. Przepuszczalność naczyń

Na przepuszczalność naczyń oprócz kinin działa również specyficzny czynnik zawarty w leukocytach. Podanie ziarnistości specyficznych leukocytów do skóry zdrowych zwierząt powoduje wzrost przepuszczalności naczyń (34, 35, 67, 96). Czynnikiem powodujący tę reakcję jest białkiem zasadowym lub polipeptydem (110). Golub i Spitznagel (34) oraz Hayashi i wsp. (43) scharakteryzowali go nieco dokładniej. Czynnikiem ten różni się od histaminy, serotoniny i innych znanych mediatorów powodujących wzrost przepuszczalności naczyń. Nie przechodzi on przez błony półprzepuszczalne i jest niewrażliwy na leki antyhistaminowe oraz nie powoduje skurczu izolowanych mięśni gładkich. Czynnikiem ten można otrzymać *in vitro* w wyniku inkubacji leukocytów z kompleksami antygen-przeciwciało (67). Inhibitory proteaz hamują częściowo tę reakcję (14). Wielu badaczy sugeruje, że uszkodzenie naczyń i tkanek jest przynajmniej częściowo związane z uwolnieniem enzymów lizosomowych (proteaz) z leukocytów (96, 97, 98). Proteazy te mogą działać na białka i uwalniać polipeptydy czynne biologicznie (68), a więc i omawiany czynnik.

Wstrzyknięcie zwierzętom kortizonu znacznie zwiększa wpływ podania lizosomów leukocytnych na przepuszczalność naczyń (47), co związane jest prawdopodobnie ze stabilizującym wpływem kortizonu na błony lizosomów.

4. Hemostaza

Leukocyty odgrywają również pewną rolę w procesach hemostazy. Od wielu lat znany jest fakt, że leukocyty biorą udział w krzepnięciu krwi (13, 32). Wielu autorów (25, 58) wykazało, że leukocyty mają aktywność tromboplastyczną. Aktywność ta wykazuje szereg własności czynnika płytkowego 3 (58). Z obserwacji klinicznych wynika, że w warunkach szybkiego rozpadu leukocytów może dojść do wzmożonego wewnątrzcząsteczkowego krzepnięcia (15).

Leukocyty wykazują również aktywność antyheparynową. Wyciągi z leukocytów w warunkach doświadczalnych zmniejszają antylipemiczny wpływ heparyny we krwi (31) oraz zmniejszają *in vitro* wrażliwość osocza na heparynę w badaniu testem tolerancji heparyny (59). Wzrost liczby leukocytów po podaniu heparyny (51) mógłby przemawiać za rolą tych komórek w mechanizmie wiązania i eliminacji heparyny w ustroju.

Od wielu lat znane są także własności antytrombinowe leukocytów (36, 61). Czynnikiem warunkujący tę aktywność jest białkiem pochodzącym z granulocytów, interferującym z fosfolipidami w reakcji tworzenia tromboplastyny osoczowej (82), w której biorą udział czynniki V, X i jony Ca^{2+} .

Badania w mikroskopie elektronowym (33) wykazały, że leukocyty wchodzi w skład czopu hemostatycznego.

Leukocyty mogą warunkować wystąpienie zaburzeń w procesie hemostazy w różnych reakcjach patologicznych ustroju, do których należy przede wszystkim uogólniony fenomen Shwartzmana powstający w wyniku dwukrotnego wstrzyknięcia dożylnego endotoksyny, w odstępie 24 godzin. W ustroju powstają wówczas w wielu narządach liczne zmiany krwotoczne i martwicze, a przede wszystkim obustronna martwica kory nerek. Obserwuje się przy tym wewnątrznaczyniową aglutynację leukocytów, zakrzepy, pojawienie się fibrynogenu strącanego heparyną oraz obniżoną aktywność fibrynolityczną osocza. Zmiany te określa się ogólnie jako koagulopatię ze zużycia (57, 62, 79). Wielu badaczy uważa, że obecność leukocytów warunkuje powstawanie fenomenu Shwartzmana (90, 91); u zwierząt neutropenicznych nie udaje się wywołać tej reakcji (90, 91). Uwolnienie katepsyn i proteaz z lizosomów leukocytów do tkanek lub ich aktywacja ma decydujący udział w mechanizmie miejscowej reakcji Shwartzmana (42, 94, 95). Dowodem potwierdzającym rolę proteaz w tej reakcji jest jej hamowanie przez inhibitory proteaz (14, 40).

5. Tromboliza

Leukocyty odgrywają również poważną rolę w trombolizie. Welch (106) w 1887 roku zwrócił uwagę na obecność leukocytów w zakrzepach. Znaczenie tych komórek w trombolizie podkreśla wielu badaczy (4, 44, 49). Henri (44) wykazał, że liczba leukocytów narasta wraz z wiekiem zakrzepu, ich obecność nie jest więc przypadkowa. Największą liczbę leukocytów stwierdzono w 13 godzin od chwili powstania zakrzepu; zawierał on wtedy około 11—14-krotnie więcej leukocytów niż krew. Liczba leukocytów nie zwiększa się w zakrzepach powstających w zamkniętych odcinkach naczyń (2, 107) lub w zakrzepach wytwarzanych metodą Chandra (18). Z badań Riddle i Barnhardt (78) wynika, że obecność fibryny w zakrzepie może „przyciągać” leukocyty obojętne.

Można rozważać trzy mechanizmy, za pomocą których leukocyty rozpuszczają zakrzepy (4):

1) Wnikając do zakrzepu leukocyty mogą w sposób mechaniczny niszczyć jego strukturę, a przepływająca krew może odrywać części zakrzepu.

2) Strukturę zakrzepu mogą osłabić neutrofile wchłaniając i trawiąc fibrynę.

3) Śmierć komórki, albo uwolnienie zawartości lizosomu, dostarcza licznych enzymów proteolitycznych (65, 71) i fibrynolitycznych (16, 71, 88). Istnieje również możliwość, że katepsyna obecna w leukocytach aktywuje plazminogen do plazminy (56) co jeszcze dodatkowo powiększałoby zawartość enzymów fibrynolitycznych.

Badania w mikroskopie elektronowym pozwoliły prześledzić proces fagocytozy fibryny przez leukocyty (78). Trawienie fibryny przez neutrofile może przebiegać w dwojaki sposób:

- 1) wewnątrzkomórkowo — ziarnistości specyficzne tych komórek dostarczają enzymów do wodniczki trawiącej, zawierającej fibrynę za czym przemawiałaby obecność ziarnistości swoistych obok wodniczki i przyleganie ich bezpośrednio do błony fagosomu;
- 2) pozakomórkowo — stwierdzono, że leukocyty mogą uwalniać pozakomórkowo ziarnistości (77, 78).

Mechanizm wchłaniania i trawienia fibryny przedstawia się następująco (78): neutrofil wysuwa wypustki protoplazmatyczne i pochłania fibrynę, która ulega wielu przekształceniom. W wodniczkach trawiących neutrofilu znajduje się więc fibryna we wszystkich etapach trawienia. W pierwszym etapie tworzą się z fibryny masy ziarniste o umiarkowanej gęstości. W miarę dalszego trawienia struktura fibryny staje się bardzo luźna i w końcu zanika.

Na ważną rolę leukocytów w rozpuszczaniu zakrzepów wskazują badania przeprowadzone zarówno na zwierzętach, jak i u ludzi. Stwierdzono, że podanie psom trombiny (4) wywoływało 2—5-krotny wzrost liczby leukocytów, a szczególnie form o jądrze pałeczkowatym (13-krotny wzrost). Komórki te były „naładowane” fibryną. U pacjentów z zawałem serca i zakrzepami naczyń mózgowych leukocyty wykazywały szczególnie dużą aktywność w fagocytowaniu fibryny, fibrynogenu lub produktów ich rozpadu (4).

Trawienie fibryny nie jest wyłączną domeną leukocytów. Dużą rolę w tym procesie odgrywają komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony (55). Inni badacze (100, 101) zwracają uwagę, że te własności mają również komórki śródbłonka i włósniczek kłębków nerwowych.

LITERATURA

1. Allison M. J., Zappadosi P., Lurie M. B., *Am. Rev. Respirat. Dis.* **84**, 364 (1961).
2. Ambrus J. L., Back N., Mihalyi E., Ambrus C. M., *Circulation Res.* **4**, 430 (1956).
3. Barnes J. M., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **21**, 264 (1940).

4. Barnhart M. I., *Federation Proc.* **24**, 846 (1965).
5. Barnhart M. I., Riddle J. M., *Blood* **21**, 306 (1963).
6. Beck W. S., *J. Biol. Chem.* **232**, 251 (1958).
7. Beck W. S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 4 (1958).
8. Beck W. S., Valentine W. N., *Rev. Cancer Res.* **13**, 309 (1953).
9. Beck W. S., Valentine W. N., *J. Lab. Clin. Med.* **38**, 245 (1951).
10. Borel C., Frei J., Horvath G., Montri S., Vannotti A., *Helv. Med. Acta* **26**, 785 (1959).
11. Brogan T. D., *Immunology* **10**, 137 (1966).
12. Buchanan A. A., *Biochem. J.* **75**, 315 (1960).
13. Bunting C. H., *Physiol. Rev.* **2**, 505 (1922).
14. Burke J. S., Uriuhara T., Macmorine D. R. L., Movat H. Z., *Life Sci.* **3**, 1505 (1964).
15. Cattan A., Schwarzenberg L., Amiel J. L., Schneider M., Schlumberger J. R., Mathe G., *Rev. Franc. Et. Clin. Biol.* **11**, 155 (1966).
16. Caviezel O., Vollery M., Vannotti A. *Schweiz. Med. Wochschr.* **94**, 1016 (1964).
17. Chance B., The cytochromes of respiring cells. W: Blood Cells and Plasma Proteins, red. J. L. Tullis, Academic Press, New York 1953, s. 306.
18. Chandler A. B., *Lab. Invest.* **7**, 110 (1958).
19. Cline M. J., Melmon K. L., *Science* **153**, 1135 (1966).
20. Cohn Z. A., Hirsch J. G., *J. Exptl. Med.* **112**, 1022 (1960).
21. Cohn Z. A., Hirsch J. G., *J. Exptl. Med.* **112**, 983 (1960).
22. de Duve C., *Federation Proc.* **23**, 1045 (1964).
23. de Duve C., „Lysosomes: A new group of cytoplasmic particles” in Subcellular Particles, red. T. Hayashi, Ronald Press New York 1959, str. 128.
24. Edery H., Lewis G. P., *Brit. J. Pharmacol.* **19**, 299 (1962).
25. Eiseman G., Stefanini M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **86**, 763 (1954).
26. Elsbach P., Rizaack M. A., *Amer. J. Physiol.* **205**, 1154 (1963).
27. Erben F., *Z. Heilk.* **24**, 70 (1903).
28. Erdös E., Renfrew A., Sloane E., Wohler J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **104**, 222 (1963).
29. Erdös E., Wohler J., *Biochem. Pharmacol.* **12**, 1193 (1963).
30. Evans W. H., Karnovsky M. L., *Biochemistry* **1**, 159 (1962).
31. Fekete L. L., Lever W. F., Klein E., *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 680 (1958).
32. Fowler W. M., The leukocytes in Hematology, wyd. II, Paul B. Hoeber New York 1949, str. 28.
33. French J. E., Macfarlane R. G., Sanders A. G., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **45**, 467 (1964).
34. Golub E. S., Spitznagel J. K., *J. Immunol.* **95**, 1060 (1966).
35. Golub E. S., Spitznagel J. K., *Federation Proc.* **23**, 509 (1964).
36. Graham R. C. Jr., Ebert R. H., Ratnoff O. D., Moses J. M., *J. Exptl. Med.* **121**, 807 (1965).
37. Greenbaum L. M., Freer R., Kim K. S., *Federation Proc.* **25**, 551 (1966).
38. Greenbaum L. M., Kim K. S., *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **29**, 238 (1967).
39. Grob D., *J. Gen. Physiol.* **33**, 103 (1950).
40. Halpern B. N., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **115**, 273 (1964).
41. Hardin E. B., Valentine W. N., Follette J. H., Lawrence J. S., *Am. J. Med. Sci.* **229**, 397 (1955).

42. Hayashi H., Udaka K., Miyoshi H., Kudo S., *Lab. Invest.* **14**, 665 (1965).
43. Hayashi H., Yoshinaga M., Koono M., Miyoshi H., Matsumura M., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **45**, 419 (1964).
44. Henry R. L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **13**, 35 (1965).
45. Hirsch J. G., *J. Exptl. Med.* **116**, 827 (1962).
46. Hirsch J. G., Cohn Z. A., *Federation Proc.* **23**, 1023 (1964).
47. Humprey J. H., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **32**, 274 (1951).
48. Izak G., Wilner T., Mager J., *J. Clin. Invest.* **39**, 1763 (1960).
49. Jacobsen C. D., Chandler A. B., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**, suppl. 84, 209 (1965).
50. James A. T., Lovelock J. E., Webb J. P. W. *Biochem. J.* **73**, 106 (1959).
51. Jansen C. R., Cronkite E. P., Mather G., Nielsen O. N., Rai K., Adamik E. A., Sipe C. R., *Blood* **20**, 443 (1962).
52. Jürgens J., *Folia Haematol. N. F.*, **8**, 52 (1963).
53. Karnovsky M. L., „Metabolic shifts in leukocytes during the phagocytic event” w Ciba Foundation Study Group 10, Biological activity of the leukocyte, red. G. E. W. Wolstenholme i M. O. Connor. Little, Brown and Co., Boston 1961, str. 60.
54. Karnovsky M. L., Wallach D. F. H., *J. Biol. Chem.* **236**, 1895 (1961).
55. Lee L., McCluskey R. T., *J. Exptl. Med.* **116**, 611 (1962).
56. Lenon H. L., Proteolytic enzymes as activators of the fibrinolytic system. M. S. Thesis, Wayne State University, Detroit, Michigan, 1964.
57. Levin J., Beck E., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* **15**, 519 (1966).
58. Lisiewicz J., *Acta Physiol. Polon.* **17**, 627 (1966).
59. Lisiewicz J., *Pol. Tyg. Lek.* **31**, 1150 (1965).
60. Lockwood W. R., Allison F. Jr., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **47**, 158 (1966).
61. Martin H., Roka L., *Klin. Wochschr.* **29**, 510 (1951).
62. McKay D. G., *Federation Proc.* **22**, 1373 (1963).
63. Melmon K. L., Cline M. J., *Nature* **213**, 90 (1967).
64. Miecznikow E., *Ann. Inst. Pasteur* **1**, 321 (1887) cyt. wg L. Brandt., *Scand. J. Haematol.*, 1967, suppl. 2.
65. Mounter L. A., Atiyeh W., *Blood* **15**, 52 (1960).
66. Movat H. Z., Fernando N. V. P., Uriuhara T., Weiser J. W., *J. Exptl. Med.* **118**, 557 (1963).
67. Movat H. Z., Uriuhara T., Macmorine D. R. L., Burke J. S., *Life Sci.* **3**, 1025 (1964).
68. Murray R. K., Wasi S., Macmorine D. R. L., *Federation Proc.* **24**, 368 (1965).
69. Opie E. L., *J. Exptl. Med.* **8**, 410 (1906).
70. Panlitschko M., Stattman K., *Biochem. Z.* **326**, 252 (1955).
71. Prokopowicz J., *Throm. Diath. Haemorrhag.* **19**, 154 (1968).
72. Prokopowicz J., *Biochim. Biophys. Acta.* **154**, 91 (1968).
73. Prokopowicz J., Niewiarowski S., *Bull. Acad. Polon. Sci.* (w druku).
74. Prokopowicz J., Rejniak L., Niewiarowski S., *Experientia* **23**, 813 (1967).
75. Prokopowicz J., Stormorken H., *Scand. J. Haematol.* **7**, 68 (1968).
76. Rabinowitz Y., Dietz A. A., *Blood* **29**, 182 (1967).
77. Rebuck J. W., Crowley J. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **59**, 757 (1955).
78. Riddle J. M., Barnhart M. I., *Am. J. Pathol.* **45**, 805 (1964).
79. Rodriguez-Erdmann F., *New. Engl. J. Med.* **273**, 1370 (1965).
80. Rous P., *J. Exptl. Med.* **41**, 399 (1925).
81. Rulot H., *Arch. Inst. Physiol. Biochim.* **1**, 152 (1904).

82. Saba H. I., Roberts H. R., Herion J. C., *J. Clin. Invest.*, **46**, 580 (1967).
83. Sbarra A. J., Phagocytosis, McGraw-Hill Encyklopedia of Science and Technology, McGraw Hill Book Company, Inc. New York 1964.
84. Sbarra A. J., Bardawil W. A., Shirley W., *Nature* **198**, 159 (1963).
85. Sbarra A. J., Karnovsky M. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1355 (1959).
86. Schwab J., *Nature* **195**, 345 (1962).
87. Selvaraj R. J., Sbarra A. J., *Nature* **210**, 158 (1966).
88. Sinakos Z., Larrieu M., *Nouvelle Rev. Franç. Haematol.* **5**, 601 (1965).
89. Sprick M. G., *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* **74**, 552 (1956).
90. Stetson C. A., *J. Exptl. Med.* **94**, 347 (1951).
91. Stetson C. A., Good R. A., *J. Exptl. Med.* **93**, 49 (1951).
92. Tanaka K. R., Valentine W. N., *J. Lab. Clin. Med.* **56**, 754 (1960).
93. Tatarsky I., Sinakos Z., Larrieu M., Bernard J., *Nouvelle Rev. Franc. Hematol.* **7**, 95 (1967).
94. Thomas L., Stetson C. A., *J. Exptl. Med.*, **89**, 461 (1949).
95. Ungar G., Hayashi H., *Ann. Allergy* **16**, 542 (1958).
96. Uriuhara T., Macmorine D. R. L., Franklin A. E., *Federation Proc.* **24**, 368 (1965).
97. Uriuhara T., Movat H. Z., *Exptl. Mol. Pathol.* **5**, 539 (1966).
98. Uriuhara T., Movat H. Z., *Lab. Invest.* **13**, 1057 (1964).
99. Valentine W. N., *Am. J. Med.* **28**, 699 (1960).
100. Vassalli P., Simon G., Rouiller C., *Am. J. Pathol.* **43**, 579 (1963).
101. Vassalli P., Simon G., Rouiller C., *Nature* **199**, 1105 (1963).
102. Vercauteren R. E., *Enzymologia* **27**, 369 (1964).
103. Vercauteren R. E., *Enzymologia* **24**, 37 (1962).
104. Vercauteren R. E., Gillis van Maele A., *Enzymologia* **24**, 25 (1962).
105. Weiss C., Czarnetsky E. J., *Arch. Pathol.* **20**, 233 (1945).
106. Welch W. H., *Trans. Pathol. Soc. Phila.*, **13**, 281 (1887) cytowane wg. poz. 44.
107. Wright H. P., Kumik M. M., Hayden M., *Brit. Med. J.* **1**, 1021 (1953).
108. Yamafuji K., Greenbaum L. M., *Federation Proc.* **24**, 488 (1966).
109. Zachariae H., Malmquist J., Oates J. A., *Life Sci.* **5**, 2347 (1966).
110. Zeya H. J., Spitznagel J. K., *Science* **142**, 1085 (1963).

ANNA MAZANOWSKA*, OLGIERD ROSIEK*, ZOFIA KURATOWSKA*

Regulacja biosyntezy hemoglobiny

Control of Haemoglobin Biosynthesis

Recent concepts on regulatory mechanisms controlling the biosynthesis of globin and haem as well as coordination of both processes are reviewed.

Problemy regulacji biosyntezy białek znajdują się w centrum zainteresowania współczesnej biochemii. Hemoglobina należy do tych białek, których regulacja biosyntezy jest szczególnie intensywnie badana. Składa się na to szereg przyczyn: struktura hemoglobiny jest dobrze znana, hemoglobinę łatwo otrzymać w stanie stosunkowo czystym w dużej ilości, stanowi ona około 95% białka syntetyzowanego w retikulocytach *in vitro*, można również badać jej syntezę w układach bezkomórkowych. Dodatkowym elementem wpływającym na zainteresowanie syntezą hemoglobiny jest fakt, że jest to białko złożone, co stwarza możliwość badania wzajemnej zależności pomiędzy biosyntezą grupy prostetycznej (hem) i białkowej (globina).

Część białkowa hemoglobiny składa się z dwóch par dwóch różnych łańcuchów globinowych. Każdy z łańcuchów związany jest z cząsteczką hemu. Istnieje kilka rodzajów hemoglobin prawidłowych i wiele patologicznych. Hem jest identyczny we wszystkich hemoglobinach, natomiast różnią się one między sobą częścią globinową.

I. Regulacja syntezy globiny

1. Hemoglobiny prawidłowe

W hemoglobinach ludzkich występują łańcuchy peptydowe pięciu rodzajów: α , β , γ , δ i ϵ . Łańcuch α jest zbudowany z 141 aminokwasów, zaś łańcuchy β , γ i δ z 146. Znana jest sekwencja aminokwasów w łań-

* Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: ALA — kwas δ -aminolewulinowy, PBG — porfobilinogen

cuchach α (13, 58), β (13, 34) i γ (90). Wiele odcinków tych łańcuchów ma identyczną strukturę pierwszorzędową, dlatego nazywa się je niekiedy łańcuchami homologicznymi (12). Stopień homologii między poszczególnymi rodzajami łańcuchów jest rozmaity. Między łańcuchem α i γ istnieje 80 różnic, między β i γ — 39 różnic a między β i δ — 10 różnic (11). U ludzi występują cztery hemoglobiny prawidłowe:

Hemoglobina embrionalna, czyli prehemoglobina, która znajduje się w płodach ludzkich w wieku do 10 tygodni (47). Składają się na nią prawdopodobnie dwie frakcje: hemoglobina Gower I ($\epsilon_4?$) i Gower II $2(\alpha_2\epsilon_2)$.

Hemoglobina F, czyli płodowa ($\alpha_2\gamma_2$) jest główną frakcją hemoglobinową we krwi płodu. Zawartość Hb płodowej zmniejsza się od 32 tygodnia ciąży z szybkością 2,5—4% w ciągu tygodnia (23). U noworodków jej zawartość waha się w granicach 70—80%. W ciągu pierwszego roku życia pozapłodowego spada do paru procent (55). Metodami immunofluorescencyjnymi wykryto HbF w 5% erytrocytów u osobników dorosłych (45, 93).

Hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) pojawia się prawdopodobnie w krwinkach czerwonych płodu trzynastotygodniowego (101). Zawartość jej stopniowo zwiększa się i u osobników dorosłych dochodzi do 97% (107).

Hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) jest frakcją, która we krwi ludzi dorosłych stanowi 2,5% całkowitej ilości hemoglobiny (62). U płodów pojawia się jednocześnie z hemoglobina A (61).

2. Hemoglobiny nieprawidłowe

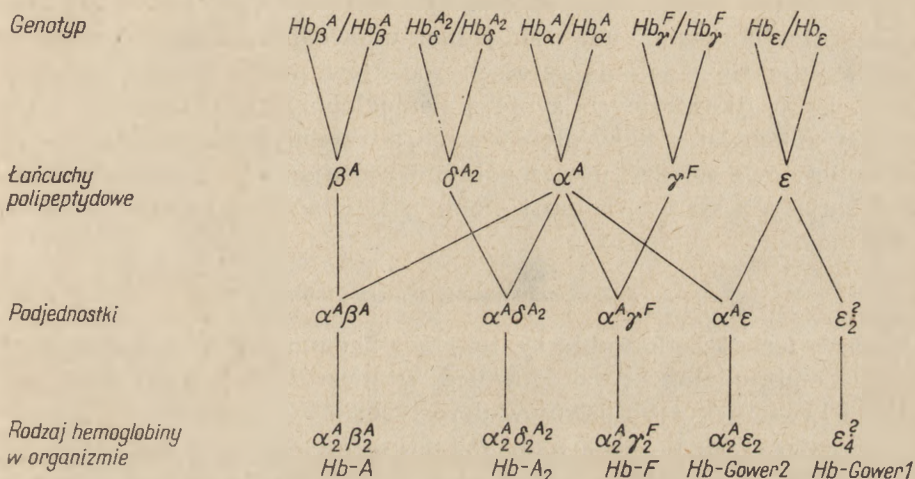
W 1949 roku Pauling i wsp. opisali (83) pierwszą hemoglobinę patologiczną (HbS) występującą w anemii sierpowatej. Od tego czasu u chorych z zespołami hemolitycznymi oraz w wrywkowych badaniach populacyjnych wykryto wiele hemoglobin nieprawidłowych. Początkowo oznaczano je kolejnymi literami alfabetu, a po ich wyczerpaniu — nazwami miejscowości, w których hemoglobiny te wykryto (1).

Hemoglobiny nieprawidłowe mają zmienione łańcuchy α , β , γ lub δ . Najczęściej zmiany te polegają na zastąpieniu aminokwasu znajdującego się w określonej pozycji normalnego łańcucha przez inny aminokwas, np. Hb_{Radom} β 63Tyr (79). W hemoglobinach Lepore oprócz prawidłowych łańcuchów α występują łańcuchy mieszane złożone z części dwóch różnych łańcuchów normalnych: od końca aminowego z odcinka o sekwencji aminokwasów łańcucha δ , natomiast od końca karboksylowego — z odcinka łańcucha β (67). Opisano hemoglobiny nieprawidłowe, w których łańcuchach brak jest jednej lub kilku reszt aminokwasowych (Hb_{Gun Hill}) (9), Hb_{Freiburg} (54). Umiejscowienie zmian jest różne w rozmaitych hemoglobinach nieprawidłowych, jednak zmiana zawsze występuje w obydwu łańcuchach danej pary (1).

Ponadto istnieją hemoglobiny nieprawidłowe, złożone z czterech łańcuchów jednego rodzaju np. HbH (β_4) (89), Hb Barta (γ_4) (48). Hemoglobiny takie powstają gdy zablokowana jest synteza jednego z rodzajów łańcuchów lub łańcuchy te wytwarzane są w postaci nieczynnej, niezdolnej do tworzenia podjednostek.

3. Determinacja genetyczna struktury pierwszorzędowej łańcuchów globiny

Sekwencję aminokwasów w łańcuchach globiny wyznaczają geny strukturalne zajmujące pięć odrębnych loci. W normalnym genotypie człowieka istnieją po dwa geny strukturalne dla każdego rodzaju łańcucha, a więc następujący ich zestaw: α^A/α^A , β^A/β^A , γ^F/γ^F , δ^A/δ^A , ϵ/ϵ (46) (schemat 1).



Schemat 1. Determinacja genetyczna hemoglobiny prawidłowych człowieka (wg Huensa i Shootera (46))

O istnieniu genów strukturalnych świadczy przekazywanie z pokolenia na pokolenie zgodnie z prawami Mendla właściwości wytwarzania hemoglobiny nieprawidłowych z określonymi zmianami sekwencji aminokwasów (33, 46). Powstawanie takich hemoglobiny warunkują zmutowane geny, które są allelami normalnych genów strukturalnych. Większość wykrytych mutacji genów strukturalnych stanowią mutacje punktowe, powodujące substytucję jednego z aminokwasów. Postuluje się, że drugim mechanizmem genetycznym powstawania hemoglobiny nieprawidłowych jest *crossing-over* mejozy. Nierówny *crossing-over* pomiędzy homologicznymi genami byłby przyczyną istnienia hemoglobiny mających ubytki reszt aminokwasowych (9, 54). Natomiast *crossing-over* między genami niehomologicznymi warunkowałby powstawanie hemo-

globin Lepore (1). Występowanie tego rodzaju *crossing-over* byłoby możliwe dzięki dużemu podobieństwu genów łańcuchów β i δ oraz bliskiemu ich położeniu na chromosomie (66).

Geny łańcuchów β i δ są ściśle sprzężone (8, 18, 44). Pośrednie dane przemawiają za istnieniem sprzężenia pomiędzy genami β oraz δ i γ (81, 116). Natomiast geny α i β nie wykazują takiego sprzężenia i ulegają niezależnej segregacji, co może świadczyć o tym, iż znajdują się one na innych parach chromosomów (52, 92). Dotychczas nie wiadomo na jakich chromosomach znajdują się geny strukturalne łańcuchów globinowych.

W czasie rozwoju ontogenetycznego zachodzą zmiany stanu czynnościowego genów strukturalnych. W celu wyjaśnienia powyższego zjawiska oraz niektórych problemów związanych z ilościową regulacją syntezy poszczególnych rodzajów łańcuchów postulowano istnienie rozmaitych genów regulatorowych oraz operatorowych, o czym będzie mowa poniżej. Dotychczas nie udało się jednak udowodnić istnienia tych genów.

Postuluje się działanie czterech rodzajów mechanizmów regulacyjnych: zapoczątkowujących syntezę hemoglobiny, zmieniających rodzaj wytwarzanych łańcuchów globinowych, utrzymujących prawidłowe stosunki ilościowe między poszczególnymi rodzajami łańcuchów oraz synchronizujących syntezę hemu i globiny. Mechanizmy te zostaną kolejno omówione.

4. Zapoczątkowanie syntezy globiny

Procesy zapoczątkowania syntezy Hb badano zarówno w komórkach tkanek embrionalnych, jak również w niezróżnicowanych komórkach układu krwiotwórczego ustrojów dorosłych.

W embrionach kurzych hemoglobina w mierzalnej ilości pojawia się na etapie 6-ego somitu (69, 111). W bezbarwnych komórkach wcześniejszych okresów rozwoju, przed tworzeniem się wysepek krwiotwórczych, tworzą się enzymy katalizujące poszczególne etapy syntezy hemu. Według Wilita (113) do zapoczątkowania syntezy Hb konieczny jest w komórce odpowiedni poziom substratów dla syntezy kwasu δ -aminolewulinowego (ALA) i hemu: glicyny, CoA, fosforanu pirydoksalu, bursztynianu, żelaza. Gromadzenie tych substratów (niektóre z nich przenikają do komórek blastodermy z tkanki endodermalnej) następuje już na etapie smugi pierwotnej i trwa przez 6—8 godzin. Wilt (112) wykazał, że w okresie smugi pierwotnej obecna jest również niewielka ilość globiny. Biosynteza tej globiny (różniacej się od globiny dorosłych) ulega następnie zatrzymaniu i w okresie 6-ego somitu rozpoczyna się synteza właściwej globiny. Według tego autora niewielka ilość łańcuchów polipeptydowych globiny niezbędna jest jako „starter” do rozpoczęcia syntezy Hb w okresie, gdy hem jest już syntetyzowany i następuje połączenie części hemowej z białkową. Zarówno Wilt jak i Wainwright i Wainwright

(98, 99, 100, 112) zwracają uwagę na ALA jako niezbędny czynnik do zapoczątkowania syntezy Hb. Według Wainwrightów proces ten może się bowiem rozpocząć nawet w 3 godziny po utworzeniu smugi pierwotnej, jeżeli dostarczy się z zewnątrz ALA.

Granick i Kappas (37) oraz Levere i wsp. (69, 70) stwierdzili, że w bezbarwnych komórkach blastodermy zarodka kurzego przed stadium 6-ego somitu znajdują się już wszystkie enzymy szlaku biosyntetycznego hemu poza kluczowym — syntetazą ALA. Gotowy jest również cały układ syntetyzujący białko, jak polirybosomy oraz mRNA dla tworzenia globiny. Świadczą o tym dane Wilita (112), który stwierdził, że podanie puromycyny, która hamuje syntezę białka na poziomie rybosomów, a więc syntezę globiny, zatrzymuje całkowicie proces syntezy Hb. Momentem uruchamiającym cały mechanizm jest utworzenie mRNA dla syntetazy ALA katalizującej pierwszy etap syntezy. W doświadczeniach bowiem, w których hodowano komórki blastodermy, mimo obecności wszystkich substratów i układu polirybosomów nie dochodziło do syntezy Hb, jeżeli do hodowli dodano aktynomycynę D w dawkach hamujących tworzenie mRNA. Natomiast jeżeli jednocześnie z aktynomycyną podawano ALA, synteza Hb w komórkach blastodermy rozpoczynała się i przebiegała prawidłowo.

Do utworzenia mRNA dla syntetazy ALA dochodzi na skutek aktywacji właściwego genu strukturalnego. Poziom syntetazy ALA jest kontrolowany przez mechanizm represorowy, lecz czynnik powodujący derepresję nie jest znany. Granick i współpracownicy wskazują na niektóre pochodne sterydowe jako na substancje derepresorowe. Te sterydy syntetyzowane są w tkankach embrionalnych również na etapie 6-ego somitu. U osobników dorosłych w czasie różnicowania komórek macierzystych układu krwiotwórczego w kierunku erytroblastów działają według Granicka i Kappasa (37) bardziej specyficzne substancje derepresorowe niż w ustroju embrionalnym. Można przypuszczać, że jedną z takich substancji jest erytropoetyna, której działanie polega prawdopodobnie na zwiększeniu syntezy RNA o cechach messengera (19, 43, 59, 60, 87). Wpływ hemu na syntezę globiny opisany zostanie w jednym z dalszych rozdziałów.

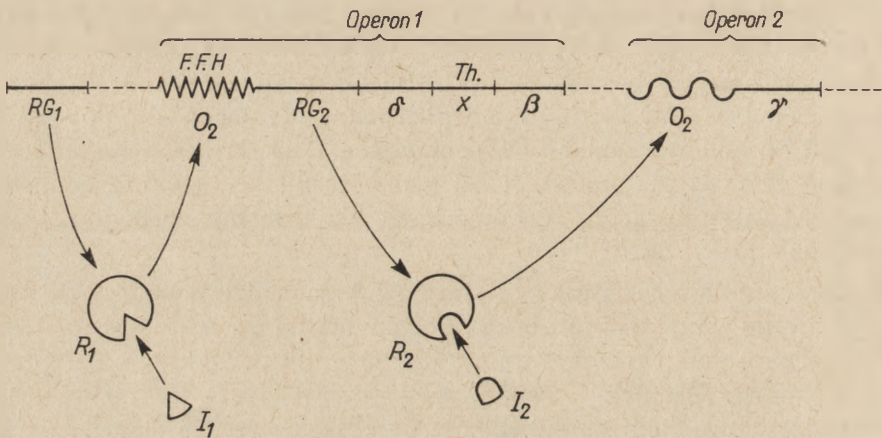
Zapoczątkowanie biosyntezy Hb pozostaje nadal zagadnieniem otwartym. Jak się wydaje, koniecznym elementem dla rozpoczęcia syntezy jest obecność śladów globiny na bardzo wczesnym etapie rozwoju komórki oraz utworzenie hemu, co może zajść dopiero po umożliwieniu transkrypcji genu strukturalnego dla syntetazy ALA na skutek derepresji.

5. Zmiana rodzaju wytwarzanych łańcuchów globinowych

W czasie rozwoju ontogenetycznego następuje stopniowy zanik produkcji hemoglobiny embrionalnej a potem płodowej i pojawiają się hemoglobiny właściwe dla osobnika dorosłego. Oznacza to, że w ustroju

ustaje synteza łańcuchów ϵ i γ , a rozpoczyna się wytwarzanie łańcuchów β i δ . Proces owego przełączania (*switch*) syntezy jednych łańcuchów globinowych na syntezę innych jest zjawiskiem, które zdaniem wielu badaczy może stanowić dogodny model doświadczalny badania różnicowania komórkowego. Niestety dotychczas nic nie wiadomo o czynnikach warunkujących owo „przełączanie”, a jego mechanizm jest przedmiotem dociekań teoretycznych.

Postuluje się, że „przełączanie” zachodzi na poziomie genowym i polega na aktywacji lub derepresji genów strukturalnych. Zaproponowano szereg modeli regulacji genetycznej syntezy łańcuchów globiny, z których jeden, opracowany przez Zuckerkandla (116) przedstawiono na schemacie 2.



Schemat 2. Model regulacji syntezy łańcuchów globinowych

o — operator; RG — gen regulatorowy; R — cząsteczka represora, której syntezę reguluje RG; I — induktor; δ , β , γ — geny strukturalne łańcuchów globinowych; X — nieznany gen strukturalny; F.F.H. — miejsce mutacji powodującej dziedziczne przetrwanie hemoglobiny płodowej; Th — miejsce, w którym prawdopodobnie występują mutacje β -talassemii. (Wg Zuckerkandla (116))

Geny strukturalne łańcuchów β i δ wespół z operatorem o_1 oraz genem regulatorowym RG_2 tworzą operon 1. Czynność całego operonu 1 kontrolowana jest przez gen regulatorowy RG_2 za pośrednictwem represora R_1 . Represor R_1 działając na operator o_1 zapobiega syntezie mRNA dla łańcuchów β i δ oraz represora R_2 . Represor R_2 jest produktem genu regulatorowego RG_2 . Miejscem działania represora R_2 jest gen operatorowy o_2 , który wraz z genem strukturalnym łańcucha γ wchodzi w skład operonu 2. Jeśli nie ma represora R_2 , to na genie łańcucha γ powstaje swoisty mRNA. Na określonym etapie rozwoju ontogenetycznego pojawia się induktor I_1 , który łącząc się z represorem R_1 uniemożliwia jego działanie na operator o_1 . Powoduje to „włączenie” operonu 1 i „wyłączenie” operonu 2. Model dopuszcza możliwość różnego stopnia aktywności operonu 2 w warunkach, kiedy włączony jest operon 1. Stan czynnościowy operonu 2 miałby bowiem zależeć od stężenia induktora I_2 , który łącząc

się z represorem R_2 , powodowałby jego unieczynnienie. Tak więc powyższy model tłumaczyłby zarówno przejście od produkcji HbF do wytwarzania HbA i HbA₂, jak i możliwość aktywacji genu łańcucha γ u osobników dorosłych, zwłaszcza w stanach wzmożonej syntezy Hb, na przykład w anemiach z żywą odnową erytroblastyczną.

W populacjach ludności murzyńskiej wykryto dziedziczną anomalię polegającą na wytwarzaniu HbF u osobników dorosłych (25). Jest to więc zaburzenie mechanizmu przełączania syntezy hemoglobiny z HbF na syntezę hemoglobiny typu dorosłych HbA i HbA₂. Anomalia dziedziczona jest jako gen autosomalny sprzężony z genami łańcuchów β i δ (2, 22). Osobnicy dorośli, heterozygoty w zakresie tej anomalii, mają około 25% hemoglobiny płodowej równomiernie rozmieszczonej w erytrocytach i zmniejszoną nieco zawartość HbA i HbA₂. W jednym opisanym dotychczas przypadku homozygoty, zdrowego chłopca, hemoglobina płodowa stanowiła 100% (110). U podwójnych heterozygot w zakresie genu warunkującego powyższą anomalię oraz genu β^S lub β^C powstają normalne ilości HbS lub HbC, lecz nie ma HbA (22). Natomiast u homozygoty z anomalią przetrwania HbF nie zachodzi synteza łańcuchów β i δ . Fakty powyższe przemawiają za tym, iż gen na anomalię przetrwania hemoglobiny płodowej wywołuje supresję genów strukturalnych β i δ w pozycji *cis*, a nie ma na niego wpływu w pozycji *trans* (2). Występuje tu podobieństwo do efektów mutacji negatywnej genu operatorowego u bakterii (53). Na tej podstawie można przypuszczać, że anomalia przetrwania HbF jest wynikiem mutacji negatywnej genu operatorowego α_1 (116). Istnieje jednak możliwość, że jej przyczyną jest delecja genów β i δ (107).

6. Utrzymywanie prawidłowego stosunku ilościowego pomiędzy łańcuchami α i β

W warunkach prawidłowych utrzymywany jest stały stosunek ilościowy pomiędzy poszczególnymi łańcuchami Hb. Mechanizmu regulującego stałość tego stosunku dotychczas nie wyjaśniono. Omówimy tutaj dwa główne poglądy na jego istotę.

I t a n o (51) wysunął hipotezę, według której gen strukturalny określa nie tylko strukturę pierwszorzędową danego łańcucha, lecz również szybkość jego syntezy. Hipotezę tę rozwinęto na podstawie danych o względnych szybkościach syntezy łańcuchów β^A i β^S . Na ogół w krwinkach znajduje się mniej hemoglobiny nieprawidłowej niż HbA. Oznacza to, że szybkość syntezy łańcucha prawidłowego jest większa niż szybkość syntezy łańcucha zmienionego. Przyczyną tego jest zapewne fakt, iż w przebiegu ewolucji geny kontrolujące szybkość syntezy osiągnęły taki stan, że szansa wystąpienia mutacji powodującej zwiększenie produkcji danego łańcucha globinowego jest niezmiernie mała. Mutacje wywołujące znaczne zaburzenia równowagi między ilością wytworzonych łańcuchów α i β prowadzą do ciężkiej anemii hemolitycznej, są

więc eliminowane w procesie ewolucji. Itano postuluje, iż równomierna synteza łańcuchów α i β jest wynikiem ewolucji odpowiednich genów strukturalnych, która doprowadziła do uzyskania jednakowej lub prawie jednakowej zdolności kontrolowania szybkości syntezy łańcuchów globinowych. Umiarkowane zaburzenia równowagi byłyby usuwane przez destrukcję zbędnych łańcuchów. Kontrola szybkości syntezy łańcuchów przez geny strukturalne może zachodzić bądź w czasie syntezy mRNA, bądź w toku syntezy samych łańcuchów peptydowych. Tę drugą możliwość uważa Itano za bardziej prawdopodobną. Wiąże ją z istnieniem na mRNA punktów, w których szybkość syntezy łańcuchów jest najmniejsza. Najdłużej trwający etap syntezy łańcuchów określałby szybkość uwalniania łańcuchów peptydowych z mRNA.

W roku 1966 Colombo i Baglioni (20) przedstawili koncepcję kontroli biosyntezy łańcuchów α przez biosyntezę łańcuchów β , według której łańcuchy α pozostawałyby przyłączone do polirybosomu tak długo, dopóki nie zostałaby ukończona synteza łańcuchów β . Po oderwaniu od polirybosomu łańcuchy β łączyłyby się z łańcuchami α w dimery, a następnie tetramery $\alpha_2\beta_2$. Wyniki prac Shaeffera (91) oraz Baglioni'ego i Campana'y (3) poważnie podważyły tę możliwość. Okazało się bowiem, że w komórce istnieją niewielkie ilości rozpuszczalnych łańcuchów podczas syntezy łańcuchów β na polirybosomie. Baglioni i Campana przypuszczają więc, że wolne łańcuchy α są związkami pośrednimi w syntezie Hb. Łączą się one z przyłączonym do polirybosomu łańcuchem w momencie, gdy ma on już długość co najmniej 120 aminokwasów. Po utworzeniu kompleksu: łańcuch α -łańcuch β -polirybosom dobiega końca synteza łańcucha β i powstały dimer $\alpha\beta$ odłącza się od polirybosomu. Połączenie dwóch takich dimerów stanowić ma ostatni etap syntezy cząsteczki globiny. Wolnych łańcuchów β nie udało się wykryć w lizacie retikulocytów ludzi zdrowych, co potwierdzałoby koncepcję, że uwalniają się one z polirybosomu tylko w postaci związanej z łańcuchami α . Ponieważ w retikulocytach jest zawsze obecna pewna niewielka ilość wolnych łańcuchów α , przeto ilość dostępnych łańcuchów β na polirybosomie byłaby jedynym czynnikiem ograniczającym łączenie się obu rodzajów łańcuchów w dimery.

Do poważnych zaburzeń mechanizmu regulującego prawidłowy stosunek łańcuchów α do łańcuchów β dochodzi w tzw. talassemiach. Jest to grupa wrodzonych niedokrwistości niedobarwliwych ze skłonnością do hemolizy, w których podstawowy defekt polega na zahamowaniu syntezy jednej pary łańcuchów polipeptydowych: α (α -talassemia) lub β (β -talassemia). Zależnie od tego, czy defekt dotyczy obu alleli, czy tylko jednego, spotyka się postać homo- lub heterozygotyczną, które różnią się stopniem upośledzenia syntezy danego łańcucha (108, 109).

Defekt genetyczny w talassemiach nie jest znany. Zuckerkandl (116) uważa, że w β -talassemii skutek utajonej mutacji w hipotetycznym

genie strukturalnym X sąsiadującym z genem łańcucha β nie syntetyzuje się mRNA dla tego łańcucha (schemat 2). Brak syntezy mRNA w talassemiach mógłby być również spowodowany delecją genów strukturalnych (10) odpowiednich łańcuchów globinowych. Wyszukiwano także możliwość (4, 49, 73), że w talassemiach w wyniku mutacji genów strukturalnych powstają zmienione mRNA, które mogą być nietrwałe i ulegać rozpadowi w komórce przed przekazaniem informacji lub też ich konfiguracja strukturalna może uniemożliwiać proces translacji.

Brak jednej pary łańcuchów powoduje zaburzenie wzajemnej regulacji ich wytwarzania. Pozostałe łańcuchy polipeptydowe tworzą się w nadmiarze (5, 6, 21, 28) i nie natrafiając na odpowiednich partnerów, łączą się w tetramery wiążące hem, jak HbH (β_4) i Hb Barta (γ_4), albo wytrącają się w komórce w postaci nierozpuszczalnych strąków pojedynczych łańcuchów, dimerów, triad lub tetramerów nie wiążących hemu. Powstawanie takich strąków prowadzi do hemolizy krwinki czerwonej. W α - i β -talassemiach brak lub niedobór normalnej HbA ($\alpha_2\beta_2$) jest częściowo wyrównywany przez inne rodzaje hemoglobin: HbF ($\alpha_2\gamma_2$) i HbA ($\alpha_2\delta_2$) w β -talassemii, HbH (β_4) w α -talassemii (109).

7. Utrzymywanie prawidłowego stosunku ilościowego między łańcuchami β i δ

W krwinkach czerwonych dorosłego człowieka odsetek HbA₂ (2,5%) jest zadziwiająco stały. Musi więc istnieć odpowiedni mechanizm regulujący, który zapewnia utrzymanie syntezy łańcuchów δ w granicach $\frac{1}{40}$ liczby łańcuchów β . Jeden z teoretycznie możliwych mechanizmów polega na tym, że gen dla łańcucha β wytwarza 40 razy więcej cząsteczek mRNA niż gen łańcucha δ (50). Obecnie przypuszcza się jednak, że geny β i δ znajdują się w tym samym operonie i że transkrypcja ich zachodzi wspólnie w postaci jednego zestawu informacji (2, 50). Aktywności właściwe hemoglobin A i A₂, wyodrębnionych po inkubacji komórek szpikowych w środowisku zawierającym aminokwasy radioaktywne, są zbliżone (88, 114). Wskazuje to, że w komórkach szpikowych układy syntezy HbA i HbA₂ są jednakowo sprawne. Natomiast po trwającej dłużej niż 20 min. inkubacji retikulocytów z krwi obwodowej aktywność właściwa wyodrębnionej HbA jest zawsze większa niż HbA₂ (107). Wydaje się więc, że w czasie dojrzewania retikulocytów zdolność wytwarzania łańcuchów δ zanika wcześniej niż zdolność wytwarzania łańcuchów α i β . W retikulocytach w odróżnieniu od wcześniejszych postaci komórkowych rzędu czerwonekrwinkowego nie zachodzi synteza mRNA (74). Z tego wynikałoby, że w retikulocytach mRNA dla łańcuchów δ szybciej ulega rozpadowi niż mRNA dla łańcuchów α i β . Ponadto mRNA dla łańcucha δ jest wykorzystywany w mniejszym stopniu niż mRNA dla łańcuchów α i β . Winslow i Ingram (114) wykazali bowiem, że szybkość

syntezy łańcuchów δ jest mniejsza niż szybkość syntezy łańcuchów α i β hemoglobiny A oraz łańcucha α wyizolowanego z HbA₂.

Możliwe jest, że mniejsza szybkość syntezy łańcuchów δ warunkuje mniejszą trwałość kompleksu mRNA-rybosomy, a w następstwie — przyspieszony rozpad swoistego mRNA (107, 114).

II. Regulacja biosyntezy hemu

Biosynteza hemu jest wieloetapowym procesem (schemat 3), w którym poszczególne etapy są w warunkach prawidłowych doskonale skoordynowane: związki pośrednie — kwas δ -aminolewulinowy i porfobilinogen (PBG) — oraz produkty nie wykorzystywane do syntezy hemu (uroporfiryne i koproporfiryne) wykrywa się jedynie w ilościach śladowych (68), a ilość utworzonego hemu nie przekracza zapotrzebowania organizmu. Ten ekonomiczny przebieg biosyntezy hemu warunkują mechanizmy regulacyjne, z których najważniejszymi są: mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego oraz mechanizm represji syntezy enzymu ograniczającego.

Substraty i związki pośrednie	Enzymy	Lokalizacja komórkowa enzymu
Glicyna + sukcylokoenzym A (związana z fosforanem pirydoksalu w postaci zasady Schiffa)		
↓		
Kwas δ -aminolewulinowy (ALA)	Syntetaza ALA	Mitochondria
↓		
Porfobilinogen (PBG)	Dehydrataza ALA	Cytoplazma
↓		
Uroporfirylogen (UROgen)	Porfobilinogenaza (Deaminaza + kosyntetaza UROgenowa)	Cytoplazma
↓		
Koproporfirylogen (KOPROgen)	Dekarboksylaza UROgenowa	Cytoplazma
↓		
PROTO	Oksydaza KOPROgenowa (KOPROgenaza + oksydaza PROTOgenowa?)	Mitochondria
↓		
+ Fe	Chelataza żelazawa	Mitochondria
↓		
Hem		

Schemat 3. Schemat biosyntezy hemu

Regulujący wpływ na biosyntezę hemu wywiera również środowisko (pod tym pojęciem rozumie się istnienie lokalnych warunków w odrębnych obszarach komórki, w których rozmieszczone są poszczególne etapy biosyntezy), dostępność substratów i kofaktorów reakcji oraz wzajemna zależność pomiędzy syntezą części hemowej i części globinowej. Wszystkie te czynniki kontrolujące proces powstawania hemu zostaną obecnie kolejno omówione.

1. Regulacja biosyntezy hemu przez ujemne sprzężenie zwrotne

Mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, który działa szybko i powoduje czułą regulację biosyntezy, polega na hamowaniu aktywności pierwszego lub jednego z początkowych etapów procesu przez produkt końcowy. W przypadku biosyntezy hemu istnienie tego mechanizmu regulacyjnego wykazano najpierw u bakterii (16), a następnie w doświadczeniach *in vitro* na retikulocytach królika (72) i w układach zawierających preparaty enzymatyczne z erytrocytów ludzkich (17). W każdym przypadku hem (hemina) hamował czynność syntetazy ALA, katalizującej pierwszy etap i ograniczającej przebieg całego szlaku biosyntetycznego. W doświadczeniach *in vivo* na zwierzętach nie zdołano z całą pewnością ustalić, czy hamowanie przez hem swej własnej syntezy zachodzi na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego, czy też represji syntetazy ALA. Według Levere i Granicka (69) ten drugi mechanizm jest czynny w różnicującym się erytroblastie, a Granick (35) sugeruje jego działanie na biosyntezę hemu w komórkach wątrobowych zarodka kurzego.

Burnham i Lascelles (16) w doświadczeniach prowadzonych na fotosyntetyzujących bakteriach *R. spheroides* wykazali, że oprócz heminy również inne porfiry, metaloporfiryny, hemoglobina i mioglobina hamują syntetazę ALA niekompetycyjnie. Ci sami autorzy w badaniach na układach zawierających preparaty enzymatyczne z komórek bakteryjnych stwierdzili, że hemina hamuje również — choć słabiej — aktywność dehydratazy ALA, drugiego z kolei enzymu szlaku biosyntetycznego hemu. Hamowanie aktywności syntetazy ALA i dehydratazy ALA zaobserwowali też Karibian i London (56), badając wpływ heminy na wbudowywanie glicyny-2-¹⁴C oraz ALA-4-¹⁴C do hemu w hemolizatach i pełnych retikulocytach królika. Hemina hamowała syntezę hemu z glicyny około czterokrotnie silniej niż jego syntezę z ALA, co wskazuje, że w tym układzie regulacja syntezy hemu przez sprzężenie zwrotne zachodzi przypuszczalnie na poziomie syntetazy ALA.

Hamowanie syntezy ALA przez heminę w układzie zawierającym preparat mitochondrialny z retikulocytów kurzych o czynności syntetazy ALA stwierdził ostatnio Vavra (96). Wyniki jego sugerują, że hamowana jest przede wszystkim aktywność syntetazy sukcyńlo-CoA, a w mniejszym stopniu kondensacja tego związku z glicyną. C a l i s s a n o

i wsp. (17) badając wpływ hemu, hemoglobiny i innych hemoproteidów na aktywność preparatów dehydratazy ALA z erytrocytów ludzkich wykazali, że mechanizm regulujący biosyntezę hemu przez ujemne sprzężenie zwrotne istnieje również na poziomie dehydratazy ALA. Hem hamuje aktywność tego enzymu dziesięciokrotnie silniej niż hemoglobina; inne hemoproteidy w takich samych stężeniach w ogóle nie mają wpływu na aktywność dehydratazy ALA.

W doświadczeniach *in vivo* wprowadzona dożylnie hemina obniżała wbudowywanie znakowanej glicyny do hemu erytrocytów krwi obwodowej u myszy oraz włączanie do nich radioaktywnego żelaza (31). Ponieważ obniżenie inkorporacji nie było spowodowane rozcieńczeniem puli nowosyntetyzowanego hemu ani puli radioaktywnego żelaza, a hemina nie wpływała na dojrzewanie czerwonych krwinek i przechodzenie retikulocytów ze szpiku do krwi obwodowej, można przypuszczać, że hemina działa jako inhibitor swej własnej syntezy albo na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego, albo represji syntezy kluczowego enzymu.

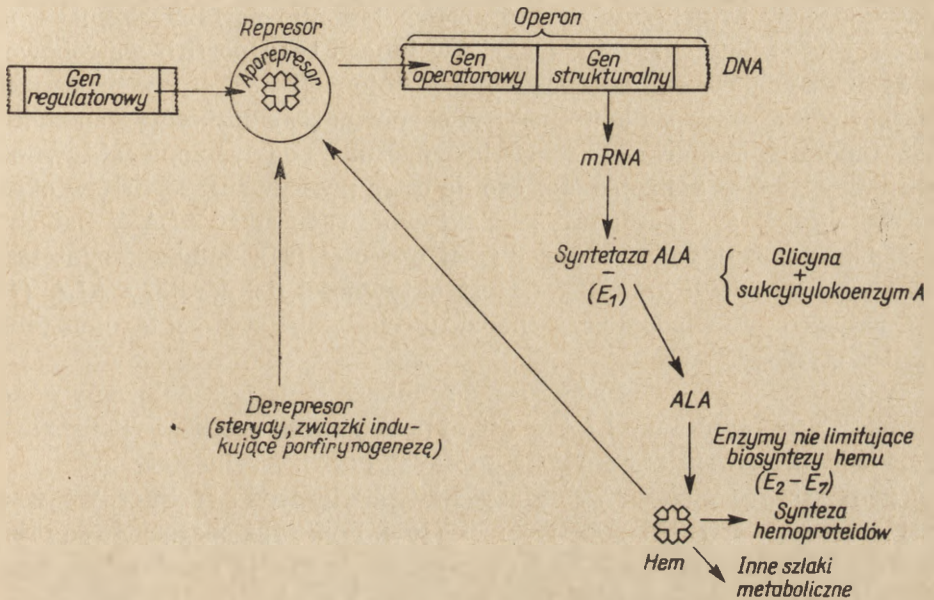
2. Regulacja biosyntezy hemu drogą represji

Regulacja drogą represji przez produkt końcowy jest mechanizmem bardzo ekonomicznym, choć nie tak szybkim, jak ujemne sprzężenie zwrotne. Polega on na kontrolowanej genetycznie represji syntezy jednego lub kilku enzymów szlaku biosyntetycznego przez produkt końcowy. W przypadku hemu represji ulega synteza enzymu ograniczającego — syntetazy ALA (schemat 4), jak również — choć w mniejszym stopniu — dehydratazy ALA (tak zwana represja skoordynowana). Regulację syntezy hemu na drodze represji zaobserwowano w bakteriach, w komórkach wątrobowych zarodka kurzego i erytroblastach blastodermy kurzej.

W doświadczeniach na bakteriach *R. spheroides* Lascelles (68) stwierdziła, że niskie (10^{-5} M) stężenia heminy tłumią syntezę obu wspomnianych enzymów. W odróżnieniu od regulacji przez ujemne sprzężenie zwrotne inne metaloporfiryny nie dają tego efektu. Dowody na istnienie mechanizmu represji syntezy hemu w organizmach wyższych są bardziej pośrednie. Granick (35) stwierdził, że hem hamuje indukcję syntetazy ALA w hodowli komórek wątrobowych zarodka kurzego. Indukcję syntetazy ALA na drodze derepresji obserwowali Marver i wsp. (76), którzy doprowadzili do zmniejszenia zawartości hemu w komórkach wątroby szczurów przez podanie im tryptofanu; hem zużywany jest w tym przypadku do indukowanej syntezy pirolazy tryptofanowej. Następującymi po sobie kolejno: represją i derepresją syntezy syntetazy ALA Waxman i wsp. (103) tłumaczą oscylacje poziomu tego enzymu w wątrobie szczurów zachodzące po podaniu dożylnym heminy. Nawet bardzo niskie stężenia heminy powodują zmiany poziomu syntetazy ALA i zmiany te hamuje całkowicie aktynomycyna D, która blokuje tworzenie się

mRNA. Wskazuje to, że istotnie w przytoczonych doświadczeniach synteza hemu jest regulowana przez mechanizm represji.

Tschudy i wsp. (95) stwierdzili oscylacje poziomu wątrobowej syntetazy ALA również po jednorazowej niewielkiej dawce estradiolu podanej samicom szczurzym, którym usunięto jajniki. Indukcję tego enzymu pod wpływem hormonów płciowych, a zwłaszcza ich 5β -H pochodnych zaobserwowali również Granick i wsp. w komórkach



Schemat 4. Hipotetyczny model regulacji biosyntezy hemu (zmodyfikowany schemat wg Levere i Granicka (70))

wątrobowych zarodka kurzego (37) i w różniących się erytroblastach blastodermy kurzej (70). Badacze ci przypuszczają, że sterydy C-19 i C-21 o konfiguracji 5β -H biorą udział w regulacji biosyntezy hemu we wszystkich komórkach, w których zachodzi hemopoeza, działając jako derepresory tworzenia się syntetazy ALA, tzn. współzawodnicząc skutecznie z hemem o miejsce na cząsteczce aporepresora.

Stwierdzono, że oprócz hormonów płciowych również niektóre inne związki chemiczne mogą na drodze derepresji syntezy powodować wzrost poziomu syntetazy ALA w wątrobie (35). Są to związki wywołujące napady ostrej przerywanej porfirii, choroby przenoszonej dziedzicznie jako cecha dominująca. Wśród innych objawów klinicznych chorobę tę charakteryzuje wydzielanie w moczu dużych ilości ALA i PBG. Pierwotnie sądzono, że porfirię tę powoduje zablokowanie przejścia PBG w uroporfirynogen na skutek niedoboru porfobilinogenazy. Dopiero Granick na podstawie wzrostu aktywności syntetazy ALA w porfirii

doświadczalnej wywołanej przez podanie 3,5-dwukarboetoksy-1,4-dwuhydrokolidyny (38) wysunął hipotezę (35), że w ostrej przerywanej porfirii zmutowany gen operatorowy jest niecałkowicie tłumiony przez represor. Wskutek tego niewielkie ilości indukującego związku chemicznego, które u normalnych osobników nie wywołałyby objawów chorobowych, u ludzi z porfirią powodują nagły wzrost syntezy syntetazy ALA, co pociąga za sobą wzmoczoną produkcję ALA. W tych warunkach enzymem ograniczającym staje się jeden z dalszych enzymów szlaku biosyntetycznego. W ostrej przerywanej porfirii jest nim porfobilinogenaza, na co wskazuje wydalanie ALA i PBG; w innego typu porfirii wątrobowej, w której wydalone są koproporfiryna i protoporfiryna, enzymem ograniczającym jest oksydaza koproporfirynogenowa. Za słuszością wspomnianej hipotezy Granicka przemawia znacznie podwyższona aktywność syntetazy ALA w wątrobie chorego na ostrą przerywaną porfirię w okresie remisji (80), oraz bardzo wysoka aktywność syntetazy ALA w wątrobie u chorej zmarłej podczas napadu tej choroby (94). Indukcji syntetazy ALA w wątrobie towarzyszy wzrost aktywności dehydratazy ALA (75, 95), jednakże nie wiadomo czy chodzi tu o indukcję syntezy tego enzymu, czy też o jego aktywację.

Marver i wsp. (75) sugerują, że glukoza hamuje regulowany genetycznie wzrost syntetazy ALA w ostrej przerywanej porfirii i w porfiriach doświadczalnych, co nie znalazło jednakże potwierdzenia (35).

Podwyższoną syntezę syntetazy ALA stwierdzono również we wrodzonych porfiriach erytropoetycznych (102). Ponieważ choroby te są przenoszone dziedzicznie jako cecha recesywna, mutacja musi występować w genie regulatorowym, który wskutek tego produkuje wadliwy aporepresor.

Jakkolwiek mechanizm regulacji na drodze represji może obejmować również syntezę dehydratazy ALA, zasadniczą rolę odgrywa z całą pewnością regulacja produkcji syntetazy ALA. Nie wiadomo jednakże, czy wątrobową syntetazę ALA jest identyczna z syntetazą ALA erytroblastów i czy w genomie występuje jeden operon dla syntezy tego enzymu, czy też, jak sugeruje Granick (35), trzy różne operony.

3. Wpływ środowiska

Doświadczenia przeprowadzone na erytrocytach ptasich, retikulocytach ssaków lub frakcjach subkomórkowych wątroby ssaków wykazały, że enzymy biosyntezy hemu rozmieszczone są częściowo w mitochondriach, a częściowo w cytoplazmie (schemat 3). Stanowi to, samo przez się, czynnik regulujący, gdyż przepuszczalność błony mitochondrialnej ogranicza swobodny przepływ substratów i związków pośrednich, a ponadto umożliwia utrzymanie optymalnych warunków reakcji w odpowiednich obszarach komórki. Doświadczenia *in vitro* wykazały jednak, że w obrębie

zarówno mitochondriów, jak i cytoplazmy panują różnorodne warunki oksydoredukcyjne. Na istnienie odrębnych stref w obrębie mitochondrium wskazuje stwierdzony w doświadczeniach *in vitro* fakt różnej zależności od warunków tlenowych dwóch kolejno po sobie następujących reakcji: przemiany koproporfirynogenu w protoporfirynę i włączania żelaza do protoporfiryny. Pierwsza z nich wymaga obecności tlenu (optymalne stężenie 20% obj/obj), którego nie można zastąpić żadnym innym akceptorem elektronów (85), druga zaś najszybciej przebiega w warunkach beztlenowych (86).

Zewnętrzne ciśnienie tlenu, od którego zależy stężenie tlenu w komórce, może więc być czynnikiem regulującym bezpośrednio przebieg biosyntezy hemu. Przypuszcza się, że spadek ciśnienia tlenu jest jedną z przyczyn wzmożonej hemopoezy na dużych wysokościach lub w sztucznie wytworzonych warunkach niedotlenienia. Ponieważ przejście porfobilinogenu w uroporfirynogen jest odwracalnie hamowane przez tlen, Falk i Porra (26) sugerują, że wzrost syntezy hemu może być w pewnym stopniu spowodowany stymulowaniem syntezy uroporfirynogenu. Regulujący wpływ tlenu na biosyntezę hemu stanie się jeszcze bardziej oczywisty, jeśli się uwzględni, że nawet drobne zmiany jego stężenia w komórce mogą wpływać na stan utlenienia grup tiolowych, znajdujących się w centrach aktywnych szeregu enzymów szlaku biosyntetycznego hemu.

4. Dostępność substratów i kofaktorów reakcji

Normalny przebieg biosyntezy hemu zależy od stałego dopływu odpowiednich substratów i kofaktorów, co wiąże ten proces z innymi szlakami metabolicznymi komórki. Zaburzenia metabolizmu, których wynikiem jest niedobór żelaza, fosforanu pirydoksalu lub sukcynylo-CoA dla syntezy hemu spotykane są w różnych rodzajach niedokrwistości, podczas gdy nadmiar sukcynylo-CoA może wywoływać objawy porfirii.

Żelazo jest potrzebne nie tylko jako substrat ostatniej reakcji łańcucha, lecz również jako niezbędny kofaktor przemiany koproporfirynogenu w protoporfirynę (68) oraz — w przypadku erytrocytów ptasich — syntezy ALA (14). Niedostateczny dopływ żelaza do szlaku biosyntezy hemu może być spowodowany jego rzeczywistym niedoborem w ustroju (upośledzenie wchłaniania, nadmierna utrata wskutek krwawień), zaburzeniami transportu, utrudnionym uruchamianiem zapasów żelaza w wątrobie bądź wreszcie zaburzeniami pobierania żelaza przez krwinkę czerwoną i włączania go do protoporfiryny (71, 77). Nie zdołano do tej pory wyjaśnić przyczyny zmniejszonego włączania żelaza do hemu przy jego jednoczesnym odkładaniu się w mitochondriach erytroblastów i ogólnej hemosyderozie występującej w tzw. anemii syderoakrestycznej. Ponieważ w tej chorobie krwinki obwodowe zawierają często podwyższone ilości koproporfiryny przy normalnej lub obniżonej zawartości protoporfiryny sugeruje

ruje się, że zaburzenia te spowodowane są niedoborem oksydazy koproporfirynogenowej (32). Nadmiar żelaza i jego odkładanie się w krwinkach hamuje tworzenie się ALA, a więc i hemu, co jest jedną z wtórnych przyczyn niedokrwistości występującej w β -talassemii (97).

Drugim ważnym substratem w biosyntezie hemu jest sukcynylo-CoA, który w reakcji kondensacji z glicyną daje ALA. Źródłem sukcynylo-CoA jest w pierwszym rzędzie cykl kwasu cytrynowego. Alternatywną drogą, która w przypadku zaburzeń obrotu tego cyklu może zapewnić normalny dopływ sukcynylo-CoA jest jego bezpośrednia synteza z bursztynianu i CoA katalizowana przez syntetazę sukcynylo-CoA. W pewnych warunkach obie drogi są czynne, co prowadzi do nadmiaru produktu. Według Labbe i Labbe (64) uruchomienie dodatkowej produkcji sukcynylo-CoA występuje podczas napadów porfirii wątrobowej wywołanych podaniem chorym niektórych leków, np. barbituranów. Labbe sugeruje, że nadmiar tego związku działa jako derepresor syntezy syntetazy ALA (indukcja substratowa) wywołując w efekcie nadmierne wytwarzanie ALA. Wzmoczona synteza sukcynylo-CoA jest wynikiem indukcji syntetazy tego związku (65) i reduktazy fumaranowej (63). Wzrost aktywności reduktazy fumaranowej spowodowany jest zahamowaniem utleniania zred. NAD, co według Kurumady i Labbe (63) świadczy o powiązaniu i uzależnieniu biosyntezy hemu od stanu funkcjonalności łańcucha oddechowego. Zaburzenia transportu elektronów spowodowane zahamowaniem utleniania zred. NAD pociągają za sobą dalsze skutki: jednym z nich jest wzmoczona glikoliza, w wyniku której powstaje kwas pirogronowy, metabolizowany dalej do kwasów dwukarboksyłowych, drugim — spadek zawartości ATP w komórce. Zwiększona pula kwasów dwukarboksyłowych może być źródłem substratów dla reduktazy fumaranowej i syntetazy sukcynylo-CoA. Obniżenie stężenia ATP w komórce mogłoby stymulować porfirynogenezę. Wynięta na tej podstawie hipoteza Gajdosa i wsp. (30) o odwrotnej zależności pomiędzy poziomem ATP i porfiryn w porfiriach wątrobowych nie znalazła jednak potwierdzenia (24). Ostatnio sugeruje się (29), że stymulowanie obrotu kwasów tłuszczowych przez ATP powoduje wzrost zużycia glicyny do syntezy tych związków, co pociąga za sobą spadek jej stężenia w komórce i w rezultacie obniżoną syntezę hemu.

Podczas gdy nadmiar sukcynylo-CoA prowadzi do nadprodukcji ALA, jego niedobór powoduje zmniejszenie syntezy hemu. Niedostateczny dopływ sukcynylo-CoA może być spowodowany niedoborem kwasu pantotenowego (część składowa koenzymu A) w pożywieniu. Podobnie zmniejszenie dostaw pirydoksyny (część składowa fosforanu pirydoksalu i czynnik ułatwiający zwalnianie z mitochondriów żelaza, które następnie włączane jest do protoporfiryny) prowadzi do obniżenia syntezy hemu i objawów niedokrwistości.

Innym czynnikiem, który może wpływać regulująco na szybkość biosyntezy hemu jest tworzenie przez związki pośrednie nietrwałych kom-

pleksów z białkami lub lipidami, co zmniejsza szybkość ich przesuwania się w komórce i zwiększa lokalne stężenie ułatwiając przebieg reakcji enzymatycznych. Porra i Falk (84) stwierdzili powstawanie takiego kompleksu podczas przejścia koproporfirynogenu w protoporfirynogen, a Yoshikawa i Yoneyama (115) wykazali, że protoporfiryna związana jest z lipoproteidami stromy erytrocytów ptasich. Na wiązanie protoporfiryny z białkami wskazują również wyniki innych autorów (57, 78, 82).

Istnieje wiele publikacji o znaczeniu różnych substancji dla biosyntezy hemu, których tutaj nie omawiano, ograniczając się jedynie do tych substratów lub kofaktorów, których zmiany ilościowe są powodem wrodzonych zaburzeń regulacji syntezy hemu.

III. Współzależność syntezy hemu i globiny

W warunkach prawidłowych w krwinkach czerwonych nie wykryto wolnego hemu i najwyżej śladowe ilości globiny, co wskazuje na istnienie ścisłej koordynacji między procesami syntezy globiny i hemu.

Teoretycznie można sobie wyobrazić, że koordynacja ta odbywa się już na poziomie genowym poprzez regulację wytwarzania specyficznych mRNA. Według tej koncepcji hem miałby regulować syntezę mRNA dla globiny, natomiast globina regulowałaby syntezę mRNA dla syntetazy ALA. Według Granaicka (36) gen operatorowy dla syntetazy ALA jest zablokowany przez represor składający się z hemu i aporepresora białkowego. Globina odłączając hem z tego kompleksu powodowałaby odblokowanie genu operatorowego, co umożliwiłoby transkrypcję genu strukturalnego na mRNA dla syntetazy ALA (schemat 4). Można sobie wyobrazić, że w podobny sposób hem działa regulująco na syntezę globiny. Ponieważ jednak nie zdołano wyizolować i określić ilości specyficznych mRNA przeto mechanizmy regulacji na poziomie genowym pozostają w sferze hipotez.

Natomiast za istnieniem wzajemnej regulacji syntezy hemu i globiny na poziomie cytoplazmatycznym przemawiają liczne fakty doświadczalne. Hem i żelazo powodują znaczny wzrost syntezy globiny w układach bezkomórkowych (41, 42) i całych retikulocytach (15, 40, 104, 106) a jednocześnie zapobiegają rozpadowi polirybosomów na pojedyncze rybosomy podczas syntezy globiny (105). Istnieją dwa poglądy na sposób, w jaki hem wywołuje powyższe efekty. Według pierwszego z nich synteza globiny byłaby regulowana przez ujemne sprzężenie zwrotne, w którym efektozem byłaby sama globina lub pojedyncze łańcuchy polipeptydowe. Na poparcie tej hipotezy można przytoczyć wyniki doświadczeń Bluma i Schapiry (7), którzy stwierdzili, że dodanie hemoglobiny α do układu bezkomórkowego powoduje ograniczenie syntezy łańcuchów α . Przy

niedoborze hemu spowodowanym wiązaniem żelaza przez związki chelatujące, w retikulocytach nagromadza się globina, która działa hamująco na swą własną syntezę (27, 106), co prowadzi do rozpadu polirybosomów. Hem wiążąc globinę uruchamia na nowo jej syntezę. Drugi pogląd zakłada, że stymulujące działanie hemu na syntezę globiny polega na ułatwianiu przyłączania rybosomów do mRNA i zapoczątkowaniu syntezy łańcuchów polipeptydowych. Przejawem tego byłaby stabilizacja kompleksu polirybosomowego. Okazało się (104), że puromycyna, która uwalnia łańcuchy polipeptydowe z polirybosomów ma tylko nieznaczny wpływ na ilość heminy związanej z polirybosomami. Fakt ten świadczy o przyłączeniu się heminy wprost do polirybosomów, co przeczyłoby sugestii Grayzela i wsp. (40), którzy zakładali, że przyczyną stabilizacji kompleksu polirybosomowego mogą być zmiany konformacyjne łańcuchów lub całych zespołów polirybosomowych spowodowane przyłączeniem hemu do rosnących łańcuchów polipeptydowych.

Istnieją dane na to, że na poziomie cytoplazmatycznym występuje również regulacja syntezy hemu przez globinę. Grayzel i wsp. (39) z doświadczeń przeprowadzonych na retikulocytach króliczych wnioskuje, że zahamowanie wbudowywania glicyny do hemu w obecności cykloheksimidu jest spowodowane zablokowaniem syntezy globiny, której niedobór prowadzi do nagromadzania się hemu w komórkach aż do stężenia hamującego aktywność syntetazy ALA przez ujemne sprzężenie zwrotne.

Biosynteza hemoglobiny jest więc prawdopodobnie regulowana przez wiele mechanizmów molekularnych czynnych na różnych poziomach komórkowych. Istnienie niektórych mechanizmów wzajemnej regulacji syntezy hemu i globiny zostało stwierdzone doświadczalnie, wiele z nich pozostaje jednak nadal w sferze hipotez. Ponadto w organizmie żywym biosynteza hemoglobiny podlega nie omówionym tutaj mechanizmom regulacyjnym kontrolującym liczebność populacji komórek układu czerwonokrwinkowego syntetyzujących to białko.

LITERATURA

1. Baglioni C., w *Molecular Genetics*, Część 1, red. J. H. Taylor, Academic Press, New York, Londyn 1963, str. 405.
2. Baglioni C., *J. Cell. Physiol.* **67**, 169 (1966).
3. Baglioni C., Campana T., *Eur. J. Biochem.* **2**, 480 (1967).
4. Bank A., Marks P. A., *Nature* **212**, 1198 (1966).
5. Bank A., Marks P. A., *J. Clin. Invest.* **45**, 985 (1967).
6. Bargellesi A., Pontremoli S., Meurini C., Conconi F., *Eur. J. Biochem.* **3**, 364 (1968).
7. Blum N., Schapira G., *Compt. Rend. Acad. Sci. D* **264**, 1211 (1967).
8. Boyer S. H., Rucknagel D. L., Weatherall D. J., Watson-Williams E. J., *Am. J. Human Genet.* **15**, 438 (1963).

9. Bradley T. B. jr., Wohl R. C., Rieder R. F., *Science* **157**, 1581 (1967).
10. Brancati C., Baglioni C., *Nature* **212**, 262 (1966).
11. Braun V., Hilse K., Best J. S., Flamm U., Braunitzer G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 935 (1967).
12. Braunitzer G., *J. Cell. Physiol.* **67**, suppl. 1,1 (1966).
13. Braunitzer G., Gehring-Mueller R., Hilschmann N., Hilse K., Hoborn G., Rudloff V., Wittman-Liebold B., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **325**, 283 (1961).
14. Braun E. G., *Nature* **190**, 313 (1958).
15. Bruns G. P., London I. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 236 (1965).
16. Burnham B. F., Lascelles J., *Biochem. J.* **87**, 462 (1963).
17. Calissano P., Bonsignore D., Cartasegna C., *Biochem. J.* **101**, 550 (1966).
18. Ceppellini R. w *Biochemistry of Human Genetics*, red. G. E. W. Wolstenholme, Boston, Little Brown 1959, str. 133.
19. Cole R. J., Paul J., *Embryol. Exptl. Morphol.* **15**, 245 (1966).
20. Colombo B., Baglioni C., *J. Mol. Biol.* **16**, 51 (1966).
21. Conconi F., Bergellessi A., Pontremoli S., Vigi V., Volpato S., Gaburo D., *Nature* **217**, 259 (1968).
22. Conley C. L., Weatherall D. J., Richardson S. N., Shepard M. K., Charache S., *Blood* **21**, 261 (1963).
23. Cook C. D., Brodie H. R., Allen D. W., *Pediatrics* **20**, 272 (1957).
24. De Matheis F., Slater T. F., Wang D. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 100 (1963).
25. Edington G. M., Lehmann H., *Brit. Med. J.* **2**, 1328 (1955).
26. Falk J. E., Porra R. J., *Biochem. J.* **90**, 66 (1964).
27. Felicetti L., Colombo B., Baglioni C., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 380 (1966).
28. Gabuzda T. G., Nathan D. G., Gardner F. H., *J. Clin. Invest.* **44**, 315 (1965).
29. Gajdos A., Gajdos-Török M., Gorchein A., Neuberger A., Tait G. H., *Biochem. J.* **106**, 185 (1968).
30. Gajdos A., Gajdos-Török M., Palma-Carlos A., Palma-Carlos M. L., *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.* **11**, 915 (1966).
31. Gallo R. C., *J. Clin. Invest.* **46**, 124 (1967).
32. Garby L., Sjölin L., Vahlquist B., *Brit. J. Haematol.* **3**, 55 (1957).
33. Gerald P. S., *Medicine* **43**, 747 (1964).
34. Goldstein J., Konigsberg W., Hill R. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 2016 (1963).
35. Granick S., *J. Biol. Chem.* **241**, 1359 (1966).
36. Granick S., Levere R. D., w *Progress in Haematology* **4**, 1 (1964).
37. Granick S., Kappas A., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **57**, 1463 (1967).
38. Granick S., Urata G., *J. Biol. Chem.* **238**, 821 (1963).
39. Grayzel A. I., Fuhr J. E., London I. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 705 (1967).
40. Grayzel A. I., Hoerchner P., London I. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **55**, 650 (1966).
41. Gribble T. J., Schwartz H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 333 (1965).
42. Hammel C. L., Bessman S. P., *Science* **152**, 1080 (1966).
43. Hodgson G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **124**, 1045 (1967).
44. Horton B. F., Huisman T. H. J., *Am. J. Human Genet.* **15**, 394 (1963).
45. Hosoi T., *Exptl. Cell. Res.* **37**, 680 (1965).
46. Huens E. R., Shooter E. M., *J. Med. Genet.* **2**, 48 (1965).

47. Huens E. R., Flynn F. V., Butler E. A., Beaven G. H., *Nature* **189**, 496 (1961).
48. Hunt J. A., Lehmann H., *Nature* **184**, 872 (1959).
49. Ingram V. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **119**, 485 (1964).
50. Ingram V. N., *Medicine* **43**, 759 (1964).
51. Itano H. A., *J. Cell. Physiol.* **67**, 65 (1966).
52. Itano H. A., Robinson E. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1492 (1960).
53. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
54. Jones R. T., Brimhall B., *Science* **154**, 1024 (1966).
55. Jonxis J. H. P. w Abnormal Haemoglobins, red. Jonxis J. H. P., Delafresnaye J. F., Blackwell, Oxford 1959, str. 114.
56. Karibian D., London I. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 243 (1965).
57. Klein J. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 154 (1967).
58. Konigsberg W., Guidotti G., Hill R. J., *J. Biol. Chem.* **236**, PC55 (1961).
59. Krantz S. B., Galien-Lartigue O., Goldwasser E., *J. Biol. Chem.* **238**, 4085 (1963).
60. Krantz S. B., Goldwasser E., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 325 (1965).
61. Kunkel H. G., Ceppellini R., Mueller-Eberhardt V., Wolf J. *J. Clin. Invest.* **36**, 1615 (1957).
62. Kunkel H. G., Wallenius G., *Science* **122**, 288 (1955).
63. Kurumada T., Labbe R. F., *Science* **151**, 1228 (1966).
64. Labbe R. F., *Lancet* **II**, 1361 (1967).
65. Labbe R. F., Kurumada T., Onisawa J., *Biochim. Biophys. Acta* **111**, 403 (1965).
66. Labie D., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 1013 (1967).
67. Labie D., Schroeder W. A., Huisman T. H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 428 (1966).
68. Lascelles J., Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation, W. A. Benjamin, Inc., New York 1964.
69. Levere R. D., Granick S., *J. Biol. Chem.* **242**, 1903 (1967).
70. Levere R. D., Kappas A., Granick S., *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **58**, 985 (1967).
71. London I. M., *Series Haematol.* **2**, 1 (1965).
72. London I. M., Bruns G. P., Karibian D., *Medicine* **43**, 789 (1964).
73. Marks P. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1437 (1965).
74. Marks P. A., Willson C., Kruh J., Gros F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 9 (1962).
75. Marver H. S., Collins A., Tschudy D. P., Rechcigl M. jr., *J. Biol. Chem.* **241**, 4323 (1966).
76. Marver H. S., Tschudy D. P., Perltroth M. G., Collins A., *Science* **154**, 501 (1966).
77. Mazur A., Sackler M., *Lancet* **I**, 254 (1967).
78. Minakami S., Yoneyama Y., Yoshikawa H., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 447 (1958).
79. Murawski K., Carta S., Sorcini M., Tentori L., Vivaldi G. Antonini E., Brunori M., Wyman J., Bucci E., Rossi-Fanelli A., *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 197 (1965).
80. Nakao K., Wada O., Kitamura T., Uono M., Urata G., *Nature* **210**, 838 (1966).
81. Neel J. V., *Blood* **18**, 769 (1961).
82. Nishida G., Labbe R. F., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 519 (1959).

83. Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Well I. C., *Science* **110**, 543 (1949).
84. Porra R. J., Falk J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 179 (1961).
85. Porra R. J., Falk J. E., *Biochem. J.* **90**, 69 (1964).
86. Porra R. J., Jones O. T. G., *Biochem. J.* **87**, 181 (1963).
87. Powsner E. R., Berman L., *Blood* **30**, 189 (1967).
88. Rieder R. F., Weatherall D. J., *J. Clin. Invest.* **44**, 42 (1965).
89. Rigas D. A., Koler R. D., Osgood E. E., *J. Lab. Clin. Med.* **47**, 51 (1956).
90. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 284 (1962).
91. Shaeffer J. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 647 (1967).
92. Smith E. W., Torbert J. V., *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **101**, 38 (1958).
93. Tomada Y., *Nature* **202**, 910 (1964).
94. Tschudy D. P., Perlroth M. G., Marver H. S., Collins A., Hunter G. jr., Rechcigl M. jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 481 (1965).
95. Tschudy D. P., Waxman A. D., Collins A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1944 (1967).
96. Vavra J. D., *J. Clin. Invest.* **46**, 1127 (1967).
97. Vavra J. D., Mayer V. K., Moore C. V., *J. Lab. Clin. Med.* **63**, 736 (1964).
98. Wainwright S. D., Wainwright L. K., *Can. J. Biochem.* **45**, 255 (1967).
99. Wainwright S. D., Wainwright L. K., *Can. J. Biochem.* **45**, 344 (1967).
100. Wainwright S. D., Wainwright L. K., *Can. J. Biochem.* **45**, 1648 (1967).
101. Walker J., Turnbull E. P. N., *Arch. Dis. Childhood* **30**, 114 (1955).
102. Watson C. J., Runge W., Taddeini L., Bossenmaier I., Cardinal C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 474 (1965).
103. Waxman A. D., Collins A., Tschudy D. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 675 (1966).
104. Waxman H. S., Freedman M. L., Rabinowitz M., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 353 (1967).
105. Waxman H. S., Rabinowitz M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 538 (1965).
106. Waxman H. S., Rabinowitz M., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 369 (1966).
107. Weatherall D. J., *Proc. Roy. Soc. Med.* **60**, 1037 (1967).
108. Weatherall D. J., w The Thalassaemia Syndromes, Blackwell Sc., Oxford 1965.
109. Weatherall D. J., *Seminars Hematol.* **4**, 72 (1967).
110. Wheeler J. T., Krevans J. R., *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **109**, 217 (1961).
111. Wilt F. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1582 (1962).
112. Wilt F. H., *J. Mol. Biol.* **12**, 331 (1965).
113. Wilt F. H., *Science* **147**, 1588 (1965).
114. Winslow R. M., Ingram V. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 1144 (1966).
115. Yoshikawa H., Yoneyama Y. w Iron Metabolism, Springer, Berlin 1964.
116. Zuckerkandl E., *J. Mol. Biol.* **8**, 128 (1964).

ZOFIA KURATOWSKA*

Sprężenie zwrotne w wewnątrzkomórkowej regulacji przemian

Feedback Regulation in the Intracellular Control of Metabolism

The intracellular system of metabolic regulation by the feedback control of enzymatic activity and by multienzymes complexes is described. The role of concerted action of these systems and repression of enzyme synthesis is discussed.

Mechanizmy regulacyjne w komórce żywej, utrzymujące ciągłość przemian mimo zmian środowiska tak zewnątrz, jak wewnątrzkomórkowego, można podzielić na dwa typy.

1. Regulację „czynną” utrzymującą prawidłowy kierunek reakcji metabolicznych. Obejmuje ona:

- a) regulację aktywności już gotowych enzymów, głównie poprzez sprzężenie zwrotne,
- b) regulację syntezy enzymów *de novo*, drogą represji enzymatycznej.

Obydwa te mechanizmy, niezależnie od siebie, często działają jednocześnie, co zapewnia skuteczną kontrolę przemian (38).

2. Regulację „bierną”, niejako automatyczną, działającą w wyniku określonych zmian w komórce. Przykładem takiej regulacji może być hamowanie kompetycyjne enzymów, hamowanie reakcji przez jej produkty na zasadzie prawa działania mas, wreszcie wpływ zmian *pH* i innych warunków fizyko-chemicznych na przebieg reakcji.

Przedmiotem artykułu będzie typ regulacji „czynnej”, głównie mechanizmy regulujące aktywności enzymów i ich współdziałanie z regulacją syntezy enzymów.

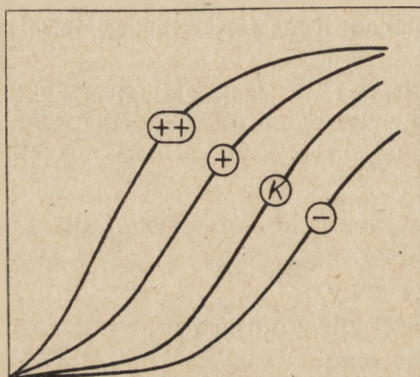
I. Regulacja aktywności enzymatycznej

1. Sprężenie zwrotne

Sprężenie zwrotne polega na hamowaniu (ang. *feedback inhibition*) lub aktywacji enzymu przez końcowy produkt lub inny metabolit wieloetapowej przemiany. Dotyczy to zazwyczaj enzymu katalizującego pierw-

* Dr med., Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych w Warszawie

szy etap syntezy lub kluczową reakcję łańcucha przemian (43), przy czym katalizowana reakcja jest praktycznie nieodwracalna. Zmiana aktywności polega na zmianie powinowactwa enzymu do substratu przez czynnik działający. Czynnik ten nosi nazwę efektoru ujemnego, jeżeli obniża aktywność enzymu, lub dodatniego, jeżeli ją zwiększa. Wyrazem działania efektoru jest przesunięcie w układzie współrzędnych sigmoidalnej krzywej zależności szybkości reakcji od stężenia substratu w sposób przedstawiony na rysunku 1.

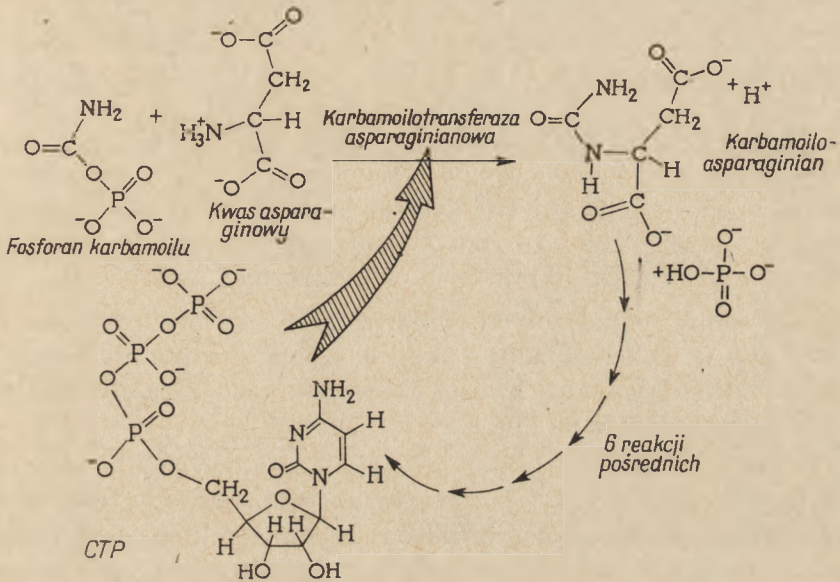


Rys. 1. Przebieg reakcji enzymatycznej (oś rzędnych) zależnie od stężenia substratu (oś odciętych); kontrolnej (k) i pod wpływem działania efektorów: + dodatniego ++ wyższe stężenie efektoru dodatniego, - ujemnego (według Atkinsona (1))

Pierwszy przykład regulacji będącej w istocie ujemnym sprzężeniem zwrotnym podał D i s c h e (6), który opisał hamowanie fosforylacji glukozy w erytrocytach przez aldehyd fosfoglicerynowy, nie wyjaśniając jednak mechanizmu tego zjawiska. Badania nad hamującym działaniem izoleucyny na dehydratazę treoniny (42) oraz nad hamowaniem karbamilotransferazy asparaginianowej przez CTP (8, 50) wykazały, że nie ma żadnej analogii strukturalnej ani kinetycznej między substratem a efektor, a zatem, że nie jest to hamowanie kompetycyjne. Ponadto hamowana przez CTP reakcja przyłączania grupy karbamoilowej do kwasu asparaginowego rozpoczyna cykl biosyntezy zasad pirymidynowych, a więc pierwszy etap syntezy ulega regulacji przez czynnik hamujący (schemat 1).

Wielu danych o mechanizmie hamowania przez sprzężenie zwrotne dostarczyły badania prostych i złożonych cykli metabolicznych u bakterii i w organizmach zwierzęcych. Przykładem złożonego cyklu kontrolowanego przez sprzężenie zwrotne może być biosynteza cholesterolu w wątrobie. Nadmiar cholesterolu w diecie lub zwiększenie jego stężenia wewnątrz komórki wątrobowej powoduje zahamowanie syntezy tego związku w mikrosomach (35). Na biosyntezę cholesterolu z acetylo-CoA

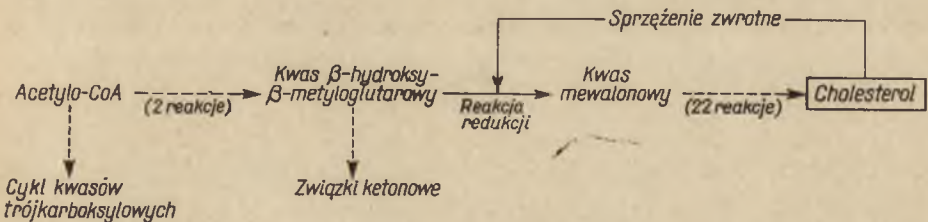
składa się 26 reakcji enzymatycznych przedstawionych w skrócie na schemacie 2, przy czym wczesne produkty przemiany: acetylo-CoA i kwas β -hydrokso- β -metyloglutarowy włączają się w inne jeszcze reakcje dając rozgałęzienia szlaku metabolicznego. Wykazano (34), że nadmiar cholesterolu nie wpływa na tworzenie się związków ketonowych, których głównym źródłem w ustroju jest kwas β -hydrokso- β -metyloglutarowy. W obecności cholesterolu przebiegają również prawidłowo 22 reakcje przemian



Schemat 1. Biosynteza nukleotydów pirymidynowych z kwasu asparaginowego u *E. coli*

Kreskowaną grubą strzałką zaznaczono etap hamowany przez sprzężenie zwrotne (8)

doprowadzających do syntezy tego związku z kwasu mewalonowego. Jedyną reakcją hamowaną przez cholesterol na drodze sprzężenia zwrotnego jest zatem redukcja kwasu β -hydrokso- β -metyloglutarowego do kwasu mewalonowego.



Schemat 2. Cykl biosyntetyczny cholesterolu w wątrobie

Zaznaczono nieodwracalną reakcję redukcji hamowaną przez cholesterol w drodze sprzężenia zwrotnego

Zahamowanie za miejscem rozgałęzienia szlaku biosyntetycznego przez gromadzący się produkt nie zakłóca mechanizmu innych reakcji, a związki powstające we wspólnych, nie zahamowanych reakcjach są wykorzystywane w innych szlakach metabolicznych (25).

Odległe efekty regulacji przez ujemne i dodatnie sprzężenie zwrotne można prześledzić w układach metabolicznych związanych z przemianą energii w komórce: fosforylacji oksydacyjnej i przemiany węglowodanów (44).

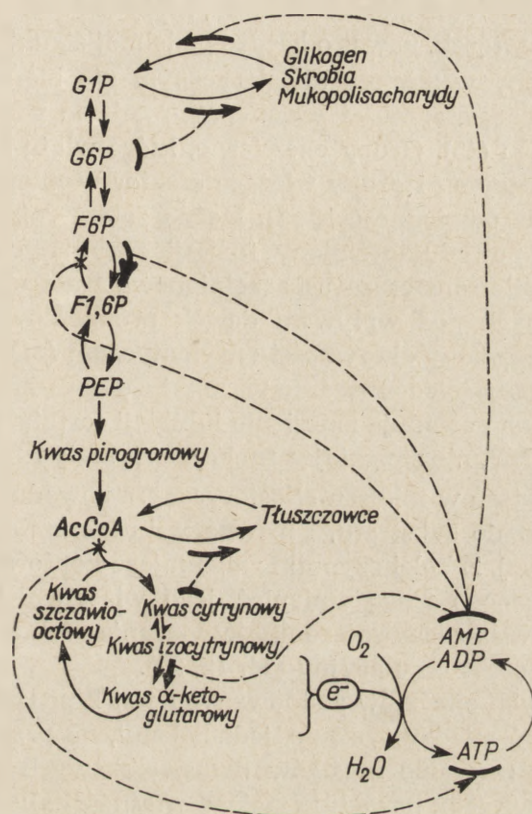
Na rolę nukleotydów adenyłowych jako regulatorów metabolizmu po raz pierwszy zwrócił uwagę *Mansour* (według 18 i 29), który wykazał, że AMP i jego cykliczny izomer kwas adenozy-3', 5'-monofosforowy aktywują, a ATP — hamuje fosfofruktokinazę mięśnia sercowego. Badania nad rolą fosforanów adenozy w regulacji przemiany pośredniej (1, 2, 9) zostały poparte bilansem energetycznym (32). Schemat 3 przedstawia proponowaną przez *Atkinsona* (1) „mapę” sterowanych przez AMP, ADP i ATP reakcji w cyklu przemian energetycznych.

Spśród ogni w regulowanych przez fosforany adenozy najbardziej kluczową rolę w wykorzystaniu energii odgrywają: syntetaza kwasu cytrynowego, dehydrogenaza kwasu izocytrynowego, fosfofruktokinaza, fosfataza fruktozodwufosforanu.

Gdy komórka wskutek braku produktów azotowych dla biosyntezy białka jest „przeładowana” energią wytworzoną podczas intensywnej przemiany węglowodanów, nagromadzony ujemny efektor — ATP hamuje syntetazę kwasu cytrynowego. Enzym ten katalizuje reakcję włączającą acetylo-CoA do cyklu Krebsa. Zahamowanie syntetazy kwasu cytrynowego zwiększa zatem udział CoA w przemianie tłuszczowej i syntezie kwasów tłuszczowych magazynujących w komórce energię. Jednocześnie ATP hamuje dehydrogenazę kwasu izocytrynowego, co zwiększa przejściowo stężenie kwasu cytrynowego pomimo zmniejszenia jego syntezy. Kwas cytrynowy, jako dodatni efektor, aktywuje z kolei karboksylazę acetylo-CoA, katalizującą pierwszy etap syntezy kwasów tłuszczowych. ATP działając ponadto jako efektor ujemny na fosfofruktokinazę i jako dodatni — na fosfatazę fruktozodwufosforanu (39, 41), powoduje nagromadzenie fruktozo-6-fosforanu oraz glukozo-6-fosforanu i glukozo-1-fosforanu. Wywołuje to zwiększenie syntezy wielocukrowców (glikogenu, skrobi lub mukopolisacharydów), a więc związków magazynujących energię.

Gdy wydatkowanie energii wzrasta, wówczas gromadzi się AMP (lub ADP), co jest sygnałem do zapoczątkowania reakcji prowadzących do regeneracji ATP. Następuje zahamowanie fosfatazy fruktozodwufosforanu, aktywacja fosfofruktokinazy i fosforylasy polisacharydów. Uruchomienie cyklu kwasów trójkarboksylowych kieruje CoA w stronę przemian prowadzących do syntezy związków fosforowych bogatych energetycznie. Do tego mechanizmu dołączają się inne przemiany również regulowane przez

związki adenyłowe, na przykład odwodorowanie niektórych aminokwasów. Sprzężenie zwrotne pozwala zatem na szybkie przesunięcie przemian w kierunku wyzwalań lub magazynowania energii w sposób maksymalnie ekonomiczny, zależny od aktualnych potrzeb komórki.



Schemat 3. Rola związków adenyłowych (ATP, ADP, AMP) w regulacji przemiany energii w komórce (według Atkinsona (1))

Krzyżyki oznaczają miejsca działania ujemnego efektora, grube strzałki — efektora dodatniego. Czarnymi łukami oznaczono efektory. Linie przerywane łączą efektory z kontrolowanymi przez nie reakcjami enzymatycznymi. Użyte w schemacie skróty: G1P — glukoza-1-fosforan, G6P — glukoza-6-fosforan, F6P — fruktoza-6-fosforan, F1,6P — fruktoza-1,6-dwufosforan, PEP — kwas fosfo-enolo-pirogronowy, AcCoA — acetylokoenzym A

Przykłady regulacji na zasadzie sprzężenia zwrotnego można znaleźć niemal w każdym łańcuchu przemian metabolicznych. Efektorami mogą być końcowe produkty drobno lub nawet wielkocząsteczkowe oraz drobno-cząsteczkowe metabolity pośrednie. Jako efekторы mogą również działać stosunkowo nietrwałe, złożone produkty pośrednie, jak to na przykład ma miejsce w regulacji syntezy glikoproteidów przez nukleotydowe pochodne kwasu sialowego i glukozoaminy (12, 13).

2. Mechanizm działania efektorów na enzymy

Według koncepcji *M o n o d a* i wsp. (22, 23) w cząsteczce enzymu są oprócz centrum (ów) aktywnego tak zwane allosteryczne miejsca wiążące efekторы. Miejsce allosteryczne, podobnie jak centrum aktywne, cechuje specyficzność wiązania dla danego efektora, który nie może być zastąpiony przez żaden inny związek, nawet o bardzo podobnej strukturze.

Efektor związany w miejscu allosterycznym nie bierze bezpośrednio udziału w reakcji katalizowanej przez enzym ani nie wiąże się w żaden sposób z substratem (45). Grupy chemiczne, które wiążą substrat w centrum aktywnym enzymu i grupy wiążące efektor w miejscu allosterycznym, są całkowicie odmienne (21, 23). Można zatem zniszczyć właściwości allosteryczne nie powodując zmiany funkcji enzymatycznej białka: na przykład karbamoilotransferaza asparaginianowa traci około 90% właściwości allosterycznych pod wpływem dawek promieniowania, które nie powodują w ogóle zmiany aktywności enzymatycznej (11). Podobny efekt można osiągnąć stosując odpowiednie warunki ogrzewania, mocznik i sole miedzi (47). Papaina powoduje zniesienie inhibicji fosfatazy fruktozodwufosforanu przez AMP, nie zmieniając funkcji enzymatycznej (39).

Związanie efektora w miejscu allosterycznym powoduje zmianę powinowactwa enzymu do substratu, zapewne wskutek zmiany konformacji cząsteczki białkowej. Z kolei czynniki zmieniające konformację cząsteczki białka enzymatycznego mogą zmieniać jego właściwości allosteryczne. Białko może wówczas zachować zdolność wiązania efektora, przestaje on jednak wywierać efekt regulacyjny (14, 15, 22).

Wiele natywnych enzymów zbudowanych jest z podjednostek (16, 33, 40); zmiana wiązań między tymi podjednostkami, na przykład osłabienie połączeń poprzez zerwanie mostków dwusiarczkowych czy zniszczenie wiązań wodorowych (38), powoduje zmianę właściwości allosterycznych enzymu (8a). Zmiany te, zależnie od stopnia dysocjacji podjednostek, mogą obejmować reakcje allosteryczne z jednym lub wieloma efektorami (47, 49).

Różnorodność miejsc allosterycznych w cząsteczce enzymu współdziałających w czynności regulacyjnej odgrywa rolę w przypadkach tak zwanego „skoordynowanego hamowania przez sprzężenie zwrotne” (ang. *concerted feedback inhibition*). Zjawisko to zachodzi w przypadku syntezy lizyny, treoniny, metioniny i izoleucyny z wspólnego prekursora — kwasu asparaginowego. Nagromadzenie tylko jednego z produktów końcowych nieznacznie hamuje kinazę β -asparaginianową, katalizującą pierwszy etap ich syntezy. Natomiast nagromadzenie wszystkich czterech aminokwasów powoduje silne zahamowanie znacznie przewyższające sumę efektów poszczególnych aminokwasów. Jest to przykład dużej ekonomii aparatu biosyntetycznego komórki. Dzięki takiej regulacji aktywność enzymu znajdującego się przed rozgałęzieniem szlaku metabolicznego nie jest hamo-

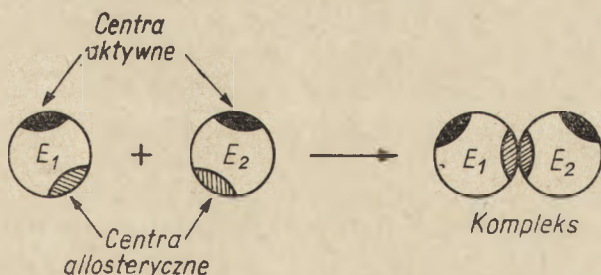
wana przez produkt tylko jednej z gałęzi tego szlaku, co umożliwia powstawanie pozostałych metabolitów. Nie jest wyjaśnione, czy miejsca allosteryczne dla każdego z tych aminokwasów znajdują się w oddzielnych podjednostkach enzymu (5) czy też kinaza β -asparaginianowa jest kompleksem kilku enzymów, z których każdy jest wrażliwy na inny aminokwas (37).

3. Układy wieloenzymatyczne

Powiązanie enzymów katalizujących szereg reakcji jednego łańcucha metabolicznego w duże zespoły stanowiące jednostkę czynnościową i strukturalną odgrywa doniosłą rolę w regulacji metabolizmu, zwłaszcza u organizmów wyższych. Znaczenie związków allosterycznych pomiędzy cząsteczkami poszczególnych enzymów w tej regulacji jest szczególnie wyraźne w przypadku kompleksów enzymów zawartych w supernatancie po odwirowaniu struktur podkomórkowych przy 105 000 g. Dobrym przykładem takiego kompleksu jest zespół enzymów katalizujących biosyntezę wyższych kwasów tłuszczowych (17, 27). Zespół ten, zwany syntetazą kwasów tłuszczowych, składa się z siedmiu aktywnych cząsteczek białkowych: enzymu kondensującego, dwóch reduktaz, dehydrogenazy oraz transferaz kwasu malonowego, palmitynowego i octowego.

Poszczególne składniki tego kompleksu są powiązane ze sobą w specyficzny sposób zapewniający wieloraką czynność enzymatyczną. Rozbicie kompleksu na poszczególne enzymy znosi niemal całkowicie ich aktywność. Interakcja cząsteczek białkowych kompleksu nosi cechy związku allosterycznego.

Kompleksem wieloenzymatycznym jest również dehydrogenaza kwasu pirogronowego, która składa się z 64 podjednostek enzymów reduktazowo-transacetylazowych otoczonych przez 16 cząsteczek dekarboksylazy pirogronianowej i 8 cząsteczek dehydrogenazy amidu kwasu liponowego (7, 33). Po rozszczepieniu kompleksu poszczególne enzymy zachowują wprawdzie własności katalityczne, jednakże szybkość poszczególnych reakcji jest znacznie mniejsza.



Rys. 2. Interakcje allosteryczne między dwoma enzymami. Związek w miejscach allosterycznych wpływa modyfikująco na czynność katalityczną centrów aktywnych (według 16)

W takich kompleksach wzajemny związek między miejscami allosterycznymi enzymów (rysunek 2) modyfikuje czynność katalityczną każdego z nich i wpływa na powinowactwo centrum aktywnego do substratu (16). Istnienie kompleksów enzymów rozpuszczalnych, skupiających kolejne etapy danej przemiany na małej przestrzeni, zapobiega rozproszeniu enzymów i produktów pośrednich w cytoplazmie i zapewnia maksymalną ekonomię procesów biochemicznych w komórce.

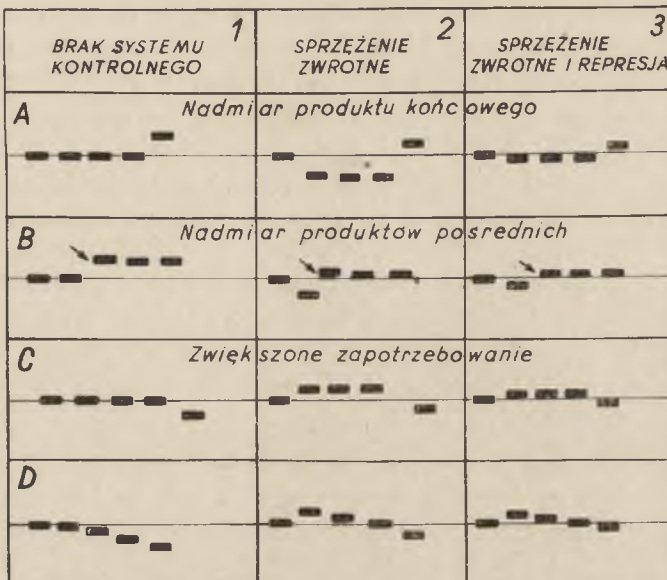
II. Koordynacja systemów regulacyjnych w komórce

Obok już omówionych, działa w komórce również regulacja syntezy enzymu i jego stężenia w komórce. Jej podstawowymi mechanizmami są procesy represji, derepresji i indukcji enzymatycznej (26). Procesy te są pod bezpośrednią kontrolą aparatu genetycznego i leżą u podstaw różnicowania komórkowego (19).

Mechanizm represji enzymatycznej działa zazwyczaj równolegle ze sprzężeniem zwrotnym, lecz sprzężenie zwrotne odnosi się zwykle do jednego enzymu w łańcuchu metabolicznym, zaś represja obejmuje kilka lub, jak w przypadku tzw. represji skoordynowanej, wszystkie enzymy danego szlaku przemiany (20). Często ten sam etap jest pod kontrolą zarówno sprzężenia zwrotnego, jak represji. Mechanizm represji jest bardzo czuły, wrażliwy na stężenia metabolitów (28) wielokrotnie niższe niż stężenia uruchamiające sprzężenie zwrotne. Ujawnia się natomiast później, gdyż u podstaw represji leży zahamowanie powstawania mRNA specyficznego dla syntezy danego enzymu (3).

Zwiększenie stężenia metabolitu w komórce uruchamia przede wszystkim regulację poprzez sprzężenie zwrotne, co obniża aktywność pierwszego lub kluczowego enzymu danego łańcucha przemian. Włączenie tego mechanizmu następuje w przeciągu sekund. W następnym etapie dołącza się mechanizm represji tego samego enzymu i szeregu innych w tym łańcuchu. Ponieważ w organizmach wyższych występują niemal zawsze rozgałęzione łańcuchy przemian, mające liczne ogniwa wspólne, kontrola tylko na zasadzie sprzężenia zwrotnego powodowałaby nierównomierny spadek stężenia niektórych metabolitów przy stale podwyższającym się poziomie syntetyzowanego nadal enzymu, który w skutek działania sprzężenia zwrotnego ma zmniejszone powinowactwo do substratu. Powstaniu chaosu metabolicznego zapobiega mechanizm represji enzymatycznej zaczynający działać po pewnym czasie. Gdy stężenie produktów w komórce obniży się tak, że wystąpi zapotrzebowanie na nie włączają się stosunkowo powolne mechanizmy skoordynowanej derepresji (24). Wzrasta wówczas w komórce stężenie efektorów dodatnich, które szybko aktywują enzymy allosteryczne. Skojarzone działanie represji, derepresji i sprzężenia zwrotnego zapewnia utrzymanie stężeń produktów przemiany pośredniej w stanie bliskim równowagi.

Atkinson (1) przedstawił ten mechanizm w sposób następujący (rysunek 3): jeżeli stężenie produktu reakcji w komórce wzrasta (A1), zahamowanie na zasadzie sprzężenia zwrotnego pierwszego enzymu powoduje spadek poniżej stanu wyjściowego poziomu produktu końcowego (A2) i wszystkich pośrednich produktów przemiany. Po dłuższym czasie (A3) wszystkie enzymy łańcucha ulegną skoordynowanej represji i stężenie produktów pośrednich wzrośnie do stanu równowagi. W porównaniu z momentem wyjściowym (A1) reakcja enzymatyczna przebiega wolniej z powodu niższego stężenia i aktywności enzymu. Gdy stężenie produktów



Rys. 3. Koordynacja systemów wewnątrzkomórkowej regulacji metabolizmu wg (1) Grube czarne odcinki oznaczają kolejne produkty przemiany. Linia pozioma przedstawia stan równowagi. Szczegółowe objaśnienia w tekście

pośrednich wzrośnie na skutek doprowadzenia ich z zewnątrz to przy zachowanej biosyntezie (B1), zwiększy się ilość produktu końcowego, który będzie hamował pierwszy enzym (B2) i obniżał szybkość reakcji dopóty, dopóki tworzenie się produktu końcowego i poprzedzających go metabolitów nie osiągnie wielkości początkowej. Skoordynowana represja enzymów pośrednich z jednoczesnym zmniejszeniem zahamowania zwrotnego powoduje szybszy powrót stężenia wszystkich składników do normy (B3). Odwrotna sytuacja może powstać wobec zwiększonego zapotrzebowania na produkt końcowy (C) lub produkty pośrednie (D). W tym przypadku działa mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego i następnie skoordynowanej derepresji (C1 — 3, D1 — 3), co prowadzi do przywrócenia równowagi. Schemat Atkinsona dotyczy nie tylko prostej, nierozgałęzionej drogi metabolicznej, ale całej skomplikowanej siatki przemian w komórce.

Omówione systemy regulacyjne mają podstawowe znaczenie w fizjologicznej adaptacji komórki do zmian środowiska wewnętrznego w procesach dojrzwania, rozwoju i starzenia. Nie jest natomiast jasne ich znaczenie w reakcjach patologicznych w ustroju.

Potter (30) wysunął hipotezę, że w nowotworach brak niektórych, podlegających mechanizmom regulacyjnym, enzymów o podstawowym znaczeniu w przemianach katabolicznych. Potter tłumaczył to występowaniem delecji w elementach genetycznych sterujących mechanizmami kontrolnymi. Delecje te warunkowałyby przekształcenie komórek normalnych w nowotworowe, a mogłyby być wywoływane przez różne czynniki rakotwórcze. Zdaniem Pottera spowodowane delecjami zaburzenia procesów indukcji, represji i derepresji prowadzą do całkowitego zahamowania syntezy niektórych i nadmiernego tworzenia się innych enzymów. Hipoteza ta nie utrzymała się, ponieważ liczni autorzy wykazali obecność wszystkich normalnych enzymów w tkankach nowotworowych.

Siperstein i Fagan (34) stwierdzili natomiast w cyklu biosyntezy cholesterolu w nowotworze wątroby (w przeciwieństwie do wątroby regenerującej) brak normalnego mechanizmu hamowania przez sprzężenie zwrotne aktywności enzymu katalizującego syntezę kwasu newalonowego. Autorzy uważają, że cechą charakterystyczną enzymów tkanek nowotworowych jest brak oddziaływania na efekторы ujemne. Tłumaczenie tego zjawiska może być dwojakie: Zaburzenie to polegałoby na zmianie centrum allosterycznego, co uniemożliwia wiązania efektoru, lub na braku zmian konformacji po związaniu z czynnikiem allosterycznym. Nie można jeszcze powiedzieć czy analogiczne zaburzenia regulacji występują w innych cyklach metabolicznych komórek nowotworowych. Stwierdzono (46) obniżenie aktywności niektórych enzymów glikogenolizy i glikoneogenezy w niektórych nowotworach wątroby, co tłumaczono zmniejszonym powinowactwem enzymu do substratu, być może na skutek trwałego związku enzymu z ujemnym efekterem allosterycznym. Wheeler (48) obserwował zmiany kinetyki enzymatycznej procesów katabolicznych kwasów nukleinowych w tkankach nowotworowych przypisując je nieprawidłowemu sprzężeniu zwrotnemu. Natomiast Prager i wsp. (31) nie wykazali różnic między hamowaniem przez sprzężenie zwrotne karbamoilotransferazy asparaginianowej w leukocytach normalnych i białaczkowych. Wydaje się, że zmiany procesów regulacyjnych enzymów tkanek nowotworowych są raczej wtórne i nie mogą być traktowane jako przyczyna patologicznego rozrostu.

Na uwagę zasługuje szczególnie postać tzw. młodzieńczej dny moczonowej, w której biosynteza kwasu moczowego nie podlega normalnym mechanizmom regulacji (10). Kluczowym enzymem biosyntezy puryn podlegającym kontroli poprzez sprzężenie zwrotne jest amidotransferaza fosforybozylpirofosforanowa. Enzym ten ma dwa centra allosteryczne: dla rybonukleotydu adenylowego i dla rybonukleotydu guanylowego (4).

W przypadku dny młodzieńczej enzym ten nie jest wrażliwy na normalne inhibitory allosteryczne, prawdopodobnie wskutek genetycznie uwarunkowanego defektu struktury wewnętrznej enzymu uniemożliwiającego wiązanie efektorów (36).

Na pograniczu patologii i fizjologii leżą zmiany procesów regulacyjnych wywołane działaniem leków z grupy środków uspokajających (1). W narkomanii procesy regulacyjne są przesunięte na inny poziom, toteż nagłe odstawienie narkotyku wywołuje „kryzys metaboliczny” objawiający się w komórce nadmiarem niektórych produktów przemiany i burzliwymi reakcjami ustroju. Stopniowe odstawianie leku umożliwia powrót systemów regulacyjnych do równowagi. Podobne sytuacje powstają w przewlekłych stanach chorobowych, powodujących długotrwałe zmiany systemu kontroli, jak na przykład w przewlekłej niewydolności krążenia, czy w marskości wątroby (1).

LITERATURA

1. Atkinson D. E., *Science* **150**, 851 (1965).
1. Atkinson D. E., *Annual Rev. Biochem.* **35**, 85 (1966).
3. Basu S. K., Chakrabarty A. M., Roy S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 713 (1965).
4. Caskey C. T., Ashton D. M., Wyngaarden J. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 2570 (1964).
5. Datta P., Gest H., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **52**, 1004 (1964).
6. Dische Z., *Bull. Soc. Biochem. Franc.* **23**, 1140 (1940).
7. Fernandez-Moran H., Reed L. J., Koike M., Willms C. R., *Science* **145**, 930 (1964).
8. Gerhardt J. C., Pardee A. B., *J. Biol. Chem.* **237**, 891 (1962).
9. Gerhardt J. C., Pardee A. B., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 491 (1963).
10. Hathaway J. A., Atkinson D. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 2875 (1963).
11. Kelley W. N., Rosenbloom T. M., Seegmiller J. E., *J. Clin. Invest.* **46**, 1518 (1967).
12. Kleppe K., Sanner T., Pihl A., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 210 (1966).
13. Kornfeld R., *J. Biol. Chem.* **242**, 3135 (1967).
14. Kornfeld S., Kornfeld R., Neufeld E. F., O'Brien P. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **52**, 371 (1964).
14. Koshland D. E., *Science* **142**, 1533 (1963).
15. Koshland D. E., *Biochemistry* **5**, 365 (1966).
16. Lehninger A. J., *Naturwissenschaften* **53**, 57 (1966).
17. Lynen F., w *New Perspectives in Biology*, red. M. Sela, Amsterdam 1964, str. 132.
18. Mansour T. E., *J. Biol. Chem.* **240**, 2165 (1965).
19. Masters M., Donackie W. D., *Nature* **209**, 476 (1966).
20. Mc Fadden B. A., Howes W. V., *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 415 (1965).
21. Monod J., *Science* **154**, 475 (1966).
22. Monod J., Changeaux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* **6**, 306 (1963).

23. Monod J., Wyman J., Changeaux J. P., *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
24. Moses V., *Biochem. J.* **103**, 650 (1967).
25. Moyed H. S., Umbarger H. E., *Physiol. Rev.* **42**, 444 (1962).
26. Nakada D., Magasanik B., *J. Mol. Biol.* **8**, 105 (1964).
27. Numa S., Ringeemann E., Lynen F., *Biochem. Z.* **343**, 243 (1965).
28. Okinaka R. T., Dobrogosz W. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 451 (1967).
29. Passonneau J. V., Lowry O. H., *Advan. Enz. Regul.* **2**, 265 (1965).
30. Potter V. R., *Univ. Mich. Med. Bul.* **23**, 400 (1957).
31. Prager M. D., Young J. E., Atkins J. C., *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 768 (1967).
32. Ramaian A., Hathaway J. A., Atkinson D. E., *J. Biol. Chem.* **239**, 3619 (1964).
33. Reed L. J., Cox D. J., *Annual Rev. Biochem.* **35**, 57 (1966).
34. Siperstein M. D., Fagan V. M., *Advan. Enz. Regul.* **2**, 249 (1963).
35. Siperstein M. D., Fagan V. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 602 (1966).
36. Sorensen L. B., Benke P. J., *Nature* **213**, 1122 (1967).
37. Stadtman E. R., *Bakteriol. Rev.* **27**, 170 (1963).
38. Stadtman E. R., *Advan. Enzymol.* **28**, 41 (1966).
39. Taketa K., Pogell B., *J. Biol. Chem.* **240**, 651 (1965).
40. Talal N., Tomkins G. M., Mushinski J. F., Yielding K. L., *J. Mol. Biol.* **8**, 46 (1964).
41. Tsuboi K. K., *J. Biol. Chem.* **240**, 582 (1965).
42. Umbarger H. E., *Science* **123**, 848 (1956).
43. Umbarger H. E., *Science* **145**, 674 (1964).
44. Uyeda K., Racher E., *J. Biol. Chem.* **240**, 4682 (1965).
45. Volkenstein M. V., Goldstein B. N., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 478 (1966).
46. Weber G., Henry M. C., Wagle S. R., Wagle D. S., *Advan. Enz. Regul.* **2**, 335 (1964).
47. Weitzman P. D. J., Wilson J. B., *J. Biol. Chem.* **241**, 5481 (1966).
48. Wheeler G. P., Alexander J. A., Morris H. P., *Advan. Enz. Regul.* **2**, 347 (1964).
49. Williams V. R., Lartigue D. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 2973 (1967).
50. Yates R. A., Pardee A. D., *J. Biol. Chem.* **221**, 757 (1956).

ANNA ODRZYWOLSKA *

Struktura i własności makroglobuliny γ M

Structure and Properties of Macroglobulin γ M

The properties and structure of macroglobulin γ M are described.

Makroglobulina γ M jest wysokocząsteczkowym, heterogennym białkiem surowicy, zawierającym do 10% węglowodanów i wykazującym aktywność przeciwciała; stanowi ona 5—10% wszystkich immunoglobulin. Po raz pierwszy wykryto ją u koni hyperimmunizowanych wielocukrowcem pneumokoków (34). Później obecność jej stwierdzono również w surowicach innych zwierząt oraz w normalnych i patologicznych surowicach ludzkich. Na podstawie ruchliwości elektroforetycznej w pH 8,6 białko to zaliczono do γ -globulin, wędruje ono nieco szybciej od głównego składnika tej frakcji — 7S γ G-globuliny. W elektroforezie strefowej występuje między γ i β -globulinami. W immunoelektroforezie daje linię precypitacyjną w strefie β_2 i z tego powodu bywa określane symbolem β_2 M. Ciężar cząsteczkowy γ M-globulin jest rzędu 1 miliona. Wartość stałej sedymentacji głównej komponenty tej frakcji białek wynosi 19S i od niej wywodzi się spotykana często nazwa 19S γ -globulina. Według Komitetu Nomenklatury dla ludzkich immunoglobulin przy Światowej Organizacji Zdrowia wysokocząsteczkowe γ -globuliny oznacza się symbolami γ M, lub IgM.

Stosując metody chemiczne i enzymatyczne rozbito cząsteczki γ -globulin na mniejsze jednostki strukturalne i indywidualne łańcuchy polipeptydowe. Najdokładniej są scharakteryzowane globuliny klasy γ G. Na tej frakcji opracowano model podstawowej struktury składającej się z dwóch ciężkich i dwóch lekkich łańcuchów polipeptydowych, połączonych między sobą mostkami dwusiarczkowymi i wiązaniami niekowalencyjnymi (23, 29). Łańcuchy lekkie są podobne, albo identyczne u wszystkich poznanych dotąd typów γ -globulin, natomiast łańcuchy ciężkie są specyficzne dla każdej klasy. Wyniki badań nad strukturą i własnościami immunoglobulin przedstawiono w wyczerpujących artykułach przeglądowych (5, 28, 43, 67), uwzględniających głównie obserwacje odnoszące się do najlepiej po-

* Mgr, Zakład Biochemii Instytutu Reumatologii, Warszawa

znanych cząstek 7S γ G-globulin. Obszerne informacje o własnościach serologicznych immunoglobulin klasy γ G i γ M można znaleźć w pracy Pike, a (58).

Fizykochemiczne dane o makroglobulinach są jeszcze fragmentaryczne, wskazują jednak na istnienie podobieństw między γ M i γ G-globulinami.

Większość badań przeprowadzono na makroglobulinach typu Waldenstroma, które są patologicznym odpowiednikiem γ M globulin normalnych, nie różnią się od nich pod względem składu aminokwasów i posiadają wspólne z nimi determinanty antygenowe (40, 44, 52).

I. Otrzymywanie γ M-globuliny

Uzyskanie względnie jednorodnego preparatu 19S globulin jest trudne. Proces ich otrzymywania składa się zazwyczaj z dwóch etapów. W pierwszym oddziela się je od głównej masy białek surowicy, najczęściej drogą wytrącania przy niskiej sile jonowej przez rozcieńczenie surowicy wodą (24, 33, 49), albo dializę wobec buforu (12, 25). Następnie wyodrębnia się frakcję 19S za pomocą chromatografii na DEAE celulozie (25) lub sączenia na żelach agarowych (49). Chaplin i wsp. (12) otrzymali czystą frakcję γ M-globuliny stosując kolejno dializę, ultrawirowanie w gradiencie gęstości, chromatografię na DEAE celulozie i sączenie przez *Sephadex G 200*. Onue i wsp. (56) otrzymali w wysokim stopniu oczyszczony preparat przez połączenie metody elektroforetycznej na blokach agarowych i sączenie przez *Sephadex G 200*.

II. Własności fizykochemiczne

Ciężary cząsteczkowe γ M-globulin ludzkich i zwierzęcych oznaczone różnymi metodami mieszczą się w granicach od 0,75 do $1,28 \times 10^6$ (7, 32, 41, 42, 49, 50). W ultrawirówce zarówno normalne, jak i patologiczne γ M-globuliny wykazują charakterystyczną heterogenność: około 90% frakcji stanowi komponenta o stałej sedymentacji między 17—20S, pozostała część — cząstki około 30 i 35—40S, będące prawdopodobnie dimerem i trimerem głównego składnika (30, 32, 49).

Dla oznaczenia cech morfologicznych przeciwciał Almeida i wsp. (1) immunizowali świnki morskie wirusem FMDV (*foot and mouth disease virus*) i porównywali w mikroskopie elektronowym kompleksy utworzone przez wirus z izolowanymi 7S i 19S immunoglobulinami. Obydwa rodzaje przeciwciał w obrazie mikroskopowym mają postać włókna o rozmiarach w przybliżeniu, dla 7S globulin $27 \times 250 \text{ \AA}$, dla 19S globulin $50 \times 370 \text{ \AA}$.

Globuliny klasy γ M są nierozpuszczalne w wodzie, rozpuszczają się w obojętnych roztworach soli i w alkaliach. W pH 11,9 ulegają części-

wej denaturacji (39). Usunięcie wody przez liofilizację prowadzi do zmian strukturalnych i białko staje się nierozpuszczalne (41). Guanidyna i detergenty powodują odwracalne zmiany z wzrastającą asymetrią we wzroście sedymentacji. Te efekty wiąże się z odwracalną asocjacją cząstek (8). Nie stwierdzono zmian w stałych sedymentacji przy różnych pH w granicach 3,5—8,6 i w 6,6M roztworze mocznika. Ultradźwięki nie powodują rozbicia makrocząsteczki na podjednostki (60). Duże rozbieżności wykazują wartości granicznej liczby lepkości, które dla różnych preparatów makroglobulin wahają się od 0,06 dl g^{-1} do 0,2 dl g^{-1} (8, 36, 39, 49). Punkt izoelektryczny zawarty jest w przedziale pH 6,4—7,7 (8, 39).

III. Struktura γ M globulin

1. Degradacja chemiczna

Pod wpływem związków sulfhydrylowych, na przykład merkaptoetanolu, makrocząsteczka ulega rozbiciu na podjednostki o stałej sedymentacji około 7S (19, 24). Po usunięciu czynnika redukującego podjednostki te tworzą agregaty około 13 i 18S, które można ponownie rozbić działając czynnikiem redukującym (20). Wprowadzenie związków blokujących grupy sulfhydrylowe zapobiega powstawaniu agregatów (17, 18). Działanie innymi związkami redukującymi: cysteiną i tiotreitiolem prowadzi również do rozbicia makrocząsteczki na podjednostki, oznaczone symbolem γM_s , o bardzo podobnych wartościach stałej sedymentacji i ciężarze cząsteczkowym 185 000 (49). Mostki siarczkowe są prawdopodobnie jedynymi wiązaniami łączącymi podjednostki w makrocząsteczki 19S, ponieważ w warunkach, w których wiązania niekowalencyjne ulegają rozerwaniu, cząsteczki 19S nie rozpadają się (19). Fakt, że po redukcji nie zwiększa się ilość N-końcowych aminokwasów, wskazuje, że wiązania peptydowe również nie biorą udziału w łączeniu podjednostek (50, 55, 60). Zalkilowane monomery 7S (γM_s) podobnie jak zredukowane γ G-globuliny ulegają w środowisku 1N kwasu octowego lub propionowego dysocjacji na łańcuchy polipeptydowe ciężkie i lekkie (26, 42). Ciężary cząsteczkowe lekkich łańcuchów zarówno γ M, jak i γ G-globulin wynoszą około 23 000 (15, 26, 64), natomiast łańcuchy ciężkie γ M-globulin (μ) mają większy ciężar cząsteczkowy (około 70 000) niż łańcuchy ciężkie γ G-globulin (około 50 000) (15, 42, 57, 65).

Ilość grup -SH uwalnianych podczas redukcji γ M-globulin wskazuje na obecność 24—25 wiązań dwusiarczkowych w cząsteczce (50). Ponieważ redukcja tej ilości wiązań wystarcza do uwolnienia wszystkich łańcuchów peptydowych, a w stosowanych warunkach tylko wiązania międzyłańcuchowe ulegają rozerwaniu, liczba ta reprezentuje całkowitą ilość

wiązań międzylańcuchowych. Na podstawie proporcji łańcuchów ciężkich i lekkich w podjednostkach γM_s i stosunku grup sulfhydrylowych na łańcuchach ciężkich i lekkich (4:1), Miller i Metzger (50, 51) uważają za prawdopodobne, że jej podstawowa struktura nie różni się od czterołańcuchowego modelu przyjętego przez większość badaczy dla cząsteczki γG -globulin (26, 27, 45, 59).

2. Charakterystyka łańcuchów

Łańcuchy lekkie γM i γG -globulin wykazują wiele wspólnych cech. Jednakowo zachowują się w elektroforezie na żelu skrobiowym w buforze mocznik—kwas mrówkowy pH 5,3 i mocznik—glicyna w środowisku obojętnym (9, 15), mają podobny skład aminokwasowy i są nosicielami determinant antygenowych, wspólnych dla obu klas globulin (12, 15, 16, 30). Znaczne różnice wykazano pomiędzy łańcuchami ciężkimi, które posiadają determinanty antygenowe specyficzne dla każdej klasy globulin (14, 31). W elektroforezie łańcuchy μ γM -globulin wykazują mniejszą ruchliwość niż łańcuchy γ (14). Przy tym samym jakościowym składzie aminokwasowym łańcuchów γ i μ stwierdzono dość znaczne różnice ilościowe. Łańcuchy μ ludzkich γM -globulin zawierają więcej alaniny, argininy i izoleucyny, a mniej seryny i tyrozyny w porównaniu z łańcuchami γ (12). U królików w ciężkich łańcuchach IgM zawartość seryny, alaniny i fenyloalaniny jest wyższa, a kwasu asparaginowego mniejsza (42).

Analiza aminokwasów skrajnych wskazuje na obecność różnych łańcuchów peptydowych. Podobnie jak w ludzkiej γG -globulinie jako N-końcowe aminokwasy w przewodzie występują kwasy asparaginowy i glutaminowy (4, 37, 60), znaleziono również serynę, alaminę i glicynę (39). Dwupeptydową sekwencję C-końcowych aminokwasów stanowi prawdopodobnie tyrozylocysteina, chociaż nie wyklucza się możliwości sekwencji odwrotnej (22).

Z polipeptydowymi łańcuchami, przede wszystkim ciężkimi γG i γM -globulin związana jest komponenta węglowodanowa. W łańcuchach μ jest jej prawie czterokrotnie więcej, niż w łańcuchach γ .

Części peptydowa i wielocukrowa w γG -globulinach połączone są wiązaniem kowalencyjnym przez β -karboksyl kwasu asparaginowego (53, 61). W makroglobulinach prawdopodobnie również występują wiązania kowalencyjne (39). W różnych obszarach ciężkiego łańcucha μ jest rozmieszczonych 5—6 łańcuchów oligosacharydowych (3).

Glikopeptydowa frakcja γM i γG -globulin różnią się znacznie składem aminokwasowym. Cl a m p i Put n a m (13) wyodrębnili z γG -globuliny ludzkiej dwa glikopeptydy, które zawierały asparaginę, treoninę, serynę, kwas glutaminowy, tyrozynę i argininę. W frakcjach glikopeptydowych makroglobuliny Waldenstroma oprócz asparaginy, kwasu glutaminowego, seryny i treoniny występujących w takich samych lub

podobnych proporcjach jak w γ G-globulinach, stwierdzono również obecność lizyny, fenyloalainy, proliny, glicyny, alaniny i histydyny, a brak tyrozyny i argininy (3).

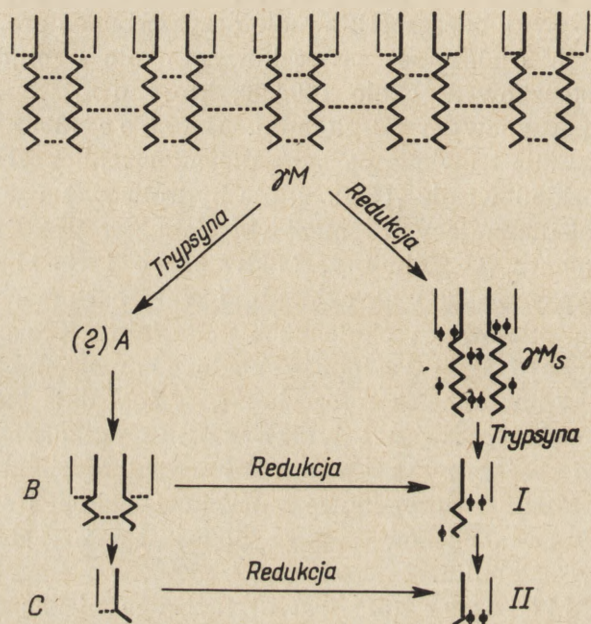
3. Rozszczepienia enzymatyczne

Trawienie γ M-globulin enzymami proteolitycznymi prowadzi do rozszczepienia makrocząsteczki na fragmenty o mniejszych ciężarach cząsteczkowych. Pappenheimer i Peterman (cytowane według 33) używając pepsyny odszczepili z mało oczyszczonego preparatu immunoglobuliny końskiej o ciężarze cząsteczkowym około 1 miliona, fragment o ciężarze cząsteczkowym około 100 000, który uważali za identyczny z fragmentem pepsynowym γ G-globulin. Harboe (33) stwierdził jednak, że γ M-globulina trawiona pepsyną ulega znacznie szybszemu i dalej posuniętemu rozkładowi niż γ G-globulina hydrolizowana w tych samych warunkach, a niedializujący fragment γ M-globuliny jest lżejszy od pepsynowego fragmentu γ G-globuliny. Mihaesco i Seligmann (48) z hydrolizatu pepsynowego makroglobuliny Waldenstroma, uzyskali dwie frakcje. Lżejszą, stanowiącą około 80% materiału reprezentują drobne peptydy. W drugiej frakcji występuje składnik homogenny przy ultrawrowaniu, który w immunoelektroforezie z anty IgM daje jedną linię precipitacyjną. Z badań podwójnej dyfuzji w żelu wynika, że fragment ten jest antygenowo uboższy od natywnej γ M i podjednostki γ M_S, ale zawiera wszystkie determinanty antygenowe łańcuchów lekkich i część determinant antygenowych łańcuchów ciężkich, podobnie jak fragmenty wiążące antygen (Fab) γ G-globulin.

Miller i Metzger (51) trawili trypsyną nienaruszoną cząstkę γ M-globuliny i powstającą przez jej redukcję podjednostkę γ M_S (schemat 1). Z γ M-globuliny powstaje mieszanina produktów, z której przez sączenie przez *Sephadex G 100* wyodrębniono trzy wysokomolekularne składniki: A, B i C. Natura komponenty A nie została wyjaśniona. Komponentę B, o ciężarze cząsteczkowym 114 000, stanowi fragment złożony z łańcuchów ciężkich i lekkich, homogenny pod względem sedymentacji i jednorodny w immunoelektroforezie. Fragment C ma ciężar cząsteczkowy 47 000, zawiera determinanty antygenowe łańcuchów ciężkich i lekkich. Występuje w nim pojedynczy mostek dwusiarczkowy. W wyniku trawienia γ M_S powstają dwa produkty: γ M_S-I i γ M_S-II. Fragment γ M_S-I odpowiada połowie cząsteczki niezredukowanego fragmentu B i jest z nim identyczny pod względem antygenowym. Fragment γ M_S-II różni się nieznacznie ciężarem cząsteczkowym od fragmentu C, a w porównaniu z γ M_S-I jest uboższy o pewne determinanty antygenowe łańcucha μ . Redukcja fragmentów B i C prowadzi odpowiednio do powstania produktów γ M_S-I i γ M_S-II. Trypsynowe fragmenty γ M-globulin

wykazują uderzające podobieństwo do pepsynowych i papainowych fragmentów Fab γ G-globulin (10, 45, 54).

Badania nad trawieniem papainą w obecności cysteiny przeprowadziło kilku autorów na preparatach makroglobuliny Waldenstroma (21, 46, 48, 56) oraz na normalnej IgM królika (66). Mihaesco i Seligmann (48) po 24-godzinnej hydrolizie enzymatycznej otrzymali mieszaninę produktów, która na żelu *Sephadex* G 100 rozdziela się na 4 frakcje. W pierwszej występuje fragment uboższy antygenowo od natywnej cząsteczki, od podjednostki γ M_S i pełnego preparatu łańcuchów ciężkich i nie zawie-



Schemat 1. Rozszczepienie trypsyną γ M-globuliny i podjednostki γ M_S

— łańcuch ciężki, — łańcuch lekki, wiązanie dwusiarczkowe, —|— zredukowane wiązanie dwusiarczkowe

rający determinant antygenowych łańcuchów lekkich. Frakcja ta stanowi 2—5% całkowitego białka i odpowiada prawdopodobnie fragmentowi krystalizującemu (Fc) γ G-globulin. We frakcji drugiej występuje pojedynczy produkt prawie identyczny z pepsynowym fragmentem Fab γ M, ale o nieco większej ruchliwości elektroforetycznej. Frakcji trzeciej i czwartej zawierających mieszaninę mniejszych fragmentów nie analizowano. Ilość dializujących peptydów wynosi około 60% całkowitego białka. Onue i wsp. (56) trawili papainą w obecności cysteiny podjednostkę γ M_S. Po 16-godzinnej hydrolizie 48% białka ulega rozpadowi do dializujących peptydów. Reszta uwalnia się w postaci mieszaniny fragmentów 3,2S, o ciężarze cząsteczkowym 50 000, składających się z nieznaruszonych łańcuchów lekkich i części łańcuchów ciężkich. Wykazują

one wiele cech wspólnych z fragmentem Fab γ G. Po krótkotrwałym trawieniu papainą (45 min.) autorzy uzyskali frakcję odpowiadającą (Fc) γ G-globulin, która zawiera większość determinant antygenowych występujących w nienaruszonej cząsteczce. Z tym odcinkiem łańcuchów ciężkich związana jest większość komponenty węglowodanowej. U n g a r - W a r o n i wsp. (66) z trawionej papainą króliczej globuliny IgM uzyskali dwie frakcje, odpowiadające fragmentom Fab I i Fab II IgG. Obie frakcje reagowały z surowicą anty Fab IgG, prawdopodobnie na skutek obecności wspólnych determinant antygenowych w łańcuchach lekkich γ M i γ G-globulin.

Na podstawie uzyskanych dotychczas danych uważa się że makrocząsteczka γ M-globulin składa się z 5 podjednostek γ M_S, a cały układ pentameryczny stabilizowany jest mostkami dwusiarczkowymi między łańcuchami ciężkimi podjednostek. Liczba i lokalizacja wiązań łączących podjednostki nie jest znana. Ponieważ podjednostki γ M_S wykazują tendencję do łączenia się w cząsteczkę o określonej wielkości, a nie tworzą przypadkowych polimerów, M i l l e r i M e t z g e r (50) dyskutują możliwość uporządkowania podjednostek w termodynamicznie stabilny pierścień.

Z wartości czasów relaksacji, uzyskanych na podstawie pomiarów polaryzacji fluorescencji makrocząsteczki, podjednostki γ M_S i trypsynowego fragmentu Fab μ sprzężonych z chlorkiem 1-dwumetyloamino-naftalenosulfonylu, M e t z g e r i wsp. (47) przypisują γ M-globulinie konformację elastyczną, to jest taką, w której poszczególne komponenty makrostruktury nie są związane ze sobą w sposób sztywny.

Sposób ułożenia łańcuchów wewnątrz cząsteczki nie jest znany. J i r g e n s o n (38) badając dyspersję rotacji optycznej γ M-globulin stwierdził istnienie α -heliksu w cząsteczce. C a l l a g h a m i M a r t i n (6) na podstawie wartości z zachowania się skręcalności optycznej w polarnych i niepolarnych rozpuszczalnikach sugerują obecność prawoskrętnej α -spirali i form β w cząsteczce.

IV. Związek pomiędzy strukturą i funkcją przeciwciała

Immunoglobuliny γ M wykazują cechy przeciwciał kompletnych, co w reakcji serologicznej wyraża się zdolnością do swoistego łączenia się z antygenem, a w zależności od badanego układu, precypitacją, aglutynacją, lizą lub neutralizacją wirusa. Uzyskane przez zredukowanie makrocząsteczki podjednostki γ M_S, w przeciwieństwie do zredukowanych γ G-globulin, tracą zdolność do wywołania drugiego etapu reakcji serologicznej, co nie jest spowodowane uszkodzeniem miejsc wiążących antygen. Zdolność wiązania antygeny jest zachowana w przypadku przeciwciał anty Rh, które po redukcji dawały pozytywną reakcję w teście

Coombsa (11). Okazało się, że zredukowane izoaglutyniny powodują hamowanie aglutynacji przez natywne izoaglutyniny (35). Uzyskano też specyficzne hamowanie nie zredukowanego homologicznego systemu precipitującego przez produkty redukcji wysokocząsteczkowych przeciwciała skierowanych na albuminę surowicy bydłowej (2). Podjednostki uzyskane przez redukcję i alkilację IgM anty- γ -globulin wykazują aktywność anty γ -globulinową (62,63). Bezpośredniego dowodu zachowania aktywności wiązania antygeny przez podjednostki dostarczyła radioimmuno-elektroforeza zredukowanych makroglobulin królika z aktywnością przeciwciała skierowaną na *p*-azobenzoarsenian (55).

Utrata zdolności do wywołania widocznego efektu reakcji serologicznej przez podjednostki γM_s nie została dotychczas wyjaśniona. Proponowany przez Millera i Metzgera (51) model struktury podjednostki 7S uzyskanej przez redukcję i alkilację immunoglobulin γM zakłada istnienie dwóch miejsc potencjalnie zdolnych do wiązania antygeny, co w przypadku 7S γG -globulin jest wystarczającym warunkiem dla zachowania pełnej aktywności przeciwciała nawet po traktowaniu czynnikami redukującymi (17). Nie wyklucza się możliwości, że odrębności w zachowaniu aktywności przeciwciała w zredukowanych γG -globulinach i podjednostkach γM_s wynikają z różnic między innymi obszarami cząsteczki, niż miejsca wiążące antygen.

Wydaje się, że do wyjaśnienia tego zagadnienia będą mogły przyczynić się badania nad aktywnością przeciwciała w dwuwartościowych fragmentach γM -globulin, otrzymywanych przez kontrolowaną w czasie hydrolizę enzymatyczną, prowadzoną w nieobecności czynników redukujących.

LITERATURA

1. Almeida J. D., Brown F., Waterson A. P., *J. Immunol.* **57**, 1490 (1967).
2. Benedict A. A., Larson C., Nik-Khan H., *Science* **139**, 1302 (1963).
3. Bourrillon R., Razafimahaleo E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 1115 (1967).
4. Brackenridge C. J., *Immunochem.* **4**, 227 (1967).
5. Buchowicz I., *Post. Biochem.* **12**, 5 (1966).
6. Callaghan P., Martin N. H., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 539 (1964).
7. Caputo A., Apella E., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 149 (1960).
8. Caputo A., Apella E., *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 201 (1960).
9. Carbonara A. O., Heremans J. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 137 (1963).
10. Cebra J. J., Ginol D., Silman H., Katchalsky E., *J. Biol. Chem.* **236**, 1720 (1961).
11. Chan P. C., Deutsch H. F., *J. Immunol.* **85**, 37 (1960).
12. Chaplin H., Cohen S., Press E. M., *Biochem. J.* **95**, 256 (1965).
13. Clamp J. R., Putnam F. W., *J. Biol. Chem.* **239**, 3233 (1964).

14. Cohen S., *Nature* **197**, 253 (1963).
15. Cohen S., *Biochem. J.* **89**, 334 (1963).
16. Cohen S., Porter R. R., *Biochem. J.* **90**, 278 (1964).
17. Cooper A. C., *Science* **157**, 933 (1967).
18. Deutsch H. F., Greenwood F. C., *Federation Proc.* **19**, 344 (1960).
19. Deutsch H. F., Morton J. J., *Science* **125**, 600 (1957).
20. Deutsch H. F., Morton J. J., *Biochem. J.* **231**, 1107 (1958).
21. Deutsch H. F., Stiehm E. R., Morton J. J., *J. Biol. Chem.* **236**, 2216 (1961).
22. Doolittle R. R., Singer S., Metzger H., *Science* **154**, 1561 (1966).
23. Edelman G. M., Gally J. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **51**, 846 (1964).
24. Edelman G. M., Poulik M. D., *J. Exptl. Med.* **113**, 861 (1961).
25. Fahey J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 440 (1962).
26. Fleishman J. B., Pain R. H., Porter R. R., *Arch. Biochem. Biophys. suppl.* **1**, 174 (1962).
27. Fleishman J. B., Porter R. R., Press E. M., *Biochem. J.* **88**, 220 (1963).
28. Fleishman J. B., *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 632 (1966).
29. Fougereau M., Edelman G. M., *J. Exptl. Med.* **121**, 373 (1965).
30. Franklin E. C., *J. Immunol.* **85**, 138 (1960).
31. Franklin E. C., Frangione B., *J. Immunol.* **99**, 810 (1967).
32. Georges M. C., Guinand S., Arrio B., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **261**, 3687 (1965).
33. Harboe M., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**: (suppl. 84), 233 (1965).
34. Heidelberger M., Pedersen K. O., *J. Exptl. Med.* **65**, 393 (1937).
35. Jacot-Guillarmond H., *Vox Sanguinis* **7**, 675 (1962).
36. Jahnke K., Scholtan W., Heinzler F., *Helv. Med. Acta* **25**, 2 (1958).
37. Jasselin J., Gombert J., Masseyeff R., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **260**, 3519 (1965).
38. Jirgenson B., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 48 (1960).
39. Jirgenson B., Ikenaka T., Gorguraki V., *Clin. Chim. Acta* **5**, 502 (1960).
40. Korngold L., Van Leeuwen G., *J. Exptl. Med.* **106**, 467 (1957).
41. Kovacs A. M., Daune M., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 249 (1961).
42. Lamm M., Small P., *Biochemistry* **5**, 267 (1966).
43. Lennox E. S., Cohn M., *Annual Rev. Biochem.* **36**, 365 (1967).
44. Mandema E., Van der Scharaf P. C., Huisman T. H. J., *J. Lab. Clin. Med.* **45**, 261 (1955).
45. Marler E., Nelson C. A., Tanford C., *Biochemistry* **3**, 279 (1964).
46. Metzger H., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **57**, 1490 (1967).
47. Metzger H., Perlman R. L., Edelhoeh H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1741 (1966).
48. Mihaesco C., Seligmann M., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **262**, 2661 (1966).
49. Miller F., Metzger H., *J. Biol. Chem.* **240**, 3325 (1965).
50. Miller F., Metzger H., *J. Biol. Chem.* **240**, 4740 (1965).
51. Miller F., Metzger H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1732 (1966).
52. Morton J. J., Deutsch H. F., *Biochem. J.* **231**, 1119 (1958).
53. Nolan C., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 446 (1962).
54. Nissonoff A., Markus G., Wissler F. C., *Nature* **189**, 293 (1961).
55. Onoue K., Yagi J., Stelos O., Pressman D., *Science* **146**, 404 (1964).
56. Onoue K., Kishimoto T., Yamamura Y., *J. Immunol.* **98**, 303 (1967).
57. Pain R. H., *Biochem. J.* **88**, 234 (1963).
58. Pike R. M., *Bacteriol. Rev.* **31**, 157 (1967).
59. Porter R. R., *Biochem. J.* **73**, 119 (1959).

60. Putnam F., *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 67 (1959).
61. Rosevear J. W., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2 (1961).
62. Schrohenloker R. E., *J. Immunol.* **99**, 115 (1967).
63. Schrohenloker R. E., Kunkel H. G., Tomasi T. B., *J. Exptl. Med.* **120**, 1215 (1964).
64. Small P. A., Kehn J. E., Lamm M. E., *Science* **142**, 393 (1963).
65. Small P. A., Lamm M. E., *Biochemistry* **5**, 259 (1966).
66. Ungar-Waron H., Jatou J. C., Sela H., *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 542 (1967).
67. Zabłocki B., *Post. Mikrobiol.* **5**, 17 (1966).

MAGDALENA JELEŃSKA*

Niektóre zagadnienia metabolizmu proliny

Some Problems of Proline Metabolism

The actual views on the proline metabolism are presented

Prolinę (kwas pirolidyno-2-karboksylowy), pięciowęglowy aminokwas o budowie pierścieniowej, otrzymał Wilstätter w roku 1900 na drodze syntezy z estru α , δ -dwubromopropylomalonowego, a w rok później Emil Fischer wyodrębnił ją z hydrolizatów kazeiny. Prolina jest szeroko rozpowszechniona i występuje niemal we wszystkich białkach. Najwyższą jej zawartość znaleziono w kolagenie (14,7%) oraz w żelatynie (16,4%) (22). Prolina odgrywa szczególną rolę w kształtowaniu struktur cząsteczek białkowych, gdyż wywołuje zaburzenia struktury α -heliksu. Poznano dotychczas dwa związki, które mogą wbudowywać się do cząsteczek białek w miejsce proliny: kwas azetydino-2-karboksylowy i 3,4-dehydroprolinę (19, 20). Wbudowanie tych analogów do białek *Escherichia coli* i kielków bobu powoduje zahamowanie wzrostu.

Już w pierwszych badaniach nad metabolizmem proliny zwrócono uwagę na pokrewieństwo strukturalne pięciowęglowych aminokwasów: proliny, kwasu glutaminowego, ornityny i hydroksyproliny. W toku dalszych badań udało się ustalić wzajemne biochemiczne powiązania między nimi (schemat 1).

I. Zależności metaboliczne między kwasem glutaminowym a prolina

1. Przemiana kwasu glutaminowego w prolina

W 1910 roku Adberhalden (2) zaobserwował, że kwas glutaminowy może zastąpić prolina w diecie warunkującej normalny wzrost

* Mgr inż., Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: Δ' -PYR-5-CA — kwas pirolino-5-karboksylowy, Δ' -PYR-2-CA — kwas pirolino-2-karboksylowy Δ' -PiP-2-CA — kwas piperidyno-2-karboksylowy

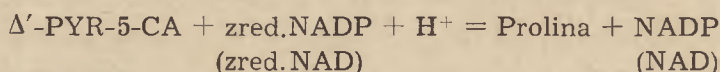
młodych psów. Bezpośredniego dowodu przemiany kwasu glutaminowego w prolinę dostarczyli Sallach, Koeppe i Rose (44), którzy po podaniu szczurom w diecie kwasu glutaminowego znakowanego ^{14}C stwierdzili wbudowanie izotopu do cząsteczek proliny. W badaniach nad pośrednimi etapami tej przemiany używano mutantów drobnoustrojów, w których biosynteza proliny była blokowana na różnych etapach. Abderhalden przypuszczał, że związkciem pośrednim jest bezwodnik kwasu glutaminowego — kwas 2-pirolidyno-5-karboksylowy. Forbes i Sevag (18) zaobserwowali, że choć związek ten może zastąpić kwas glutaminowy jako czynnik wzrostowy dla auktotrofu *M. pyrogenes*, nie jest jednak czynnikiem wzrostowym dla auktotrofów prolinowych *E. coli* i *M. pyrogenes*. Nie stwierdzono również jego przemiany w kwas glutaminowy ani w prolinę w skrawkach nerki i wątroby (35), co wskazuje, że nie jest on prekursorem proliny. Produktem pośrednim w przemianie kwasu glutaminowego w prolinę, jak wykazali Vogel i Davis (62) jest γ -semialdehyd glutaminowy, który pozostaje w równowadze z kwasem Δ' -pirolino-5-karboksylowym (Δ' -PYR-5-CA). Autorzy ci badali różne mutanty *E. coli*: dla *E. coli* „55-1” substancją wzrostową była prolina, dla *E. coli* „55-25” — prolina lub γ -semialdehyd glutaminowy, a dla *E. coli* „22-64” — prolina, γ -semialdehyd glutaminowy i kwas glutaminowy. Te różne zapotrzebowania na czynniki wzrostowe Vogel i Davis tłumaczyli istnieniem bloków metabolicznych. Pierwszy z mutantów nie zawierał reduktazy pirolinowej redukującej Δ' -PYR-5-CA do proliny i dlatego ani kwas glutaminowy ani γ -semialdehyd glutaminowy nie podtrzymywały jego wzrostu. Drugi mutant nie wykazał zdolności do redukcji kwasu glutaminowego i dlatego w obecności tego związku bakterie nie rosły. U trzeciego mutantu *E. coli* nie było żadnego bloku w przemianie kwasu glutaminowego w prolinę i w tym przypadku bakterie rosły w obecności któregośkolwiek z trzech podawanych związków. Ta droga syntezy istnieje też u *Neurospora crassa*, *Torula utilis*, *Aspergillus nidulans* i innych mikroorganizmów (1, 47, 53, 64, 67, 69, 71), oraz w organizmach zwierzęcych (36, 44, 48).

Cyklizacja γ -semialdehydu glutaminowego do Δ' -PYR-5-CA (reakcja 2 w schemacie 1) jest nieenzymatyczna (56, 62). Dwie pozostałe reakcje tego szlaku wymagają natomiast udziału enzymów (54, 55, 62, 64, 71).

Mechanizm redukcji kwasu glutaminowego (reakcja 1 w schemacie 1) do jego γ -semialdehydu nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony (49, 54, 55). Przypuszcza się, że jest on taki sam jak redukcji kwasu asparaginowego do γ -semialdehydu asparaginowego. Również enzym katalizujący redukcję kwasu glutaminowego nie został dotychczas bliżej poznany.

Redukcja Δ' -PYR-5-CA (reakcja 3 w schemacie 1) przebiega w obecności zredukowanego NADP lub zredukowanego NAD i reduktazy pirolinowej występującej we frakcji białek rozpuszczalnych (36, 47, 48, 69, 71). Enzym ten jest nietrwały, jednak oczyszczono go 40-krotnie z ekstraktów *N. crassa* (71)

oraz 160-krotnie z wątroby cielejcej (36). Prolina jest jedynym związkiem powstającym w wyniku redukcji Δ' -PYR-5-CA. Wskazuje na to równo-
ważność ilości produktów powstających w reakcji:



Bakteryjna reduktaza pirolinowa (24, 71) jest bardziej aktywna w obecności zred. NADP, a enzym z wątroby zwierzęcej — w obecności zred. NAD (36, 48). Optymalne *pH* dla reduktazy pirolinowej wynosi około 7 niezależnie od pochodzenia enzymu (36, 47, 48, 71). Reduktaza pirolinowa jest enzymem sulfhydrylowym (36, 47, 48, 71), na co wskazuje częściowa jego inaktywacja przez inhibitory grup -SH i reaktywacja po dodaniu niskocząsteczkowych związków tiolowych (glutation, merkaptoetanol).

Ponieważ cyklizacja do Δ' -PYR-5-CA jest odwracalna przypuszczano, że właściwym substratem reduktazy pirolinowej jest γ -semialdehyd glutaminowy. Smith i Greenberg (48) zauważyli, że reduktaza pirolinowa jest silnie hamowana przez substancje blokujące grupy tiolowe jak *p*-chlorobenzoesan rtęci, jodozobenzen oraz sole metali ciężkich, których działanie można znieść dodając γ -semialdehyd glutaminowy. Na podstawie tych faktów i w oparciu o powszechnie znaną zdolność aldehydów do reakcji z merkaptanami, autorzy wysunęli hipotezę, że substratem reduktazy pirolinowej jest γ -semialdehyd glutaminowy, który wiąże się z grupą sulfhydrylową w centrum aktywnym enzymu. Hipotezy tej nie potwierdziły wyniki prac Peisacha i Streckera (36), którzy badając bardziej oczyszczony preparat enzymatyczny nie stwierdzili ochronnej roli substratu wobec hamującego działania Cu^{2+} i Cd^{2+} na enzym. W związku z tym wysunęli oni przypuszczenie, że stymulujące działanie niskocząsteczkowych związków tiolowych wskazuje na udział grup -SH w utrzymaniu struktury reduktazy pirolinowej w formie aktywnej, co nie oznacza jednak, że grupy sulfhydrylowe występują w centrum aktywnym enzymu. Badając zaś działanie enzymu na pewne związki o strukturze podobnej do γ -semialdehydu glutaminowego i Δ' -PYR-5-CA autorzy doszli do wniosku, że właściwym substratem reduktazy pirolinowej jest jednak kwas Δ' -pirolino-5-karboksylowy.

2. Przemiana proliny w kwas glutaminowy

Utlenianie proliny poprzez γ -semialdehyd glutaminowy do kwasu glutaminowego zaobserwowano w wielu organizmach zwierzęcych, drobnoustrojach, oraz u niektórych roślin i owadów (7, 8, 21, 36, 43, 47, 48, 57, 59, 60, 68, 69, 71). Stetten i Schoenheimer (51) po podaniu szczurom w diecie proliny znakowanej deuterem i ciężkim azotem odnaj-

dowali obydwa izotopy w kwasie glutaminowym. Utlenienie proliny katalizowane jest przez oksydazę prolinową (reakcja 3 w schemacie 1) i dehydrogenazę pirolinową (reakcja 1 w schemacie 1). Enzymy te są różne od katalizujących przemianę kwasu glutaminowego w prolinę. Oksydaza proliny zlokalizowana jest w mitochondriach (14, 25), podczas gdy reduktaza pirolinowa katalizująca reakcję odwrotną, występuje we frakcji rozpuszczalnej (36, 47, 48, 69, 71). O istnieniu oksydazy prolinowej niezależnie od reduktazy pirolinowej świadczy również istnienie mutanta *E. coli*, u którego znaleziono oksydazę, natomiast nie stwierdzono obecności reduktazy (21).

Johnson i Strecker (25) badając oksydazę prolinową w mitochondriach wątroby szczura doszli do wniosku, że jest to enzym flawinowy. Erecińska i Szarkowska (14, 15) wyodrębniły i częściowo oczyściły oksydazę prolinową z mitochondriów nerki i wątroby szczura, oraz dostarczyły dalszych dowodów, że jest ona enzymem flawinowym.

Kwas Δ' -pirolino-5-karboksylowy powstający z proliny w wyniku działania oksydazy prolinowej jest utleniany dalej do kwasu glutaminowego przez dehydrogenazę pirolinową (13, 57).

Omówiony szlak metaboliczny proliny połączony jest z cyklem kwasów trójkarboksylowych poprzez kwas α -ketoglutarowy. Nie jest to jedyna możliwa droga łącząca prolinę z cyklem Krebsa. Chung-Mei-Ling i Hedrick (9) donieśli ostatnio o występowaniu u drożdży *Hansenula subpelliculosa* dwóch oksydaz prolinowych. Jedna z nich jest identyczna z wyżej opisaną, druga natomiast katalizuje utlenianie proliny do kwasu Δ' -pirolino-2-karboksylowego (Δ' -PYR-2-CA) (reakcja 4 w schemacie 1). Utlenianie to może być początkiem dalszych przemian prowadzących do kwasu α -ketoglutarowego.

Należałoby jeszcze wspomnieć o innych możliwościach powstawania γ -semialdehydu występującego w przemianie kwasu glutaminowego do proliny. Oprócz kwasu glutaminowego prekursorem może być również kwas α -amino- δ -hydroksywalerianowy (reakcja 5 w schemacie 1), Yura i Vogel (70) znaleźli bowiem u *N. crassa* enzym katalizujący tę reakcję. Przemiany tej nie stwierdzono u badanych mutantów *E. coli* (62) ani w nerce (35).

II. Zależności metaboliczne między ornityną a proliną

Schoenheimer i wsp. (42, 51) analizując skład aminokwasowy białek po podaniu myszom ornityny znakowanej deuterem stwierdzili, że ornityna może być prekursorem proliny. Przekształcenie ornityny może zachodzić na dwóch drogach: transaminacji lub oksydacyjnej dezaminacji. Przy transaminacji, lub oksydacyjnej dezaminacji grupy α -ami-

nowej ornityny (reakcja 6 w schemacie 1) powstaje kwas α -keto- δ -aminowalerianowy pozostający w równowadze z kwasem Δ' -pirolino-2-karboksylowym. Natomiast transaminacja, lub oksydacyjna dezaminacja grupy δ -aminowej (reakcja 7 w schemacie 1) prowadzi do γ -semialdehydu glutaminowego będącego w równowadze z kwasem Δ' -pirolino-5-karboksylowym. Obydwa te związki pirolinowe (Δ' -PYR-5-CA i Δ' -PYR-2-CA) mogą być redukowane do proliny (schemat 1). Nie zaobserwowano jednak aby ulegały one wzajemnej przemianie jeden w drugi (34).

Kwas α -keto- δ -aminowalerianowy może powstać z D-proliny i D-ornityny w obecności oksydazy D-aminokwasów izolowanej z nerki (28, 45), oraz z L-proliny pod działaniem oksydazy L-aminokwasów nerki lub wątroby szczura (5). L-ornityna natomiast okazała się substratem jedynie dla preparatów oksydazy z wątroby indyka (6). Oksydacyjna dezaminacja ornityny prowadząca do powstania kwasu α -keto- δ -aminowalerianowego zachodzi z niewielką wydajnością. Druga reakcja, której produktem jest również kwas α -keto- δ -aminowalerianowy, a mianowicie reakcja transaminacji ornityny, ma miejsce tylko w przypadku zablokowania grupy δ -aminowej ornityny (30). Prawdopodobnie więc powstawanie proliny z ornityny poprzez Δ' -PYR-2-CA nie ma większego znaczenia biologicznego. Niektóre tkanki zwierzęce, roślinne, oraz niektóre drobnoustroje wykazują jednak zdolność redukcji Δ' -PYR-2-CA do proliny (33, 38). Badania przeprowadzone z częściowo oczyszczonymi preparatami enzymatycznymi z wątroby i nerki szczura (33) wskazują, że redukcja Δ' -PYR-2-CA do L-proliny katalizowana jest przez enzym czynny w przemianie kwasu piperydino-2-karboksylowego (Δ' -PIP-2-CA) do kwasu pipekolinowego. Znaczenie tej reduktazy w przemianie ornityny w prolinę nie jest jeszcze dostatecznie jasne.

Za istnieniem przemiany proliny w ornitynę poprzez γ -semialdehyd glutaminowy (reakcja 7 w schemacie 1) przemawiają doświadczenia Stettena (52). Badał on metabolizm D,L-ornityny znakowanej ^{15}N w pozycji α lub δ . Większość izomeru D była wydalana z moczem, a azot obu grup aminowych ornityny pojawiał się zarówno w prolinie, jak w kwasie glutaminowym. Stężenie ^{15}N było wyższe w kwasie glutaminowym niż w prolinie gdy podawano ornitynę znakowaną w pozycji δ , zaś wyższe w prolinie niż w kwasie glutaminowym, gdy dieta zawierała ornitynę znakowaną w pozycji α . Wyniki te wskazują, że pierwszy etap w przemianie ornityny polega na przeniesieniu grupy δ -aminowej do labilnej puli azotu (akceptorem może tu być kwas α -ketoglutarowy) i powstaniu γ -semialdehydu glutaminowego będącego w równowadze z Δ' -PYR-5-CA. Ten ostatni może być z kolei redukowany do proliny lub utleniony do kwasu glutaminowego (schemat 1). Intensywne włączenie azotu α -aminowej grupy ornityny do proliny wskazuje na to, że γ -semialdehyd glutaminowy w organizmie zwierzęcym jest związkiem pośrednim przy powstawaniu proliny z ornityny. Obecność ^{15}N w prolinie przy

podaniu ornityny znakowanej w pozycji δ wynika z redukcji kwasu glutaminowego (powstałego w reakcji transaminacji δ -ornityny) do γ -semialdehydu glutaminowego.

Obecność transaminazy ornitynowej stwierdzono u bakterii gram-dodatnich (16, 17, 40, 46, 64, 65), glonów (z wyjątkiem błękitno-zielonych) i pierwotniaków (46), roślin wyższych (11, 27, 46), oraz w tkankach zwierzęcych (20, 26, 36, 37, 39, 46, 52, 58). Natomiast nie występuje ona w bakteriach gramujemnych (46, 58). Enzym ten jest zlokalizowany we frakcji mitochondrialnej (37, 58) i wymaga obecności fosforanu pirydoksalu jako koenzymu (37, 58, 63, 65). Transaminaza ornitynowa jest specyficzna w stosunku do L-ornityny (58), przy czym akceptorem grupy aminowej jest kwas α -ketoglutarowy (10, 17, 37, 40, 58, 65). Czynność enzymu jest hamowana przez *p*-chlorobenzoesan rtęci (37, 65) jony Cu^{2+} i Co^{2+} (64), a chroniona przez merkaptoetanol (37), co świadczy o tym, że obecność wolnych grup sulfhydrylowych w cząsteczce transaminazy ornitynowej ma istotne znaczenie dla jej funkcji katalitycznej. Równowaga reakcji transaminacji ornityny jest przesunięta silnie w kierunku powstawania γ -semialdehydu glutaminowego (58), prawdopodobnie wskutek jego skłonności do samorzutnej cyklizacji.

W pewnych warunkach może zachodzić przemiana odwrotna: proliny w ornitynę (schemat 1, reakcje 3, 2, 7). Fincham (16) w ekstraktach z *N. crassa* i Meister (32) w preparatach enzymatycznych z wątroby szczura zaobserwowali powstawanie małych ilości ornityny z γ -semialdehydu glutaminowego w obecności kwasu glutaminowego jako donatora grup aminowych. Streckler i wsp. (50) uważają, że równowaga reakcji transaminacji (reakcja 7 w schemacie 1) może być przesunięta w kierunku powstawania ornityny przez usunięcie jednego z produktów tej przemiany, a mianowicie kwasu α -ketoglutarowego w reakcji dysmutacji, lub przez jego transaminację z kwasem asparaginowym. Stwierdzili oni, że enzymem limitującym przemianę proliny w ornitynę jest transaminaza ornitynowa.

III. Zależności metaboliczne między kwasem glutaminowym a ornityną

Na możliwość przemiany kwasu glutaminowego w ornitynę w układach biologicznych wskazali Sallach i Koeppe (44). Po podaniu szczurom w diecie kwasu glutaminowego znakowanego ^{14}C odnajdowali oni izotop w argininie powstającej z ornityny w cyklu mocznikowym. O wykazaniu przez Stettena (52) włączania ^{15}N z ornityny do kwasu glutaminowego u szczura wspomniano już wyżej. Odwrotna przemiana kwasu glutaminowego w ornitynę prowadzi przez te same etapy.

Istnieją jednak mikroorganizmy, które nie posiadają kompletu enzymów biorących udział w tych przemianach. Należą do nich *E. coli* i inne

gramujemne drobnoustroje, które, jak już wspomniano, nie wykazują aktywności transaminazy ornitynowej. Dzięki pracom Vogela (63) wiadomo, że powstawanie ornityny z kwasu glutaminowego zachodzi w tych bakteriach poprzez acetylowane związki pośrednie (reakcje 8, 9, 10, 11 w schemacie 1).

Obecnie przypuszcza się, że u drożdży przemiana ta zachodzi też na tej samej drodze (12). Również u *N. crassa* wykazano obecność acetylo-ornitynazy i transacetylazy przenoszącej grupę acetylową z N^α-acetylo-ornityny na kwas glutaminowy. Można zatem przyjąć, że u tego mikroorganizmu synteza ornityny może przebiegać dwiema drogami (66): poprzez acetylowane związki pośrednie oraz poprzez γ -semialdehyd glutaminowy. W tkankach zwierzęcych nie stwierdzono istnienia biosyntezy ornityny poprzez acetylowane związki pośrednie (50).

Nie wyjaśniono jeszcze na jakiej drodze zachodzi przemiana ornityny w prolinę u drobnoustrojów syntetyzujących ornitynę tylko poprzez acetylowane związki pośrednie (30, 41). Choć brak transaminazy ornitynowej uniemożliwia u nich syntezę proliny poprzez γ -semialdehyd glutaminowy, to jednak mutanty *E. coli* wymagające proliny do wzrostu rosły również dobrze gdy do pożywki dodano ornitynę (30). Koncepcję biosyntezy proliny z ornityny poprzez acetylowane związki pośrednie należało odrzucić, gdy okazało się, że mutanty *E. coli*, które mają zablokowane przejście pomiędzy ornityną i N^α-acetyloornityną, potrafią mimo to syntetyzować prolinę z ornityny (30).

Wzajemne przemiany ornityny, proliny i kwasu glutaminowego są dosyć dobrze poznane, natomiast bardzo niewiele wiadomo o mechanizmach regulujących te przemiany. W przypadku biosyntezy proliny w drobnoustrojach (4, 55, 61) można brać pod uwagę działanie dwóch mechanizmów: ujemnego sprzężenia zwrotnego oraz represji enzymatycznej.

Ujemne sprzężenie zwrotne dotyczyć może działania proliny na pierwszą reakcję, to jest na redukcję kwasu glutaminowego do jego γ -semialdehydu (4, 55, 61). Ten mechanizm regulujący badano na mutantach *E. coli* nie posiadających reduktazy Δ' -PYR-5-CA. Nagromadzenie się Δ' -PYR-5-CA przy wzroście tych drobnoustrojów na pożywce zawierającej kwas glutaminowy ulegało znacznemu zahamowaniu po podaniu nadmiaru proliny.

Na podstawie wyników prac Baicha i Piersona (4), którzy zaobserwowali znaczne hamowanie produkcji γ -semialdehydu glutaminowego w obecności chloramfenikolu, można przypuszczać, że mechanizm represji również bierze udział w regulacji biosyntezy proliny. Sypberd i De Moss (59) stwierdzili bowiem, że u *E. coli* synteza niektórych enzymów podlegających represji może maleć przy wzroście komórek w obecności chloramfenikolu, który działa wówczas jako sty-

mulator syntezy represora. Nie wyjaśniono jednak ostatecznie czy w regulacji biosyntezy proliny działają jednocześnie sprzężenie zwrotne i represja, czy też tylko jeden z tych mechanizmów.

Na zakończenie należy wspomnieć, że zaburzenia metabolizmu proliny leżą u podstaw przekazywanej dziedzicznie choroby zwanej prolinemią (34). Jednym z objawów tej choroby jest podwyższony poziom proliny we krwi oraz wydalanie nadmiernych ilości proliny, glicyny i hydroksyproliny z moczem. Klinicznie zespół ten charakteryzują: opóźniony rozwój umysłowy, zaburzenia neurologiczne oraz uszkodzenie czynności nerek. Zaburzenia metabolizmu proliny w tej chorobie są spowodowane niedoborem jednego z dwóch enzymów katalizujących utlenianie proliny, a mianowicie oksydazy prolinowej lub dehydrogenazy kwasu Δ' -prolino-5-karboksylogowego.

LITERATURA

1. Abelson P. H., Vogel H. J., *J. Biol. Chem.* **213**, 355 (1955).
2. Abderhalden O., *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **68**, 487 (1910).
3. Abderhalden O., *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **77**, 22 (1912).
4. Baich A., Pierson D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 397 (1965).
5. Blanchard M., Green D. S., Nocito V., Ratner S., *J. Biol. Chem.* **155**, 421 (1944).
6. Boulanger P., Bertrand J., Osteux R., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 143 (1957).
7. Brosemer R. W., Weerabhadrapa P. S., *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 102 (1965).
8. Bryła J., Frackowiak B., Kaniuga Z., V Kraj. Symp. Biochem. Kraków 1967, Streszczenie C 43.
9. Chung-Mei-Ling, Hedrick L. R., *Bacteriol.* **87**, 1462 (1964).
10. Civen M., Brown C. B., Trimmer B. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 352 (1967).
11. Coleman R. G., Hegarty M. P., *Nature* **179**, 376 (1957).
12. De Deken R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 462 (1962).
13. De Hauwer G., Lavalley R., Wiame J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 257 (1964).
14. Erecińska M., *Acta Biochim. Polon.* **13**, 209 (1966).
15. Erecińska M., Szarkowska L., III F.E.B.S. Meeting, Warsaw 1966. Academic Press, Abstract M 7.
16. Fincham J. R. S., *Biochem. J.* **53**, 313 (1953).
17. Fincham J. R. S., Boulter A. B., *Biochem. J.* **62**, 72 (1956).
18. Forbes M., Sevag M. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **31**, 406 (1951).
19. Fowden L., Richmond M. H., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 459 (1963).
20. Fowden L., Neale S., Tristram H., *Nature* **199**, 35 (1963).
21. Frank L., Ranhard B., *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 325 (1964).
22. Fruton J. S., Simmonds S., General Biochemistry, J. Wiley and sons New York, Londyn 1960, str. 125.
23. Goldstone A., Gryder R. M., Adams E., *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 364 (1966).
24. Greenberg D. M., Metabolic Pathways, Academic Press, New York, Londyn, 1961.

25. Johnson A. B., Strecker H. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 1876 (1962).
26. Katanuma N., Okada M., Matsuzawa T., Otsuka Y., *J. Biochem.* **57**, 445 (1965).
27. Kleczkowski K., Kretowicz W. L., *Biochimija* **25**, 164 (1960).
28. Krebs H. A., *Enzymologia* **7**, 53 (1939).
29. Lang K., Lang H., *Biochem. Z.* **329**, 577 (1958).
30. Mc Elroy W. D., Glass H. B., A Symposium on Amino Acid Metabolism, Baltimore 1955.
31. Meister A., *J. Biol. Chem.* **195**, 813 (1952).
32. Meister A., *J. Biol. Chem.* **206**, 587 (1954).
33. Meister A., Radhakrishnan A. V., Bucley S. D., *J. Biol. Chem.* **229**, 789 (1957).
34. Meister A., *Biochemistry of the Amino Acid*. Academic Press. New York, Londyn 1965.
35. Neber M., *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **240**, 70 (1936).
36. Peisach J., Strecker H. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2255 (1962).
37. Peraino C., Pitot H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 222 (1963).
38. Petralus P., Greenberg D., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 78 (1965).
39. Quastel J. H., Witty R., *Nature* **167**, 556 (1951).
40. Ramley R. F., Bernlohr R. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 34 (1966).
41. Reed D. E., Lukens L. N., *J. Biol. Chem.* **241**, 262 (1966).
42. Roloff M., Ratner S., Schoenheimer R., *J. Biol. Chem.* **136**, 561 (1940).
43. Sacktor B., Childress C. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 583 (1967).
44. Sallach H. J., Koeppe R. E., Rose W. C., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4500 (1951).
45. Shemin D., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.* **158**, 71 (1945).
46. Scher W. J., Vogel H. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **43**, 796 (1957).
47. Smith M., Greenberg D., *Nature* **177**, 1139 (1956).
48. Smith M., Greenberg D., *J. Biol. Chem.* **226**, 317 (1957).
49. Smith P. F., *J. Bacteriol.* **74**, 75 (1957).
50. Smith A. D., Benziman M., Strecker H. J., *Biochem. J.* **104**, 557 (1967).
51. Stetten M. R., Schoenheimer R., *J. Biol. Chem.* **153**, 113 (1944).
52. Stetten M. R., *J. Biol. Chem.* **189**, 499 (1951).
53. Strassman M., Weinhouse S., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1726 (1952).
54. Strecker H. J., Mela P., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 580 (1955).
55. Strecker H. J., *J. Biol. Chem.* **225**, 825 (1957).
56. Strecker H. J., *J. Biol. Chem.* **235**, 2045 (1960).
57. Strecker H. J., *J. Biol. Chem.* **235**, 3218 (1960).
58. Strecker H. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1225 (1965).
59. Sypherd P. S., De Moss J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 589 (1963).
60. Taggart J. W., Krakaur R. B., *J. Biol. Chem.* **177**, 641 (1949).
61. Tristram T., Thurston C. F., *Nature* **212**, 74 (1966).
62. Vogel H. J., Davis D. D., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 109 (1952).
63. Vogel H. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **39**, 578 (1953).
64. Vogel H. J., Bonner D. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **40**, 688 (1954).
65. Vogel R. H., Kopac H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 539 (1960).
66. Vogel R. H., Vogel H. J., *Genet.* **48**, 914 (1963).
67. Węgleński P., *Genet. Res.* **8**, 311 (1966).
68. Yong-Gil Sinn., Masuvo Yamaguchi, Azumo Okuda, *Nippon Dajo-Miryogaku Zasshi* **37**, 451 (1966). *wg Chem. Abstr.*
69. Yura T., Vogel H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 582 (1955).
70. Yura T., Vogel H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 648 (1957).
71. Yura T., Vogel H. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 335 (1959).

ZBIGNIEW SZOT*

Biochemiczne aspekty procesu mineralizacji kości

Biochemical Aspects of Bone Calcification

The author gives a review of the chemical reactions, considered as important in the mechanism of calcification, and the chemical characteristic of bone mineral. The cellular control in calcification is supposed.

Kość jest wyspecjalizowaną tkanką łączną, zawdzięczającą swą niezwykłą twardość gromadzeniu się związków mineralnych w substancji międzykomórkowej. Nie zwapniała substancja międzykomórkowa tkanki kostnej zwana osteoidem lub macierzą kości składa się z dwu głównych komponent: kolagenu (96% masy organicznej kości) oraz z tak zwanej substancji podstawowej lub cementującej, zbudowanej z mukopolisacharydów (4%) (31).

Powstawanie specyficznego utkania tkanki kostnej jest złożonym procesem zwanym kostnieniem. Pierwszym jego etapem jest przekształcenie nie zróżnicowanej komórki tkanki łącznej w komórkę kościotwórczą — osteoblast, zdolną do syntezy wszystkich składników substancji międzykomórkowej (7, 15, 26, 28, 57, 91, 97, 103, 144).

Końcowym etapem procesu kostnienia jest kalcyfikacja, czyli odkładanie się soli wapniowych w matrycy organicznej. W warunkach fizjologicznych w ustroju podlega procesowi mineralizacji kość, chrząstka oraz trzy składniki zębów: szkliwo, dentyna i cement. W warunkach patologicznych wapnienie może zachodzić w każdej miękkiej tkance. Przyczyną mogą być zmiany w tkance lub w stężeniu wapnia w płynach ustrojowych (100, 143).

Wprowadzenie metod izotopowych do badania tkanki kostnej przyczyniło się do znacznego poznania struktury molekularnej i metabolizmu tkanki kostnej oraz jego powiązań z ogólnym metabolizmem ustroju (81, 84).

Z drugiej strony wskutek zastosowania izotopów promieniotwórczych

* Dr med., Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: HA — hydroksyapatyt, MPS — mukopolisacharydy.

w nauce, technice i w celach militarnych metabolizm kości znalazł się w centrum zainteresowań, ponieważ skażenie izotopami osteotropowymi — „kościolubnymi” okazało się najpoważniejszym zagrożeniem radiologicznym populacji ludzkiej i zwierzęcej (83, 87, 88, 134).

I. Część mineralna kości

Znajomość własności części mineralnej od chwili jej powstawania do momentu osiągnięcia krystalicznej formy hydroksyapatytu włącznie, ma duże znaczenie w badaniach zarówno kinetyki odkładania się i metabolizmu radionuklidów osteotropowych w ustroju żywym.

Część mineralna kości jest pod względem chemicznym materiałem niejednorodnym, złożonym z fosforanu ośmiowapniowego ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}/\text{P} = 1,33$) i trójwapniowego ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}/\text{P} = 1,5$), hydroksyapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}/\text{P} = 1,66$) oraz z szeregu związków przejściowych, które pod względem budowy krystalicznej są izostrukturalne i w badaniach dyfrakcji promieni X dają obraz apatytów (12, 13, 23, 25, 137).

Dawniejsza hipoteza Hendricksa i Hilla (62) tłumaczyła różnice w składzie apatytów kości absorpcją jonów HPO_4^{2-} przez hydroksyapatyt. Posner i wsp. (101) wprowadzili natomiast koncepcję tak zwanych apatytów z niedoborem wapnia, według której miejsce brakującego wapnia jest zastąpione wodorem. Za pomocą absorpcji w podczerwieni przy 3400 cm^{-1} Posner i wsp. (102, 133) udowodnili, że w różnych apatytach o niskim stosunku Ca/P wodór łączy dwie grupy fosforanowe $\text{O}_3\text{PO.H} \dots \text{OPO}_3$.

Dla poznania budowy i własności części mineralnej kości szczególnie owocne były badania własności sztucznie otrzymanych apatytów (62, 76, 140) jak również badania nad wpływem pH (77) i temperatury (23, 44) na ich powstawanie i przekształcanie chemiczne.

Oprócz jonów wapnia i ortofosforanowych w kości stale występują domieszki: węglanów — około 6%, cytrynianów — 1%, sodu — 0,7%, magnezu — 0,7% i fluoru około 0,1% (98). Stosunek molarny Ca/P w mineralach kości wynosi przeciętnie około 1,5, przy czym w kości młodych osobników występuje materiał o niskim stosunku Ca/P , który w miarę upływu czasu zwiększa się osiągając wartość hydroksyapatytu. Mówiąc o dojrzewaniu kości rozumie się pod tym terminem przekształcenie apatytów ubogich w wapń w hydroksyapatyt (45).

François (46) wykazał, że wbudowywanie $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ do kości szczura, znacznie intensywniejsze u młodych niż u starych zwierząt, następuje do tak zwanej frakcji pirofosforanowej, czyli do ośmio- i trójwapniowego fosforanu. Ten ostatni jest według niektórych badaczy (23, 77) pierwszym związkiem powstającym podczas wapnienia. Po pewnym

czasie aktywność frakcji pirofosforanowej maleje na korzyść ortofosforanowej, czyli hydroksyapatytu. Frakcja o niskim stosunku Ca/P jest najbardziej aktywną frakcją kości. *In vitro* izojonowa wymiana pomiędzy roztworem a materiałem mineralnym kości (cząstki o średnicy 5—10 μ i ciężarze właściwym 1,7—2,3) jest największa we frakcjach o niskim ciężarze właściwym (104).

W kości zbitej szczura i krowy znaleziono bezpostaciowy materiał mineralny (29, 146), którego skład chemiczny przypomina apatyt ubogi w wapń, a stosunek Ca/P wynosi $1,48 + 0,02$. W kościach tych materiał bezpostaciowy stanowił aż 42%, a krystaliczny apatyt — tylko około 58% soli mineralnych (30, 139).

O znaczeniu biologicznym bezpostaciowej komponenty można sądzić w oparciu o badanie materiału syntetycznego. Badania te wskazują, że stanowi ona bierny zbiornik Ca i fosforanów. Faza mineralna powstaje bowiem na drodze rozpuszczania bezpostaciowej komponenty i odkładania powstałych jonów na powierzchni uprzednio utworzonych kryształów. Jony Mg^{2+} i CO_3^{2-} opóźniają ten proces. Pochodzenie niekrystalicznego materiału mineralnego w kości nie jest obecnie znane. W sztucznych warunkach może on powstawać przy raptownym wypadaniu z roztworu. Green w alt (52) stwierdził, że w mitochondriach komórek wątroby szczura przy aktywnym oddychaniu powstaje fosforan wapnia. Czy jest to możliwe w kości i w wyniku jakiej reakcji, wymaga dalszych badań.

II. Powstawanie zarodków krystalizacji (nukleacja)

Hydroksyapatyt w fizjologicznie uwapnionej kości powstaje z jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} występujących we krwi i płynie zewnątrzkomórkowym.

Spośród wielu teorii odkładania związków wapnia w kościach dwie odegrały większą rolę: teoria przesylenia jonami Ca^{2+} i PO_4^{3-} do punktu samorzutnego wytrącenia oraz teoria tworzenia się jąder krystalizacji w obecności katalizatora heterogenicznego, występującego w postaci stałej. Obecnie uważa się, że tworzenie się zarodków krystalizacji, czyli nukleacja, jest istotnym etapem procesu mineralizacji (88, 126). Nukleację można zdefiniować jako proces tworzenia w macierzystej, metastabilnej fazie początkowych fragmentów nowej, bardziej stałej fazy, zdolnej do samodzielnego wzrostu. Wyprowadzono szereg równań opisujących wytwarzanie zarodków krystalizacji, istnieją jednak poważne zastrzeżenia czy oddają one przebieg procesu w warunkach panujących w ustroju (126).

Wytwarzanie jąder krystalizacji w możliwie krótkim czasie, a zatem podobnie jak to ma miejsce w ustroju, może nastąpić przy przesycaeniu roztworu. Mamy wówczas do czynienia z wytrącaniem się fazy stałej. Możliwa jest także nukleacja w roztworze przy niższych stężeniach w

obecności katalizatora, którym może być powierzchnia ciała stałego. Katalizator ten umożliwi powstawanie zarodków krystalizacji przez wiązanie specyficznych jonów, lub jak sugeruje Neuman, przez dostarczenie epitaktycznej powierzchni (86, 88). Epitaksja jest to zjawisko polegające na tworzeniu się kryształów jednego związku na powierzchni kryształu innego związku. Jest to możliwe gdy w obu kryształach odległości międzypłaszczyznowe sieci krystalicznych są identyczne lub pozostają do siebie jak stosunki liczb całkowitych, a ponadto gdy jony tworzącego się kryształu mają taki sam ładunek jak jony w kryształach macierzystym (88).

Małe rozmiary kryształów części mineralnych kości (9, 85, 88) powodują, że połowa lub $\frac{2}{3}$ komórek elementarnych (najmniejszych jednostek kryształu, w których występują wszystkie rodzaje jonów rozmieszczonych w sposób charakterystyczny dla danej struktury) znajduje się na powierzchni lub w fazie granicznej. W zarodkach krystalizacji, których rozmiary są jeszcze mniejsze, stosunek powierzchni do objętości jest jeszcze większy (80).

W takich warunkach energia swobodna przejścia jonu z roztworu do mikroagregatu lub w kierunku przeciwnym, zależy nie tylko od ciśnienia, temperatury i stężenia, lecz także od parametrów określających stosunek powierzchni do objętości. Warunki dla jonów we wnętrzu mikroagregatu i na jego powierzchni są tak różne, że wewnątrz i powierzchnię można uważać za oddzielne fazy (9).

Best (9) uwzględniając ogólne własności kryształów oraz szczególne własności fazy mineralnej kości podał następującą zależność:

$$\mu \geq \mu_z > \mu_s > \mu_i$$

gdzie

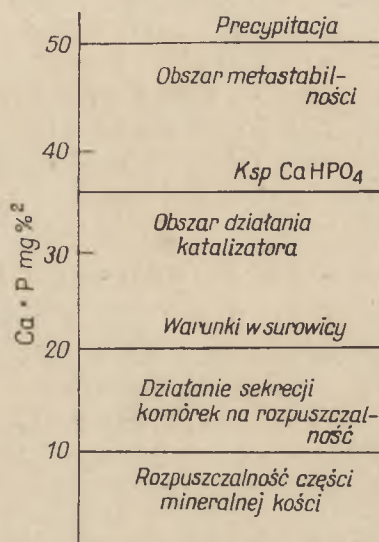
μ	—	swobodna energia roztworu
μ_z	—	„ „ zarodka krystalizacji
μ_s	—	„ „ powierzchni
μ_i	—	„ „ wnętrza zarodka krystalizacji.

W roztworze μ jest funkcją iloczynu jonowego $[\text{Ca}^{2+}][\text{HPO}_4^{2-}]$ (bardzo często podawanego w postaci uproszczonej jako $\text{Ca} \times \text{P}$) (64), z czego wynika, że do wytworzenia zarodków krystalizacji konieczny jest większy iloczyn $\text{Ca} \times \text{P}$ niż dla wzrostu kryształu.

W fizjologicznych warunkach pH i temperatury oraz wartości $\text{Ca} \times \text{P}$ we krwi nie ma możliwości dla samorzutnego powstawania jakiegokolwiek formy fosforanu wapnia z wyjątkiem hydroksyapatytu (92). Porównanie bowiem iloczynu rozpuszczalności CaHPO_4 i hydroksyapatytu (88) oraz iloczynów jonowych dla Ca^{2+} i HPO_4^{2-} krwi wskazują, że krew i płyn zewnątrzkomórkowy są roztworami nienasyconymi w stosunku do CaHPO_4 , a przesyconymi w stosunku do hydroksyapatytu (131).

Jednak trudno sobie wyobrazić, że w tkance kostnej powstaje od razu hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ złożony z 18 jonów. Shear i Kramer (117) sugerowali, że pierwotnym związkiem w procesie kalcyfikacji jest CaHPO_4 , co potwierdzili McLean i Urist (82) badając fazę stałą, powstającą w procesie wapnienia w fizjologicznych warunkach pH i temperatury.

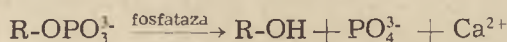
W powstawaniu zarodków krystalizacji w ustroju musi brać zatem udział jakiś mechanizm pomocniczy (rysunek 1).



Rys. 1. Warunki tworzenia i rozpuszczania kości w ustroju określone iloczynem $\text{Ca} \times \text{P}$ (mg^2/o^2) wg Fleischa (41).

III. Rola fosfataz i cynku

W drugiej i trzeciej dekadzie obecnego stulecia panował dość powszechnie pogląd, że kalcyfikacja jest zjawiskiem fizykochemicznym zachodzącym bez udziału żywych komórek i polegającym na łączeniu się wapnia z grupami aminowymi białka, a następnie z fosforanami (143). Badania nad mechanizmem kalcyfikacji szły zatem początkowo w kierunku znalezienia czynników wpływających na zwiększenie stężenia jonów uczestniczących w tym procesie. Według fosfatazowej teorii kalcyfikacji Robisona fosfataza alkaliczna obecna w miejscach wzrostu kości hydrolizuje znajdujące się we krwi estry fosforanowe (105, 108), co powoduje lokalne przesylenie płynu jonami fosforanowymi powyżej iloczynu rozpuszczalności fosforanów (reakcja 1)



1

Występowanie fosfatów w tkankach nie ulegających fizjologicznie wapnieniu oraz niskie stężenia estrów fosforanowych we krwi były przyczyną postulowania przez Robisona innego mechanizmu enzymatycznego, według którego w komórkach wapniejącej chrząstki zachodzi synteza estrów z fosforanów nieorganicznych prawdopodobnie w procesie degradacji glikogenu (105, 106, 107).

Natomiast według Gutmana i Yu (55) rola fosfatazy polega na przenoszeniu grup fosforanowych z estrów na akceptor w matrycy, przy czym źródłem estrów fosforanowych jest proces glikolizy zachodzący w tkance chrząstnej. Gutman (56) wykazał, że nagromadzony w chrząstce glikogen znika podczas mineralizacji. Zahamowanie glikolizy wstrzymuje proces mineralizacji, można go jednak przywrócić dodając do układu pośrednie produkty glikolizy powstające w reakcjach dalszych niż reakcja zahamowania. Oba źródła fosforanów: krew i proces glikolizy uznano jednak za niewystarczające (75, 136).

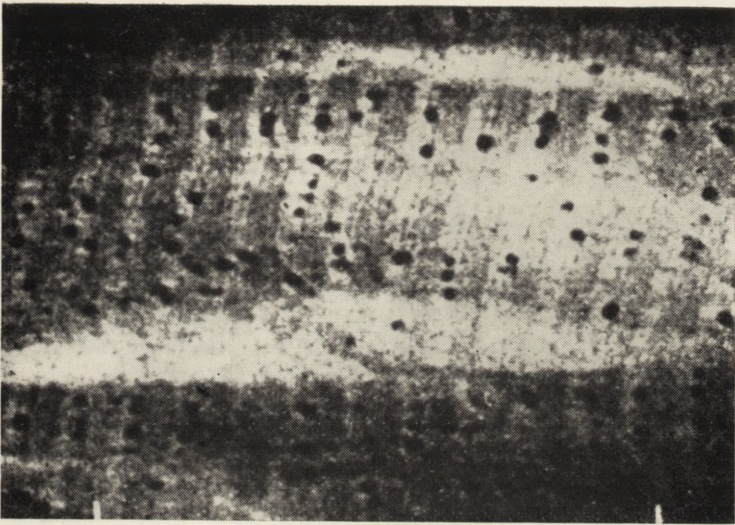
Należy podkreślić, że poglądy na rolę fosfatów w procesie wapnienia ulegały dużym zmianom (18, 36, 53, 116, 120, 125, 145).

Przed kilkoma laty Fleisch i Neuman (39, 40) donieśli, że fosfataza inaktywuje inhibitor nukleacji HA w kolagenie. Inhibitorem tym okazał się polifosforan występujący w płazmie w stężeniach rzędu $10^{-6}M$, oraz w większych ilościach w moczu (40, 43). Fosfataza (polifosfataza) rozkłada polifosforan umożliwiając tworzenie się zarodków krystalizacji przy niższych wartościach $Ca \times P$.

Fleisch i wsp. (41, 42) przypisują polifosforanom duże znaczenie w powstawaniu kamicy nerkowej i w odkładaniu soli wapnia w tkankach, które u zdrowych osobników nie wapnieją. W kamicy nerkowej wykazano zmniejszone wydalanie polifosforanów w moczu, a w doświadczalnie wywołanym zwapnieniu tętnicy głównej u szczura stwierdzono hamujący wpływ polifosforanów na ten proces (43).

Przypuszcza się także, że pewną rolę w procesie nukleacji może odgrywać cynk. Pierwiastek ten występuje w miejscu, w którym tkanka świeżo uwapniona styka się z tkanką jeszcze nie zwapniałą, czyli w tak zwanej linii kostnienia (60). Podany dożylnie ^{65}Zn nie podlega wymianie w części mineralnej, lecz wbudowuje się w nowo powstającą substancję mineralną (59).

Działanie cynku mogłoby być bezpośrednie, polegające na tworzeniu zarodków krystalizacji w postaci fosforanu cynku, lub pośrednie poprzez układy enzymatyczne aktywowane jonami Zn^{2+} , jak fosfatazy alkaliczne lub zawierające cynk, jak anhydraza węglanowa. Aktywność anhydrazy węglanowej wykazano w wolnych od krwi nasadach długich kości kur. Podawanie kurom *Diamoxu*, inhibitora anhydrazy węglanowej, w okresie „niesienia”, w którym zawartość Ca plazmy wzrasta do 20—30 mg⁰/₀, po-



Rys. 2. Położenie zarodków krystalizacji pomiędzy prążkami d i a każdego okresu osiowego włókna kolagenu (zarodki krystalizacji wykazują już budowę krystaliczną przy badaniu metodą dyfrakcji promieni X) wg Jackson-Fitton 1956.

wodowało znaczne obniżenie poziomu wapnia plazmy (119). Wyniki te wydają się wskazywać, że anhydraza węglanowa odgrywa jakąś rolę w wapieniu oraz resorpcji kości.

IV. Rola kolagenu

Neuman (86) w 1953 roku wyraził przypuszczenie, że kolagen, główny składnik organicznej matrycy kostnej, pełni rolę nukleatora w procesie mineralizacji. W tym samym roku Engström i Finean (32) stosując technikę dyfrakcji promieni X znaleźli związane z powierzchnią kolagenu kryształy hydroksyapatytu. W zmineralizowanym *in vivo* materiale kostnym kryształy te mają kształt prętów lub igieł o wymiarach $200\text{--}300 \times 20\text{--}50 \text{ \AA}$. Ich osie są częściowo zorientowane w kierunku osi długiej włókna kolagenu (16, 33, 34, 35, 37, 38). Niektóre kryształy znajdują się także wewnątrz włókien (118). W największym stopniu kryształy są zorientowane w kości ryb (49). Orientacji tej nie wykazują kryształy w kości embrionalnej, a także w wapniejącej chrząstce, w której występują one także w substancji podstawowej pomiędzy włóknami kolagenu (3, 11, 49, 110).

Badania kości embrionalnej ptaków w mikroskopie elektronowym sugerują, że pierwsze kryształy fosforanu wapnia pojawiają się w regularnych odstępach na włóknie pomiędzy prążkami *d* i *ab* w każdym dużym okresie wstęgi (69, 70, 71, 72) (rysunek 2). Później drogą połączenia dwóch pierwotnych punktów mineralizacji powstają kryształy o długości około 500 \AA , a więc zbliżone do długości dużego okresu włókna (112). W całkowicie zmineralizowanej kości kryształy gęsto pokrywają włókna, niektóre leżą także wewnątrz nich lub wypełniają przestrzenie substancji podstawowej (109).

In vitro na kolagenu z każdej nawet normalnie nie wapniejącej tkanki (4, 5, 93, 132), jeżeli tylko w jego strukturze jest zachowany okres około 700 \AA , tworzą się zarodki krystalizacji. Kryształy HA rosnące *in vitro* w obecności kolagenu, podobnie jak wytworzone na drodze precypitacji w próbówce, mają kształt płytek.

Przypuszcza się, że na kształt kryształu HA mają wpływ warunki panujące w środowisku, w którym on wzrasta (2, 12, 54, 65). Należy jednak zaznaczyć, że istnieją duże trudności techniczne w ocenie kształtu HA kości, wielkość ich bowiem leży na granicy zdolności rozdzielczej mikroskopu elektronowego (95), a cięcie zmineralizowanej kości powoduje często zniekształcenia kryształów (49).

Wiele danych wydaje się wskazywać, że kolagen w roztworze metastabilnym, zawierającym wapń i fosforany, zachowuje się jak nukleator (39, 40). Jego działanie może polegać na ułatwieniu przekroczenia granic metastabilności roztworu lub na selektywnym wiązaniu wapnia lub fosforu przez

pewne grupy włókna i tworzeniu pierwszych fragmentów fazy stałej (48). Najbardziej jednak atrakcyjnym wydaje się tłumaczenie, że kolagen jako białko krystaliczne może powodować powstawanie zarodków krystalizacji na drodze epitaksji (86).

Wapnienie kolagenów pochodzących z tkanek normalnie nie wapniejących (99) tłumaczy się usunięciem inhibitora kalcyfikacji w czasie preparatyki kolagenu lub obecnością związków wchodzących w skład substancji podstawowej, na przykład mukopolisacharydów, które jako minimalna domieszka towarzyszą nawet znacznie oczyszczonym preparatom kolagenu (127, 128). G l i m c h e r natomiast wyjaśnia tę różnicę w zachowaniu się *in vivo* i *in vitro* kolagenów z tkanek nie wapniejących tym, że *in vivo* kalcyfikacja może być regulowana stopniem metastabilności płynu zewnątrzkomórkowego. Stopień ten zależy bezpośrednio od stężenia wapnia, fosforu od *pH*, siły jonowej itp. w komórce, a pośrednio od aktywności enzymów (1, 22, 55, 56, 130) wpływających na dyfuzję jonów do włókna kolagenu, w czym odgrywa rolę substancja podstawowa. Mukopolisacharydy chronią czynne miejsca kolagenu ograniczając dyfuzję jonów oraz selektywnie je wiążąc.

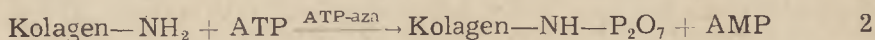
Jakkolwiek dla procesu nukleacji ważna jest przede wszystkim specyficzna organizacja przestrzenna kolagenu, to jednak reaktywność aminokwasów bocznego łańcucha odgrywa także ważną rolę.

S o l o m o n s i I r v i n g (129) dostarczyli dowodów, że grupa ϵ -aminowa lizyny i hydroksylizyny bierze udział w procesie nukleacji. Dostępność tych grup, badana zdolnością do reakcji z dwunitrofluorobenzenem, jest różna w różnych kolagenach: w kolagenie nie wapniejącym reaguje z nim 65% wolnych grup ϵ -aminowych a w świeżo demineralizowanej zębinie lub kolagenie kości do 100%. W miarę ponownej mineralizacji ilość dostępnych grup ϵ -aminowych zmniejsza się.

Kolagen zdemineralizowanej kości odznacza się znacznie mniejszą rozpuszczalnością niż kolagen tkanek miękkich (51), co jest wynikiem większej liczby wiązań krzyżowych. Powstawanie w kolagenie kości dużej liczby wiązań krzyżowych można wytłumaczyć zjawiskami towarzyszącymi procesowi kalcyfikacji. W procesie tym zachodzi utrata wody w matrycy organicznej (111, 112), co powoduje zmniejszenie odległości między cząsteczkami i wzrost siły wiązań między nimi. Wpływa to na ściślejsze upakowanie włókien w cząsteczce, zwiększenie ich stabilności, a także oporności na pęcznienie i rozpuszczanie w kwaśnych roztworach. Niektórzy uważają, że wiązania krzyżowe w kolagenie kości odgrywają rolę w ograniczaniu wzrostu kryształów hydroksyapatytu (49, 142). W latyryzmie, w którym mineralizacja kości jest upośledzona, w makrocząsteczce kolagenu nie ma łańcuchów β , a ilość międzycząsteczkowych wiązań kowalencyjnych jest znikoma (6, 8).

C a r t i e r i w s p. (17, 18, 19, 20, 21) badając kalcyfikację chrząstki embrionalnej *in vitro* stwierdzili, że w obecności ATP mineralizacja jest

bardzo intensywna, natomiast nieznaczna przy udziale estrów fosforowych powstających w procesie glikolizy. Znaleźli oni ponadto w chrząstce nie dającą się wyekstrahować ATP-azę o optimum działania w *pH* 8, aktywowaną jonami Mg^{2+} . Według Cartier i Picarda (20) mineralizację matrycy zapoczątkowuje wiązanie pirofosforanu pochodzącego z ATP (reakcja 2).



Pewnego rodzaju potwierdzeniem tej hipotezy było wykrycie pirofosforanów w chrząstce krzywiczej (98).

Zagadnienie, który jon jest pierwotnie wiązany przez matrycę, Ca^{2+} czy $P_2O_7^{2-}$ jest ciągle sprawą sporną. Prawdopodobnie nie jest to Ca^{2+} , bowiem utworzona struktura kowalencyjna byłaby mało reaktywna, a raczej $P_2O_7^{2-}$, który po związaniu z kolagenem kowalencyjnym wiązaniem N-P albo O-P jest zdolny do przyłączenia Ca (149). Ponadto sieć krystaliczna apatyty jest złożona przede wszystkim z fosforanów.

Glimcher i Krane (50) wykazali, że rekrystalizowany kolagen wiąże duże ilości fosforu (150 moli/mol kolagenu) przy czym około $\frac{1}{3}$ tej ilości jest związana bardzo mocno. Przypuszczają oni, że aminokwasy bocznych łańcuchów tworzą koordynacyjne wiązania z fosforanem. Ponadto okazało się, że kolagen ma zdolność rozszczepiania ATP do ADP i AMP oraz że uwolniony fosforan wiąże się natychmiast z kolagenem (74). Wiązanie to jest typu O-P, a nie N-P, jak przypuszczali Cartier i Picard.

Teoria o roli kolagenu jako nukleatora w procesie kalcyfikacji spotkała się z wielu zastrzeżeniami (14).

Okazało się, że zdolność indukowania zarodków krystalizacji nie jest wyłączną własnością kolagenu. Wykazują ją także elastyny, ściana aorty, wyciągi śliny, bakterie żyjące w jamie ustnej itp. (128, 136). Stosując nie całkowicie oczyszczone kolageny nie można być pewnym czy tworzenie zarodków krystalizacji zależy wyłącznie od kolagenu. Zarodki krystalizacji są tak małe (128), że nie można wykluczyć czy używane w badaniach *in vitro* kolageny są od nich wolne, a to uniemożliwia interpretację warunków przestrzennych na modelach, nasuwa wątpliwości czy zjawisko i niektórych grup w kolagenie i hydroksyapatycie, a także przesłedzenie warunków przestrzennych na modelach, nasuwa wątpliwości czy zjawisko epitaksji jest możliwe w kolagenie. Odpowiednie odległości w kolagenie różnią się bowiem od tychże w HA o przeszło 170%, co znacznie przekracza tolerancję dla zjawiska epitaksji określoną na około 70% (90, 138).

V. Rola substancji podstawowej

Myśl o udziale substancji podstawowej w procesie kalcyfikacji nasuwały badania histochemiczne (73, 79). W tym obszarze kości, w którym zachodzi mineralizacja, matryca organiczna barwi się inaczej niektórymi

barwnikami, na przykład błękitem toluidyny. Wielu badaczy jest zdania, że związane to jest z obecnością siarczanu chondroityny w substancji podstawowej (63, 113, 114). Wykazano bowiem, że siarczan chondroityny reaguje z kolagenem wypierając związane z nim uprzednio barwniki. Kompleks kolagenu z siarczanem chondroityny inkubowany w płynie mineralizującym wiąże jony Ca^{2+} . Chociaż siarka ^{35}S jest szybko wbudowywana do substancji podstawowej w okolicach wapniejących, gdzie można ją wykryć w siarczanie chondroityny (157), nie udało się jednak stwierdzić zależności pomiędzy kalcyfikacją a syntezą siarczanu chondroityny.

Sobel przypuszcza, że kolagen z mukopolisacharydami tworzy układ identyczny ze znajdującym się w krzywiczej chrząstce, wykazującej zdolność do kalcyfikacji *in vitro* (124, 125, 126). Utworzony kompleks jest specyficznie aktywowany lub, w przypadku zinaktywowania innymi kationami, reaktywowany jonami Ca^{2+} . Mechanizm ten nazwał Sobel mechanizmem „zamka i klucza” (121, 122, 123, 126).

Niektórzy utrzymują jednak, że kwaśne MPS pełnią rolę inhibitora procesu kalcyfikacji. Chrząstka szklista na przykład, zawierająca pokaźne ilości kwaśnych mukopolisacharydów, w normalnych warunkach nie ulega kalcyfikacji. Pewne dane wskazują też, że w przebiegu kalcyfikacji stężenie kwaśnych mukopolisacharydów ulega zmniejszeniu. Depolimeryzacja mukopolisacharydów zachodząca bezpośrednio przed kalcyfikacją, a warunkująca reakcje barwne substancji podstawowej, usuwa prawdopodobnie barierę dyfuzyjną dla jonów umożliwiając powstawanie zarodków krystalizacji.

Irving (66, 67, 68) po ekstrakcji kości gorącą pirydyną, odwapnieniu jej i wybarwieniu czernią Sudan B stwierdził barwnik w matrycy otaczającej hipertroficzne komórki chrząstki nasadowej oraz w tak zwanej linii kostnienia. Badania substancji wiążącej czerni sudanową wykazały, że jest to lipid. Pomimo że istnieją dane świadczące, że lipidy mogą wiązać wapń i fosfor oraz, że produkty patologicznej kalcyfikacji naczyń krwionośnych zawierają materiał lipidowy (10, 78), nie można obecnie ocenić roli lipidów w fizjologicznej kalcyfikacji tkanki kostnej.

VI. Rola komórek w procesie kalcyfikacji

Wszystkie dotychczasowe hipotezy mechanizmu kalcyfikacji przyjmują, że jądra krystalizacji tworzą się w sposób niezależny od komórki, której rola w tym procesie ogranicza się do wytworzenia matrycy organicznej, a materiał mineralny jest dostarczany drogą dyfuzji. Prawdopodobnie nie jest to prosta dyfuzja o czym świadczy niejednakowa dyskryminacja pomiędzy strontem i wapniem w kości *in vivo* i *in vitro* (89).

Szereg faktów zwraca jednak uwagę na to, że i komórki mogą pełnić rolę w procesie wapnienia. Pobieranie przez komórki Ca^{2+} (27, 58) nasu-

nęło myśl o działaniu komórek na wzrost stężenia jonów wapnia. Komórka mogłaby też działać poprzez regulację wytwarzania ATP na proces wapnienia, którego szybkość zmniejsza się przy niedoborze ATP (148). Ponadto kostna komórka produkuje kwaśne substancje, które prawdopodobnie stanowią na powierzchni kryształów barierę zapobiegającą dalszemu ich wzrostowi. W naszej pracowni wykazaliśmy w badaniach *in vitro*, że wskutek dyfuzji materiału mineralnego częściowo zmineralizowana żywa kość przeciwdziała nadmiernej kalcyfikacji produkując substancje kwaśne. Zabicie komórek powoduje wzmożoną kalcyfikację (135). Również mikroskopowo stwierdzono, że obumieraniu komórek towarzyszy proces intensywnej mineralizacji.

Obecnie badacze zajmujący się biologią porównawczą tkanek zmineralizowanych są zwolennikami hipotezy komórkowego mechanizmu wapnienia (96, 147). Zjawisko kalcyfikacji jest bardzo powszechne w świecie istot żywych (92, 93, 94, 141, 147) przy czym u wielu jednokomórkowców, lub wyżej uorganizowanych zwierząt, jak *Lingula*, a nawet w fiszbinie u płetwala odkładanie się soli mineralnych zachodzi wewnątrzkomórkowo (94, 96, 147).

Rola komórki w procesie wapnienia może polegać nie tylko na dostarczeniu Ca^{2+} i PO_4^{3-} do wytwarzania zarodków krystalizacji na zewnątrz komórki, lecz także na wewnątrzkomórkowym wytwarzaniu zarodków. Gromadzenie się fosforanu wapnia w komórce wątrobowej wskazywałoby na takie możliwości (52). Robinson i Cameron (115) donieśli, że w kości w okolicy „frontu kalcyfikacji” w komórkach występują kryształy, zaś Hancox i Boothroyd (58) opisali wypustki komórek kostnych skierowane do brzegów zwapniałej matrycy organicznej. Zastosowanie nowej techniki utrwalania do celów mikroskopii elektronowej pozwoliło na zaobserwowanie nitkowatych wypustek osteoblastu (120) skierowanych do obszaru, w którym odbywał się proces wapnienia. Jeżeli się okaże, że komórka kostna usuwa na zewnątrz bezpostaciowy fosforan wapnia w postaci metastalej, to można sobie wyobrazić wytwarzanie materiału krystalicznego z metastalej cząstek, a nie z metastalego roztworu.

Jak widać z przedstawionych badań, pomimo olbrzymiego postępu jaki został dokonany w poznaniu tkanki kostnej, nie można jeszcze w chwili obecnej podać prostego schematu mechanizmu kalcyfikacji opartego na jednoznacznych i zgodnych wynikach badań.

LITERATURA

1. Albaum H. G., Hirschfeld A., Sobel A. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 79, 682 (1952).
2. Ascenzi A., Bone and Tooth, Proceedings of the First Europ. Symp. Oxford, April 1963. Wyd. H. J. J. Blackwood, Pergamon Press, Oxford, Londyn, New York, Paryż 1964, str. 231.

3. Ascenzi A., Bonucci E., Bacciarelli D. S., *J. Ultrastruct. Res.* **18**, 605 (1967).
4. Bachra B. N., Sobel A. E., Stanford J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 79 (1959).
5. Bachra B. N., Sobel A. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 9 (1959).
6. Baker S. L., Bone and Tooth, Wyd. H. J. J. Blackwood, Pergamon Press, Oxford, Londyn, New York, 1964, str. 245.
7. Baud C. A., Dupont D. H., Calcified Tissues Proceedings of the Second Europ. Symp. Domaine Provincial de Wegimont 31 March 4 April 1964, wyd. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne, Collection des Colloques de l'Universite de Liege 1965, str. 31.
8. Belanger L. F., *J. Bone Joint Surg.* **41B**, 581 (1959).
9. Best J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 194 (1959).
10. Blumenthal H. T., Lansing A. J., Gray S. H., *Am. J. Pathol.* **26**, 989 (1950).
11. Bonucci E., *J. Ultrastruct. Res.* **20**, 33 (1967).
12. Brown W. E., *Nature* **196**, 1048 (1962).
13. Brown W. E., Smith J. P., Lehr J. R., Frazier A. W., *Nature* **196**, 1050 (1962).
14. Budy A. M., *Science* **151**, 225 (1966).
15. Cameron P. A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 583 (1961).
16. Carlström D., *Acta Radiol. Suppl.* **121** (1955).
17. Cartier P., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **144**, 331 (1950).
18. Cartier P., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **145**, 274 (1951).
19. Cartier P., *J. Physiol. Paris* **43**, 677 (1951).
20. Cartier P., Picard J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**, 1159 (1955).
21. Cartier P., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **241**, 1632 (1955).
22. Cobb J. D., *Arch. Pathol.* **55**, 496 (1953).
23. Dallemagne M. J., Winand L., Richelle L. J., Herman H., François P., Fabry C., Cloosen J., *Acad. Roy. Med. Belg.* **1**, No 10 VII serie 749 (1961).
24. Dallemagne M. J., *Lyon Chirurgical* **59**, 787 (1963).
25. Dallemagne M. J., Richelle L. J., *La Presse Medicale* **73**, 1915 (1965).
26. Deiss W. P., IV-Europ. Symp. on Calcified Tissues 28 March—1 April 1966, Wyd. P. J. Gaillard, International Congress Series No 120 Excerpta Medica Foundation Amsterdam, New York, London, Milano, Tokyo, Buenos Aires 1966, str. 19.
27. De Luca H. F., Engström A., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **47**, 1744 (1961).
28. Dudley H. R., Spiro D., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11**, 627 (1961).
29. Eanes E. D., Gillessen I. H., Posner A. S., *Nature* **208**, 365 (1965).
30. Eanes E. D., Harper R. A., Gillessen I., Posner A. S., IV-Europ. Symp. on Calcified Tissues, 28 March—1 April 1966, Wyd. J. P. Gaillard, International Congress Series No 120 Excerpta Medica Foundation Amsterdam, New York, London, Milano, Tokyo, Buenos Aires 1966, str. 24.
31. Engfeldt B., Strandh J., *Clin. Orthop.* **17**, 63 (1960).
32. Engström A., Finean A., *Nature* **171**, 564 (1953).
33. Engström A., *Clin. Orthop.* **17**, 34 (1960).
34. Engström A., Radioisotopes and Bone, red. F. C. McLean, P. Lacroix, A. M. Budy, Blackwell Scientific Publ., Oxford 1962.
35. Engström A., Bone as Tissue, Wyd. K. Rodahl, J. T. Nicholson, E. M., Brown, McGraw-Hill, New York, Toronto, London 1960, str. 251.
36. Fell H. B., Danielli J. F., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **24**, 196 (1943).

37. Fernandez-Moran H., Engström A., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 264 (1957).
38. Finean J. B., Engström A., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 202 (1957).
39. Fleisch H., Neuman W. F., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 996 (1960).
40. Fleisch H., Neuman W. F., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3783 (1960).
41. Fleisch H., *Schweiz. Med. Wochschr.* **91**, 858 (1961).
42. Fleisch H., Bisaz S., *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne, Universite de Liege 1965, str. 299
43. Fleisch H., Schibler D., Maeski J., Frossard I., *Nature* **207**, 1301 (1965).
44. François P., Herman H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **43**, 643 (1961).
45. François P., *J. Physiol. Paris* **53**, 343 (1961).
46. François P., *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne, Université de Liège 1965, str. 167.
47. Gersh I., *Bone as Tissue*, red. K. Rodahl, J. T. Nicholson, E. M. Brown, McGraw-Hill, New York, Toronto, London 1960, str. 128.
48. Glimcher M. J., Hodge A. J., Schmitt F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **43**, 860 (1957).
49. Glimcher M. J., *Rev. Mod. Physics* **31**, 359 (1959).
50. Glimcher M. J., Krane S. M., *Radioisotopes and Bone*, red. F. C. McLean, P. Lacroix, A. M. Budy, Blackwell Sci. Publ., Oxford 1962, str. 393.
51. Glimcher M. J., Katz E. P., *J. Ultrastruct. Res.* **12**, 705 (1965).
52. Greenwalt T. W., Rosso C. S., Lehninger A. L., *J. Cell. Biol.* **23**, 21 (1964).
53. Greep R. O., Fischer C. J., Morse A., *J. Am. Dental Assoc.* **36**, 427 (1948).
54. Greep R. O., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 541 (1955).
55. Gutman A. B., Yu T. F., Josiah Macy Jr., *Foundation First Conf. on Metab. Inter.* New York 1949, str. 11.
56. Gutman A. B., *Bull. Hosp. Joint. Dis.* **12**, 74 (1951).
57. Hancox N. M., Boothroyd B., *Modern Trends in Orthopaedics*, red. J. M. P. Clark, Butterworth, London 1964, str. 26
58. Hasselbach W., *Proc. Roy. Soc. London* **160B**, 501 (1964).
59. Haumont S., Vincent J., *Experientia* **17**, 296 (1961).
60. Haumont S., *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 141 (1961).
61. Hendricks S. B., Hill W. L., *Science* **96**, 255 (1942).
62. Herman H., François P., Fabry C., *Bull. Soc. Chim. Biol. Franc.* **43**, 629 (1961).
63. Herring G. M., *IV-Europ. Symp. on Calcified Tissues*, 28 March — 1 April 1966, wyd. J. P. Gaillard, International Congress Series No. 120 Excerpta Medica Foundation Amsterdam, New York, London, Milano. Tokyo, Buenos Aires 1966, str. 51
64. Howland J., *Harvey Lectures Series* 18, wyd. J. P. Lippincott Philadelphia 1923, str. 189.
65. Hohling H. J., Vahl J., *IV-Europ. Symp. on Calcified Tissues*, 28 March — 1 April 1966, wyd. P. J. Gaillard, International Congress Series No. 120 Excerpta Medica Foundation Amsterdam, New York, London. Milano, Tokyo, Buenos Aires, 1966, str. 56.
66. Irving J. T., *Clin. Orthop.* **17**, 92 (1960).
67. Irving J. T., *Nature* **194**, 390 (1962).
68. Irving J. T., *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne, Université de Liege 1965, str. 313.
69. Jackson-Fitton S., Smith R. H., *Symp. Soc. Exp. Biol.* **9**, 89 (1955).

70. Jackson-Fitton S., *Nature* **175**, 39 (1955).
71. Jackson-Fitton S., *Proc. Roy. Soc. London* **146 B**, 270 (1957).
72. Jackson-Fitton S., *Bone as a Tissues*, red. Rodahl, J. T. Nicholson, E. M. Brown, McGraw-Hill, New York, Toronto, London 1960, str. 165.
73. Kasavina B. S., Zenkevich G. D., *Clin. Chim. Acta* **6**, 874 (1961).
74. Krane S. M., Glimcher M. J., *Radioisotopes and Bone*, red. F. C. McLean, P. Lacroix, A. M. Budy, Blackwell Sci. Publ., Oxford 1962, str. 419.
75. Kutnerian R., Kuyper A. C., *J. Biol. Chem.* **233**, 760 (1958).
76. Lerch P., Delay A., IV-Europ. Symp. on Calcified Tissues, 28 March-1 April 1966, wyd. P. J. Gaillard, International Congress, Series No. 120, Excerpta Medica Foundation Amsterdam, New York, London, Milano, Tokyo, Buenos Aires, 1966, str. 69.
77. Lerch P., Vuilleumier C., Proc. III Europ. Symp. on Calcified Tissues, Davos 11-16 April 1965, red. H. Fleisch, H. J. J. Blackwood, M. Owen, Springer Verlag, New York, 1966, str. 132.
78. Martin G. R., Schiffman E., Bladen H. A., Nysten M., *J. Cell. Biol.* **16**, 143 (1963).
79. Moog F., Wenger E. L., *Am. J. Anat.* **90**, 339 (1952).
80. Mc Connell D., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 450 (1955).
81. Mc Lean F. C., *Science* **127**, 451 (1958).
82. Mc Lean F. C., Urist M. R., *Bone, an Introduction to the Physiology of Skeletal Tissue*, Univ. Press Chicago, 1961.
83. Mc Lean F. C., Budy A. M., *Radiation, Isotopes and Bone*, Academic Press New York, Londyn 1964.
84. Mc Gregor J., Brown W. E., *Nature* **205**, 359 (1965).
85. Neuman W. F., Mulryan B. J., *J. Biol. Chem.* **159**, 843 (1952).
86. Neuman W. F., Neuman M. W., *Chem. Rev.* **53**, 1 (1953).
87. Neuman W. F., Neuman M. W., *Amer. J. Med.* **22**, 123 (1957).
88. Neuman W. F., Neuman M. W., *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*, The University of Chicago Press 1958.
89. Neuman W. F., *Bone Biodynamics*, Henry Ford Hospital Internat. Symp., wyd. H. M. Frost. Little Brown, Boston, Massachusetts 1964, str. 393.
90. Papirov I. J., Palatnik I., *Sov. Phys. Cryst.* **7**, 222 (1962).
91. Owen M., *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne Universite de Liege 1965, str. 11.
92. Pautard F. G. E., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 514 (1951).
93. Pautard F. G. E., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 32 (1959).
94. Pautard F. G. E., *New Scientist* Nr 260, Nov. 1961, str. 364.
95. Pautard F. G. E., *Modern Trends in Orthopedics*, red. J. M. P. Clark, Butterworths, London 1964 rozdz. 2.
96. Pautard F. G. E., III Europ. Symp. on Calcified Tissues, Davos 11-16 April 1965, red. H. Fleisch, H. J. J. Blackwood, M. Owen, Springer Verlag, New York, 1966, str. 108.
97. Pearse A. G. E., IV-Europ. Symp. on Calcified Tissues, 28 March-1 April 1966, wyd. P. J. Gaillard, International Congress Series No. 120, Excerpta Medica Foundation Amsterdam, New York, London, Milano, Tokyo, Buenos Aires 1966, str. 85.
98. Perkins H. R., Walker P. G., *J. Bone Joint Surg.* **40 B**, 333 (1958).
99. Piez K. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **109**, 256 (1963).
100. Policard A., Baud C. A., Collet A., Daniel-Moussard H., Martin J. C., Proc. III Europ. Symp. on Calcified Tissues, Davos 11-16 April 1965, red. H. Fleisch, H. J. J. Blackwood, M. Owen, Springer-Verlag, New York 1966, str. 162.

101. Posner A., Fabry C., Dallemagne M. J., *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 304 (1954).
102. Posner A. S., Stutman J. M., Lippincott E. R., *Nature* **188**, 467 (1960).
103. Porter K. R., Pappas G. D., *J. Biophys Biochem. Cytol.* **5**, 153 (1959).
104. Richelle L. J., *Clin Orthop.* **33**, 211 (1964).
105. Robison R., *Biochem. J.* **20**, 388 (1926).
106. Robison R., *The Significance of Phosphoric Esters in Metabolism*, New York Univ. Press, New York 1932.
107. Robison R., Rosenheim A. H., *Biochem. J.* **28**, 684 (1934).
108. Rosenheim A. H., *Biochem. J.* **28**, 708 (1934).
109. Robinson R. A., Watson M. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 596 (1955).
110. Robinson R. A., Cameron D. A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 253 (1956).
111. Robinson R., *Bone as Tissue*, red. K. Rodahl, J. T. Nicholson, E. M., Brown, McGraw Hill, New York, Toronto, London 1960, str. 186.
112. Robinson R. A., *Clin. Orthop.* **17**, 69 (1960).
113. Rogers H. J., *Nature* **164**, 625 (1949).
114. Rubin P. S., Howard J. E., *Metabol. Interrel. Trans. of the Second Conf.* 1950, wyd. V. Reifenstein Jr., Josiah Macy Jr., Foundation New York 1950.
115. Sabatini D. D., Miller F., Barnett R. S., *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 57 (1964).
116. Schajowicz F., Cabrini R. L., *Science* **127**, 1447 (1958).
117. Shear M. J., Kramer B., *J. Biol. Chem.* **79**, 125 (1928).
118. Sheldon H., Robinson R. A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 1011 (1957).
119. Siegmund P., Dulce H. J., Korber F., Schutte E., *Naturwissenschaften* **46**, 358. (1959).
120. Siffert R. S., *J. Exptl. Med.* **93**, 415 (1951).
121. Sobel A. E., Cohen J., Kramer B., *Biochem. J.* **29**, 2640 (1935).
122. Sobel A. E., Nobel S., Hanok A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **72**, 68 (1949).
123. Sobel E., Hanok A., *J. Biol. Chem.* **197**, 669 (1952).
124. Sobel A. E., Burger M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **87**, 7 (1954).
125. Sobel A. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 713 (1955).
126. Sobel A. E., Burger M., Nobel S., *Clin. Orthop.* **17**, 103 (1960).
127. Sobel A. E., Penni A. L., Burger M., *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **22**, 233 (1960).
128. Sobel A. E., *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne, Université de Liege 1965, str. 291.
129. Solomons C. C., Irving J. F., *Nature* **178**, 548 (1956).
130. Solomons C. C., Neuman W. F., *J. Biol. Chem.* **235**, 2502 (1960).
131. Strates B. S., Neuman W. F., Levinskas G. J., *J. Phys. Chem.* **61**, 279 (1957).
132. Strates B., Neuman W. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **97**, 688 (1960).
133. Stutman J. M., Posner A. S., Lippincott E. R., *Nature* **193**, 369 (1962).
134. Szot Z., Kość jako narząd krytyczny, *Postępy Techniki Jądrowej Dodatek Nr 26* 337 1967.
135. Szot Z., Geisler J., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 111 (1967).
136. Taves D. R., Neuman W. F., *Atomic Energy Commission Report University of Rochester* 628 (1963).
137. Taves D. R., *Nature* **200**, 1312 (1963).
138. Taves D. R., *Clin. Orthop.* **42**, 207 (1965).

139. Termine J. D., Posner A. S., *Calc. Tissue Res.* **1**, 8 (1967).
140. Trautz O. R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 696 (1955).
141. Travis D. F., François C. J., Bonar L. C., Glimcher M. J., *J. Ultrastruct. Res.* **18**, 519 (1967).
142. Tristram G. R., *Calcified Tissues*, red. L. J. Richelle, M. J. Dallemagne, Universite de Liege 1965, str. 215.
143. Urist M. R., *J. Bone Joint Surg.* **46A**, 889 (1964).
144. Urist M. R., *Science* **150**, 893 (1965).
145. Waldman J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **69**, 262 (1948).
146. Watson M. L., Robinson R. A., *Am. J. Anat.* **93**, 25 (1953).
147. Whipple H. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **109**, 1 (1963).
148. Whitehead R. G., Weidmann S. M., *Biochem. J.* **71**, 312 (1959).
149. Weidmann S. M., *Internat. Rev. Connect. Tissue Res.* **1**, 339 (1963).
150. Weatherell J. A., Bailey P. J., Weidmann S. M., *Bone and Tooth. Proc. of the 1-rst Europ. Symp.*, red. H. J. J. Blackwood, Pergamon Press, Oxford, Londyn, New York, Paris 1964, str. 227.

JANUSZ Z. BEER*

Dziedziczne popromienne uszkodzenia zwierzęcych komórek somatycznych

Heritable Radiation-Induced Lesions in Somatic Mammalian Cells

Recent advances in the studies on radiation-induced heritable lesions affecting growth of mammalian cells *in vitro* are reviewed and discussed.

Skutki biologiczne promieniowania jonizującego fascynują badaczy różnych specjalności niemalże od dnia odkrycia promieniowania X. Dokonano w tej dziedzinie niezliczonych obserwacji prowadząc doświadczenia na wszystkich poziomach organizacji materii żywej. Szczególne zainteresowanie wzbudziło wykazanie mutagennego działania promieniowania w klasycznych pracach Mullera z lat 1927—28. Od tego czasu intensywne badania nad wpływem promieniowania na mechanizmy i struktury odpowiedzialne za dziedziczenie prowadzono na organizmach żywych od najprostszych do najbardziej złożonych. U organizmów niższych brak podziału na komórki somatyczne i rozrodcze stwarza możliwość wykrycia zmiany w dowolnym elemencie aparatu genetycznego na podstawie obserwacji charakterystycznych cech pokoleń potomnych. W organizmach wielokomórkowych natomiast, analiza cech potomstwa pozwala jedynie wykryć zmiany dotyczące komórek rozrodczych (tak zwane mutacje genetyczne). Prowadzenie tych badań na owadach i małych gryzoniach pozwoliło śledzić efekty mutagenne w wielkich populacjach.

Jednocześnie narastało zainteresowanie dziedzicznymi zmianami aparatu genetycznego komórek somatycznych — mutacjami somatycznymi. Zmiany dziedziczne komórek somatycznych wywoływane przez promieniowanie budzą szczególne zainteresowanie, między innymi ze względu na to, że do chwili obecnej nie wykluczono możliwości, iż tak zwane mutacje spontaniczne są w gruncie rzeczy mutacjami radiacyjnymi. Z badaniami tych zmian zaczęto wiązać nadzieję na wyjaśnienie niektórych zjawisk biologicznych tak doniosłych, jak powstawanie nowotworów, starzenie się organizmów, czy powstawanie populacji komórek kompeten-

* Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych, Warszawa

tnych immunologicznie. Szersze perspektywy przed badaniami mutacji somatycznych otworzyło opracowanie prostych metod hodowli komórek roślinnych i zwierzęcych *in vitro* oraz sposobów hodowania całych roślin z komórek somatycznych. Jednakże hodowla takich komórek, zwłaszcza zwierzęcych, jest o wiele trudniejsza niż hodowla mikroorganizmów, doświadczenia są znacznie bardziej czasochłonne (czas życia jednego pokolenia komórek zwierzęcych jest niekiedy 50, a nawet 100 razy dłuższy niż pokolenia bakterii), a poliploidalność i większa liczba genów w tych komórkach utrudniają wykrywanie zmian dziedzicznych. Dlatego też do niedawna jedynymi popromiennymi, dziedzicznymi zmianami obserwowanymi w zwierzęcych komórkach somatycznych były aberacje chromosomalne.

W ostatnich latach zwrócono uwagę, że analiza kinetyki wzrostu populacji komórek zwierzęcych *in vitro* pozwala również wykrywać dziedziczne zmiany wywoływane przez promieniowanie jonizujące.

Wzmianki wskazujące na występowanie popromiennych uszkodzeń, które upośledzają wzrost komórek zwierzęcych w hodowli znaleźć można już w pracach P u c k a z roku 1955. W pracach tych udało się po raz pierwszy ściśle ustalić zależność przeżywalności komórek zwierzęcych od dawki promieniowania, dzięki wprowadzeniu techniki hodowania komórek HeLa w postaci kolonii (technika klonowania). Komórki te przejawiają tendencję do przylegania do podłoża. Jeżeli początek hodowli tego typu daje zawiesina pojedynczych komórek, wówczas każda z wytworzonych kolonii stanowi potomstwo jednej komórki. Technika ta umożliwia nie tylko śledzenie losów potomstwa pojedynczych komórek, lecz również dokładne oznaczenie liczby komórek pozostałych przy życiu po poddaniu populacji komórkowej działaniu czynnika zewnętrznego, na przykład promieniowania. Puck posłużył się stosowanym już wcześniej w mikrobiologii kryterium, według którego za żywozną uznaje się komórkę zdolną do wytworzenia makroskopowej kolonii. Jednakże już w swych pierwszych badaniach stwierdził on niedostatki takiego kryterium żywotności i wprowadził kryteria dodatkowe, według których kolonie można podzielić na w pełni żywotne i nie rokujące nadziei na nieograniczoną w czasie proliferację (ang. *abortive colonies*).

W dalszych pracach P u c k a i wsp. (22, 23) znaleźć można szereg wzmianek, że w hodowlach zapoczątkowanych z populacji napromienianych promieniami X poszczególne kolonie różnią się szybkością wzrostu. Wolniejszy wzrost niektórych kolonii w takich hodowlach tłumaczono jednak albo zahamowaniem pierwszych podziałów komórkowych, albo też tym, że niektóre uszkodzone letalnie komórki mogą przejść jeszcze kilka podziałów.

W miarę postępu radiobiologicznych badań komórek zwierzęcych ukazywały się dalsze doniesienia o pojawianiu się w hodowlach przeżywających napromienienie komórek dających początek wolniej rosnącym klo-

nom (2), bądź też o znacznie większej zmienności rozmiarów poszczególnych żywotnych kolonii w napromienianych hodowlach w porównaniu z hodowlami kontrolnymi (6, 7, 12, 13, 27, 31). Zauważono, że odmienne zachowanie się napromienianych linii komórkowych utrzymuje się przez dłuższy czas (16) oraz podjęto próby izolowania i bliższego scharakteryzowania linii komórkowych o zmienionych cechach dziedzicznych (24). Ostatnio zaś, co nie jest bez praktycznego znaczenia dla radioterapii onkologicznej, wykazano, że również *in vitro* populacje napromienianych komórek są wysoce niejednorodne z punktu widzenia kinetyki wzrostu (8, 15).

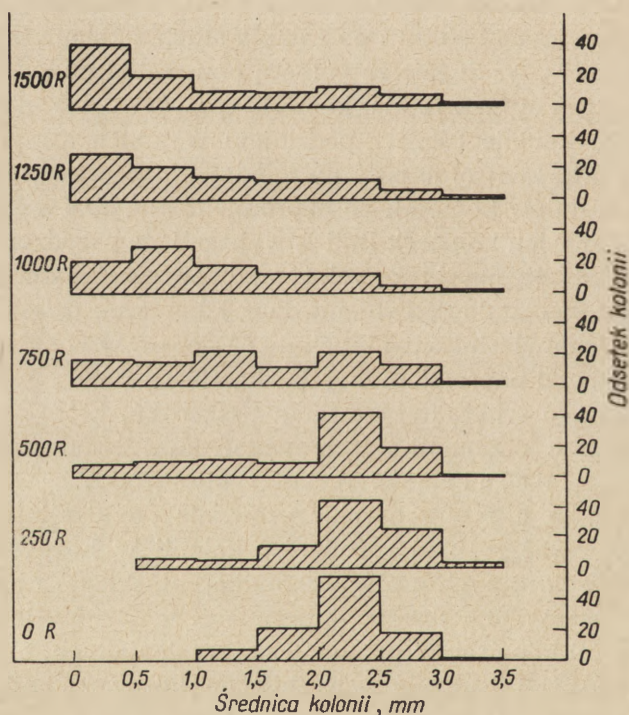
Pierwszymi, którzy poświęcili więcej uwagi sprawie niejednorodności napromienianych populacji komórek zwierzęcych byli Dewey, Humphrey i Cork (10). Zwrócili oni uwagę, że niejednorodność populacji przeżywających napromienianie jest przyczyną rozbieżności w ocenach skutków promieniowania przeprowadzanych dwoma podstawowymi metodami: oznaczania odsetka komórek, które utraciły zdolność do wytwarzania w pełni żywotnych kolonii i określania stopnia zahamowania wzrostu populacji. Wyniki uzyskiwane za pomocą obu metod powinny być całkowicie zgodne, gdyby wszystkie komórki przeżywające napromienienie i wytwarzające kolonie ulegały podziałom w takich samych odstępach czasu jak komórki kontrolne przy uwzględnieniu poprawki na opóźnienie pierwszych podziałów komórek po napromienieniu. Dewey i wsp. stosując hodowle mysich komórek linii L wykazali, że przyczyną poważnych rozbieżności wyników uzyskiwanych tymi dwoma metodami jest wydłużenie czasu potrzebnego do podwojenia liczby komórek (czasu podwajania) z 24 godzin w hodowlach kontrolnych do 41 godzin w populacji, która pochodziła od hodowli napromienionej dawką 1000 radów.

Próby bliższego scharakteryzowania uszkodzeń, które powodują spowolnienie wzrostu populacji napromienianych i tworzenie się małych kolonii podjął Sinclair (25). Wykorzystał on fakt, że technika klonowania pozwala na bliższe scharakteryzowanie populacji przeżywającej. Sinclair zanalizował rozkład rozmiarów kolonii w hodowlach komórek szczepu V-79 (izolowanych z płuca chomika chińskiego) nienapromienianych i napromienianych dawkami promieni X od 250 do 1500 R. Dobrał on tak ilości komórek w populacji napromienianych, aby uzyskać na wszystkich płytkach hodowlanych zbliżone liczby kolonii. Wspomnieć warto, że po napromienieniu dawką 1500 R zdolność do wytwarzania kolonii zachowywało około 0,2% komórek. Rozmiary kolonii w hodowli kontrolnej różnią się tylko nieznacznie, natomiast różnice rozmiarów kolonii wytworzonych w hodowlach napromienianych są łatwo widoczne. Rozkład rozmiarów kolonii w zależności od dawki ilustruje rysunek 1.

Najliczniejszą grupę w hodowli kontrolnej stanowiły kolonie o średnicy 2—2,5 mm. W hodowlach napromienianych obok takich kolonii wrosły również kolonie mniejsze i bardzo małe. W miarę wzrostu dawki

spektrum rozmiarów kolonii poszerzyło się i wzrastał odsetek małych kolonii; po dawce 1500 R kolonie o średnicy do 0,5 mm stanowiły ponad 40%.

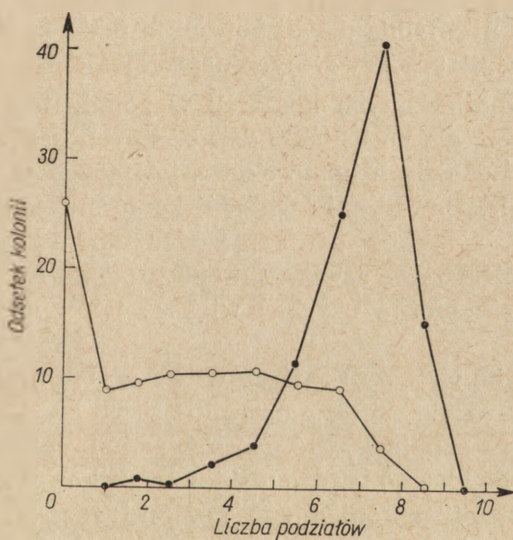
Następnie z hodowli napromienionych dawką 1500 R wyizolowano komórki z małych, średnich i dużych kolonii. Z dużych i średnich kolonii wyprowadzono ponad dwadzieścia linii komórkowych, zaś z małych kolonii, zawierających od 40 do 200 komórek — 14 linii komórkowych. W niektórych próbach materiał z małych kolonii dzielono na dziesięć mniejszych próbek. Wszystkie linie okazały się żywotne, a zatem przyczyn powstawania małych kolonii nie można doszukiwać się w niepełnej żywotności części komórek wchodzących w ich skład. Wszystkie nowe linie hodowano ponad rok porównując komórki poszczególnych linii pod względem rozmiarów, szybkości wzrostu, liczby chromosomów, występujących aberracji chromosomowych, wydajności klonowania i wrażliwości na promieniowanie.



Rys. 1. Rozkład rozmiarów kolonii komórek V-79 w zależności od dawki (25).

Stwierdzono, że czas podwajania w większości dużych kolonii wynosił od 10—14 godzin, natomiast w koloniach małych sięgał nawet 34 godzin. Nie znaleziono żadnej korelacji pomiędzy zwolnionym wzrostem a występowaniem aberracji chromosomowych (choć znajdowano je w ponad 30% komórek napromienionych dawką 1500 R) ani też nie znaleziono związ-

ku pomiędzy szybkością wzrostu kolonii a ploidalnością komórek. Zarówno wśród linii pochodzących z dużych, jak i małych kolonii znajdowano populacje komórkowe znacznie różniące się wydajnością klonowania. Natomiast okazało się, że linie wyprowadzone z małych kolonii są bardziej wrażliwe na promieniowanie: średnia dawka letalna (D_{37}) wynosiła dla nich 130—150 R, podczas gdy dla komórek pochodzących z dużych kolonii dla wyjściowej linii V-79 sięgała ona 200 R. Ponowne napromienienie komórek linii tworzących małe kolonie powoduje powstanie nowego spektrum wielkości kolonii, przy czym rozkład wielkości kolonii porównywalny z uzyskiwanym po pierwszej ekspozycji obserwowano po napromienieniu znacznie niższymi dawkami. Fakt ten, jak również utrzymywanie się wydłużonego czasu podwajania przez okres odpowiadający setkom pokoleń wskazują wyraźnie na dziedziczenie subletalnego uszkodzenia przez komórki wykazujące upośledzony wzrost.



Rys. 2. Rozkład rozmiarów kolonii po dziesięciodniowej inkubacji hodowli komórek HeLa.

●—●—● — hodowla kontrolna, ○—○—○ — hodowla napromieniona dawką 600 R. W każdej kolonii oznaczono liczbę komórek i na tej podstawie obliczono liczbę podziałów, przez które przeszły populacje w poszczególnych koloniach (19).

Nias, Gilbert, Lajtha i Lange (19) zanalizowali rozwój poszczególnych kolonii w napromienianych hodowlach komórek HeLa, stosując dokładniejszą niż pomiar średnicy kolonii technikę oznaczania liczby komórek. Stwierdzili oni jednak, że nawet nie napromieniane populacje takich komórek są niejednorodne i ustalili, że pojawianie się wolniej rosnących komórek może być związane z wywołaniem subletalnych uszkodzeń przez trypsynę stosowaną w czasie przenoszenia hodowli na no-

we płytki. Zmieniając warunki oddzielania komórek od podłoża uzyskali oni znacznie bardziej jednorodną populację o czasie podwajania około 29 godzin i takie populacje poddali napromienianiu dawką 600 R promieniowania X, co zmniejsza do 6% liczbę komórek zdolnych do utworzenia kolonii. Oznaczenie liczby komórek w poszczególnych koloniach po dziesięciodniowej inkubacji (rysunek 2) potwierdziło, że promieniowanie powoduje uszkodzenie komórek prowadzące do powstawania szerokiego spektrum wielkości kolonii, a dalsze obserwacje upośledzonych populacji świadczyły o dziedzicznym charakterze uszkodzeń hamujących wzrost.

Badania autoradiograficzne Niasa i wsp. (19), a również niektóre dane Sinclaira (25) wskazują, że główną przyczyną zahamowania wzrostu w małych koloniach jest wydłużenie czasu życia pokolenia.

Omówione wyniki badań wskazują zatem, że wywoływane przez promieniowanie jonizujące dziedziczne uszkodzenia, upośledzające wzrost komórek zwierzęcych w hodowlach, są zjawiskiem powszechnym, przy czym stosunkowo niewielkie dawki powodują takie uszkodzenia u znacznego odsetka komórek przeżywających napromienienie.

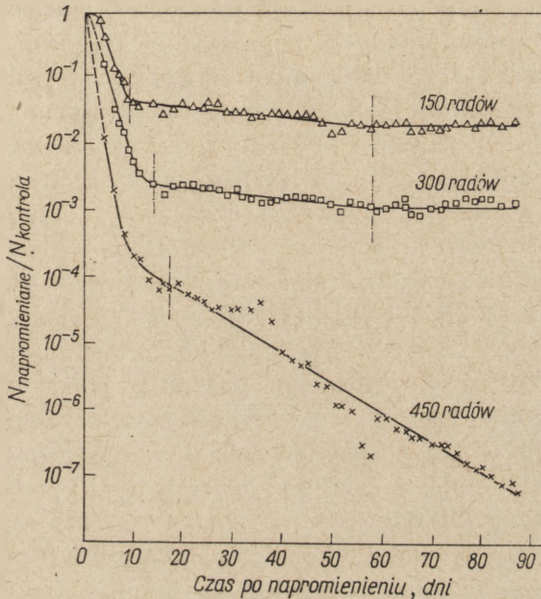
Duża liczba upośledzonych komórek w populacjach przeżywających napromienienie pozwala na badanie dziedzicznych uszkodzeń popromiennych również w hodowlach komórek wzrastających w postaci zawiesin. Nawet długotrwałe prowadzenie hodowli komórek tego rodzaju nie wymaga stosowania czynników uszkodzających, jak na przykład trypsyna czy związki kompleksujące używane do odczepiania komórek od podłoża. Ponadto z zawiesin można uzyskać większe ilości materiału do badań biochemicznych.

Śledząc kinetykę wzrostu komórek w hodowlach mysich limfoblastów linii L 5178Y w zawiesinach (3) autor niniejszego artykułu zauważył różnice w zachowaniu populacji, które przeżyły napromienienie i populacji kontrolnych w hodowlach o bardzo niskiej początkowej gęstości populacji, w których nawet nienapromienione komórki rozmnażają się wolniej. Wzrost komórek, które przeżyły napromienienie był jeszcze wolniejszy, co świadczy o ich większej wrażliwości na niekorzystne warunki wzrostu. Nadwrażliwość ta utrzymuje się przez dłuższy czas, przy czym stopniowo maleje zanikając po okresie odpowiadającym czasowi życia kilkudziesięciu pokoleń (5). Wskazywało to na niejednorodność populacji przeżywających napromienienie. Prawdopodobnie obok komórek wzrastających z normalną szybkością zawierały one i komórki upośledzone, które warunkowały nadwrażliwość, a w czasie wzrostu hodowli były stopniowo eliminowane. Prześledzenie procesu ich eliminacji (4) wykazało (rysunek 3), że populacje napromieniane niezbyt wysokimi dawkami przechodzą przez trzy charakterystyczne fazy rozwoju.

Bezpośrednio po napromienieniu rozpoczyna się faza I (po dawce 150 R odpowiada ona około 15-tu czasom podwajania), podczas której

eliminowane są uszkodzone letalnie komórki. Przed zakończeniem fazy I odsetek komórek nieżywotnych w populacji powraca do poziomu kontroli.

W fazie II populacje napromieniane wzrastają wolniej niż kontrolne, mimo że składają się w tym samym stopniu z komórek żywotnych. W fazie tej zapewne zachodzi eliminacja komórek upośledzonych pod względem aktywności proliferacyjnej. W znacznym przedziale dawek długość fazy II w niewielkim stopniu zależy od dawki i odpowiada nieco więcej niż 80-ciu czasom podwajania.



Rys. 3. Porównanie kinetyki wzrostu populacji komórek L 5178Y napromienianych różnymi dawkami promieniowania X i populacji nienapromienianej (4)

N — oznacza liczbę komórek w 1 ml

W fazie III szybkość wzrostu populacji napromienianych zrównuje się z szybkością wzrostu hodowli nienapromienianych.

Badania kinetyczne pozwoliły też ocenić w przybliżeniu udział komórek upośledzonych w populacji przechodzącej z fazy I do II. Okazało się, że na początku fazy II odsetek komórek, których wzrost jest upośledzony dziedzicznie, nie zależy od dawki promieniowania jonizującego w pewnym przedziale dawek. Potwierdził to ostatnio Berry (9) badając komórki HeLa. Brak zależności tego typu może oznaczać, że bezpośrednio po napromienieniu wszystkie komórki w populacji są uszkodzane. Później, w zależności od stopnia uszkodzenia i wydolności mechanizmów naprawy, uszkodzenia mogą prowadzić w niektórych komórkach do efektów letalnych, w innych następuje częściowa naprawa zapewniająca żywotność, ale

nie prowadząca do całkowitej odbudowy aktywności proliferacyjnej, w jeszcze innych wreszcie odbudowa aktywności proliferacyjnej jest całkowita.

Rozwój hodowli napromienionych wysokimi dawkami (na przykład populacja napromieniona dawką 450 R, przedstawiona na rysunku 3 nie wykazuje trzech faz rozwoju, gdyż prawdopodobnie populacja taka składa się wyłącznie z upośledzonych dziedzicznie komórek i wzrost hodowli jest zwolniony przez cały okres obserwacji.

Nie można wykluczyć, że dziedziczne uszkodzenia wywoływane przez promieniowanie w różnych rodzajach komórek, a nawet w różnych komórkach jednorodnej populacji mają odmienny charakter. Oprócz występowania w napromienianych populacjach komórek o wydłużonym cyklu komórkowym (19, 25) opisano również obserwacje świadczące o wyraźnie obniżonej żywotności populacji nawet po dłuższym czasie od napromienienia (25, 29, 30). Obydwa te efekty mogą występować łącznie w tej samej populacji dotycząc różnych (25), a nawet tych samych komórek. O tej ostatniej możliwości świadczą obserwacje Thompsona (26) wskazujące, że czas życia pokolenia w letalnie uszkodzonych liniach komórkowych stopniowo wydłuża się, aż do całkowitej utraty aktywności proliferacyjnej. Elkind i wsp. (11) tłumaczą to występowaniem efektów letalnych dopiero wówczas, gdy w komórkach potomnych ulegnie rozcieńczeniu poniżej krytycznego poziomu jakiś istotny składnik wewnątrzkomórkowy, którego wytwarzanie zostało zahamowane częściowo lub całkowicie. Ponadto pewien udział w obserwowanych efektach może mieć opóźnienie pierwszych po napromienieniu podziałów komórkowych, które według Lund i Rosengrena (17) może być bardzo znaczne i sięgać na przykład dla komórek HeLa kilku tygodni. Ocena ilościowa dotychczasowych danych wyklucza jednak aby opóźnienia takie były jedynym źródłem obserwowanych zjawisk.

Dokładniejsze prześledzenie losów poszczególnych komórek i ich potomstwa umożliwia technika mikrokinematografii, chociaż okres, w którym można prowadzić obserwacje tą techniką w praktyce nie przekracza czasu życia kilku pokoleń. Wyniki takich badań potwierdzają fakt wydłużania się cyklu komórkowego części komórek żywotnych w populacjach potomnych po napromienieniu (1, 14, 18). Ponadto stwierdzono jednak (1, 14) również wydłużenie cyklu komórkowego u potomstwa komórek, które bezpośrednio po napromienieniu nie wykazują wydłużenia cyklu. Wydłużenie okresu międzypodziałowego obserwowano niekiedy po paru normalnych cyklach, przy czym w pewnych przypadkach upośledzenie to przenoszone było na dalsze pokolenie, a w innych nie. Niewątpliwie świadczy to o złożoności zjawisk związanych z dziedzicznymi uszkodzeniami promiennymi.

Sklasyfikowanie zmian obserwowanych na poziomie komórkowym i ich ilościowa ocena może zbliżyć nas do znalezienia odpowiedzi na

zasadnicze pytanie dotyczące mechanizmów przenoszenia uszkodzeń z pokolenia na pokolenie. Być może uda się ustalić, czy zmiany te mają charakter mutacji cytoplazmatycznych, które jak wiadomo wyróżniają się znaczną częstością występowania, czy też, że są to uszkodzenia informacji genetycznej zawartej w jądrze. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia powinno ułatwić znalezienie odpowiedzi na pytanie czy popromienne efekty letalne i dziedziczne upośledzenie subletalne wiążą się z uszkodzaniem różnych miejsc w komórkach, czy też są one wynikiem uszkodzania tych samych obszarów, lecz w różnym stopniu.

Petrović i Nias (21) stwierdzili, że dodanie do napromienianej hodowli komórek HeLa równomolarnej mieszaniny czterech dezoksynukleozydów powoduje nie tylko zwiększenie liczby kolonii, lecz również pewne przyspieszenie wzrostu komórek uszkodzonych subletalnie. Można podejrzewać, że dezoksynukleozydy służą tu jako materiał do odbudowy uszkodzonych fragmentów DNA przez mechanizmy naprawy popromiennej.

W badaniach dziedzicznych uszkodzeń popromiennych przydatny może okazać się fakt, że inne czynniki wywołują podobne uszkodzenia. Wspomniano już o uszkodzającym komórki HeLa działaniu trypsyny (19, 20). Efektu tego nie stwierdzono wprawdzie w przypadku komórek chomika (25), ostatnio doniesiono jednak, że podobne uszkodzenia mogą wywoływać pewne substancje toksyczne, a nawet krótkotrwałe ogrzewanie hodowli komórkowych do 45—47°C (28).

Badania dziedzicznych uszkodzeń popromiennych w somatycznych komórkach zwierzęcych znajdują się w początkowej fazie. Na razie, obok dwu podstawowych kategorii komórek rozróżnianych w populacjach napromienianych, to jest komórek żywotnych i komórek uszkodzonych letalnie, dostrzeżono znajdującą się na pograniczu tych dwu kategorii klasę komórek żywotnych, lecz upośledzonych dziedzicznie. Dalszy rozwój tych badań z pewnością przyczyni się do zbliżenia teorii radiobiologicznych do rzeczywistego obrazu zjawisk zachodzących w napromienianych komórkach żywych.

LITERATURA

1. Adams R. B., Gregg E. C., Third Int. Congress of Radiation Research, Cortina d'Ampezzo, 1966, Book of Abstracts, Abstract 66/12.
2. Bases R. E., *Cancer Res.* **19**, 311 (1959).
3. Beer J. Z., Lett J. T., Alexander P., *Nature* **199**, 193 (1963).
4. Beer J. Z., Rosiek O., Sabliński J. M., Ziemia-Żak B., *Studia Biophysica* **6**, 103 (1968).
5. Beer J. Z., Ziemia-Żak B., Rosiek O., Sabliński J. M., Bull. Boris Kidric Inst. Nucl. Sci., Recovery of Irradiated Cells and Organisms by Nucleic Acids, Suppl. tom 17, 37 (1967).

6. Bender M. A., Gooch P. C., *Intern. J. Rad. Biol.* **5**, 133 (1962).
7. Berry R. J., *Intern. J. Rad. Biol.* **11**, 301 (1966).
8. Berry R. J., *Brit. J. Radiol.* **40**, 285 (1967).
9. Berry R. J., *Radiation Res.* **30**, 237 (1967).
10. Dewey W. C., Humphrey R. M., Cork A., *Intern. J. Rad. Biol.* **6**, 463 (1963).
11. Elkind M. M., Han A., Volz K. W., *J. Nat. Cancer Inst.* **30**, 705 (1963).
12. Elkind M. M., Sutton H., *Radiation Res.* **13**, 556 (1960).
13. Elkind M. M., Sutton H., Moses W. B., *J. Cellular Comp. Physiol.* suppl. **1**, 58, 113 (1961).
14. Froese G., *Intern. J. Rad. Biol.* **10**, 353 (1966).
15. Johnson R. E., Hardy W. G., Swain R. W., *Intern. J. Rad. Biol.* **10**, 243 (1966).
16. Kohn H. I., Fogh J. E., *J. Nat. Cancer Inst.* **23**, 293 (1959).
17. Lund E., Rosengren B., *Intern. J. Rad. Biol.* **11**, 99 (1966).
18. Marin G., Bender M. A., Third Int. Congress of Radiation Research, Cortina d'Ampezzo, 1966, Book of Abstracts, Abstract 588/8.
19. Nias A. H. W., Gilbert C. W., Lajtha L. G., Lange C. S., *Intern. J. Rad. Biol.* **9**, 275 (1965).
20. Nias A. H. W., Lajtha L. G., *Nature* **202**, 613 (1964).
21. Petrović D., Nias A. H. W., *Intern. J. Rad. Biol.* **11**, 609 (1966).
22. Puck T. T., Marcus P. I., *J. Exptl. Med.* **103**, 653 (1956).
23. Puck T. T., Marcus P. I., Cieciora S. J., *J. Exptl. Med.* **103**, 273 (1956).
24. Puck T. T., Morkovin D., Marcus P. I., Cieciora S. J., *J. Exptl. Med.* **106**, 485 (1957).
25. Sinclair W. K., *Radiation Res.* **24**, 584 (1964).
26. Thompson L. H., *Biophys. J.*, Biophysical Society Elventh Annual Meeting, Feb. 22-24, 1967, Houston, Texas, Abstracts, No FF5, str. 126.
27. Till J. E., Whitmore G. F., Proc. of the Third Canadian Cancer Research Conference, tom 3, red. R. W. Begg, New York, Academic Press, Inc., str. 415.
28. Westra A., *Studia Biophysica*, Radiobiological Symposium and Fifth Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, Spindleruv Mlyn, CSSR, 1967, str. 246.
29. Westra A., Barendsen G. W., *Intern. J. Rad. Biol.* **9**, 595 (1965).
30. Westra A., Barendsen G. W., *Intern. J. Rad. Biol.* **11**, 477 (1966).
31. Whitmore G. F., *Natl. Acad. Sci. — Natl. Res. Council Publ.* **888**, 49 (1961).

Laureaci Nagrody Nobla z dziedziny medycyny w 1967 roku G. Wald, R. Granit i H. K. Hartline

Nagrodę Nobla z zakresu medycyny za rok 1967 otrzymali zespołowo trzech uczeni: G. Wald, R. Granit, H. K. Hartline za wybitne odkrycia nad mechanizmem powstawania wrażeń wzrokowych.

G. Wald, lat 61, profesor Uniwersytetu Harvard, już w latach trzydziestych wykazał znaczenie witaminy A w procesie widzenia. Pod wpływem absorpcji kwantu światła w zewnętrznych członach pręcików rodopsyna poprzez związki pośrednie: preluminorodopsynę, lumino-rodopsynę i metarodopsynę, rozkłada się na neoretyninę b i opsynę. W czasie tej reakcji neoretynina, b-11-cis izomer aldehydu witaminy A₁, przekształca się w izomer *trans* i powstają dwie grupy -SH, które umożliwiają wytworzenie potencjału czynnościowego. W laboratorium Walda określono również inne pigmenty fotoreceptorów: jodopsynę, porfiropsynę i cjanopsynę. Okazało się, że substancje światłoczułe siatkówki kręgowców i pigmenty wzrokowe u bezkręgowców są podobne. Jest to jedno z pięknych i zdumiewających osiągnięć biochemicznych Walda we współczesnej biologii. Wald podał także dane doświadczalne dla trójchromatycznej teorii barw. Metodą mikrospektrofotometryczną wykazał w siatkówce ludzkiej trzy rodzaje czopków o maksimum absorpcji: 450, 525, i 555 nm.

R. Granit, lat 67, emerytowany dyrektor Królewskiego Instytutu Neurofizjologii w Sztokholmie, przeprowadził zasadnicze badania z elektrofizjologii siatkówki. Wykazał on, że potencjał czynnościowy daje obiektywny obraz siatkówki *in situ*. Prace R. Granita w tej dziedzinie są podstawą elektretinografii klinicznej. Dzięki zastosowaniu mikroelektrod zbadał on aktywność poszczególnych komórek zwojowych siatkówki oraz ustalił ich wzajemne oddziaływania na bodźce pobudzające i hamujące. Znane są powszechnie prace Granita nad mechanizmem powstawania wrażeń barwnych. Niektóre fotoreceptory (dominatory) posiadają rozległą czułość spektralną, natomiast inne elementy siatkówki (modulatory) bezpośrednio, bądź po chromatycznej adaptacji, są wrażliwe na widmo o stosunkowo wąskim paśmie. Badania Granita dały pierwszy bezpośredni dowód wyspecjalizowanej czułości spektralnej określonych czopków.

Jednakże poznanie mechanizmu działania fotoreceptorów jest tylko częścią problemów widzenia. Drugi zespół zagadnień dotyczy sposobu kodowania informacji wzrokowej przy przekazywaniu jej od fotoreceptorów do mózgu. Zasadniczych odkryć w tej dziedzinie dokonał H. K. Hartline, lat 67, profesor biofizyki Uniwersytetu Rockefellera w Nowym Yorku, w r. 1932 zapisał on jako pierwszy aktywność pojedynczych włókien nerwu wzrokowego u kraba *Limulus*. Wyniki jego badań dowiodły, że impulsy przekazywane przez pojedyncze włókna są mało zróżnicowane według kształtu i amplitudy. Informacja dotycząca na przykład oświetlenia fotoreceptora zakodowana jest w częstotliwości impulsów biegnących do mózgu. Również zasadnicze dla teorii widzenia były rozległe badania Hartline'a nad polami recepcji włókien nerwu wzrokowego. Hartline podał mapę tych pól dowodząc jednocześnie, że komórka zwojowa siatkówki może być pobudzona lub hamowana przez wiele fotoreceptorów mających zbieżne drogi. Wymienione tu, niektóre wyniki badań Hartline'a oraz odkrycia Walda, i Granita nawzajem się uzupełniają, choć były wykonywane niezależnie. Przyczyniły się one do częściowego poznania mechanizmu fotorecepcji — transformacji kwantów światła w zjawisko widzenia.

T. Mikulski

RECENZJE

Biosynthetic Pathways in Higher Plants. red. J. B. Pridham i T. Swain. Academic Press. Londyn, New York 1965. 212 str.

Recenzowana książka jest zbiorem referatów wygłoszonych na sympozjum poświęconym biosyntezie pierwotnych i wtórnych produktów roślinnych, zorganizowanym w dniach od 13 do 15 kwietnia 1964 r. w Leeds przez *Plant Phenolic Group*, która na dorocznym zebraniu w tym samym roku, w związku z rozszerzonym programem dyskusji przyjęła nazwę *Phytochemical Group*.

Podobnie jak materiały poprzednich sympozjów tej organizacji (*Phenolics in Plants in Health and Diseases*, Pergamon Press, 1960; *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pergamon Press 1963) również i recenzowany tom nie jest zbiorem opracowań monograficznych o jednolitym charakterze i obejmujących w sposób mniej lub bardziej wyczerpujący pewną grupę zagadnień biochemii roślin. *Biosynthetic Pathways* jest raczej zbiorem dyskusyjnych referatów dotyczących różnych dziedzin badań nad pierwotnymi i wtórnymi metabolitami roślin, przygotowanych przez najwybitniejszych specjalistów pracujących w tych dziedzinach w Wielkiej Brytanii.

Ten dyskusyjny charakter najmniej widoczny jest w dwóch pierwszych pracach recenzowanego tomu: *N. A. Burges* i *M. H. Hurst* z Uniwersytetu w Liverpoolu omawiają rolę struktur wewnątrzkomórkowych w ewolucji i regulacji szeregów biosyntetycznych, a *T. Swain* z Cambridge większą część swego referatu poświęcił metodom badania biosyntezy. Następnie *T. W. Goodwin* z Uniwersytetu w Aberystwyth omawia w dwóch kolejnych artykułach zagadnienia biosyntezy karotenoidów i regulacji syntezy terpenoidów w roślinach wyższych. Następne prace to: *L. Fowdena* z Uniwersytetu Londyńskiego o biosyntezie aminokwasów, *D. Butlera* z Liverpoolu o problemach badania biosyntezy białka w roślinach wyższych, *R. D. Prestona* z Leeds o biosyntezie celulozy, *F. A. Isherwooda* z Cambridge o niektórych zagadnieniach biosyntezy ligniny, *T. B. Cromwella* z Hull o biogenezie alkaloidów piperydynowych, *J. Lascelles* z Oxfordu o problemach biosyntezy chlorofilu i *S. L. Ransona* z Newcastle o kwasach roślinnych. W recenzowanym tomie znalazły się również nadesłane streszczenia referatów *G. A. Barbera* z Berkely w USA o roli nukleotydów w przemianach cukrowców i *H. Griesebacha* z Freiburga w NRF o antocyjanidynach i flawonoidach.

Żaden z autorów prac zamieszczonych w omawianym tomie nie stawił sobie za cel przedstawienia całokształtu poruszanego zagadnienia. Wszystkie wypowiedzi są skierowane do specjalistów pracujących w omawianej lub pokrewnych dziedzinach i dobrze zorientowanych w podstawowych zagadnieniach biosyntezy pierwotnych i wtórnych metabolitów roślinnych. Uogólnienia przedstawione w niektórych pracach oparte są na wynikach badań ostatnich lat i często stanowią jeszcze hipotezę roboczą, a nie usystematyzowanie szczegółowo udowodnionych procesów. Dotyczy to zarówno mechanizmu regulacji syntez terpenoidów, jak i procesu powstawania włókien celulozy, wzajemnych zależności różnych dróg biosyntezy alkaloidów piperydynowych, a nawet tak dobrze zbadanych zagadnień, jak biosynteza aminokwasów i roślinnych kwasów organicznych. Zwraca uwagę poruszanie przez niemal każdego autora proble-

matyki regulacji procesów biosyntetycznych, dokonywane najczęściej w formie propozycji lub hipotez.

Zbiór referatów zawarty w tomie „Biosynthetic Pathways” nie obejmuje całości zagadnień związanych z biosyntezą metabolitów roślinnych i nie to było zamierzeniem wydawcy. Niektóre zagadnienia są zaledwie zasygnalizowane w postaci streszczeń referatów, inne dotyczące niemniej ważnych grup połączeń chemicznych, jak na przykład lipidy, kwasy nukleinowe czy liczne metabolity wtórne — całkowicie pominięte.

Profil recenzowanej książki powoduje, że nie mogłaby ona być zalecana jako lektura uzupełniająca dla początkujących pracowników nauki. Niemniej dobrze by było aby mogła się znaleźć w każdej pracowni zainteresowanej zagadnieniami biochemii roślin.

S. Lewak

M. Rybák, Z. Brada, J. M. Hais: Säulenchromatographie an Cellulose Jonenaustauschern, Jena 1966, VEB, G. Fischer, 551 str.

Czechosłowacki ośrodek badań nad chromatografią oddawna już zalicza się do czołówki światowej. Podręcznik „Chromatografia Bibułowa” w języku czeskim wydany w 1954 roku należał do pionierskich i najbardziej wyczerpujących opracowań z tej dziedziny w owym okresie i przetłumaczono go na wiele języków. Drugie, kilkutomowe, rozszerzone wydanie tego podręcznika w języku niemieckim zawiera bibliografię doskonale opracowaną według problemów i autorów do 1960 roku. Dla nas książka ta jest szczególnie pożyteczna gdyż w żadnym z dotychczasowych wydań zarówno polskich, jak i zagranicznych nie znajdziemy tak wyczerpująco zebranych prac polskich. Czechosłowacki zespół chromatograficzny skupia wielu chemików różnych specjalności, od teoretyków do analityków, a ponadto biochemików, biologów i lekarzy. Świadczą o tym systematycznie organizowane sympozja międzynarodowe i starannie wydawane pamiętniki sympozjalne, ponadto wydawnictwa specjalistyczne z dziedziny metodyki chromatograficznej. Pozostaje nam tylko podziwiać i wysoko cenić te zespołowe osiągnięcia.

Ostatnio wydana w języku niemieckim czeska monografia pod tytułem: „Chromatografia kolumnowa na jonowymiennikach celulozowych” zawiera 16 rozdziałów opracowanych przez 12 chemików i biochemików. Autorami są kierownicy i pracownicy Instytutów naukowych i Katedr Uczelni: Instytutu Biochemii i Farmacji, Hematologii i Transfuzji krwi, Onkologii, Mikrobiologii, Wirusologii oraz Zakładów Uniwersyteckich Biochemii i Botaniki. Niewątpliwie aktualność i wartość monografii wiążą się z trudnym problemem doboru najlepszej metodyki chromatograficznej dla rozdzielania związków wielkocząsteczkowych, a w szczególności białek. Obecnie osiągnięcia techniki kolumnowej na jonowymiennikach celulozowych stawiają tę metodę w rzędzie najlepszych w analizie związków wielkocząsteczkowych. Na cztery pierwsze rozdziały w części ogólnej składają się: syntetyczny przegląd znanych metod chromatograficznych i ich krótka charakterystyka (*J. Hais*), preparatyka jonowymienników celulozowych i charakterystyka ich własności fizycznych i chemicznych (*J. Koči* i *Z. Pechan*), problemy teoretyczne procesów jonowymiennych (*A. Kočent*) i szczególnie cenne i pożyteczne dla większości odbiorców szczegóły techniczne odnośnie doboru odpowiednich do badanego materiału jonowymienników, ponadto praktyczne przepisy i interpretacja wyników (*Z. Brada*). Część systematyczna obejmuje frakcjonowanie białek osocza w fizjologii i patologii (*M. Rybák*) rozdzielanie

hemoglobiny i innych białek w krwinkach (Z. Brada), białek w płynach ustrojowych (mleko, płyn mózgo-rdzeniowy, ślina, sok trzustkowy, jady wężowe, mocza) (Z. Brada i Č. Altaner), białek tkankowych (Č. Altaner), hormonów o budowie białkowej i polipeptydowej (M. Queisnerova), enzymów (Č. Altaner), białek roślinnych (J. Tupý i M. Čech), kwasów nukleinowych i polinukleotydów (J. Doscočil), substancja pochodzenia bakteryjnego (V. Liebl), wirusów (L. Hana), wielocukrowców (Z. Brada) i związków niskocząsteczkowych (aminokwasów i peptydów, witamin i koenzymów, anionów i kationów nieorganicznych) (Z. Pechan).

Wszystkie te rozdziały łączą wspólny schemat opracowania. Redakcji udało się uniknąć pospolitego błędu wydawnictw zbiorowych — nierównomiernej rozbudowy poszczególnych rozdziałów. Piśmiennictwo zebrano oddzielnie dla każdego rozdziału. Niestety brak pozycji bibliograficznych z ostatnich lat, cechujący wszystkie większe wydawnictwa zbiorowe o dłuższym okresie przygotowawczym do publikacji, wystąpił i w tym wydawnictwie. Szkoda, że Redakcja nie dodała „addendum”. Liczne tabele z przeglądem jonowymienników i ich charakterystyką ułatwiają czytelnikowi dobór tychże do własnych badań. Sądząc na podstawie tytułu wydawałoby się, że powyższa monografia jest bardzo specjalistyczna i może budzić zainteresowanie tylko u bardzo niewielkiego grona czytelników. Jednakowoż dokładny przegląd wszystkich rozdziałów pozwala ją ocenić jako bardzo użyteczną dla większości pracowni naukowych i usługowych, laboratoriów klinicznych, pracowni mikrobiologicznych i przemysłowych. Pewną trudność dla polskiego czytelnika może stanowić język niemiecki publikacji, ponieważ szczególnie młodsze pokolenie pracowników naukowych i laboratoryjnych ogranicza swą znajomość języka obcego raczej tylko do angielskiego. Książka ta zainteresuje głównie tych pracowników, którzy zajmują się rozdzieleniem i analizą mieszanin związków wielocząsteczkowych. Doskonały papier i piękne opracowanie graficzne podnoszą wartość i uzupełniają zalety tego cennego wydawnictwa.

J. Opieńska-Blauth

Biochemical Factors in Alcoholism. wyd. Roger P. Maickel, Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig 1967. str. XI+256.

Omawiane dzieło obejmuje 19 opracowań zgrupowanych w czterech rozdziałach. Na pierwszy z nich składają się artykuły omawiające działanie etanolu na niektóre procesy biochemiczne u człowieka i zwierząt doświadczalnych. Rozdział ten rozpoczyna opracowanie na temat użycia zwierząt doświadczalnych do badań nad alkoholizmem (J. P. v. Wartburg). Autor podkreśla przyczyny, dla których nie wolno bezkrytycznie ekstrapolować na człowieka wyników uzyskanych na zwierzętach, mimo iż metabolizm etanolu przebiega u nich po tych samych torach. Dwa opracowania dotyczą wolnego wyboru między wodą a 10—15% etanolem przez zwierzęta doświadczalne. Stwierdzono genetycznie uwarunkowaną skłonność do wyboru napoju alkoholowego przez szczury (O. A. Forsander). Obciążanie alkoholem ośrodkowego układu nerwowego małp nie wpływa na wybór (G. Koz, J. H. Mendelson). Na szczególną uwagę zasługują opracowania dotyczące hamującego działania etanolu na aktywny transport kationów (H. Kalant, Y. Israel), metabolizm amin w alkoholizmie (V. J. Schenker, B. Kissin, L. S. Maynard, A. C. Schenker) oraz wpływu disulfiramu i etanolu na katabolizm noradrenaliny u człowieka (A. A. Smith, S. Gitlow). Obok wywołanego przez hamowanie aktywnego transportu wpływu alkoholu na aktywność ATP-azy, w wystąpieniu objawów zatrucia ważną rolę odgrywać może też hamujące działanie alkoholu na uwalnianie acetylocholiny z zakończeń nerwowych. Wybitne

wydalanie tryptaminy z moczem u ludzi po spożyciu alkoholu spowodowane jest przede wszystkim zwiększonym uwalnianiem amin z depozytów. Disulfiram, lek często używany w kuracji odwykowej alkoholików, hamując dehydrogenazę aldehydową, wpływa na metabolizm noradrenaliny. Taki sam efekt wywołują duże ilości alkoholu. Opracowanie dotyczące roli aldehydu octowego (*E. B. Truitt Jr., G. Duritz*) podkreśla, że ten produkt pośredni w przemianie alkoholu działa jako bodziec stresowy na układ podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowy i jest czynnikiem uwalnającym aminy biogenna z innych części układu nerwowego.

Rozdziały drugi i trzeci poświęcone są zagadnieniom związanym z metabolizmem etanolu i zmianami patologicznymi jakie związek ten wywołuje u ludzi i zwierząt.

Wszelkie badania nad syntezą tłuszczów i kwasów tłuszczowych z alkoholu (*H. Casier*) stanowią podstawę dla zrozumienia roli etanolu w patogenezie marskości wątroby. Doświadczenia nad seryjnym oznaczaniem aldehydu octowego w powietrzu pęcherzykowym po podaniu alkoholu (*G. Freund*) podkreślają toksyczne działanie aldehydu octowego w patogenezie chronicznego alkoholizmu. W badaniach nad wpływem glukagonu i trójiodotyroniny u psów (*F. W. Kinard*) oraz hormonów tarczycy, insuliny i D-glukozy u ludzi (*P. E. Stokes, B. Lasley*) autorzy stwierdzili brak działania tych związków na kinetykę przemian alkoholu, co zwłaszcza w odniesieniu do trójiodotyroniny, jest wciąż jeszcze sporne. Wyniki badań nad metabolizmem alkoholu u myszy z różną zawartością dehydrogenazy alkoholowej w wątrobie (*E. C. Wilson*) wskazują na brak korelacji między szybkością utleniania etanolu a zawartością tego enzymu. Wiele uwagi poświęcono zaburzeniom przemiany tłuszczowej. Badania nad patogenezą stłuszczenia wątroby w ostrym zatruciu etanolem (*N. R. Di Luzio, M. Poggi*) wskazują na obniżenie zdolności utleniania trójglicerydów w wątrobie. Etanol wzmacnia wbudowywanie kwasów tłuszczowych do trójglicerydów, a zmniejsza ich wbudowywanie do fosfolipidów (*M. G. Horning, M. Wakabayashi, H. M. Maling*). Proces ten, podobnie jak mobilizacja trójglicerydów z wątroby pod działaniem alkoholu, zależy ponadto od czynników hormonalnych i od płci (*M. G. Horning, L. Mani, K. L. Knox*). Omówiono też ścisłą zależność pomiędzy poziomem alkoholu we krwi a syntezą trójglicerydów w wątrobie szczurów zatrutowanych dużymi dawkami etanolu (*H. M. Maling, B. Highman, J. M. Hunter, W. M. Butler Jr., M. A. Williams*). Zamieszczone w tym rozdziale dwa artykuły poglądowe omawiają: wpływ niedoborów dietetycznych na pogłębianie się zmian patologicznych oraz korzystne działanie białka i sterydów anabolicznych (*C. M. Leevy, W. T. Hove*), a także hiperlipemię i hiperurykemię towarzyszącą wzmózonemu spożyciu alkoholu (*C. S. Lieber*). Z danymi biochemicznymi o mechanizmie toksycznego działania alkoholu na wątrobę zgadzają się też wyniki badań morfologicznych (*E. A. Porta, W. S. Hartroft, F. A. De La Iglesia*).

Ostatnia część obejmuje tylko jeden obszerny artykuł (*E. C. Hoff*) o perspektywach leczenia i rehabilitacji alkoholików uwzględniający farmakologiczne, kliniczne i socjologiczne aspekty tego trudnego zagadnienia.

Szeroki wachlarz tematyki uzupełnionej wyczerpująco piśmiennictwem predestynuje omawianą książkę do roli podstawowego przewodnika w studiach nad alkoholizmem. Zainteresuje ona niewątpliwie szerokie koła biochemików, toksykologów, fizjologów, farmakologów i patologów, jak również internistów, neurologów i psychiatrów, a także specjalistów spoza kręgu dyscyplin lekarskich, jak socjologów i psychologów, którzy znajdą w niej cenne informacje dotyczące problemów rehabilitacji i resocjalizacji alkoholików.

K. Spett

Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. Vol. 10, Part I. red. R. T. Holman, Pergamon Press, Oxford—London—New York—Edinburgh, 1967.

Część pierwsza 10-ego tomu wydawnictwa „*Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*” zawiera jeden tylko obszerny (150 stron) artykuł przeglądowy pod tytułem: „*Fatty livers and lipotropic phenomens*”. Autorami artykułu są: C. C. Lucas i Jessie H. Ridout, badacze kanadyjscy, od lat współpracujący z C. H. Best'em w Toronto. Autorzy bardzo obszernie i szczegółowo omawiają zagadnienia dotyczące odkładania się tłuszczu w wątrobie pod wpływem niewłaściwie dobranych składników pokarmowych, zastrzegając się przy tym, że nie jest ich celem dokładne omówienie otłuszczenia spowodowanego innymi czynnikami (chorobowymi lub toksycznymi).

W roku 1932 Best i jego współpracownicy stwierdzili, że przy pewnych sztucznie dobranych dietach można spowodować otłuszczenie wątroby u zwierząt doświadczalnych i wprowadzili określenie „substancji lipotropowych” dla tych związków, które zapobiegają gromadzeniu się tłuszczu względnie przyspieszają usuwanie jego nadmiaru. Substancją lipotropową jest przede wszystkim cholina, a poza tym niektóre inne związki (betaina, metionina). Pokarm zawierający zbyt mało choliny lub jej prekursorów powoduje otłuszczenie wątroby, a często również wiele innych zmian patologicznych, jak uszkodzenie nerek, naczyń krwionośnych, przewodu pokarmowego, zaburzenia w laktacji, zahamowanie wzrostu i inne.

Rola choliny w zapobieganiu tym zjawiskom była przez długi czas niejasna. Przypisywano jej cechy witaminy ze względu na to, że jest to związek organiczny, niezbędny dla prawidłowego rozwoju, a dostarczający bardzo niewiele energii. Z drugiej jednak strony cholina jest częścią cząsteczki lecytyny, ważnego składnika strukturalnego komórki i zapotrzebowanie na cholinę jest znacznie większe niż na witaminy. Zapotrzebowanie na cholinę zależy zresztą od ilości pobieranego pokarmu i jest szczególnie duże, gdy pokarm zawiera niewiele białka, a znaczne ilości tłuszczu lub związków prowadzących do jego powstawania. W tych przypadkach potrzeba znacznych ilości choliny, aby zapobiec otłuszczeniu wątroby i innym zmianom patologicznym.

Odkładanie się tłuszczu w wątrobie może wynikać z kilku przyczyn: 1) ze wzmózonej mobilizacji tłuszczu z tkanek zapasowych i nadmiernego jego dopływu do wątroby, 2) wzmózonej syntezy w wątrobie, 3) zahamowania utleniania oraz 4) z zakłóceń w transporcie tłuszczu z wątroby do krwi. Nikt dotychczas nie stwierdził udziału choliny w trzech pierwszych z wymienionych procesów, natomiast rola jej w transporcie lipidów z wątroby do krwi jest bardziej niż prawdopodobna. Tłuszcz bowiem jest transportowany z wątroby w postaci lipoproteidów, do których wytworzenia niezbędne są fosfolipidy, głównie zawierające cholinę lecytyny.

Wydaje się, że pozostałe zaburzenia występujące przy niedoborze choliny można sprowadzić do faktu, że cholina jest konieczna dla prawidłowej syntezy fosfolipidów, niezbędnego składnika wszystkich struktur komórkowych.

Lipotropowy efekt innych substancji (betainy, metioniny, niektórych aminokwasów) tłumaczy się tym, że ulegają one przekształceniu w cholinę, głównie poprzez mechanizm metylacji.

Artykuł Lucasa i Ridout w sposób bardzo szczegółowy (i często bardzo rozwlekły) omawia zmiany zachodzące w wątrobie przy otłuszczeniu, metody analizy, zjawiska lipotropowe i pseudolipotropowe, procesy prowadzące do syntezy choliny z jej prekursorów (głównie na zasadzie transmetylacji) wreszcie chemiczne właściwości choliny i przypuszczalny mechanizm jej działania. Nie wydaje się, aby mógł

on zainteresować nie specjalistów, ale dla osób zajmujących się tym zagadnieniem może prawdopodobnie być przydatny, zwłaszcza ze względu na niezmiernie obszerny zestaw literatury. Spis literatury zawiera około 1200 pozycji i uwzględnia zarówno prace nowsze, jak dawniejsze i bardzo dawne (sięga w przeszłość aż do drugiej połowy XIX wieku).

P. Włodawer

J. Opieńska-Blauth, A. Smockiewiczowa Vademecum chromatograficzne. PWN, Warszawa, 1968, str. 206

W roku 1957 ukazała się pierwsza, obszerna polska monografia pod tytułem „Chromatografia”, ujmująca szeroki zakres zagadnień związanych z tą współczesną metodą analityczną i badawczą. W następnych latach wydano kilka niewielkich monografii specjalistycznych polskich autorów, omawiających przede wszystkim zastosowanie chromatografii do celów specjalnych, na przykład do badania witamin, hormonów, aminokwasów i białek. Obecna książka „Vademecum chromatograficzne” jest elementarnym podręcznikiem chromatografii bibułowej, dającym również przegląd innych technik chromatograficznych. Książka składa się z trzech części. Pierwszą poświęcono ogólnemu przedstawieniu procesów i technik chromatograficznych, w drugiej omówiono chromatografię wybranych grup związków chemicznych (cukrowców, aminokwasów, kwasów organicznych glikozydów, i terpenów, alkaloidów oraz sterydów), trzecia zawiera ćwiczenia i zadania.

Książka jest przeznaczona głównie dla studentów chemii, farmacji, biologii itp., powinna także służyć pomocą zarówno w odpowiednich szkołach zawodowych jak w różnego typu pracowniach analitycznych.

SPIS TREŚCI

A. L. Copley — Fizjologiczna rola fibrynogenu i fibryny	343
S. Niewiarowski — Biochemia hemostazy	349
B. Lipiński — Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny	373
J. Prokopowicz — Aspekty biochemiczne niektórych funkcji leukocytów	383
A. Mazanowska, O. Rosiek, Z. Kuratowska — Regulacja biosyntezy hemoglobiny	393
Z. Kuratowska — Sprzężenie zwrotne w wewnątrzkomórkowej regulacji przemian	415
A. Odrzywolska — Struktura i własności makroglobuliny γ M	427
M. Jeleńska — Niektóre zagadnienia metabolizmu proliny	437
Z. Szot — Biochemiczne aspekty procesu mineralizacji kości	447
J. Z. Beer — Dziedziczne popromienne uszkodzenia zwierzęcych komórek somatycznych	463
Laureaci nagrody Nobla z dziedziny medycyny w 1967 roku, G. Wald, R. Granit i H. K. Hartline (T. Mikulski)	473
Recenzje książek (S. Lewak, J. Opieńska-Blauth, K. Spett, P. Włodawer)	475

W 4-tym zeszycie tego tomu ukażą się:

1. Niektóre problemy translacji kodu genetycznego, E. Gąsior
2. N-formylometionyl-tRNA jako inicjator syntezy łańcucha polipeptydowego, B. Grzelakowska-Sztabert
3. Białka jądra komórkowego a mechanizm kontroli genetycznej, J. Malec
4. Informacja genetyczna w rozwoju zarodkowym, L. Zagórska
5. Przemiany kwasów nukleinowych w komórce i organellach glonu *Acetabularia sp.*, M. Rytel, J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski
6. Epizom F u *Escherichia coli*, M. Rajchert-Trzpił
7. Transformacja bakterii, M. Piechowska

POSTĘPY BIOCHEMII

July 1968

ARTICLES IN POLISH

Volume 14

Number 3

A. L. Copley—On the Physiological Roles of Fibrinogen and Fibrin (Vet. Admin. Hospital, East Orange, New Jersey)	343
S. Niewiarowski—Biochemistry of Hemostasis (Dep. Physiol. Chem., Med. School, Białystok)	349
B. Lipiński—Soluble Fibrin Monomer Complexes (Dep. Physiol. Chem. Med. School, Białystok)	373
J. Prokopowicz—Biochemical Aspect of Some Granulocyte Functions (Dep. Physiol. Chem., Med. School, Białystok)	383
A. Mazanowska, O. Rosiek, Z. Kuratowska—Control of Haemoglobin Biosynthesis (Inst. Nucl. Res., Warszawa)	393
Z. Kuratowska—Feed-back Regulation in the Intracellular Control of Metabolism (Inst. Nucl. Res., Warszawa)	415
A. Odrzywolska—Structure and Properties of Macroglobulin γ M (Dep. Biochem., Inst. Rheumatol., Warszawa)	427
M. Jeleńska—Some Problems of Prolin Metabolism (Inst. Nucl. Res., Warszawa)	437
Z. Szot—Biochemical Aspects of Bone Calcification (Inst. Nucl. Res., Warszawa)	447
J. Z. Beer—Heritable Radiation Induced Lesions in Somatic Mammalian Cells (Inst. Nucl. Res., Warszawa)	463
Chronicle	473

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.

SPIS TREŚCI

A. L. Copley — Fizjologiczna rola fibrynogenu i fibryny	343
S. Niewiarowski — Biochemia hemostazy	349
B. Lipiński — Rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny	373
J. Prokopowicz — Aspekty biochemiczne niektórych funkcji leukocytów	383
A. Mazanowska, O. Rosiek, Z. Kuratowska — Regulacja biosyntezy hemoglobiny	393
Z. Kuratowska — Sprzężenie zwrotne w wewnątrzkomórkowej regulacji przemian	415
A. Odrzywolska — Struktura i własności makroglobuliny γ M	427
M. Jeleńska — Niektóre zagadnienia metabolizmu proliny	437
Z. Szot — Biochemiczne aspekty procesu mineralizacji kości	447
J. Z. Beer — Dziedziczne popromienne uszkodzenia zwierzęcych komórek somatycznych	463
Laureaci nagrody Nobla z dziedziny medycyny w 1967 roku, G. Wald, R. Granit i H. K. Hartline (<i>T. Mikulski</i>)	473
Recenzje książek (<i>S. Lewak, J. Opieńska-Blauth, K. Spett, P. Włodawer</i>)	475