

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1970

tom 16

nr 4

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

Forma maszynopisu. Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imię (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich 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, opatrzony kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście, np. Tablica 1, Wzór I, Rys 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej 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

Polonia

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1970
tom XVI
zeszyt 4

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawełkiewicz (Poz-
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1970

Nakład 2090 (1956+134)	Oddano do składania 17.VII.1970
Ark. wyd. 6,5, druk. 5,75 + 5 wkl.	Podpisano do druku 7.X.1970 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w październiku 1970 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1197/70 K-60

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

KRZYSZTOF STAROŃ*

Funkcja metaboliczna cytochromu P-450

Metabolic Function of Cytochrome P-450

The properties, supposed mode of the action and the role of cytochrome P-450, the terminal enzyme of microsomal and mitochondrial mixed-function oxidases, are reviewed.

W 1952 roku Strittmatter i Ball (39) stwierdzili w mikrosomach obecność cytochromu z grupy B, nazwanego później cytochromem b_5 . Wykryty cytochrom stanowił jednak tylko około 40% ogólnej ilości hemu występującego w mikrosomach. Pozostałe 60% Klingenberg (18) i Garfinkel (12) przypisali wykrytemu przez siebie w mikrosomach wątroby szczura i wieprza hemoproteidowi, którego kompleks z tlenkiem węgla wykazywał charakterystyczne maksimum absorpcji przy 450nm. Na podstawie tej własności został on nazwany przez Omura i Sato (30, 31) pigmentem 450 (w skrócie — P-450), a później cytochromem P-450. Obecność cytochromu o analogicznych własnościach stwierdzono następnie w mikrosomach wątroby u przedstawicieli wszystkich gromad kręgowców oraz w mikrosomach kory nadnerczy, nerki i śluzówki jelita u badanych ssaków (35).

Początkowo cytochrom P-450 lokalizowany był wyłącznie w mikrosomach, co znalazło między innymi odbicie w proponowanej nazwie „retikulochrom” (35). Jednakże Harding i wsp. (13) stwierdzili obecność cytochromu P-450 w mitochondriach kory nadnerczy, a Yohro (47) znalazł go także w mitochondriach wyodrębnionych z ciała żółtego wołu.

Prace przeprowadzone w latach sześćdziesiątych dały w rezultacie dość dokładną charakterystykę cytochromu P-450. Jednocześnie na podstawie uzyskanych wyników powiązано jego funkcję z aktywnością mikrosomalnych i mitochondrialnych hydroksylaz.

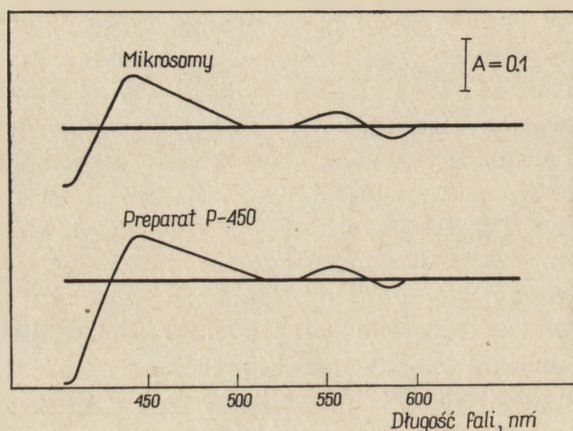
* Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: pCMB — *p*-chlorortęciobenzoesan, DOC — dezochochol, ERP — elektronowy rezonans paramagnetyczny, *g* — jeden z parametrów widma ERP, tzw. współczynnik Landego.

W artykule omówione będą niektóre fizykochemiczne własności cytochromu P-450, które dają informacje o jego budowie oraz rola, jaką odgrywa on w procesach hydroksylacji.

I. Niektóre fizykochemiczne własności cytochromu P-450

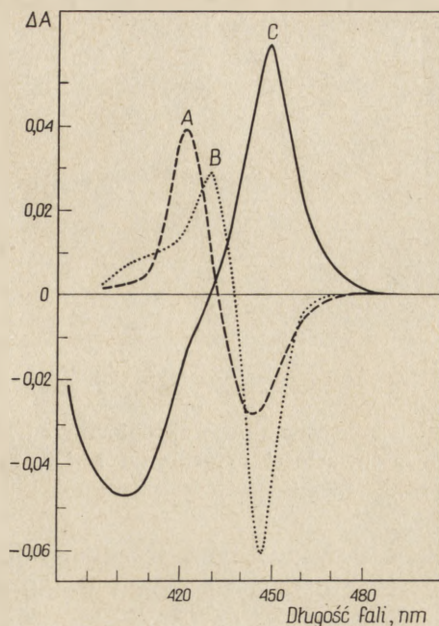
Widma cytochromu P-450 oraz jego kompleksów z różnymi ligandami różnią się zasadniczo od widm innych hemoproteidów. I tak widmo różnicowe (rysunek 1) posiada dwa szerokie i nieostre maksima przy 440 i 550nm. Charakterystyczne widmo kompleksu z tlenkiem węgla wykazuje wyraźne maksimum przy 450nm, w przeciwieństwie do widm kompleksów innych hemoproteidów, których maksima obserwuje się w rejonie 420—430nm (rysunek 2). Widmo cytochromu P-450 w obecności izocyjanku etylu posiada dwa maksima: przy 430 i 455nm.



Rys. 1. Widmo różnicowe cytochromu P-450 w mikrosomach i rozpuszczalnym preparacie (wg. 27)

A — 0,1 jednostki absorpcji

Charakterystyka spektralna, jak i w ogóle większość badań dotyczących cytochromu P-450, wykonana została na nienaruszonych mikrosomach lub też na mikrosomach, z których usunięto cytochrom b_5 . Jest to związane z wrażliwością cytochromu P-450 na czynniki rozluźniające strukturę błon lipoproteidowych, a więc detergenty (12, 26, 35) oraz na trawienie enzymami lipolitycznymi i proteolitycznymi (31, 35). Dopiero w ostatnich latach stosując niskie stężenia lubrolu (27) lub cholanu (26) udało się przeprowadzić cytochrom P-450 do roztworu bez utraty charakterystycznych właściwości.

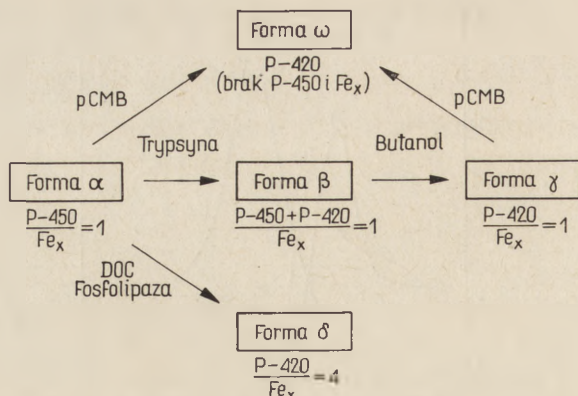


Rys. 2. Widma różnicowe kompleksów hemoproteidów z tlenkiem węgla (wg. 32)
A — peroksydaza, B — oksydaza cytochromowa, C — cytochrom P-450. ΔA — przyrost absorpcji

Pod wpływem enzymów proteolitycznych, lipolitycznych i detergentów, jak również pCMB, czynników kompleksujących żelazo (4,7-dwufenylo-1,10-fenantrolina) oraz miedź (2,9-dwumetylo-4,7-dwufenylo-1,10-fenantrolina) mikrosomy tracą zdolność tworzenia z tlenkiem węgla kompleksu absorbującego przy 450nm. Jednocześnie pojawia się hemoproteid posiadający widmo różnicowe charakterystyczne dla cytochromów z grupy B oraz wytwarzający z tlenkiem węgla kompleks o maksimum absorpcji przy 420nm. Został on nazwany cytochromem P-420 (31).

Mason i wsp. (25) zlokalizowali w mikrosomach sygnał ERP niskospinowego żelaza hemoproteidu o trzech pasmach: g_1 — 1.91, g_2 — 2.25 i g_3 — 2.41. Trawiąc mikrosomy trypsyną i przeprowadzając ekstrakcję butanolem otrzymali oni rozpuszczalny hemoproteid, tzw. cząstki Fe_x , który wykazywał wykryte uprzednio sygnały ERP. Widmo optyczne cząstek Fe_x jest prawie identyczne z widmem cytochromu P-420. pCMB powoduje zniknięcie sygnałów niskospinowego żelaza w cząstkach Fe_x , dając w rezultacie preparat wykazujący wszelkie własności cytochromu P-420.

Badając zmiany zawartości cytochromu P-450, P-420 oraz cząstek Fe_x w preparatach mikrosomalnych traktowanych trypsyną, butanolem, pCMB, fosfolipazą i dezoksychohanem Mason i wsp. (24) stwierdzili, że zarówno cytochrom P-420, jak i cząstki Fe_x są produktami degradacji cytochromu P-450 i zaproponowali podany schemat przemian (schemat 1).



Schemat 1. Model przemian mikrosomalnego akceptora zredukowanego NADP. Pod nazwą preparatu podany stosunek zawartości cytochromu P-450, P-420 i Fe_x (wg. 24)
 DOC — dezoksychoolan, pCMB — *p*-chlorortęciobenzoesan

Charakter czynników powodujących przemiany jednej formy w drugą sugeruje udział w strukturze cytochromu P-450 zarówno grup tiolowych, jak i lipidów.

II. Umiejscowienie cytochromu P-450 w mikrosomalnym i mitochondrialnym systemie przenośników elektronów

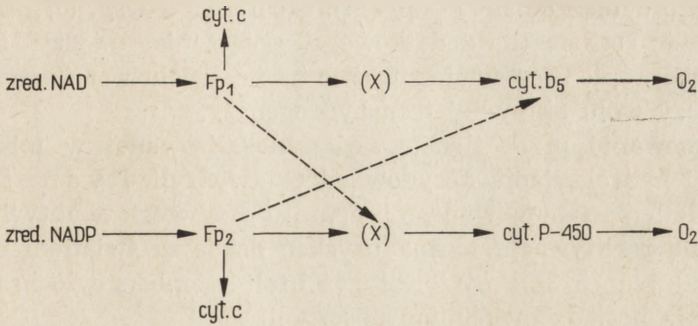
Aktywność biologiczna cytochromu P-450 związana jest z enzymatycznymi układami oksydoreduktaz hydroksylujących, nazywanych potocznie hydroksylazami, które wykorzystują jako jeden z donorów zredukowany NADP. Drugim substratem są dla hydroksylaz sterydy, kwasy tłuszczowe oraz tzw. substancje ksenobiotyczne, czyli egzogenne związki o strukturach nie syntetyzowanych przez organizm.

Używając izotopu ^{18}O Mason (23) wykazał, że ogólne równanie reakcji katalizowanych przez hydroksylazy ma postać:



gdzie AH_2 i $AHOH$ oznaczają odpowiednio substrat będący akceptorem tlenu i uhydroksylowany produkt. Dla enzymów katalizujących reakcje tego typu Hayashi i Nozaki (14) proponują nazwę monooksygenazy.

Badania przeprowadzone w latach sześćdziesiątych wykazały, że aktywność hydroksylazy związana jest z szeregiem enzymów, tworzących łańcuch przenośników elektronów z zredukowanego NADP i zredukowanego NAD na tlen (6, 11, 17, 24, 25, 28, 32, 36, 40, 41). Kolejność przenośników jest podobna do kolejności w łańcuchu oddechowym (schemat 2).



Schemat 2. Kolejność przenośników w mikrosomalnym łańcuchu transportu elektronów (wg. 11)

Fp — flawoproteid

Elektrony z zredukowanego NADP lub zredukowanego NAD przenoszone są przez flawinę na białko o charakterze cytochromu. Flawoproteidy biorące udział w transporcie elektronów utożsamiane są z wykrytymi w mikrosomach enzymami wykazującymi aktywność reduktazy zredukowanego NAD — egzogenny cyt. c (40) i zredukowanego NADP — egzogenny cyt. c (17). Jednakże oba te enzymy nie mają zdolności redukcji mikrosomalnych cytochromów. Przypuszcza się więc (36), że pomiędzy flawiną a cytochromem P-450 umiejscowiony jest jeszcze jeden przenośnik, oznaczony na schemacie 2 symbolem „X”. Jego charakter nie jest jeszcze poznany; uwzględnia się możliwość udziału ubichinonu (35) lub ferroproteidu, posiadającego niehemowo związane żelazo (28, 32).

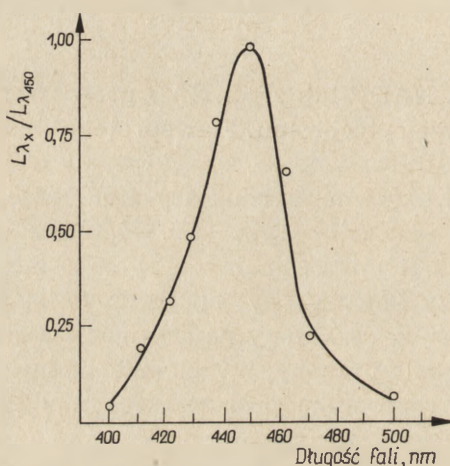
Cytochrom P-450 jest, jak się przypuszcza, końcowym enzymem łańcucha transportu elektronów związanego z hydroksylacją. O udziale cytochromu P-450 w procesach hydroksylacji oraz o jego końcowym umiejscowieniu świadczy szereg faktów, jak:

- redukcja cytochromu P-450 przez zredukowany NADP;
- hamowanie reakcji hydroksylacji przez tlenek węgla;
- stymulacja syntezy cytochromu skorelowana ze stymulacją aktywności hydroksylacyjnej;
- tworzenie się kompleksów cytochrom P-450-substrat.

a) Redukcja cytochromu P-450 w preparacie mikrosomalnym zachodzi w warunkach beztlenowych zarówno pod wpływem podsiarczynu, zredukowanego NADP, jak i zredukowanego NAD (4, 35). Szybkość redukcji, wyrażona jako stała jednocząsteczkowa, wynosi odpowiednio 5, 1,5 — 2,0 i 0,3 — 0,4 min^{-1} (35). Dane te zgadzają się z podanym uprzednio schematem, na którym cytochrom P-450 umieszczony jest w łańcuchu transportu elektronów z zredukowanego NADP. Możliwość redukcji cytochromu P-450 przez zredukowanego NAD sugeruje istnienie połączenia między systemem przenoszącym elektrony z zredukowanego NAD na cytochrom b_5 oraz z zredukowanego NADP na cytochrom P-450. Jest ono lokalizowane między flawoproteidem a czynnikiem X (11) lub

bezpośrednio cytochromem P-450 (24). Cooper i wsp. (6) proponowali włączenie do schematu dodatkowego połączenia między zredukt. NAD i zredukt. NADP, opierając swoje sugestie na wykryciu w mikrosomach kory nadnerczy wołu aktywnej transhydrogenazy.

b) Hamowanie przez tlenek węgla zlokalizowanej w mikrosomach aktywności hydroksylacji steroidów na C₂₁ wykryli Ryan i Engel (34). Naświetlenie zahamowanego preparatu przywraca tę aktywność (32). Maksymalną reaktywację można uzyskać działając światłem o długości fali 450nm (rysunek 3). Przy tej długości fali kompleks cytochrom P-450-tlenek węgla posiada maksimum absorpcji.

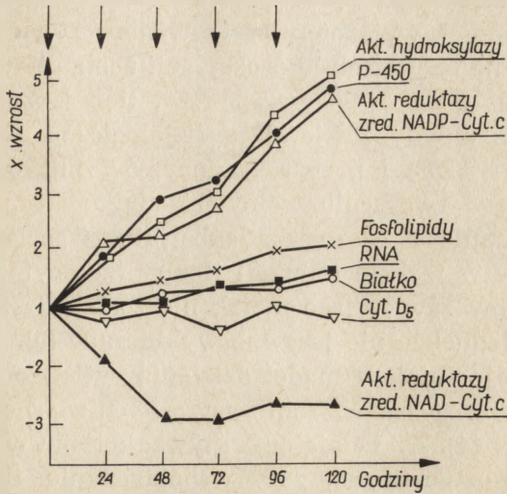


Rys. 3. Wpływ światła odwracający hamowanie hydroksylacji steroidów przez tlenek węgla (32)

Na osi rzędnych odłożony stosunek $\frac{L_{\lambda_x}}{L_{\lambda_{450}}}$, gdzie $L = \frac{K_h - K_d}{i K_d}$, i — natężenie światła, K_h i K_d — stałe szybkości reakcji po i bez oświetlenia

Podobne wyniki otrzymano badając odwracanie zahamowanej tlenkiem węgla mikrosomalnej demetylacji kodeiny, 4-monometyloaminopiryny i hydroksylacji acetanilidu (6).

c) Wstrzyknięcie substancji ksenobiotycznych do organizmu zwierzęcego powoduje bardzo szybki wzrost ilości cytochromu P-450 (10,22). Ernster i Orrenius (10), podając szczurom luminal, wykazali ścisły związek między wzrostem ilości cytochromu P-450 a zwiększeniem aktywności hydroksylacji i aktywności reduktazy zredukt. NADP-cytochrom c, która przypisywana jest flawoproteidowi biorącemu bezpośredni udział w przenoszeniu elektronów z zredukt. NADP na tlen. W tych samych warunkach nie obserwowano wzrostu aktywności reduktazy zredukt. NAD-cytochrom c ani wzrostu poziomu cytochromu b₅ (rysunek 4).



Rys. 4. Zmiany zawartości składników mikrosomalnych oraz niektórych aktywności enzymatycznych w preparatach z wątroby szczurów traktowanych luminałem. Na osi rzędnych odłożona wielokrotność zmiany zawartości składników lub aktywności mikrosomalnych, na osi odciętych — czas trwania doświadczenia. Strzałki u góry oznaczają poszczególne iniekcje luminału (wg 10)

Zwiększona synteza cytochromu P-450 oraz pozostałych enzymów łańcucha przenoszącego elektrony z zred. NADP na tlen związana jest ze wzrostem ilości fosfolipidów w retikulum (10). Zmiany te nie są jednak ściśle skorelowane w czasie ze zmianami aktywności hydroksylazy.

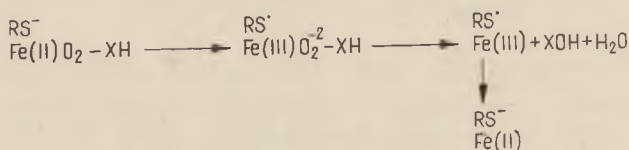
d) Stymulację syntezy cytochromu P-450 można wykryć przez odpowiedni wzrost absorpcji przy 450nm preparatu mikrosomów nasyconych tlenkiem węgla. Wzrost ten jest proporcjonalny do zwiększenia przyłączenia znakowanego substratu (10). Poza tym dodatek substratu do preparatu mikrosomalnego powoduje szereg efektów, które można interpretować jako skutki oddziaływania z cytochromem P-450. N a r a s i m h u l u (29) stwierdził, że dodanie 17-hydroksyprogesteronu do mikrosomów kory nadnerczy modyfikuje widmo optyczne preparatu. Wykryto również, że w tych samych warunkach następuje zmiana widma ERP (7). Substrat wykazuje także działanie ochronne w procesie termicznego przekształcania cytochromu P-450 w cytochrom P-420. Podobne działanie wykazują inhibitory hydroksylacji sterydów — dikumarol (45) i metopiron (46).

III. Mechanizm działania cytochromu P-450

Końcowe miejsce, jakie zajmuje cytochrom P-450 w łańcuchu transportującym elektrony z zred. NADP sugeruje, że spełnia on bezpośrednią funkcję wprowadzania do cząsteczki substratu zaktywowanego uprzednio tlenu. Za udziałem żelaza w tym procesie przemawiają wyniki szeregu badań przeprowadzonych na układach modelowych (15, 38, 44).

Sposób aktywacji tlenu przez hemowo związane żelazo cytochromu P-450 nie jest jeszcze wyjaśniony całkowicie. Staudinger i wsp. (38), opierając się na badaniach hydroksylacji acetanilidu przez modelowe układy zawierające Fe^{2+} i H_2O_2 oraz Fe^{2+} , tlen i czynnik redukujący, jak również przez układy zawierające fizjologiczne donory elektronów (zred. NAD, zred. NADP) i preparaty enzymów mikrosomalnych, sugerują udział żelaza w tworzeniu wolnych rodników typu $\text{OH}\cdot$ lub $\text{O}_2\text{H}\cdot$, reagujących następnie z cząsteczką substratu. Chociaż pojawianie się wolnych rodników w trakcie redukcji tlenu przez cytochrom P-450, jak i przez inne enzymy zawierające metal, nie zostało jeszcze bezpośrednio udowodnione, to jednakże nie jest ono wykluczane (5).

Stosunkowo najpełniejszy model działania cytochromu P-450, tłumaczący dodatkowo szereg jego charakterystycznych własności, podają Williams i wsp. (15, 44). Zakładają oni aktywację tlenu w kompleksie z żelazem związanym z porfiryną, przy współdziałaniu elektronów pochodzących z jednoelektronowego donora, najprawdopodobniej grupy tiolowej (schemat 3).



Schemat 3. Model działania cytochromu P-450 (wg. 15)

XH, XOH — substrat i uhydroksylowany produkt, RS — ugrupowanie z rodnikiem tiolowym

Już poprzednio (24) stwierdzono w pobliżu żelaza obecność grupy tiolowej, która warunkowała charakterystyczny dla formy utlenionej niskospinowy sygnał ERP. Wygaszanie sygnału ERP w trakcie redukcji cytochromu P-450 tłumaczone jest osłabieniem oddziaływania Fe-S i przejściem żelaza w stan wysokiego spinu (15).

Podany powyżej model tłumaczy mechanizm aktywowania tlenu, nie uwzględnia natomiast drugiego aspektu niezbędnego do pełnego zrozumienia działania cytochromu — sposobu i specyficzności łączenia się z substratem.

IV. Specyficzność substratowa cytochromu P-450

Substraty ulegające hydroksylacji przy udziale cytochromu P-450 różnią się od siebie strukturą chemiczną. Substraty endogenne należą do dwóch grup: kwasów tłuszczowych i sterydów. Hydroksylacja kwasów tłuszczowych związana jest z wprowadzeniem grupy $-\text{OH}$ w pozycję ω (21, 33, 43). Sterydy hydroksylowane są przy udziale cytochromu P-450

w pozycjach: 6 β (1), 7 α (2), 11 β (26), 16 α (1), 18 (2), 20 α (37) i 21 (32). Hydroksylacja w pozycji 12 α , zachodząca w trakcie biosyntezy kwasu cholewskiego, nie jest prawdopodobnie związana z udziałem cytochromu P-450 (41). Nie jest również jasny udział tego cytochromu w hydroksylacjach prowadzących do powstania cholesterolu (2, 3, 42).

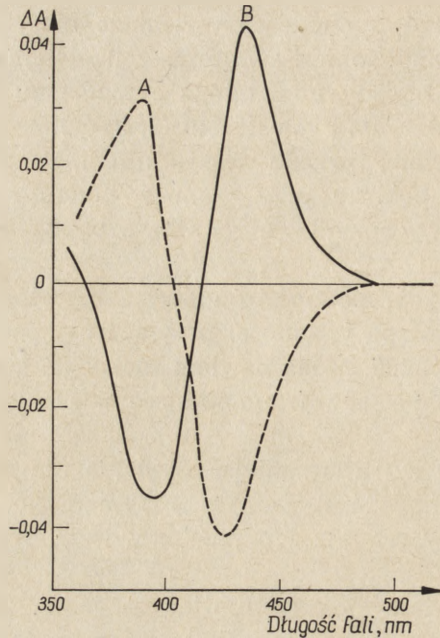
Substraty egzogenne, przede wszystkim leki, przeprowadzane są w związki bardziej polarne przy pomocy takich reakcji, jak N-, O- i S-dealkilacja oraz hydroksylacja rodnika aromatycznego lub alifatycznego (8).

Wobec tak dużej różnorodności budowy substratów hydroksylaz interesujący jest problem specyficzności przyłączania poszczególnych związków do cytochromu P-450. Mogą bowiem zachodzić trzy możliwości:

1. Cytochrom P-450 posiada jedno miejsce wiązania substratu, wysoce niespecyficzne.
2. Cytochrom P-450 ma kilka miejsc wiązania dla różnych substratów.
3. Cytochrom P-450 nie jest jednym enzymem, lecz istnieje cała ich grupa, z której każdy reaguje z odpowiednim substratem lub grupą podobnych substratów.

Szereg danych zdaje się przemawiać za jedną z ostatnich hipotez. Wszystkie substraty wiążące się z cytochromem P-450 można ogólnie podzielić na dwie grupy, różniące się fizykochemicznymi własnościami kompleksu z cytochromem P-450 oraz działaniem na syntezę enzymu. Substraty pierwszej grupy (luminal, aminopiryna, heksobarbital) modyfikują widmo optyczne cytochromu P-450 wywołując pojawienie się maksimum przy około 390nm i minimum przy 420nm (9,26) oraz widmo ERP powodując zwiększenie intensywności sygnału g_3 (7). Kompleksy cytochromu P-450 z substratami drugiej grupy (3-metylocholanteren, anilina) charakteryzują się różnicowym widmem optycznym o minimum przy około 390nm i maksimum przy 420nm (rysunek 5), a w widmie ERP sygnał g_1 jest bardziej, g_3 zaś mniej intensywny niż w widmie cytochromu P-450. Pomiedzy obiema grupami nie istnieje współzawodnictwo łączenia się z enzymem; natomiast w obrębie grupy poszczególne substraty konkurują między sobą.

Różnice w działaniu luminalu i 3-metylocholanterenu na syntezę cytochromu P-450 przejawiają się zarówno w samym procesie biosyntezy, jak i w charakterze powstałego enzymu. Luminal powoduje wolniejszy wzrost aktywności hydroksylacyjnej niż 3-metylocholanteren oraz bardziej wyraźne zmiany w mikroskopowym obrazie mikrosomów (20). Badania nad zanikaniem radioaktywności wprowadzonej do rdzenia porfirynowego cytochromu P-450 poprzez podanie znakowanego trytem kwasu δ -aminolewulinowego wykazują, że zanikanie to jest wolniejsze w przypadku cytochromu P-450 powstałego pod wpływem 3-metylocholanterenu niż w cytochromie stymulowanym luminalem, przy czym wyklucza się działanie ochronne 3-metylocholanterenu na gotowy już enzym (19). Sugeruje



Rys. 5. Widma różnicowe kompleksów mikrosomów wątroby szczura: A — z aniliną, B — z heksobarbitem (7)
 ΔA — przyrost absorpcji

to, że rdzeń porfirynowy cytochromu P-450 powstałego pod wpływem 3-metylocholanotrenu jest metabolizowany wolniej, niż w analogicznym cytochromie stymulowanym luminalem. Kompleks izocyjanku etylu z cytochromem P-450 syntetyzowanym pod wpływem luminału wykazuje podobny, jak w naturalnym enzymie, stosunek maksimum przy 430 i 455nm, podczas gdy w cytochromie stymulowanym 3-metylocholanotrenem maksimum przy 455nm wzrasta w większym stopniu. Wreszcie enzymy indukowane obydwoma związkami różnią się między sobą położeniem maksimum w widmie kompleksu z tlenkiem węgla oraz kinetyką hydroksylacji poszczególnych substratów (1).

Za bezpośredni dowód istnienia dwóch form cytochromu P-450 mogą posłużyć badania przeprowadzone przez Imai i Sato (16) nad kompleksem cytochromu z izocyjankiem etylu. Stosunek intensywności maksimum widma różnicowego tego kompleksu zależy od pH , przy czym przy granicznych wartościach jedno z maksimum zanika całkowicie. Intensywność maksimum przy 455nm wykazuje taką samą zależność od pH , jak szybkość hydroksylacji aniliny. Na tej podstawie Imai i Sato identyfikują pasma absorpcji przy 430 i 455nm z dwiema formami cytochromu P-450 o tym samym powinowactwie do izocyjanku etylu, które to formy w zakresie pH 6—8 przyjmują różne stany równowagi. Brana jest

jednak również pod uwagę możliwość zależnej od *pH* kombinacji izocyjanku etylu z jedną tylko formą cytochromu.

Wydaje się, że wiązanie pewnej grupy substratów przez określoną tylko formę cytochromu P-450 nie jest jedynym powodem specyficzności procesów hydroksylacji, przynajmniej w odniesieniu do substratów fizjologicznych. Wiele z tych substratów wykazuje przed lub po wprowadzeniu grupy hydroksylowej aktywność biologiczną (hormony sterydowe). Stąd też nawet przyjmując istnienie kilku form cytochromu P-450 trudno jest wyobrazić sobie regulowaną syntezę czy też degradację każdego z hormonów. Jest natomiast prawdopodobne, że na regulację procesów hydroksylacji może mieć wpływ również lokalizacja cytochromu P-450 w dwu różnych organellach — w mikrosomach i mitochondriach. Rozgraniczenie poszczególnych hydroksylacji systemem błon o różnej przepuszczalności może być czynnikiem warunkującym dostępność substratu dla cytochromu P-450 i przez to decydującym o charakterze ostatecznego produktu.

LITERATURA

1. Alvares A. P., Schilling G. R., Kuntzman R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 588 (1968).
2. Boyd G. S., *Biochem. J.* **115**, 24 P (1969).
3. Boyd G. S., *Biochem. J.*, w druku.
4. Brauser B., Sies H., Büther Th., *FEBS Lett.* **2**, 167 (1969).
5. Bray R. S., *Biochem. J.*, w druku.
6. Cooper D. Y., Narasimhulu S., Rosenthal O., Estabrook R. W., w *Oxidases and Related Redox Systems*, red. T. E. King, H. S. Mason i J. Morrison, John Wiley and Sons, New York 1965, str. 838.
7. Crammer W., Schenkman J. B., Estabrook R. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 264 (1966).
8. Davies D. S., *Biochem. J.* **115**, 23 P (1969).
9. Degkwitz E., Ulrich V., Staudinger H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 547 (1969).
10. Ernster L., Orrenius S., *Federation Proc.* **24**, 1190 (1965).
11. Estabrook R. W., Abstracts of 7th Intern. Congress Biochem., Tokyo 1967, Symp. IV-2, 5, str. 213.
12. Garfinkel D., *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 493 (1958).
13. Harding B. W., Wang S. H., Nelson D. H., *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 415 (1964).
14. Hayashi O., Nozaki M., *Science* **164**, 389 (1969).
15. Hill H. A. O., Röder A., Williams R. J. P., *Biochem. J.* **115**, 59 P (1969).
16. Imai Y., Sato R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 5 (1966).
17. Kamin H., Siler Masters B. S., Gibson Q. H., Williams Ch. H. Jr., *Federation Proc.* **24**, 1164 (1965).
18. Klingenberg M., *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376 (1958).
19. Lewin W., Kuntzman R., *Life Sci.* **8**, 305 (1969).
20. Long R. F., *Biochem. J.* **115**, 26 P (1969).
21. Lu Y. M., Coon M. J., *J. Biol. Chem.* **243**, 1331 (1968).

22. Marshal W. J., McLean A. E. M., *Biochem. J.* **115**, 27 P (1969).
23. Mason H. S., *Advan. Enzymol.* **19**, 79 (1957).
24. Mason H. S., North J. C., Vanneste M., *Federation Proc.* **24**, 1172 (1965).
25. Mason H. S., Yamano T., North J. C., Hashimoto Y., Sakagishi P., w Oxidases and Related Redox Systems, red. T. E. King, H. S. Mason i J. Morrison, John Wiley and Sons, New York 1965, str. 879.
26. Mitani F., Horie S., *J. Biochem. (Tokyo)* **65**, 269 (1969).
27. Miyake Y., Gaylor J. L., Mason H. S., *J. Biol. Chem.* **243**, 5788 (1968).
28. Nakamura Y., Otsuka H., Tamaoki B. J., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 34 (1966).
29. Narasimhulu S., *Federation Proc.* **22**, 530 (1963).
30. Omura T., Sato R., *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).
31. Omura T., Sato R., *J. Biol. Chem.* **239**, 2379 (1964).
32. Omura T., Sato R., Cooper D. Y., Rosenthal O., Estabrook R. W., *Federation Proc.* **24**, 1181 (1965).
33. Orrenius S., *Biochem. J.* **115**, 25 P (1969).
34. Ryan K. J., Engel L. L., *J. Biol. Chem.* **225**, 103 (1957).
35. Sato R., Omura T., Nishibayashi H., w Oxidases and Related Redox Systems, red. T. E. King, H. S. Mason i J. Morrison, John Wiley and Sons, New York 1965, str. 861.
36. Siekevitz P., *Federation Proc.* **24**, 1153 (1965).
37. Simpson E. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 10 (1967).
38. Staudinger H. J., Kerekjártó B., Ulrich V., Zubrzycki Z., w Oxidases and Related Redox Systems, red. T. E. King, H. S. Mason i J. Morrison, John Wiley and Sons, New York 1965, str. 815.
39. Strittmatter C. F., Ball E. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **38**, 55 (1952).
40. Strittmatter P., *Federation Proc.* **24**, 1156 (1965).
41. Suzuki M., Mitrapoulos K. A., Myant N. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 516 (1968).
42. Wada F., Hirata K., Sakamoto Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **65**, 171 (1969).
43. Wakabayashi K., Shimazono N., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 132 (1963).
44. Williams R. J. P., *Biochem. J.*, w druku.
45. Williamson D. G., O'Donnel V. J., *Biochemistry* **8**, 1300 (1969).
46. Williamson D. G., O'Donnel V. J., *Biochemistry* **8**, 1306 (1969).
47. Yohro T., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 515 (1967).

ANNA MARIA KONECKA *, JOANNA RYTKA **

Drogi przemian metylogliksalu w organizmach żywych

The Metabolic Pathway of Methyloglyoxal in Living Organisms

The production and utilization of methyloglyoxal in living organisms are reviewed. The physiological role of this compound is discussed.

Metylogliksal (aldehyd pirogronowy) jest związkim pośrednim w przemianach węglowodanów, aminokwasów i ciał ketonowych, a także może odgrywać ważną rolę jako czynnik regulujący podziały komórkowe.

I. Przemiany metylogliksalu

Drogi przemian metylogliksalu w organizmach żywych przez długi czas nie były dobrze poznane, sądzono nawet, iż jest on związkim niefizjologicznym. Na podstawie licznych badań prowadzonych od przeszło 50 lat wiadomo obecnie, że z metylogliksalu może powstawać D(—)-mleczan poprzez S-laktoiloglutation lub pirogronian w procesie bezpośredniego utlenienia.

1. Przemiana metylogliksalu do D(—)-mleczanu

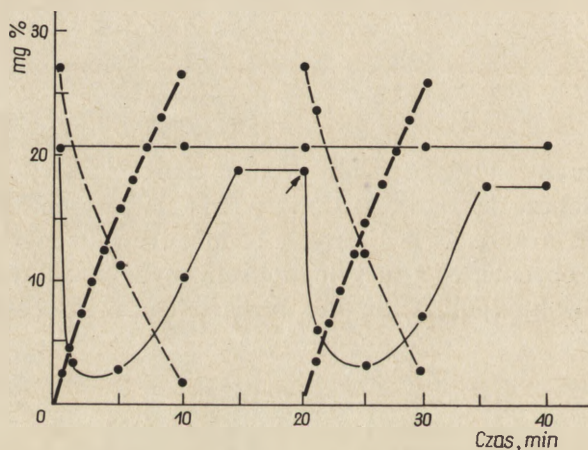
Przemianę metylogliksalu do D(—)-mleczanu odkryli w 1913 roku niezależnie Ne u b e r g (69) oraz D a k i n i D u d l e y (12). Przemianę tę nazwano reakcją gliksalazową i uważano początkowo, iż katalizuje ją jeden enzym — gliksalaza (1, 13, 29, 30, 38, 70, 110), występujący powszechnie w tkankach roślinnych, zwierzęcych i mikroorganizmach (8, 9, 37, 44, 59, 76). Później wykazano jednak, że jest to proces dwustopniowy, katalizowany przez dwa enzymy: gliksalazę I (metylogliksalo-liaza S-laktoilo glutationu, EC 4.4.1.5) oraz gliksalazę II (hydrolaza S-2-hydroksyacylglutationu, EC 3.1.2.6).

* Dr, Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, Warszawa

** Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Gliksalazę I w postaci krystalicznej otrzymał R a c k e r (78) z drożdży. Własności fizyko-chemiczne tego enzymu zostały dość dobrze poznane (42, 78). W organizmach zwierzęcych gliksalaza I występuje równocześnie z gliksalazą II. Tę ostatnią otrzymano z serca i wątroby wołowej (32, 48, 78).

L o h m a n n (55) wykazał, że koenzymem gliksalazy I jest zredukowany glutation, co potwierdzili też inni badacze (4, 16, 27, 48, 50, 51, 75). Zasluguje na podkreślenie iż jest to pierwsza reakcja enzymatyczna, w której stwierdzono koenzymatyczną funkcję glutationu. Do wyjaśnienia roli jaką spełnia GSH w procesie utleniania metylogliksalu przyczynili się K u h n a u (52) oraz J o w e t t i Q u a s t e l (44), którzy zaobserwowali zanikanie grup -SH glutationu w obecności metylogliksalu. Następnie G i r s a v i c i u s i H e y f t e z (32) oraz Y a m a z o y e i w s p. (68, 111) stwierdzili, że podczas reakcji katalizowanej przez wątrobową gliksalazę grupy -SH glutationu reagują w stosunkach ekwimolarnych z metylogliksalem, a następnie regenerują się po wytworzeniu D(-)-mleczanu (rysunek 1).



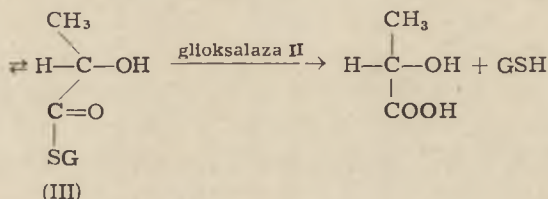
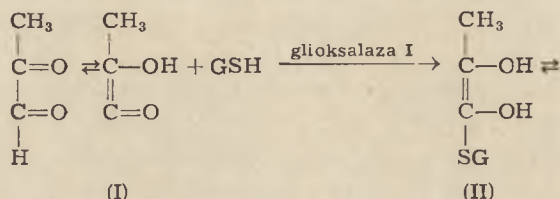
Rys. 1. Odwracalne zanikanie glutationu podczas reakcji gliksalazowej (wg. 68)

— GSH, - - - - - metylogliksal, ······ D(-)-mleczan. Powtórne dodanie glutationu w miejscu wskazanym strzałką

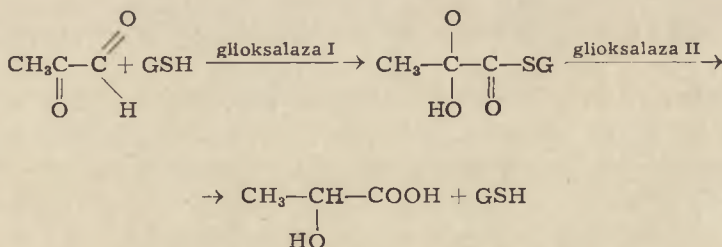
Wysunięto więc hipotezę (10, 11), że metylogliksal i glutation tworzą kompleks, który może być pośrednim produktem reakcji. Hipotezę tę potwierdził Y a m a z o y e (111), który wyizolował z mieszaniny inkubacyjnej enzymatycznie utworzony związek pośredni stabilny w temperaturze pokojowej w środowisku słabo kwaśnym lub obojętnym. Pod wpływem enzymatycznych wyciągów z wątroby związek ten ulegał hydrolizie do glutationu i D(-)-mleczanu. Produkt pośredni reakcji gliksalazowej zidentyfikowano jako S-laktoilglutation (78, 79, 105, 106, 107, 108) o charakterystycznej absorpcji światła z maksimum przy długości

fali 240 nm (78, 79). Właściwość tę wykorzystano przy opracowaniu spektrofotometrycznej metody oznaczania aktywności gliksalazy I i II, jak również do ilościowego oznaczania stężenia glutationu (5, 104, 109).

Racker (77) zaproponował mechanizm reakcji gliksalazowej, według którego gliksalaza I katalizuje kondensację enolowej formy metylogliksalazu (I) z GSH tworząc S-laktoilglutation w formie enolowej (II). Enolowa forma produktu pośredniego (II) przechodzi prawdopodobnie w nieenzymatycznej reakcji w formę ketonową (III), ta zaś ulega hydrolizie do D(—)-mleczanu i glutationu pod wpływem gliksalazy II. Przebieg tych reakcji przedstawia się następująco (77):

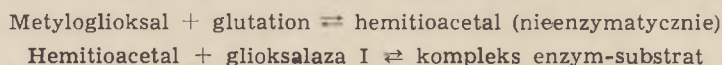


Na podstawie wyników badań nad konwersją metylogliksalazu do D(—)-mleczanu w środowisku wodnym zawierającym tryt Rose (81) sugerował następujący mechanizm reakcji:



Zdaniem autora, gliksalaza I katalizuje wewnątrzcząsteczkową oksydo-redukcję metylogliksalazu z jednoczesną tioestryfikacją. Mechanizm ten jest interesujący ze względu na podobieństwo do reakcji Cannizaro otrzymywania kwasu mlekowego z aldehydu pirogronowego w środowisku zasadowym. Cliffe i Waley (7) uważają natomiast, że gliksalaza I nie reaguje z metylogliksalem i glutationem, lecz w wyniku nie-

enzymatycznej reakcji powstaje hemitioacetal, który w połączeniu z enzymem ulega przemianie do S-laktoilglutatonu wg następującej reakcji:



Utlenienie powstającego w wyniku reakcji D(—)-mleczanu do pirogronianu wymaga udziału racemaz, które katalizują jego izomeryzację do formy L(+) (39, 46, 56).

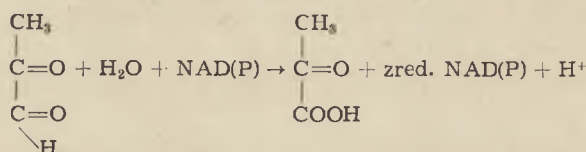
W wyniku licznych badań nad metabolizmem α -hydroksykwasów obok enzymów utleniających L- α -hydroksykwas, odkryto enzymy utleniające ich D-izomery, w tym również D(—)-mleczan. Tubbs i Greenville (94, 95, 96, 97) stwierdzili obecność tych enzymów w mitochondriach wątroby i nerek królika. Oksydoreduktazy specyficzne w stosunku do D i L mleczanu wyizolowano z wielu mikroorganizmów (3, 14, 45, 63, 64, 74, 90), wykryto je także w komórkach drożdży beztlenowych (83). W świetle powyższych odkryć, powstający w wyniku reakcji gliksalazowej D(—)-mleczan, może być wykorzystany przez komórkę jako dodatkowe źródło energii, niezależne od glikolizy, w której powstaje L(+) forma mleczanu.

Ze względu na dużą aktywność enzymów gliksalazowych stężenie wolnego metylogliksalu w tkankach jest nieznaczne. Zaobserwowano jednak, że u zwierząt cierpiących na awitaminozę B₁ nagromadza się metylogliksal (26, 84, 85, 89) oraz pojawiają się objawy zatrucia tym związkiem i hypoglikemii insulinowej (47, 103). Przypuszcza się, że bezpośrednim powodem nagromadzenia się metylogliksalu przy niedoborze witaminy B₁ jest zmniejszenie poziomu glutatonu w tkankach i w wyniku tego obniżenie aktywności gliksalazy (15, 103).

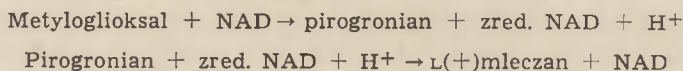
2. Przemiana metylogliksalu do pirogronianu

Przez długi czas przemiana metylogliksalu do D(—)-mleczanu była uważana za jedyny szlak metaboliczny tego związku. Dla organizmów zdolnych utleniać tylko formę L mleczanu, proces ten wydaje się jednak nieekonomiczny, co skłoniło badaczy do dalszych poszukiwań innych dróg przemiany metylogliksalu.

Monder (65, 66) wyizolował z tkanek ssaków dehydrogenazę α -keoaldehydów (oksydoreduktaza aldehyd: NAD(P),) (EC 1.2.1.5), która katalizuje bezpośrednie utlenianie metylogliksalu do pirogronianu wg następującej reakcji:



Enzym nie katalizował reakcji odwrotnej, tzn. redukcji pirogronianu, nie utleniał również D(-) i L(+) mleczanu w obecności nukleotydów pirydynowych. Do działania katalitycznego omawianego enzymu, w przeciwieństwie do reakcji glioksalazowej, nie jest konieczna obecność zredukowanego glutationu. Poza metyloglioksałem, enzym katalizował również utlenienie innych α -ketoaldehydów: glioksalu, fenyloglioksalu i aldehydu hydroksypirogronowego. Reakcję utleniania metyloglioksalu do pirogronianu katalizują co najmniej dwa enzymy, z których jeden wymaga do aktywności NAD, a drugi NADP. W badanych preparatach oksydoreduktazy aldehydowej z wątroby owcy nie udało się rozdzielić tych dwóch enzymów, pomimo że w czasie oczyszczania stosunek aktywności uzależnionej od NAD do aktywności uzależnionej od NADP zmieniał się w granicach od 1,3 do 0,7. Enzymy te różniły się również wartościami K_m i V_{max} w stosunku do poszczególnych substratów, różny był także wpływ analogów koenzymów na te dwie aktywności. Jak sugerują autorzy, rola oksydoreduktazy α -ketoaldehydów, poza utlenianiem metyloglioksalu do pirogronianu z pominięciem etapu tworzenia D(-)-mleczanu, może polegać również na jej udziale w cyklicznej regeneracji nukleotydów pirydynowych wg następującej reakcji (65):



Reakcję utleniania metyloglioksalu do pirogronianu, odkrytą przez Mondera (65, 66) potwierdzili Bonsignore i wsp. (6). Stwierdzili oni, że w wątrobie szczura metyloglioksal powstaje z aldehydu glicerynowego i następnie ulega przemianie do L(+)-mleczanu poprzez pirogronian. Reakcja ta może stanowić etap w metabolizmie fruktozy — prekursora aldehydu glicerynowego. Enzymy utleniające metyloglioksal wg schematu zaproponowanego przez Mondera (patrz wyżej) występują ponadto w mikroorganizmach (40).

Jak wynika z badań Jellum (41) odkryta przez Mondera oksydoreduktaza α -ketoaldehydów jest identyczna z enzymem katalizującym utlenienie 2-keto-3-dezoksyglukozy do 2-keto-3-dezoksyglukonianu. 2-keto-3-dezoksyglukoza nie ulega utlenieniu pod wpływem glioksalazy.

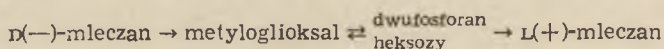
1. Powstawanie metyloglioksalu w przemianie węglowodanów

1. Powstawanie metyloglioksalu w przemianie węglowodanów

Początkowo tworzenie się metyloglioksalu wiązano z procesem glikolizy. Sądzono, że jest to niespecyficzny, nieenzymatyczny proces towarzyszący glikolizie oraz że metyloglioksal nie jest fizjologicznym substratem dla glioksalazy. Meyerhof (61) stwierdził, że aldehyd pirogro-

nowy tworzył się w nieenzymatycznej reakcji z triozyfosforanu, ale reakcji tej nie przypisywał istotnej roli w żywej komórce. Również Meyer (60) postulował, że fosforan triozy ulega nieenzymatycznej defosforylacji do aldehydu glicerynowego, a ten z kolei w samorzutnej reakcji ulega przemianie do metylogliksalu. W 1968 roku Riddle i Lorenz (80) wykazali, że w warunkach fizjologicznego pH i temperatury metylogliksal powstaje z dwuhydroksyacetonu i D,L-gliceroaldehydu bez udziału enzymu. Reakcja jest katalizowana przez niektóre aniony (arsenian, arsenin, boran) a także Tris.

Większość jednak badaczy utrzymuje, że powstawanie metylogliksalu w wyniku przemian fosfocukrowców jest specyficzną reakcją enzymatyczną. Otrzymano dane sugerujące, iż wyciągi enzymatyczne z komórek wątroby i nerek szczura katalizują przemianę dwufosforanu heksozy do metylogliksalu (2, 86, 87, 101). Reakcja ta jest odwracalna i przebiega niezależnie od glikolizy, gdyż fluorki hamujące beztlenową przemianę dwufosforanu heksozy nie wpływają na nią. Jej przebieg przedstawia się następująco (87):



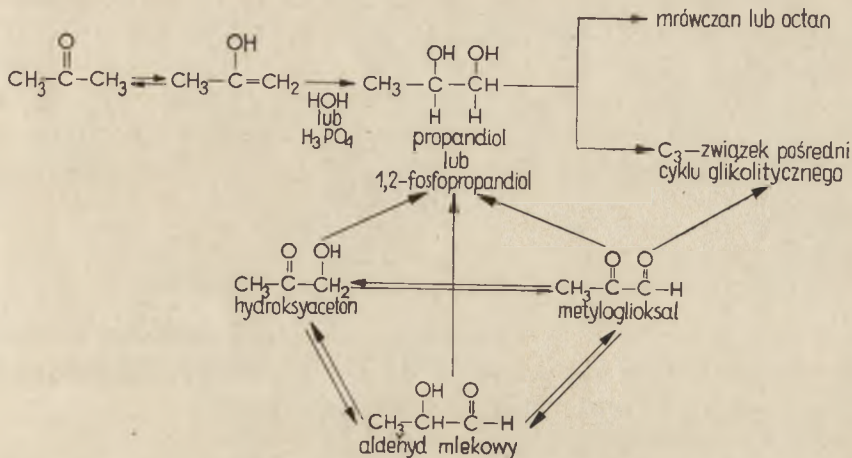
Metylogliksal może powstawać u *Aspergillus niger* i *Pseudomonas saccharophila* przez utlenianie aldehydu fosfoglicerynowego w przypadku zahamowania przemiany tego związku do pirogronianu (25, 49). Ekstrakty z komórek mózgowych gołębia katalizowały w warunkach tlenowych przemianę α -glicerofosforanu do metylogliksalu (43).

2. Powstawanie metylogliksalu w przemianach ciał ketonowych

Liczne badania wskazują, że metylogliksal może być też produktem pośrednim w przemianie ciał ketonowych. Neuberger (71) stwierdził, iż hydroksyacetone, aldehyd mlekowy oraz metylogliksal ulegają wzajemnej enzymatycznej interkonwersji (schemat 1).

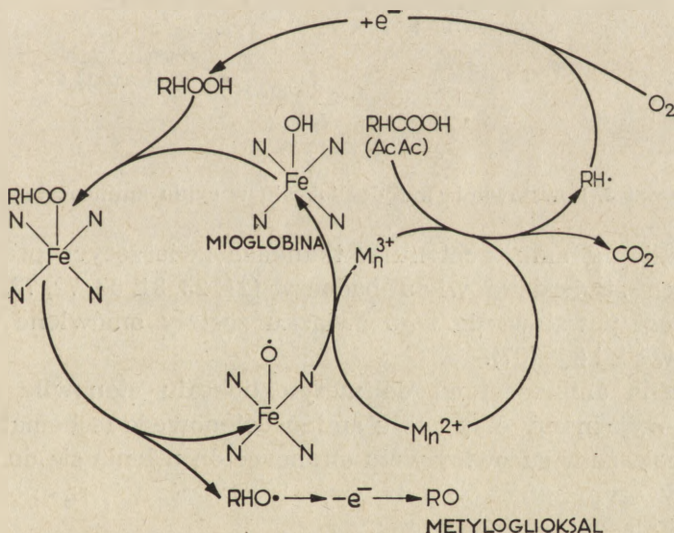
Każdy z tych związków może być następnie zredukowany do propanodiolu. Propanodiol lub jego ufosforylowana pochodna stanowi z kolei pośredni etap w przemianie acetonu prowadzącej do glikolizy lub przemiany aktywnych fragmentów jedno i dwuwęglowych (82, 88). Stwierdzono (102), że przemianę aldehydu mlekowego do hydroksyacetonu może katalizować dehydrogenaza alkoholowa z wątroby. Przypuszcza się, że enzym ten również katalizuje utlenienie obu wyżej wymienionych związków do metylogliksalu.

Dokładnie zbadano *in vitro* przemianę acetoctanu do metylogliksalu. Milligan i Baldwin (62) stwierdzili, że wyciągi enzymatyczne z serca owcy katalizowały oksydacyjną dekarboksylację acetoctanu do metylogliksalu. Reakcja ta zachodzi w obecności O_2 i jonów Mn^{2+} przy



Schemat 1. Udział metyloglioksalu w przemianie ciał ketonowych

udziale hemoproteidów: mioglobiny, hemoglobiny i cytochromu c jako katalizatorów, przy czym najaktywniejszym katalizatorem okazała się mioglobina. Silnymi inhibitorami omawianej reakcji dekarboksylacji są cyjanki oraz tlenek węgla. Proponowany przez autorów mechanizm reakcji ilustruje schemat 2.



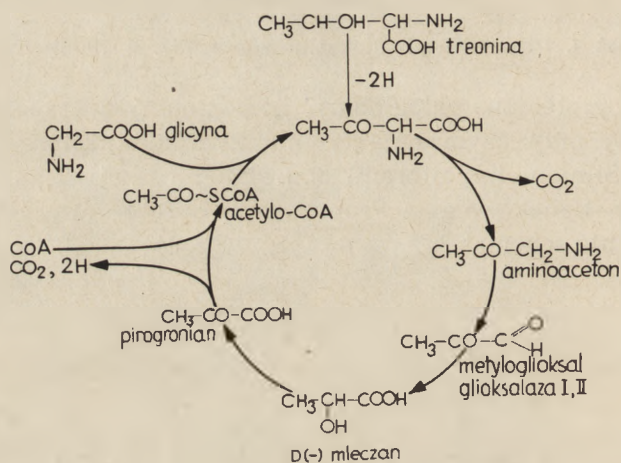
Schemat 2. Przemiana acetooctanu do metyloglioksalu (wg. 62)

Jak wynika z schematu 2 przemiana przebiega z utworzeniem wolnorodnikowych form acetooctanu przy udziale jonów Mn^{2+} . Nie wiadomo jednak, czy reakcja ta przebiega również *in vivo*, gdyż wymagane stęże-

nie jonów Mn^{2+} przewyższa 50-krotnie stężenie tego jonu w tkankach. Również pH optymalne dla reakcji i wynoszące 5,0, odbiega znacznie od pH fizjologicznego. Wyniki badań *in vitro* wskazują jednak na stosunkową łatwość przemiany acetoctanu do metylogliksalu, co może mieć duże znaczenie w wyjaśnieniu przemiany prowadzącej do syntezy trójwęglowych związków pośrednich w glikolizie z czterowęglowych ciał ketonowych.

3. Powstawanie metylogliksalu z aminokwasów

Zdaniem Elliotta (22) metylogliksal może powstawać w organizmach żywych w procesie przemian glicyny i treoniny, przy czym bezpośrednim prekursorem jest aminoaceton (schemat 3).



Schemat 3. Powstawanie metylogliksalu w cyklu aminoacetonowym

Tworzenie się aminoacetonu w tkankach zwierzęcych oraz w mikroorganizmach stwierdziło wielu badaczy (21, 23, 31, 58, 72, 73, 98). Szczegółowe drogi powstawania tego związku zostały omówione w artykule Malinowskiej (57).

Przemiana aminoacetonu do metylogliksalu stanowiła początkowo jedyny niewyjaśniony etap cyklu aminoacetonowego (schemat 3). Stwierdzono jednak, że w surowicy wołu aminoaceton utlenia się do metylogliksalu, przy czym ten ostatni tworzy się w ilościach równoważnych do ilości zanikającego aminoacetonu.

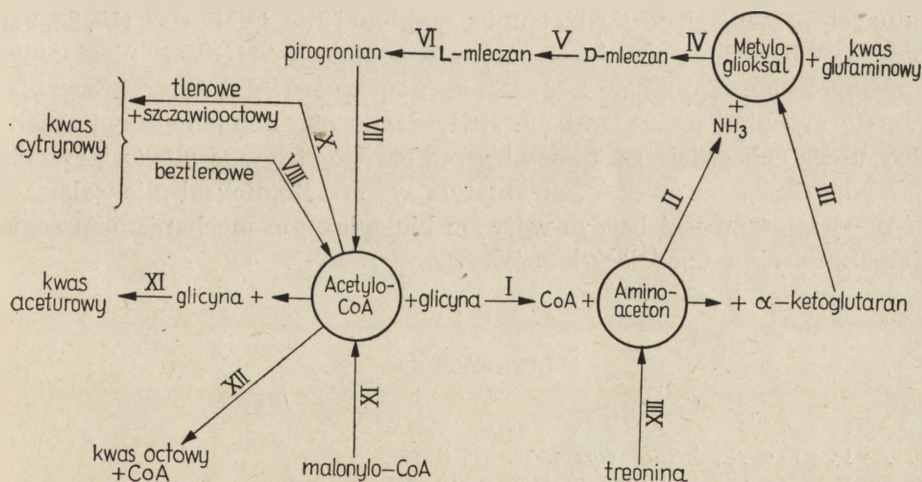
Obecnie wiadomo, że powstawanie metylogliksalu w cyklu aminoacetonowym zachodzi podczas oksydacyjnej dezaminacji aminoacetonu, katalizowanej przez enzym z grupy oksydaz aminowych, który otrzymano z surowicy wołu. Reakcja ta przebiega następująco:



Powstający metyloglioksal zanika po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej glutationu i gliksalazy (24).

Mitochondria z wątroby świnki morskiej również utleniały aminoaceton do metyloglioksalu (99). Zdolność utleniania tego związku do aldehydu pirogronowego wykazują też liczne mikroorganizmy. Bakterie z gatunku *Arthrobacter* hodowane na treoninie jako jedynym źródle węgla wytwarzają aminoaceton, który z kolei ulega przemianom do metyloglioksalu (34, 67). Zahamowanie dalszej przemiany metyloglioksalu jodoocetanem powoduje jego nagromadzenie się. Również *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spheroides* mogą metabolizować aminoaceton do metyloglioksalu. Prawdopodobnie omawiana przemiana zachodzi w sprzężonej reakcji enzymów: aminotransferazy aminokwas: 2-hydroksykwas oraz oksydoreduktazy NAD: 2-hydroksyaldehyd (33, 35, 36). Aktywność tego układu hamują silnie odczynniki reagujące z grupami -SH, chelatory oraz niektóre związki karbonylowe.

Powstawanie metyloglioksalu w procesie oksydacyjnej dezaminacji aminoacetonu łączy przemiany tego związku z całym szeregiem innych przemian. Utrata i Granick (100) zaproponowali schemat przemian aminoacetonu i metyloglioksalu w mitochondriach z wątroby świnki morskiej w powiązaniu z innymi szlakami metabolicznymi (schemat 4).



Schemat 4. Metabolizm aminoacetonu i metyloglioksalu w mitochondriach z wątroby świnki morskiej (wg. 100)

Aminoaceton tworzy się pod wpływem syntezy aminoacetonu (I) z glicyny i CoA oraz w wyniku przemiany treoniny (XIII). W reakcji transaminacji z kwasem α-ketoglutarynowym (II) powstaje kwas glutaminowy oraz metyloglioksal. Metyloglioksal powstaje też w procesie oksydacyjnej dezaminacji aminoacetonu (III) i może ulegać dalszej przemianie do acetylo-CoA w reakcjach IV, V, VI, VII. Acetylo-CoA powstający także w wyniku przemiany cytrynianu (VIII) oraz rozpadu malonylo-CoA (IX) może być wykorzystywany w cyklu kwasu cytrynowego (X), w syntezie kwasu aceturowego (XI) oraz ulec rozpadowi do kwasu octowego (XII)

III. Udział metylogliksalu w regulacji podziałów komórkowych

Nowe światło na rolę jaką metylogliksal spełnia w organizmach żywych rzuciły badania prowadzone przez Szent-Györgyiego i wsp. (17, 20, 91). Wykazano w nich, że metylogliksal oraz jego pochodne posiadają dużą aktywność biologiczną. Stwierdzono, że aldehyd pirogronowy i inne α -ketoaldehydy hamują proliferację komórek *E. coli* i *Strongylocentrotus drobiachiensis*. Również podziały pierwotniaków, komórek kultur tkankowych ssaków oraz komórek nowotworowych są bardzo wrażliwe na hamujące działanie metylogliksalu. Działanie to jest związane prawdopodobnie z hamowaniem przez metylogliksal syntezy białka. Synteza kwasów nukleinowych DNA i RNA ulegała zmniejszeniu pod wpływem metylogliksalu tylko w nieznacznym stopniu (17, 20). Wykazano ponadto, że hamowanie podziałów komórkowych przez metylogliksal jest związane z blokowaniem grup -SH, odgrywających ważną rolę w procesie podziału komórki i ustępuje po dodaniu cysteiny lub innych związków tiolowych (19, 93). Reakcję metylogliksalu z grupami sulfhydrylowymi dehydrogenazy bursztynianowej i związaną z tym utratę aktywności wykazał już poprzednio Kun (53, 54).

Po dłuższym czasie inkubacji działanie antymitotyczne metylogliksalu ustępuje, co związane jest prawdopodobnie z jego rozkładem przez gliksalazę I i II (19). W komórkach i tkankach α -ketoaldehydy występują w dużych stężeniach w postaci unieczynnionej dla gliksalaz (18, 28, 92), prawdopodobnie w postaci kompleksu z grupami -SH bliżej niezidentyfikowanych nośników. W komórkach nowotworowych charakteryzujących się szybkimi podziałami nie stwierdzono obecności metylogliksalu, który ulega całkowicie rozkładowi przez bardzo aktywne gliksalazy (75).

Wydaje się, że układ enzymatyczny metylogliksal-gliksalazy I i II-D(-)-mleczan jest bardzo ważnym biologicznym mechanizmem regulującym ustrojowe podziały komórkowe.

LITERATURA

1. Ariyama N., *J. Biol. Chem.*, **77**, 359 (1928).
2. Ariyama N., *J. Biol. Chem.* **77**, 395 (1928).
3. Baker C. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 325 (1952).
4. Behrens O. K., *J. Biol. Chem.* **141**, 503 (1941).
5. Bhattacharya S. K., Robson J. S., Stewart C. P., *Biochem. J.* **60**, 696 (1955).
6. Bonsignore A., Castellani A., Fornaini G., *Ital. J. Biochem.* **17**, 65 (1968).
7. Cliffe E. E., Waley S. G., *Biochem. J.* **73**, 25 P (1959).
8. Cohen P. P., *Cancer Res.* **5**, 626 (1945).
9. Cohen P. P., Sober E. K., *Cancer Res.* **5**, 631 (1945).
10. Crook E. M., Law K., *Biochem. J.* **46**, xxxvii (1950).

11. Crook E. M., Law K., *Biochem. J.* **52**, 492 (1952).
12. Dakin H. D., Dudley H. W., *J. Biol. Chem.* **14**, 155 (1913).
13. Dakin H. D., Dudley H. W., *J. Biol. Chem.* **14**, 423 (1913).
14. De Ley J., Schell J., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 154 (1959).
15. Drummond G. I., *J. Nutr.* **74**, 357 (1961).
16. Dudley H. W., *J. Biol. Chem.* **25**, 439 (1931).
17. Együd L. G., *Current Modern Biol.* **1**, 14 (1967).
18. Együd L. G., McLanghlin J. A., Szent-Györgyi A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1422 (1967).
19. Együd L. G., Szent-Györgyi A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 388 (1966).
20. Együd L. G., Szent-Györgyi A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 203 (1966).
21. Elliott W. H., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 446 (1958).
22. Elliott W. H., *Nature* **183**, 1059 (1959).
23. Elliott W. H., *Biochem. J.* **74**, 478 (1960).
24. Elliott W. H., *Nature* **185**, 467 (1960).
25. Entner N., Doudoroff M., *J. Biol. Chem.* **196**, 853 (1952).
26. Findlay G. M., *Biochem. J.* **15**, 105 (1921).
27. Fodor P. J., Miller A., Waelsch H., *Nature* **170**, 841 (1952).
28. Fodor G., Sachetto J. P., Szent-Györgyi A., Együd L. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1644 (1967).
29. Foster D. L., *Biochem. J.* **19**, 757 (1925).
30. Foster D. L., Woodward G. E., *Biochem. J.* **18**, 562 (1924).
31. Gibson K. D., Laver W. G., Neuberger A., *Biochem. J.* **70**, 71 (1958).
32. Girsávičius J., Heyfetz A. P., *Nature* **136**, 645 (1935).
33. Green M. L., Elliott W. H., *Biochem. J.* **92**, 537 (1964).
34. Green M. L., Lewis J. B., *Biochem. J.* **106**, 267 (1968).
35. Higgins I. J., Turner J. M., *Biochem. J.* **99**, 26 P (1966).
36. Higgins I. J., Turner J. M., Willetts A. J., *Nature* **255**, 887 (1967).
37. Hopkins F. G., Morgan E. J., *Biochem. J.* **39**, 320 (1945).
38. Hopkins F. G., Morgan E. J., *Biochem. J.* **42**, 23 (1948).
39. Huennekens F. M., Mahler H. R., Nordmann J., *Arch. Biochem.* **30**, 77 (1951).
40. Jacoby P., w *The Enzymes*, red Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., Academic Press, New York-Londyn 1963, t. VII, str. 203.
41. Jellum E., *Biochim. Biophys. Acta* **165**, 357 (1968).
42. Jerzykowski T., Matuszewski W., Winter F., *FEBS Letters*, **1**, 159 (1968).
43. Johnson R. E., *Biochem. J.* **30**, 33 (1936).
44. Jowett M., Quastel J. H., *Biochem. J.* **27**, 486 (1933).
45. Kaufmann E., Dickstein S., *Nature* **190**, 346 (1961).
46. Kaufman S., Korke S., Del Campillo A., *J. Biol. Chem.* **192**, 301 (1951).
47. Kermack W. O., Lambie C. G., Slater R. M., *Biochem. J.* **21**, 40 (1927).
48. Kermack W. O., Matheson N. A., *Biochem. J.* **65**, 48 (1957).
49. Kiessling W., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 193 (1950).
50. Klebanoff S. J., *Biochem. J.* **64**, 125 (1956).
51. Knox W. E., w *The Enzymes*, red Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., Academic Press, New York-Londyn 1960, t. II, str. 253.
52. Kühnau J., *Biochem. Z.* **243**, 332 (1964).
53. Kun E., *Federation Proc.* **9**, 292 (1952).
54. Kun E., *J. Biol. Chem.* **187**, 289 (1956).

55. Lohmann K., *Biochem. Z.* **254**, 332 (1932).
56. Mahler M. R., Tomisek A., Huennekens F. M., *Exptl. Cell Res.* **4**, 208 (1953).
57. Malinowska T., *Post. Biochem.* **10**, 133 (1964).
58. McGilvray D., Morris J. G., *Biochem. J.* **99**, 12 P (1966).
59. McKinney G. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 246 (1953).
60. Meyer F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 1395 (1953).
61. Meyerhof O., *Experientia* **4**, 169 (1948).
62. Milligan L. P., Baldwin R. L., *J. Biol. Chem.* **242**, 1095 (1967).
63. Mittenberger Ch. L., Haat A. S., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 393 (1966).
64. Molinari R., Lara J. S., *Biochem. J.* **75**, 57 (1960).
65. Monder C., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 573 (1965).
66. Monder C., *J. Biol. Chem.* **242**, 4603 (1967).
67. Morris J. G., *Biochem. J.* **111**, 251 (1969).
68. Nagaya K., Yamazoye S., Nakamura S., *J. Biochem. (Tokyo)* **23**, 41 (1936).
69. Neuberger C., *Biochem. Z.* **49**, 502 (1913).
70. Neuberger C., *Biochem. Z.* **51**, 484 (1913).
71. Neuberger C., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 170 (1950).
72. Neuberger A., Tait G. H., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 164 (1960).
73. Neuberger A., Tait G. T., *Biochem. J.* **84**, 317 (1962).
74. Pascal F. C., Pichinaty M., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 507 (1963).
75. Platt M. E., Schroeder E. F., *J. Biol. Chem.* **104**, 281 (1934).
76. Platt M. E., Schroeder E. F., *J. Biol. Chem.* **106**, 179 (1934).
77. Racker E., *Federation Proc.* **9**, 217 (1950).
78. Racker E., *J. Biol. Chem.* **190**, 685 (1951).
79. Racker E., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 577 (1952).
80. Riddle V., Lorenz F. W., *J. Biol. Chem.* **243**, 2718 (1968).
81. Rose J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 214 (1957).
82. Rudney H., *J. Biol. Chem.* **210**, 361 (1954).
83. Rytka J., Tysarowski W., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 229 (1965).
84. Salem H. M., *Biochem. J.* **57**, 227 (1954).
85. Salem H. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **57**, 20 (1955).
86. Salem H. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **96**, 10 (1961).
87. Salem H. H., Crook E. M., *Biochem. J.* **46**, xxxvii (1950).
88. Sandman R. P., Miller O. N., *J. Biol. Chem.* **230**, 361 (1958).
89. Sato A., *J. Exptl. Med.* **83**, 103 (1964).
90. Snowswell A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 574 (1959).
91. Szent-Györgyi A., *Science* **149**, 34 (1965).
92. Szent-Györgyi A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1642 (1967).
93. Szent-Györgyi A., Együd L. G., McLanghlin J. A., *Science* **155**, 539 (1967).
94. Tubbs P. K., *Biochem. J.* **76**, 48 P (1960).
95. Tubbs P. K., *Biochem. J.* **82**, 36 (1962).
96. Tubbs P. K., Greville G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 290 (1959).
97. Tubbs P. K., Greville G. D., *Biochem. J.* **81**, 104 (1961).
98. Turner J. B., *Biochem. J.* **98**, 7 P (1966).
99. Urata G., Granick S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 96 (1961).
100. Urata G., Granick S., *J. Biol. Chem.* **238**, 811 (1963).
101. van Eys J., Judge M. A., Judd J., Hill W., Bozia R. C., Abrahams S., *J. Nutr.* **76**, 375 (1962).
102. van Eys J., *J. Biol. Chem.* **236**, 1531 (1961).
103. Vogt-Möller P., *Biochem. J.* **25**, 418 (1931).

104. Wieland Th., Dose K., Pfleiderer G., *Biochem. Z.* **326**, 442 (1955).
105. Wieland Th., Koeppe H., *Ann.* **581**, 1 (1953).
106. Wieland Th., Koeppe H., *Ann.* **588**, 15 (1954).
107. Wieland Th., Pfleiderer G., Lau H. H., *Biochem. Z.* **327**, 393 (1956).
108. Wieland Th., Sandmann B., Pfleiderer G., *Biochem. Z.* **328**, 239 (1956).
109. Woodward G. E., *J. Biol. Chem.* **109**, 1 (1935).
110. Woodward G. E., Platt M. E., *J. Biol. Chem.* **109**, 11 (1935).
111. Yamazoye S., *J. Biochem. (Tokyo)* **23**, 319 (1936).

ROMAN LORENC *

Biochemiczne właściwości kalcytoniny

Calcitonin, its Biochemical Properties

Some biochemical properties of calcitonin are reviewed.

Odkryta przez Copp a i C a m e r o n a (16, 17) kalcytonina lub, jak podają H i r s c h i w s p. (30) — tyrokalcytonina, jest hormonem wpływającym na regulację gospodarki wapniowej. Jego działanie jest antagoni-
styczne do parathormonu i polega na obniżeniu poziomu wapnia w krwi (44, 46). Pochodzenie, rola fizjologiczna jak i historia odkrycia kalcytoniny były już przedmiotem osobnego artykułu w *Postęпах Biochemii* (24). Obecny artykuł omawia wybrane zagadnienia biochemicznych właściwości kalcytoniny.

1. Biologiczna i radioimmunologiczna metoda oznaczania aktywności kalcytoniny

Istota próby biologicznej polega na wykorzystaniu właściwości obniżania pod wpływem kalcytoniny poziomu wapnia w surowicy zwierzęcia. Mimo pozornej prostoty metody wprowadzenie prób biologicznych stanowiło moment zwrotny w badaniach nad kalcytoniną, zwłaszcza że odegrały one istotną rolę jako bodziec do wyodrębnienia hormonu w postaci jednorodnej. Dzięki próbom biologicznym możliwe stało się badanie czynności hormonu.

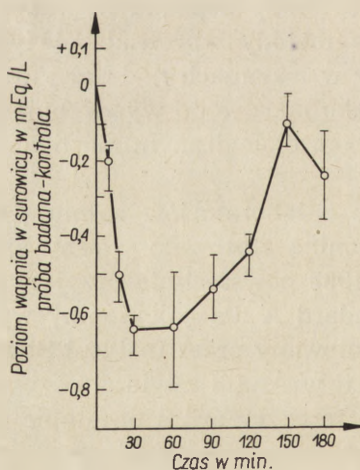
Do 1965 roku każde z laboratoriów zajmujące się wyodrębnianiem i badaniami nad kalcytoniną stosowało własny sposób standaryzowania preparatu. Dopiero od 1965 powszechnie przyjęto jednostkę MRC, którą zdefiniowano jako „standard A dla kalcytoniny wyodrębnionej z tarczycy”. Standard ten przygotowany przez Instytut Standardów Biologicznych *Medical Research Council* w Anglii zawierał oczyszczony preparat kalcytoniny wyodrębnionej z tarczycy świni na etapie przed wysoleniem solą wg preparatyki podanej przez B a g h d i a n t z a i w s p. (3). Jednostka MRC została zdefiniowana na podstawie zawartości kalcytoniny w 4 fiol-

* Dr med., Zakład Biochemii, Studium Doskonalenia Lekarzy, Akademia Medyczna, Warszawa

kach zawierających po 10 mg standardowego preparatu. Orientacyjnie 0,01J MRC podane podskórnie szczurowi rasy *Wistar* o wadze 120 g powodowało po upływie 60 minut spadek poziomu wapnia o 1 mg⁰/o.

W 1967 roku standard A wyczerpał się i zastąpiono go nowym standardem B. Jest to znacznie bardziej oczyszczony preparat kalcytoniny świńskiej o aktywności właściwej 22 J MRC/mg to znaczy około 900 razy większej w porównaniu ze standardem A. Ujemną stroną nowego standardu jest jego niska stabilność (32).

Wyniki oznaczania aktywności preparatu kalcytoniny metodą biologiczną zależą od szeregu dodatkowych czynników. Istotną rolę odgrywa wiek, rasa i płeć zwierząt doświadczalnych (29, 36, 45, 65). Najczęściej stosuje się do prób szczury. Zwierzęta o mniejszej wadze są bardziej wrażliwe na kalcytoninę (65) a zastosowanie diety ubogiej w wapń oraz równoległe podawanie fosforanów i albuminy wzmagają efekt obniżenia poziomu wapnia pod wpływem kalcytoniny (29). Spadek poziomu wapnia zależy od sposobu podania kalcytoniny (rysunek 1). Najwyższa i najdłużej trwająca hypokalcemia występuje po dożylnym podaniu preparatu, mniejszy skutek natomiast obserwuje się po podaniu podskórnym lub dootrzewnowym. Najefektywniejszy sposób opisany przez K u m a r a (36) polega na podaniu kalcytoniny w dożylny kroplówce. W tych warunkach najsilniejszy spadek poziomu wapnia występuje po 30—60 minutach od chwili podania preparatu (29, 65) przy czym do oznaczeń pobiera się krew z aorty. W naszym laboratorium z równym powodzeniem stosuje się pobieranie krwi z lewej komory serca (38).

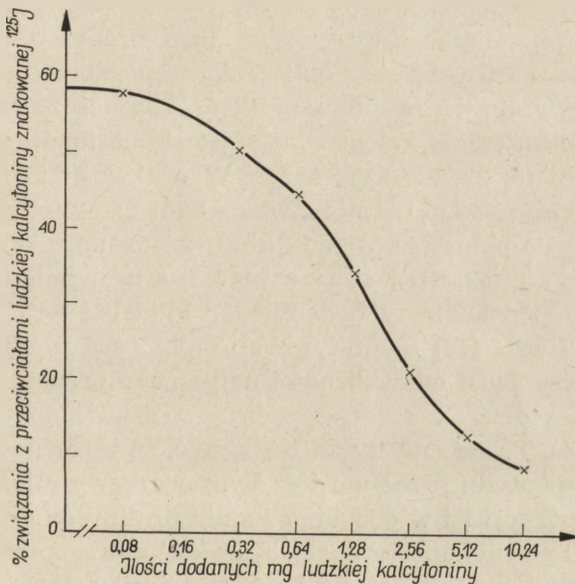


Rys. 1. Próba biologiczna oznaczania aktywności kalcytoniny (wg 36)

Każdy z punktów odpowiada średniej wyników pomiaru poziomu wapnia po dożylnym podaniu kalcytoniny grupie czterech szczurów. Linie pionowe nad punktami oznaczają rozrzut wyników. Na osi poziomej — czas działania kalcytoniny

Ujemną stroną próby biologicznej jest konieczność stosowania preparatu kalcytoniny o stosunkowo wysokiej aktywności właściwej i rozporządzenia dużą grupą zwierząt o określonych wspólnych parametrach.

Nowe nadzieje łączą się z metodami radioimmunologicznymi ze względu na ich specyficzność i czułość (kalcytoninę można oznaczać już w ilości 0,003—0,004 mJ). Metody te wprowadzili Arnauld i Littledike (2) oraz grupa Deftosa (18, 37) stosując jako antygen kalcytoninę z tarczycy świńskiej. Ostatnio Clark i wsp. (14) jako antygen użyli już materiału wyodrębnionego z przypadku raka hialinowego tarczycy ludzkiej. Antygen, w tym przypadku kalcytonina znakowana ^{125}J służy jednocześnie za standard. Przy stałym mianie przeciwciał można sporządzić krzywą wzorcową (rysunek 2). Kalcytonina obecna w badanym materiale łączy się ze specyficznymi w stosunku do niej przeciwciałami przez co zmniejsza się ilość związanego antygeny radioaktywnego. Pozwala to określić pośrednio stężenia kalcytoniny w badanym preparacie.



Rys. 2. Krzywa standardowa dla ludzkiej kalcytoniny (wg 14)
Czułość metody rzędu 100 pg

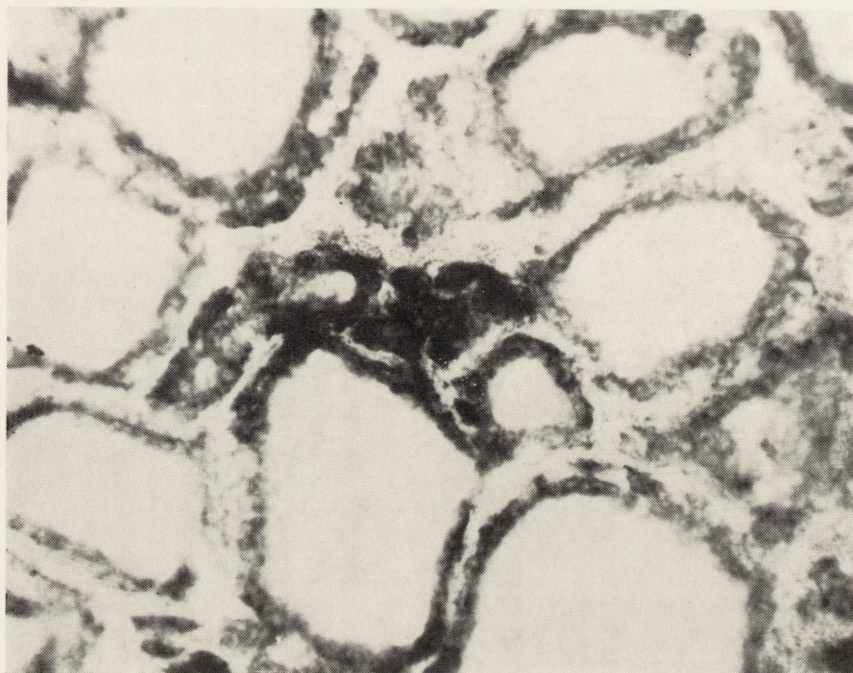
2. Wyodrębnianie i oczyszczanie kalcytoniny

Pierwsze aktywne preparaty kalcytoniny wyizolowano z tarczycy szczura (30). Najczęściej stosowanym źródłem kalcytoniny stała się jednak tarczyca świńska ze względu na stosunkowo łatwą dostępność tego materiału. Orientacyjnie tarczyca świńska zawiera trzy razy mniej a tarczyca ludzka sto razy mniej kalcytoniny na jednostkę wagi w porównaniu z tarczycą szczura (23). Hirsch i wsp. (30, 31, 33) otrzymali kalcytoninę

o aktywności właściwej 500 razy wyższej od wyjściowej stosując ekstrakcję rozcieńczonym HCl, a następnie wirowanie przy 100 000 g oraz oczyszczanie na żelach i wymiennicach jonowych. Baghdiantz i wsp. (3) ekstrahowali tkankę wysuszoną i odtłuszczoną a kwaśny ekstrakt frakcjonowali przez wysalanie NaCl. Inaktywacja częściowo oczyszczonych preparatów przez enzymy proteolityczne była jednym z pierwszych bezpośrednich dowodów na peptydowy charakter hormonu. Tenenhouse i wsp. (70) ekstrahowali proszek acetonowy z tarczycy mieszaniną mocznika, kwasu solnego i cysteiny, frakcjonowali wyciąg chlorkiem sodu po czym wytrącali aktywny preparat kwasem trójchlorooctowym i oczyszczali dalej na kolumnach z *Sephadex G-75*. Otrzymany w ten sposób preparat wydawał się homogenny a jego ciężar cząsteczkowy określono na 8 700. Dopiero badania grupy Munsona i wsp. (39, 53) ujawniły, że kalcytonina jest eluowana z kolumny w późniejszych frakcjach niż to określił Tenenhouse ze współpracownikami. Elektroforetyczny rozdział frakcji na żelu poliakrylamidowym wykazał ich heterogenność i pozwolił otrzymać preparat o aktywności właściwej 50 000 razy wyższej w stosunku do wyjściowej. Ciężar cząsteczkowy tego preparatu wynosił 4 000. Wartość tę potwierdziły zarówno obliczenia na podstawie elucji z kolumn *Sephadex* jak i wyniki wirowania w gradiencie sacharozy (47).

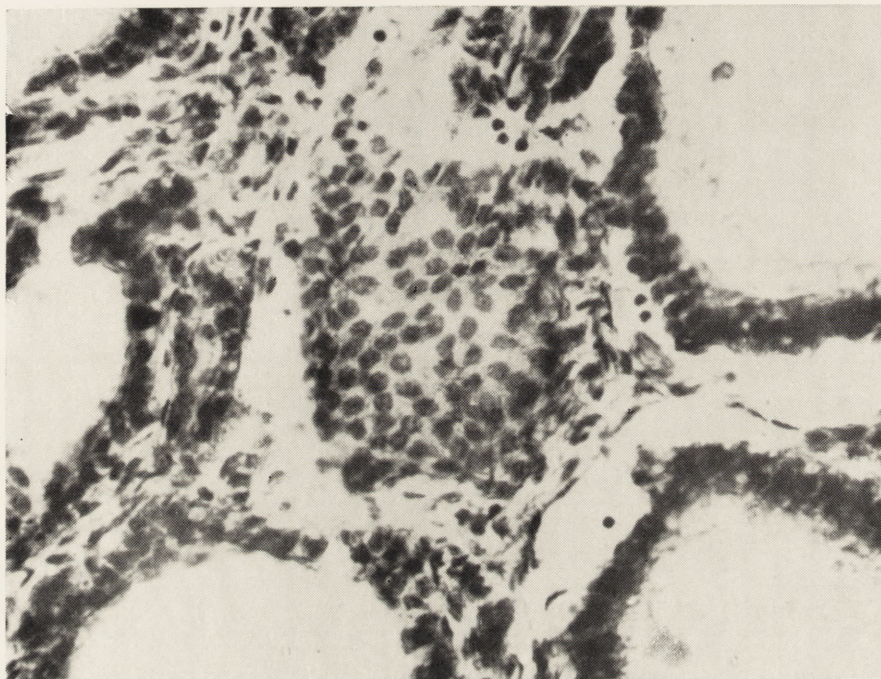
Całkowite oczyszczenie kalcytoniny stało się następnie udziałem wielu innych pracowni (5, 22, 25, 28, 34, 55). Wyniki Puttera i wsp. (55) dotyczące ogólnego składu aminokwasowego kalcytoniny okazały się zgodne z danymi o pełnej sekwencji, które uzyskano niezależnie w laboratoriach Potts'a (52, 54) i Nehera (42) a następnie też w pracowni Bella (5). Na podstawie tych danych Rittel i wsp. (61) a później Guttman i wsp. (26) zsyntetyzowali polipeptyd o aktywności biologicznej nie odbiegającej od aktywności natywnego preparatu kalcytoniny.

Budowę kalcytoniny z tarczycy świń przedstawiono już w artykule Geislera (24). Tu chcemy tylko zaznaczyć, że zarówno pętla utworzona na N-końcu peptydu przez mostek dwusiarczkowy między cząsteczkami cysteiny w pozycji 1 i w pozycji 7 i amid prolina na C-końcu kalcytoniny nasuwają pewne analogie strukturalne z wazopresyną i oksytocyną. Aktywność hormonu ulega całkowitemu zniszczeniu pod wpływem trawienia trypsyną lub chymotrypsyną (22, 33, 34, 69). U człowieka w warunkach fizjologicznych kalcytonina znajduje się w gruczole tarczowym, grasicy i przytarczycach (23) gdzie występuje w tak niskim stężeniu, że praktycznie wyklucza ono możliwości preparatywne. Natomiast w przypadku nowotworu tarczycy zwanego rakiem hialinowym lub rdzeniastym lub litym stężenie kalcytoniny okazało się ponad 100 razy wyższe niż w normalnej tarczycy. Z tego też materiału Naher, Rinikier i wsp. (42, 43, 59, 60) wyodrębnili i oczyścili kalcytoninę ludzką a Sieber i wsp. (64) następnie na podstawie określonej sekwencji aminokwasowej preparatu zsyntetyzowali odpowiedni polipeptyd.



Rys. 3. α -glicerofosforanowa reduktaza menadionu w komórkach prawidłowej tarczycy świni

Silnie aktywne komórki (czarne) odpowiadają komórkom C uczestniczącym w syntezie kalcytoniny. Powiększenie 250 \times



Rys. 4. Prawidłowa tarczyca świni

Gniazdo komórek C w środkowej części zdjęcia. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Powiększenie 400×

Omówienie budowy kalcytoniny ludzkiej oraz różnic w strukturze pierwszorzędowej między tym hormonem a kalcytoniną świni znajdzie czytelnik również w artykule Geislera (24). Należy tylko dodać, że forma dimeryczna kalcytoniny ludzkiej przechodzi w monomer pod wpływem 1M amoniaku (41). Okazało się też, że oprócz komórek raka hialinowego i jego przerzutów zwiększone wytwarzanie kalcytoniny występuje też w przypadkach gruczolaka tarczycy. Gruczolaki takie określone scyntygraficznie jako „zimne” charakteryzowały się też zwiększoną ilością komórek C. Ta nowa jednostka chorobowa otrzymała nazwę „C-cell adenoma” (6).

3. Miejsce syntezy kalcytoniny

W tarczycy ludzkiej kalcytonina jest syntetyzowana przez tzw. komórki C. Komórki te odznaczają się silną aktywnością dehydrogenazy α -glicerofosforanowej, ich jądra są z reguły blade, jakby wypłukane a cytoplazma wyraźnie kwasochłonna i delikatnie ziarnista (rysunek 3 i 4). U człowieka i psa kształt komórek C jest bryłowaty, natomiast u świni i wołu wydłużony (7).

Już wstępne badania histochemiczne wskazywały, że komórki C tarczycy uczestniczą w syntezie kalcytoniny (48, 49). Ostateczne wyjaśnienie tej sprawy umożliwiło jednak dopiero zastosowanie metod immunofluorescencyjnych. Inkubacja skrawków gruczołu tarczowego z przeciwciałami w stosunku do kalcytoniny znakowanymi fluoresceiną ujawnia lokalizację kalcytoniny dzięki charakterystycznemu świeceniu w UV związanych z nią przeciwciał. Pierwsze badania tą metodą przeprowadzone przez Hargisa i wsp. (27) przyniosły dość niespodziewane wyniki, że kalcytonina znajduje się we wszystkich komórkach gruczołu tarczowego. Później okazało się jednak, że Hargis zastosował jako antygen niedostatecznie oczyszczony preparat kalcytoniny, co doprowadziło do błędnych wyników. Ostatecznie Bussolati i Pearse (11) wykazali lokalizację kalcytoniny w komórkach C, aczkolwiek początkowo i oni również obserwowali charakterystyczne świecenie w perycytach i dopiero w dalszych badaniach wyjaśnili, że efekt ten nie był charakterystyczny dla kalcytoniny (9). Pomimo że zastosowany jako antygen preparat kalcytoniny nie był homogenny Bussolati i Pearse (11) uzyskali reakcje krzyżowe świadczące o obecności komórek C u psa i świni. Lokalizację komórek C potwierdzili Kracht i wsp. (35), którzy zastosowali jako antygen częściowo oczyszczony preparat kalcytoniny świńskiej, a przeciwciała otrzymali z królika. Kracht zidentyfikował komórki C również u owcy i królika natomiast nie uzyskał pozytywnych prób krzyżowych z tarczycą krowy i ludzką. Zarówno wspomniane już różnice w strukturze pierwszorzędowej jak i ujemne próby krzyżowe z tarczycą

ludzką wskazywały na istotne różnice biologiczne między kalcytoninami w zależności od materiału, z którego je wyodrębniono. Z drugiej strony jednak kalcytonina pochodzenia świńskiego podana człowiekowi była biologicznie aktywna. Zagadnienie to nie jest rozstrzygnięte w sposób ostateczny. Badania radioimmunologiczne wskazują na wysoką specyficzność gatunkową preparatów kalcytoniny. Bussolati i wsp. (10) otrzymali natomiast w przypadku raka hialinowego odczynu immunofluorescencyjne, mimo że zastosowali jako antygen kalcytoninę pochodzenia świńskiego.

Istotne dla badań nad czynnikami wpływającymi na biosyntezę i wydzielanie kalcytoniny są dane dotyczące jej lokalizacji we frakcjach podkomórkowych. Bussolati i wsp. (9) na podstawie zaobserwowanej w jąderku fluorescencji wysunęli hipotezę o jego roli jako miejsca syntezy kalcytoniny. Bauer i Teitelbaum (4) wykazali, że w tarczycy świni aktywność kalcytoniny związana jest z frakcją osadzającą się przy 100 000 g, w której to frakcji pod mikroskopem elektronowym stwierdza się obecność licznych ziarnistości wydzielniczych. Podobne wyniki otrzymywano dla tarczycy szczura i cielęcia (15) odnajdując 85% aktywności homogenatu w osadzie otrzymanym po wirowaniu przy 100 000 g.

4. Zależność funkcji od struktury

Pewne informacje o funkcji kalcytoniny uzyskano badając wpływ modyfikacji chemicznych reszt aminokwasowych hormonu na jego aktywność biologiczną. Okazało się, że preparat oczyszczonej homogennej kalcytoniny świńskiej tracił prawie 98% aktywności po redukcji merkaptanołem lub alkilowaniu kwasem jodoctowym, co prowadziło do powstania S-karbamylocysteiny lub S-karboksyamidometylocysteiny (32). Modyfikacja tryptofanu przy pomocy bromku 2-hydroksy-5-nitrobenzylu w pH 2 powodowała utratę 75% aktywności. Nie wpływały natomiast na aktywność biologiczną wszelkie modyfikacje reszty metioniny i to zarówno utlenianie jak i alkilacja połączona z powstaniem soli karboksymetylosulfonionowej. Tak więc dopóki metionina znajduje się w pozycji 25 ani jej zmiany przestrzenne ani zmiany ładunku elektrycznego nie wpływają na aktywność hormonu. Natomiast przerwanie łańcucha polipeptydowego w pozycji 25 pod wpływem bromku cyjanogenu, przy nienaruszonej strukturze tryptofanu w pozycji 13 powodowało całkowitą utratę aktywności biologicznej, aczkolwiek aktywność immunologiczna preparatu pozostawała niezmienną. Strata aktywności wywołana rozerwaniem łańcucha w pozycji 25 pozwala przypuszczać, że fragment pozostały po oderwaniu 7 aminokwasów a zatem pozbawiony kwasu glutaminowego jest zbyt zasadowy i to odbija się na jego funkcji.

Badania dotyczące kalcytoniny ludzkiej wskazują, że zmiana pozycji metioniny (z pozycji 25 na 8) stanowi istotną różnicę a mianowicie utle-

nienie metioniny jak również jej modyfikacje chemiczne są w tym przypadku połączone z całkowitą utratą aktywności.

5. Mechanizm działania kalcytoniny

Kalcytonina w przeciwieństwie do parathormonu (19, 57) nie jest wrażliwa na działanie aktynomycyny D. Brak wrażliwości na działanie tego antymetabolitu blokującego selektywnie proces transkrypcji wykazały między innymi badania na szczurach (1, 68). Stwierdzono, że uprzednie podanie aktynomycyny nie wpływa na efekt hypokalcemiczny hormonu, a nawet po 8 i 12 godzinach wzmacnia go prawdopodobnie na skutek zablokowania działania parathormonu można więc przypuszczać, że działanie kalcytoniny jest niezależnym od powstawania nowego RNA a więc i pośrednio nowego białka.

Pearse (50) na podstawie badań histochemicznych sądzi, że kalcytonina jest syntetyzowana w komórkach należących do dużej grupy komórek wydzielania wewnętrznego tzw. „APUD”. Obok innych cech morfologicznych komórki tej grupy charakteryzują się własnością gromadzenia amin oraz ich karboksylowych prekursorów. W grupie hormonów wydzielanych przez te komórki obok kalcytoniny znajduje się cały szereg hormonów polipeptydowych o podobnych fragmentach struktury pierwszorzędowej. Niektóre z nich, również i kalcytonina występują zdaniem Pearsa (51) w komórce w postaci prekursorów. Badania nad cyklicznym AMP ujawniły jego istotną rolę w mechanizmie działania szeregu hormonów (62). Sądzi się, że hormon przenoszony z krwiobiegami z miejsca jego syntezy do miejsca działania stymuluje tam powstawanie odpowiednich ilości cyklicznego AMP. Związek ten wraz z cyklazą adenilową (56, 66) oraz specyficzną dla niego fosfodwuesterazą (12) tworzy układ, dzięki któremu sygnał niesiony przez hormon ulega „wzmocnieniu” lub „wyciszeniu” (8, 63). Korelację stężeń AMP z efektem działania hormonu spostrzeżono dla katecholamin (67), insuliny (20), acetylocholino (40) oraz szeregu innych hormonów (62).

Badania tego typu wydają się interesujące również w przypadku kalcytoniny. Wraz ze wzrostem poziomu wapnia w krwi wzrasta poziom cyklicznego AMP w komórkach kostnych, co tłumaczy się mobilizacją wapnia kostnego związaną ze stymulacją przez parathormon aktywności cyklazy adenilowej. Natomiast hypokalcemiczny efekt działania kalcytoniny wiąże się ze stymulacją aktywności fosfodwuesterazowej (72,74). Za hipotezą tą przemawiają obserwacje, że pod wpływem teofiliny blokującej działanie fosfodwuesterazy (12) jak i izoproterenolu stymulującego aktywność cyklazy adenilowej (67) poziom wapnia u szczurów, którym usunięto przytarczycę ulega podwyższeniu (73). Również podawanie przez kilkanaście godzin kroplówki z dwumaślanem cyklicznego AMP szczurom, którym operacyjnie usunięto tarczycę i przytarczycę powoduje efekt

analogiczny do podawania parathormonu a mianowicie podwyższenie poziomu wapnia w krwi oraz obniżenie poziomu fosforu (58). Efekt ten wzmagają się po podaniu teofiliny a ulega obniżeniu po podaniu kalcytoniny. Parathormon wzmagają wydzielanie cyklicznego AMP w moczu co obserwowano szczególnie wyraźnie u zwierząt z usuniętymi przystarczycami (13). Ze względu na zaobserwowaną przez Fleischa i wsp. (21) rolę pyrofosforanu jako czynnika zapobiegającego rozpuszczaniu tkanki kostnej interesujące wydają się badania Tenenhousea i Rasmussen a (71) dotyczące aktywności pyrofosfatazy. W układzie *in vitro* badano w komórkach raka Ehrlicha aktywność pyrofosfatazy przy różnych stężeniach wapnia, kalcytoniny i parathormonu. Okazało się, że stężenia wapnia, które w środowisku bez dodatków nie hamują aktywności pyrofosfatazy po wprowadzeniu parathormonu hamują tę aktywność całkowicie. Dodanie kalcytoniny znosi to hamowanie. Natomiast stężenie wapnia ($10^{-3}M$), które normalnie hamuje całkowicie aktywność pyrofosfatazy, w obecności kalcytoniny, nie tylko traci zdolność hamowania, ale nawet zwiększa dwukrotnie aktywność pyrofosfatazy. Na tej podstawie autorzy sądzą, że badane hormony nie wpływają na zwiększenie syntezy enzymu lecz na powinowactwo enzymu do substratu. Za powiązaniem z układem cyklicznego AMP i w tym przypadku przemawia występowanie hamującego wpływu dwumaślanu cyklicznego AMP na aktywność pyrofosfatazy.

Obserwacje te nie są wprawdzie wyczerpujące i nie wyjaśniają w sposób ostateczny mechanizmu obu antagonistycznych w działaniu hormonów, niemniej umożliwiają ustalenie ich punktu uchwytu.

Uwagi końcowe

Otrzymanie kalcytoniny w postaci czystych homogennych preparatów stwarza ogromne możliwości w badaniach zależności struktury od funkcji a co za tym idzie ostatecznego wyjaśnienia mechanizmu działania hormonu. Interesujące i wciąż oczekujące na wyjaśnienie są różnice gatunkowe kalcytoniny pochodzenia ludzkiego i kalcytoniny wyizolowanej z innych źródeł. Można oczekiwać, że udoskonalenie metod oznaczania kalcytoniny a zwłaszcza wprowadzenie metod immunofluorescencyjnych i radioimmunologicznych pozwoli rozstrzygnąć szereg niejasności dotyczących lokalizacji, różnic w aktywnościach biologicznych i immunologicznych, a także miejsc i sposobu syntezy tego polipeptydu.

LITERATURA

1. Anast C. C., Arnaud C. D., Rasmussen H., Tenenhouse A., *J. Clin. Invest.* **46**, 57 (1967).
2. Arnauld C. D., Littledike T., *Mayo Clin. Proc.* **43**, 496 (1968).

3. Baghdiantz A., Foster G. V., Edwards A., Kumar M. A., Slack E., Soliman H. A., Mac Intyre I., *Nature* **203**, 1027 (1964).
4. Bauer W. C., Teitelbaum S. L., *Lab. Invest.* **15**, 323 (1966).
5. Bell P. H., Barg W. R., Colucci D. F., Davies C. M., Dziobkowski C., Englert M. E., Heyder E., Paul R., Snedeker E. H., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2704 (1968).
6. Beskid M., Lorenc R., Rościszewska A., *J. Pathol. Bact.* (w druku).
7. Beskid M., Rościszewska A., *Folia Histochem. Cytochem.* **6**, 461 (1968).
8. Bowness J. M., *Science* **152**, 1370 (1966).
9. Bussolati G., Carvalheira A. F., Pearse A. G. E., Proc. on Thyrocalcitonin and the C-cells, Heinemann, Londyn 1968, str. 133.
10. Bussolati G., Foster G. V., Clark M. B., Pearse A. G. E., *Virchows Arch. Abt. B. Zellpathol.* **2**, 234 (1969).
11. Bussolati G., Pearse A. G. E., *J. Endocrinol.* **37**, 205 (1967).
12. Buther R. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1244 (1962).
13. Chase L. R., Aurbach G. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 518 (1967).
14. Clark M. B., Boyd G. W., Byfield P. G. H., Foster G. V., *Lancet* **2**, 74 (1969).
15. Cooper C. W., Tashjian A. H. Jr., *Endocrinology* **79**, 819 (1966).
16. Copp D. H., Cameron E. C., *Science* **134**, 2038 (1961).
17. Copp D. H., Cameron E. C., Cheney B. A., Davidson A. G. F., Henze K. G., *Endocrinology* **70**, 638 (1962).
18. Deftos L. J., Lee M. R., Potts J. T. Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 293 (1968).
19. Eisenstein R., Passavoy M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **117**, 77 (1964).
20. Exton J. H., Jefferson L. S., Butcher R. W., Park C. R., *Am. J. Med.* **40**, 709 (1966).
21. Fleisch H. J., Maerki J., Russell R. G. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **122**, 317 (1966).
22. Frantz J., Rosenthaler J., Zehnder K., Doepfner W., Huguein R., Gutlmann S., *Helv. Chim. Acta* **51**, 218 (1968).
23. Galante L., Gudmundsson T. V., Matthews E. W., Tse A., Williams E. D., Woodhouse W. J. Y., Mac Intyre I., *Lancet* **2**, 537 (1968).
24. Geisler J., *Post. Biochem.* **16**, 3 (1970).
25. Gudmundsson T. V., Byfield P. G., H., Galante L., Mac Intyre I., Proc. of the Symp. on Thyrocalcitonin and C-cells, Heinemann, Londyn 1968, str. 460.
26. Guttman S., Pless J., Sandrin E., Jaquenoud P. A., Bossert H., Willems H., *Helv. Chim. Acta* **51**, 1156 (1968).
27. Hargis G. K., Williams G. A., Tenenhouse A., Arnaud C. D., *Science* **152**, 73 (1966).
28. Hawker C. C., Rasmussen H., Glass J. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1535 (1967).
29. Hirsch P. P., Proc. of the Symp. on Thyrocalcitonin and C-cells, Heinemann Londyn 1968, str. 1.
30. Hirsch P. F., Gauthier G. F., Munson P. L., *Endocrinology* **73**, 244 (1963).
31. Hirsch P. F., Munson P. L., *Pharmacologist* **5**, 272 (1963).
32. Hirsch P. F., Munson P. L., *Physiol. Rev.* **49**, 548 (1969).
33. Hirsch P. F., Voelkel E. F., Savery A., Munson P. L., *Science* **146**, 412 (1964).
34. Kahnt F. W., Riniker B., Mac Intyre I., Neher R., *Helv. Chim. Acta* **51**, 214 (1968).

35. Kracht J., Hachmaister U., Breunstedt H. J., Lenke M., *Endokrinologie* **52**, 395 (1968).
36. Kumar M. A., Slack E., Edwards A., Soliman H. A., Baghdiantz A., Foster G. V., MacIntyre I., *J. Endocrinol.* **33**, 469 (1965).
37. Lee M. R., Deftos L. J., Potts J. T., *Endocrinology* **84**, 36 (1969).
38. Lorenc R., Beskid M., w przygotowaniu do druku.
39. Munson P. L., Potts J. T. Jr., Reisfeld R. A., Cooper C. W., Voelkel E. F., *Science* **154**, 425 (1966).
40. Murad F., Chi Y. M., Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1233 (1962).
41. Neher R., Riniker B., Maier R., Byfield P. G. H., Gudmundsson T. V., MacIntyre I., *Nature* **220**, 984 (1968).
42. Neher R., Riniker B., Rittel W., Zuber H., *Helv. Chim. Acta* **51**, 1900 (1968).
43. Neher R., Riniker B., Zuber H., Ritter W., Kahnt F. W., *Helv. Chim. Acta* **51**, 917 (1968).
44. Nishino K., Munson P. L., *Federation Proc.* **28**, 384 (1969).
45. Orimo H., *Federation Proc.* **26**, 368 (1967).
46. O'Riordan J. I. H., Aurbach G. D., *Endocrinology* **82**, 377 (1968).
47. O'Riordan J. I. H., Tashjian A. H., Jr., Munson P. L., Condliffe P. G., Aurbach G. D., *Science* **154**, 885 (1966).
48. Pearse A. G. E., *Proc. Roy. Soc.* **164**, 478 (1966).
49. Pearse A. G. E., *Vet. Record* **79**, 587 (1966).
50. Pearse A. G. E., *Proc. Roy. Soc.* **170**, 71 (1968).
51. Pearse A. G. E., *Nature* **221**, 1210 (1969).
52. Potts J. T. Jr., Niall H. D., Keutman H. T., Brewer H. B. Jr., Deftos L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 1321 (1968).
53. Potts J. T. Jr., Reisfeld R. A., Hirsch P. F., Munson P. L., *Am. J. Med.* **43**, 662 (1967).
54. Potts J. T. Jr., Reisfeld R. A., Hirsch P. F., Washed A. B., Voelkel E. F., Munson P. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 328 (1967).
55. Putter I., Kaczka F. A., Harman R. E., Rickes E. L., Kempf A. J., Chaiet I., Rothrock J. W., Wase A. W., Wolf F. J., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5301 (1967).
56. Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1228 (1962).
57. Rasmussen H., Arnaud C., Hawker C., *Science* **134**, 1019 (1964).
58. Rasmussen H., Pechet M., Fast D., *J. Clin. Invest.* **47**, 1843 (1968).
59. Riniker B., Neher R., Maier R., Kahnt F. W., Byfield P. G. H., Gudmundsson T. V., Galants L., MacIntyre I., *Helv. Chim. Acta* **51**, 1738 (1968).
60. Riniker B., Sieber P., Brugger M., Kamber B., Rittel W., Neher R., *Biochem. J.* **111**, 14 (1969).
61. Rittel W., Grugger M., Kamber B., Riniker B., Sieber P., *Helv. Chim. Acta* **51**, 924 (1968).
62. Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., *Annual Rev. Biochem.* **37**, 149 (1968).
63. Schwartz I. L., Hechter O., *Am. J. Med.* **40**, 765 (1966).
64. Sieber R., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Rittel W., *Helv. Chim. Acta* **51**, 2057 (1968).
65. Sturtridge W. C., Kumar M. A., *J. Endocrinol.* **42**, 501 (1968).
66. Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T., *J. Biol. Chem.* **237**, 1220 (1962).
67. Sutherland E. W., Robinson G. A., *Pharmacol. Rev.* **18**, 145 (1966).

68. Tashijan A. H. Jr., *Endocrinology* **77**, 375 (1965).
69. Tashijan A. H. Jr., Warnook D. R., Proc. of the Symp. on Thyrocalcitonin and C-cells, Heineman, Londyn 1969, str. 80.
70. Tenenhouse A., Arnaud G., Rasmussen H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 818 (1965).
71. Tenenhouse A., Rasmussen H., Proc. of Symp. on Thyrocalcitonin and C-cells, Heineman, Londyn 1968, str. 392.
72. Wells H., Lloyd W., *Endocrinology* **81**, 139 (1967).
73. Wells H., Lloyd W., *Endocrinology* **82**, 468 (1968).
74. Wells H., Lloyd W., *Endocrinology* **83**, 521 (1968).

MAREK OMBACH*

Zmiany wyrównawcze w nerce po jednostronnej nefrektomii

Compensatory Changes in the Remaining Kidney after Unilateral Nephrectomy

Some functional, morphological and biochemical changes in the remaining kidney after unilateral nephrectomy are reviewed. The hypotheses concerning the mechanism of these changes have been discussed.

Wzrost narządów można traktować jako bezpośrednią odpowiedź na ich czynnościowe obciążenie bądź też można zakładać, że jest on *a priori* określony przez jakieś regulatory humoralne (27). Artykuł ten ma na celu zapoznanie czytelnika z faktami z tej dziedziny, posługując się jako modelem zmianami zachodzącymi w nerce pozostałej w organizmie zwierzęcym po operacyjnym usunięciu drugiej nerki. Obserwacje dotyczące tego modelu mogą przyczynić się do zrozumienia istoty procesów regulujących szybkość wzrostu i podziałów komórkowych.

Operacyjne usuwanie nerki i następstwa tej operacji były przedmiotem licznych badań, które zebrał i przedstawił Nowiński (60). Początkowo badania prowadzono głównie z punktu widzenia klinicznego. Opanowanie techniki przeszczepów nerkowych (86) a także metod badania czynności izolowanych kanalików i kłębuszków nerkowych przesunęły obecnie zainteresowania w kierunku zmian biochemicznych w nerce wykonującej podwójną pracę. W porównaniu z bardzo intensywną odnową wątroby po częściowej hepatektomii (11, 12), nerka pozbawiona swojej partnerki reaguje dużo wolniej i pierwsze morfologiczne zmiany są widoczne dopiero w kilka dni po operacji. Usunięcie części nerki powoduje wprawdzie dużo szybszy proces odnowy i liczniejsze podziały komórkowe, ale ze względu na częste komplikacje (stany zapalne, uremia, wzmożony przepływ limfy) wyniki badań są bardzo niejednolite i nie będą tu rozpatrywane.

Liczne teorie mówiące o mechanizmie regulacji wzrostu nerki po jednostronnej nefrektomii można podzielić na takie, które tłumaczą przerost nerki pozostawionej w organizmie dodatkowym obciążeniem jej pracą oraz takie, według których informacja o prawidłowej wielkości nerki jest zawarta w tym narządzie a wszelkie zmiany w ilości masy

* Dr med., Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

tkankowej natychmiast wyzwala ją cały łańcuch reakcji prowadzący do powstawania bliżej jeszcze nie określonych regulatorów tkankowych.

Za teorią o wpływie wzmożonej pracy nerki na jej wzrost mogą przemawiać doświadczenia ze stosowaniem diety wysokobiałkowej (30, 46, 76, 92). U szczurów hodowanych na diecie bogatej w białka przyrost wagi nerek jest większy niż u zwierząt kontrolnych. Zakładając, że przyczyną przerostu nerki jest konieczność wydalania zwiększonej ilości produktów katabolizmu białkowego należałoby oczekiwać, że również podawanie tych produktów zwierzęciu powinno wywołać przyrost nerki. Jednakże nie stwierdzono powiększania się nerki u zwierząt obciążonych mocznikiem doustnie (5, 19) lub pozajelitowo (33).

Wiele eksperymentalnych dowodów przemawia przeciwko teorii wyrównawczego przerostu nerki wywołanego wzmożonym obciążeniem czynnościowym. Po jednostronnej nefrektomii stwierdzono wprawdzie znaczny wzrost aktywności ATP-azy w pozostałej nerce (3). Gdy jednak zamiast usunięcia jednej nerki przecięto jej moczowód i odprowadzono go do jamy otrzewnowej nie stwierdzono wzrostu aktywności ATP-azy, mimo że nerka z nieuszkodzonym moczowodem musiała wykonywać podwójną pracę (20). Za zależnością przerostu nerki od ilości masy, a nie wzmożonej pracy jest doświadczenie Ferrisa opisanie przez Weissa (89). Ferris stwierdził u dwunastodniowych zarodków kurczenia, że funkcja wydalinicza jest wykonywana przez mesonephros. Po kauteryzacji w jednej nerce nie funkcjonalnego jeszcze metanephros zauważono 70% wzrost aktywności mitotycznej w drugiej nieuszkodzonej nerce.

I. Czynniki humoralne wpływające na przerost nerki

Można przypuszczać, że nefrektomia powoduje zmianę ilości lub aktywności czynnika humoralnego (aktywatora lub inhibitora wzrostu). Teoretycznie idealnym modelem do sprawdzenia tej hipotezy są zwierzęta parabiotyczne, operacyjnie połączone wspólnym krążeniem nie zapewniającym jednak wymiany krwi w takim stopniu, żeby praca normalnie wykonywana przez cztery nerki mogła być po nefrektomii wykonywana równomiernie przez trzy pozostałe (87). Wyniki takich doświadczeń nie są jednoznaczne, można jednak przypuszczać, że czynnik humoralny przechodzący przez połączenie kapilarne za wolno i w zbyt małej ilości jest natychmiast unieczynniany (40, 43, 82).

O g a w a i N o w i ń s k i (64) przedstawili przekonujące dowody na istnienie czynnika humoralnego odpowiedzialnego za hipertrofię nerki. Do hodowli tkankowej skrawków nerkowych dodawali oni surowicę zwierząt, u których uprzednio wykonano nefrektomię. Po trzech dniach stwierdzono w takich skrawkach znaczne podwyższenie indeksu mitotycznego w porównaniu z wartością dla skrawków hodowanych z dodatkiem suro-

wicy z nieoperowanych zwierząt (indeks mitotyczny określa ile komórek na 10 tysięcy jest w tym samym stadium podziałowym). Stwierdzono, że czynnik w surowicy odpowiedzialny za te zmiany jest nietrwały przy 100°, lecz stabilny przy 56°, nie dializuje, jest specyficzny narządowo, ale nie jest specyficzny gatunkowo. Podobne wyniki przedstawili również Lowenstein i Lozner (44).

W doświadczeniach *in vivo* pozajelitowe podawanie surowicy zwierząt po nefrektomii nie powodowało według Gossa (25) i Williamsa (92) żadnych zmian w indeksie mitotycznym w stosunku do kontroli, ale Lowenstein i Stern (45) zauważyli w tych warunkach dwukrotnie szybsze znakowanie jąder komórkowych.

Rozbieżne są również dane o wpływie pozajelitowego podawania wyciągów z nerki na szybkość podziałów komórkowych w tym narządzie. Według Williamsa (92) i Gossa (25) nie wywołuje to żadnych istotnych zmian, Semenowa (79) zaobserwowała trzykrotny wzrost podziałów komórkowych, a Saetren (78) stwierdziła w tych warunkach obniżenie aktywności mitotycznej.

Nie udało się wykazać istnienia u matki czynnika humoralnego wpływającego na nerkę płodu. Po nefrektomii u ciężarnej samicy nie stwierdzono zmian w czynności mitotycznej, ani wzmożonej syntezy RNA w nerce płodu mimo wyraźnych zmian tego typu w pozostałej nerce u matki (26, 50). Nie jest jednak wykluczone, że czynnik taki nie przenika poprzez łożysko do krwioobiegu płodu bądź też nerka płodu nie całkowicie ukształtowana i nie w pełni funkcjonalna nie może reagować na zewnętrzne bodźce.

II. Wpływ innych czynników na wzrost nerki

Wyrównawczy przerost nerki jest większy u zwierząt młodszych niż u starszych, przy czym u zwierząt młodszych jest on wynikiem głównie hyperplazji komórkowej, u starszych zaś dominuje hipertrofia (88). Duży wpływ na przerost nerki ma sposób odżywiania. Zarówno głodzenie jak i ograniczanie płynów hamuje wzrost indeksu mitotycznego w drugim dniu po operacji, a przywrócenie podawania wody trzykrotnie go zwiększa.

Największy wpływ na wyrównawczy przerost nerki mają hormony przysadki mózgowej, a głównie hormon wzrostu (22). U zwierząt którym usunięto przysadkę, usunięcie jednej nerki nie wywołuje prawie zupełnie przerostu wyrównawczego drugiej, a usunięcie przysadki po jednostronnej nefrektomii powoduje natychmiastowe zahamowanie przerostu wyrównawczego (3). Nie wpływa natomiast na przerost nerki ACTH, ponieważ usunięcie nadnerczy nawet nieznacznie przyspiesza przyrost masy nerki, o ile zapewnia się zwierzęciu odpowiednią ilość wody i NaCl (37, 73). Również hormon antydiuretyczny powoduje zwiększenie szybkości

przerostu nerki spotęgowane bardzo wyraźnie podawaniem wody i NaCl (15). Usunięcie tarczycy powoduje wyraźne zahamowanie wzrostu nerki (59). Z czynników zewnętrznych największy wpływ ma pozajelitowe podawanie zwierzęciu kwasu foliowego lub witaminy B₁₂. Powoduje to natychmiastowy i ogromny wzrost nerki nawet u zwierząt nieoperowanych (4, 10, 29, 81, 83, 84, 85). Już w pierwszych 24 godzinach po jednorazowym wstrzyknięciu kwasu foliowego lub jego pochodnych (50 µg/kg wagi ciała) ilość RNA w nerce rośnie o 50%, a po czterech dniach o 100% w przeliczeniu na jednostkę wagi nerki. Wzrasta również dwukrotnie aktywność polimerazy RNA jak i ogólna ilość DNA. Po 36 godzinach szybkość znakowania się DNA i ilość mitoz w części korowej nerki wzrasta 16-krotnie. Masa nerki powiększa się bardzo wyraźnie przy czym w pierwszej dobie wzrasta tylko mokra masa przy niezmienionej ilości suchej masy, po czym po trzech dniach wartości mokrej i suchej masy wzrastają odpowiednio o 60 i 30% w stosunku do wartości wyjściowych. Nie wiadomo, czy ten gwałtowny wzrost nerki jest stymulowany bezpośrednim działaniem pterydyn, czy też raczej ich mechanicznym działaniem, mianowicie wypadaniem osadów pterydyn w kanalikach nerkowych, hamującym czynność kanalików (4, 81).

III. Funkcja nerki po nefrektomii

Przeszczepianie nerki u ludzi dostarczyło wiele interesujących faktów dotyczących pracy nerki po nefrektomii. Nerka pozostała u dawcy już w kilka dni po operacji osiąga około 70% wydzielania kłębuszkowego i 80% ilości przepływającej krwi w stosunku do wartości normalnej dla dwóch nerek i stan taki utrzymuje się przez całe lata (23). Natomiast podwyższony poziom azotu mocznikowego w krwi trwa tygodniami a powrót do normy następuje tym wolniej im starsza jest osoba operowana (66). Również przepływ krwi przez nerkę, który u młodych operowanych osób osiąga około 80% wartości normalnej, u ludzi, którzy przekroczyli 50 rok życia waha się w granicach 45—70% (66). Stopień wyrównania, tzn. szybkość powrotu prawidłowego wydzielania kłębuszkowego, wchłaniania kanalikowego i regulacja poziomu elektrolitów jest identyczny w nerce przeszczepionej u biorcy i w nerce pozostawionej u dawcy (8).

IV. Zmiany morfologiczne w nerce spowodowane nefrektomią

W pierwszych godzinach po usunięciu jednej nerki pozostała ulega widocznemu choć przejściowemu przekrwieniu, ale wyraźne powiększenie się masy nerki daje się zaobserwować dopiero po kilku dniach (80). W badaniach wykonanych na szczurach stwierdzono wzrost suchej masy

przy końcu pierwszego dnia po operacji o około 30% a po tygodniu o 30—40% (30, 31, 39). Cztery tygodnie po operacji waga nerki wynosi już około 60% wagi obu nerek u kontrolnych nieoperowanych zwierząt (36), a po 40-tu dniach dochodzi do 70% (1, 2).

Szybki wzrost nerki po nefrektomii jest wynikiem zarówno powiększenia się masy komórkowej (hypertrofia) jak i liczniejszych podziałów komórkowych (hyperplazja). Nie stwierdzono jednak powstawania nowych nefronów nawet wtedy, gdy nefrektomii poddano zwierzęta bardzo młode (1—3 dniowe) albo zwierzęta z wrodzonym niedorozwojem nerki (57). Moore (57) wykazał, że ilość kłębuszków nerkowych 165 dni po operacji jest ta sama, co w chwili operacji. Identyczne wyniki uzyskała Hiramoto i wsp. (35).

W wyniku powiększania się komórek nerkowych kłębuszki powiększają się dwu- do trzykrotnie (52, 67), a kanaliki proksymalne i dystalne znacznie się wydłużają (34). Zarówno hipertrofia jak i hyperplazja dotyczy tylko czynnych struktur nerkowych tzn. nefronów, a nie ma miejsca np. w brodawkach nerkowych, które w sposób bierny wydalają mocz do miedniczek nerkowych (58).

W normalnej nerce u młodych szczurów podziały komórkowe są dość liczne (9, 93) i indeks mitotyczny wynosi 0,015—0,038 (24, 28). U zwierząt starszych ilość podziałów komórkowych maleje o około 60% (54, 55). Najliczniejsze podziały komórkowe mają miejsce w korze nerkowej i zewnętrznej części rdzenia (91). W wyniku nefrektomii następuje dwufazowy wzrost szybkości podziałów komórkowych. Po kilkudziesięciogodzinnym okresie utajenia następuje pięciokrotny wzrost szybkości podziałów w kanałkach proksymalnych i nieco mniejszy w kanałkach dystalnych i cewkach zbiorczych. Po siedmiu dniach następuje ponowne wzmoczenie podziałów komórkowych, ale już nie tak wyraźne, jak w pierwszym okresie (65). Według Williamsa (91) ten drugi szczyt wzmoczonej proliferacji ma miejsce na czwarty dzień po operacji.

V. Zmiany biochemiczne w nerce po nefrektomii

1. Synteza DNA

Równoległe z liczniejszymi podziałami komórkowymi następuje wzrost szybkości znakowania jąder komórkowych ^3H -tymidyną. Po 24 godz. od nefrektomii włączanie tymidyny wzrasta pięciokrotnie w części korowej i 5—8 krotnie w części rdzeniowej nerki (53, 55, 72). Zwiększone włączanie prekursorów do DNA utrzymuje się w trzecim i czwartym dniu po operacji ale po siedmiu dniach zmniejsza się i po czternastu osiąga poziom normalny (85). Nieznaczne zwiększenie ilości form hyperploidalnych i tetraploidalnych nie ma zbyt dużego wpływu na ogólną ilość DNA

jądrowego (6, 17, 24), która rośnie o około 10% po dziewięciu dniach i o 25% po dwóch tygodniach od operacji (56, 85). To stosunkowo wolne zwiększanie się syntezy DNA wynika z nieznaczej roli hyperplazji w procesie przerostu nerki po nefrektomii.

2. Synteza RNA

W przeciwieństwie do DNA wzrost syntezy RNA przebiega szybko i zaczyna się wcześniej. Ilość RNA w komórkach nerkowych wzrasta już w pierwszych 12 godzinach o 75%, a po dwóch dniach o 33% (32, 42, 85). Ilość nowopowstałego RNA wzrasta równoległe ze wzrostem ogólnej masy komórkowej, w wyniku czego stężenie RNA w komórce pozostaje prawie niezmienione podczas gdy stężenie DNA w komórce wyraźnie się obniża.

Ponieważ czas półtrwania rybosomowego RNA stanowiącego 85% całkowitego RNA komórkowego wynosi około 4 dni u operowanych zwierząt, przyrost RNA należy tłumaczyć głównie wzmożoną syntezą, a nie przyhamowaniem procesów katabolicznych (4q). Odzwierciedleniem wzmożonej syntezy RNA jest wzrost ilości polisomów, przy czym nie zauważono zmian jakościowych ani w polisomach związanych z endoplazmatycznym retikulum, ani w polisomach wolno występujących w cytoplazmie (70). W komórce nerkowej, wolne rybosomy w cytoplazmie stanowiące około 75% ogólnej ilości rybosomów są syntetyzowane wcześniej niż rybosomy związane z błonami cytoplazmatycznymi (48). Rybosomy związane stanowią część aparatu syntetyzującego białko, a głównie glikoproteidy, nie jest natomiast dokładnie znana funkcja rybosomów wolno występujących w cytoplazmie komórek nerkowych (70, 71). Nie zaobserwowano zmian we wzajemnym stosunku wolnych i związanych rybosomów cytoplazmy w czasie wyrównawczego przerostu nerki po nefrektomii (70). Poglądy co do początku zwiększonej syntezy RNA są rozbieżne. Johnson i Vera Roman (39) uważają że ma to miejsce już w pierwszej godzinie po operacji, ale nie przedstawiają wystarczająco przekonujących dowodów. Halliburton i Thompson (30, 32) zauważyli zwiększone włączanie kwasu orotowego do RNA już w 20 minut po operacji. Natomiast Malt (47) stwierdził, że bezpośrednio po nefrektomii znakowanie urydyną jąderekowych prekursorów rRNA jest obniżone. Doświadczenia, w których porównano dojrzałe cytoplazmatyczne rRNA i jego jądrowe prekursory wskazują na cykliczne zmiany w syntezie rRNA w nerce po nefrektomii z maksimum syntezy w drugim i ósmym dniu po operacji (51). Frakcjonowanie jądra komórkowego na jąderko i nukleoplazmę i następnie rozdzielanie na żelu poliakrylamidowym RNA izolowanego z tych frakcji pozwala badać dokładniej metabolizm RNA komórek nerkowych (88). Nukleoplazma zawiera bardzo szybko znakujący się RNA (14) wędrujący w żelu poliakrylamidowym szybciej

niż 28S RNA. Ma on dużo wspólnych cech z powstającym w jądrze mRNA i odgrywa główną rolę w przemianach RNA jądrowego. Zjawisko szybkiego znikania radioaktywnego piętna z RNA nukleoplazmy pojawia się już w 10 min. po nefrektomii i trwa przez okres co najmniej siedmiu dni po nefrektomii (90). Świadczy to, że nefrektomia wywołuje prawie natychmiastowe zmiany w metabolizmie kwasów nukleinowych, które z kolei inicjują dalsze zmiany w komórce. Prawdopodobnie w pierwszym okresie nie zachodzi intensywne tworzenie się nowego RNA a tylko bliżej nieokreślone jego przemiany, ale już po kilku godzinach synteza RNA odbywa się na dużą skalę dając największe stężenie RNA w komórce w drugim dniu po operacji. Ponieważ synteza DNA zachodzi dużo wolniej można przypuszczać, że jako matryca służy „stary” DNA sprzed nefrektomii.

3. Synteza białka

Zawartość białka w nerce po nefrektomii wzrasta już w pierwszych 24 godzinach wskutek wzmożonej syntezy, po czym szybkość syntezy maleje a między 48—72 godziną ponownie rośnie (13). W wyniku tego już w pierwszych 14 godzinach ilość białka powiększa się o 70%, a po 24 godzinach o 110%. Nagromadzenie się białka w nerce ma dwufazowy przebieg i jest równoległe do szybkości jego syntezy w komórce (13). Pewną trudność w interpretowaniu wyników badania syntezy białka w nerce *in vivo* stanowi nierównomierne rozmieszczenie wewnątrzkomórkowej puli wolnych aminokwasów (74). Poszczególne aminokwasy są wbudowywane do nowopowstających białek w różnym stopniu. Na przykład po nefrektomii stopień włączania się radioaktywnej L-leucyny do białka jest podwyższony, podczas gdy włączanie L-glutaminy pozostaje niezmienione (7). Ilość wolnych aminokwasów w komórce nerkowej ulega obniżeniu już w pierwszym dniu po nefrektomii (18), co może być spowodowane ich wzmożonym wykorzystaniem przez aparat syntetyzujący białko. Po 4—6 tygodniach ilość aminokwasów wewnętrznej puli wraca do poziomu normalnego.

4. Zmiany enzymatyczne

Wzmożona synteza DNA, RNA i białka jak również zwiększona praca nerki musi być związana ze zwiększoną aktywnością enzymów odpowiedzialnych za te procesy. Niestety dotychczasowe badania zmian enzymatycznych są jeszcze stale niekompletne. Równoległe ze wzrostem syntezy DNA w nerce pozostałej po nefrektomii, obserwuje się wzmożenie aktywności pewnych enzymów uczestniczących w biosyntezie DNA (53). Aktywność kinazy dezoksytymidylanowej wzrasta po pierwszym dniu dwukrotnie, a po dwóch dniach dwa i pół raza. Po czterech dniach nadal

utrzymuje się na podwyższonym poziomie, po czym po tygodniu wraca do poziomu normalnego. Aktywność dezaminazy dezoksycytydylanowej jak również fosfatazy tymidylanowej jest podwyższona po dwóch dniach. Nie zmienia się natomiast prawie zupełnie aktywność kinazy dezoksy-cytydylanowej.

Bardzo wczesne i długo trwające zmiany zauważono w aktywności zasadowej RN-azy (77). Już po czterech godzinach następuje wzrost aktywności tego enzymu i podwyższony poziom utrzymuje się przez 2 tygodnie. Nie jest jednak wykluczone, że przyczyną nie jest tu wzrost syntezy a zwiększone wchłanianie zwrotne enzymu związane z jego stosunkowo niską masą cząsteczkową. Jak już wspomniano wzmożona praca nerki po nefrektomii znajduje też swoje odbicie w podwyższonej aktywności ATP-azy enzymu spełniającego istotną rolę we wchłanianiu zwrotnym przesączu kłębuszkowego (41). Po trzech tygodniach od nefrektomii jej aktywność wzrasta o 55% przy równoległym wzroście wchłaniania zwrotnego o 21%.

Bardzo precyzyjne badania Nowińskiego i Pigionia (63) z użyciem nurków Kartezjusza nad aktywnością enzymów cyklu Krebsa w izolowanych kłębuszkach nerkowych nie wykazały zmian w aktywności tych enzymów, jak również zmian w ilości ATP kłębuszkowego. Badania wykonane były jednak dopiero w 10 dni po nefrektomii, tzn. w okresie kiedy bardzo często stwierdza się spadek aktywności innych enzymów. Ponadto kłębuszki nerkowe spełniają raczej bierną rolę w wytwarzaniu moczu toteż wzrost aktywności enzymów w tym obszarze może nie być konieczny, nawet w wypadku zwiększonej pracy nerki. Nie obserwuje się również dużych zmian w aktywności enzymów oksydoredukcyjnych, mimo znacznie zwiększonej ilości mitochondriów w kanalikach proksymalnych (38). Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej jest nieznacznie podwyższona w drugim dniu po nefrektomii, jednakże nie obserwuje się zmian w aktywności oksydazy cytochromowej i reduktazy zredu. NAD-cytochrom (16, 75).

Aktywność deacylazy acylolizynowej wzrasta o 35% w trzy dni po nefrektomii i później stopniowo spada (69). Badania aktywności dehydrogenazy kwasu glutaminowego i zasadowej fosfatazy w izolowanych kanalikach nerkowych w 14 dni po operacji wykazały, że pierwsza wzrasta o 100 a druga o 70% (61). Aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu i dehydrogenazy 6-fosfoglukonianu wzrasta o 25% po 36 godzinach, następnie zmniejsza się po 48 godzinach i ponownie wzrasta po 72 godzinach. Rośnie również aktywność glukozo-6-fosfatazy i zasadowej fosfatazy osiągając maksimum w 72 godzinie po operacji, przy czym dootrzewnowe podawanie aktynomycyny D, 12 godzin przed i w czasie operacji, hamuje wzrost aktywności tych enzymów, co wskazuje, że regulacja syntezy enzymów może zachodzić już na poziomie transkrypcji genów (62, 68). Zaobserwowano też wyraźny dwufazowo przebiegający wzrost aktywności

enzymów uczestniczących w syntezie rybozy w cyklu pentozowym (21).

Mimo licznych prac dotyczących wyrównawczego przerostu nerki po nefrektomii nadal brak jasnej odpowiedzi na pytanie, jaki jest mechanizm powstawania tych zmian. Można przypuszczać, że w wyniku nefrektomii wydziela się jakaś substancja, wyzwalająca bardzo wczesne zmiany w metabolizmie kwasów rybonukleinowych i białek, powodując ich znaczny przyrost w komórce. Doprowadza to do naruszenia prawidłowego stosunku cytoplazmy do jądra w następstwie czego następuje wzmożone dzielenie się komórek i tym samym intensywny wzrost pozostałej nerki.

LITERATURA

1. Addis T., Lew W., *J. Exptl. Med.* **71**, 325 (1940).
2. Addis T., Myers B. A., Oliver J., *Arch. Int. Med.* **34**, 243 (1924).
3. Astarabadi T., *Acta Endocrinol. (Suppl.)* **67**, 169 (1962).
4. Baserga R., Thatcher D., Marzi D., *Lab. Invest.* **19**, 92 (1968).
5. Baxter J. H., Cotzias G. C., *J. Exptl. Med.* **89**, 643 (1949).
6. Becker N. H., Ogawa K., *J. Biophys. Cytol.* **6**, 295 (1959).
7. Bignall M. C., Elebute O., Lotspeich W. D., *Am. J. Physiol.* **215**, 289 (1968).
8. Blaufox M. D., *New Eng. J. Med.* **280**, 62 (1969).
9. Blumenfeld C. M., *Anat. Record* **435**, (1938).
10. Brade W., Herken H., Marker H. J., *Klin. Wochschr.* **46**, 1232 (1968).
11. Bucher N. L. R., *New Eng. J. Med.* **277**, 686 (1967).
12. Bucher N. L. R., *New Eng. J. Med.* **277**, 738 (1967).
13. Coe F. L., Korty P. R., *Am. J. Physiol.* **213**, 1585 (1967).
14. Darnell J. E. Jr., *Bacteriol. Rev.* **32**, 262, (1968).
15. Devenyi I., *Acta Morph. Acad. Sc. Hung.* **12**, 365 (1965).
16. Dies F., Lotspeich W. D., *Am. J. Physiol.* **212**, 67 (1967).
17. Dorok H. H., Wohlrab F., Holle G., *Virchows Arch. Path. Anat.* **333**, 195 (1960).
18. Dragoni G., Magrassi B., *Arch. Sci. Med.* **102**, 11 (1956).
19. Emge L. A., *Stanford Univ. Publ. Med. Sci.* **1**, 10 (1921).
20. Fanestil D. D., *Nature* **218**, 176 (1968).
21. Farquhar J. K., Scott W. N., Coe F. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **129**, 809 (1968).
22. Findley T., Davis W. D., *South Med. J.* **49**, 137 (1956).
23. Flanigan W. J., Burns R. O., Takacs F. J., Marill J. P., *Am. J. Surg.* **116**, 788 (1968).
24. Franck G., *Arch. Biol.* **71**, 489 (1960).
25. Goss R. J., *Cancer Res.* **23**, 1031 (1963).
26. Goss R. J., *Nature* **198**, 1108 (1963).
27. Goss R. J., Adaptive Growth, Logos Press Ltd, Londyn 1964.
28. Goss R. J., Rankin M. J., *J. Exptl. Zool.* **145**, 209 (1960).
29. Haddow A., *Brit. Med. Bull.* **4**, 331 (1947).
30. Halliburton I. W., Compensatory Renal Hypertrophy, red. W. W. Nowinski i R. J. Goss, Academic Press, New York-Londyn 1969, str. 102.
31. Halliburton I. W., Thompson R. Y., *Cancer. Res.* **25**, 1882 (1965).
32. Halliburton I. W., Thompson R. Y., *Biochem. J.* **99**, 44P (1966).

33. Hartman F. W., *J. Exptl. Med.* **58**, 649 (1933).
34. Hayslett J. O., Kashgarian M., Epstein F. M., *J. Clin. Invest.* **47**, 774 (1968).
35. Hiramoto R., Bernecky J., Jurand J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **111**, 648 (1962).
36. Jackson C. M., Levine N. M., *Anat. Record.* **41**, 323 (1929).
37. Jelinek J., Albrecht I., Motlik K., *Physiol. Bohemoslov.* **17**, 69 (1968).
38. Johnson H. A., Amendola F., *Am. J. Pathol.* **54**, 35 (1969).
39. Johnson H. A., Vera Roman J. M., *Am. J. Pathol.* **49**, 1 (1966).
40. Johnson H. A., Vera Roman J. M., *Cell Tissue Kinet.* **1**, 35 (1968).
41. Katz A. L., Epstein F. H., *J. Clin. Invest.* **46**, 1999 (1967).
42. Kurnick N. B., Lindsay P. A., *Lab. Invest.* **18**, 700 (1968).
43. Kurnick N. B., Lindsay P. A., *Lab. Invest.* **19**, 45 (1968).
44. Lowenstein L. M., Lozner E. C., *Clin. Res.* **14**, 383 (1966).
45. Lowenstein L. M., Stern A., *Science* **142**, 1479 (1963).
46. MacKay L. L., Addis T., MacKay E. M., *J. Exptl. Med.* **67**, 515 (1938).
47. Malt R. A., *New Eng. J. Med.* **280**, 1446 (1969).
48. Malt R. A., Lemaitre D. A., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 190 (1967).
49. Malt R. A., Lemaitre D. A., *Am. J. Physiol.* **214**, 1041 (1968).
50. Malt R. A., Lemaitre D. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **130**, 539 (1969).
51. Malt R. A., Miller W. L., *J. Exptl. Med.* **126**, 1 (1967).
52. Marshal S., *Intern. Abstr. Surg.* **117**, 307 (1963).
53. Mayfield E. D., Jr., Liebelt R. A., Bresnick E., *Cancer Res.* **27**, 1652 (1967).
54. McCreight C. E., Sulkin N. M., *J. Gerontol.* **14**, 440 (1959).
55. McCreight C. E., Sulkin N. M., *Am. J. Anat.* **110**, 199 (1962).
56. Miyada D. S., Kurnick N. B., *Federation Proc.* **19**, 325 (1960).
57. Moore R. A., *J. Exptl. Med.* **50**, 709 (1929).
58. Morrison A. B., *Lab. Invest.* **11**, 321 (1962).
59. Nakamura N. M., Miyada D. S., Cockett A. T. K., Moyer D. L., *Experientia* **20**, 694 (1964).
60. Nowinski W. W., w Compensatory Renal Hypertrophy, red. W. W. Nowinski i R. J. Goss, Academic Press, New York-Londyn 1969, str. 1.
61. Nowinski W. W., Carpentieri U., Mahaffey W. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **129**, 26 (1968).
62. Nowinski W. W., Ombach M., VII Zjazd P. T. Bioch., Wroclaw 1969.
63. Nowinski W. W., Pigoń A., *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 32 (1967).
64. Ogawa K., Nowinski W. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **99**, 350 (1958).
65. Ogawa K., Sinclair J. G., *Texas Rep. Biol. Med.* **16**, 215 (1958).
66. Ogden D. A., *Ann. Internal. Med.* **67**, 998 (1967).
67. Oliver J., Bloom F., MacDowell M., *J. Exptl. Med.* **73**, 143 (1941).
68. Ombach M., Nowinski W. W., *Federation Proc.* **28**, 619 (1969).
69. Paik W. K., Kim S., *Nature* **210**, 735 (1966).
70. Priestley G. C., Malt R. A., *J. Cell. Biol.* **41**, 886 (1969).
71. Priestley G. C., Pruyn M. L., Malt R. A., *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 154 (1969).
72. Reiter R. J., *Lab. Invest.* **14**, 1639 (1965).
73. Reiter R. J., McCreight C. E., *J. Exptl. Zool.* **160**, 117 (1965).
74. Rosenberg L. E., Berman M., Segal S., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 664 (1963).
75. Rosental S., Teichmann I., Winkelmann E., *Acta Biol. Med. German.* **8**, 530 (1962).
76. Royce P. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **113**, 1046 (1963).

77. Royce P. C., *Am. J. Physiol.* **212**, 924 (1967).
78. Saetren H., *Exptl. Cell. Res.* **11**, 229 (1956).
79. Semenova N. F., *Bull. Exptl. Biol. Med.* **51**, 122 (1961).
80. Straube R. L., Patt H. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **108**, 808 (1961)
81. Taylor D. M., Threlfall G., Buck A. T., *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1567 (1968).
82. Thompson J. W., Lytton B., *J. Urol.* **98**, 548 (1967).
83. Threlfall G., *Cell Tissue Kinet.* **1**, 382 (1968).
84. Threlfall G., Taylor D. M., *Eur. J. Biochem.* **8**, 591 (1969).
85. Threlfall G., Taylor D. M., Buck A. T., *Am. J. Pathol.* **50**, 1 (1967).
86. Trenker M., Otto T. J., *Post. Biochem.* **13**, 541 (1967).
87. Van Dyke D. C., Huff R. L., Evans H. M., *Stanford Med. Bull.* **6**, 271 (1948).
88. Weinberg R. A., Loening U., Willems M., Penman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1088 (1967).
89. Weiss P., *Biological Specificity and Growth*, red. E. G. Butler New York 1955, str. 195.
90. Willems M., Musilowa H., Malt R. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **62**, 1189 (1969).
91. Williams G. E. G., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **42**, 386 (1961).
92. Williams G. E. G., *Lab. Invest.* **11**, 1295 (1962).
93. Zumoff B., Patcher M. R., *Am. J. Anat.* **114**, 479 (1964).

JERZY WÓJCICKI *

Rozdział kwasu rybonukleinowego na żelach poliakrylamidowych

Separation of Ribonucleic Acid on Polyacrylamide Gels

The methods and some results of ribonucleic acid separation on polyacrylamide gels are presented.

Elektroforetyczny rozdział RNA w żelach daje większą możliwość otrzymywania poszczególnych frakcji, niż dotychczas stosowane metody chromatograficzne (14) oraz wirowanie w gradiencie gęstości (4). Działając na zasadzie sita molekularnego, elektroforeza w żelach pozwala rozdzielić drobiny, które różnią się wielkością i kształtem.

Elektroforeza kolumnowa w żelu poliakrylamidowym stała się wartościową metodą rozdziału białek (16). Metodę tę w zastosowaniu do rozdziału białek surowicy ludzkiej opisał szczegółowo Davis (6).

Richards i wsp. (20, 21) dostosowali metodę elektroforezy na kolumnach akrylamidowych do rozdziału RNA.

1. Sposób przyrządzania żelu

Podstawowym składnikiem żelu jest amid kwasu akrylowego (w skrócie akrylamid). Bishop i wsp. (1) opracowali metodę rozdziału wirusowego RNA, w której do sporządzania żelu poliakrylamidowego stosowali dwa czynniki sieciujące. Żel zsieciowany N,N-metylenodwuakrylamidem (w skrócie dwuakrylamidem) jest rozpuszczalny w H_2O_2 , a żel zsieciowany dwuakrylanem etylu rozpuszcza się w zasadach (5). Najniższe stężenie akrylamidu, dające żel odpowiedni do rozdziału RNA wynosi 2,2% przy sieciowaniu dwuakrylamidem, a 2,8% przy sieciowaniu dwuakrylanem etylu. Przed rozpoczęciem właściwych badań, monomery oczyszcza się przez rekrytalizację (12). Akrylamid rekrytalizuje się z chloroformu (70 g/l w 50° sączony w tej temperaturze), dwuakrylamid zaś z acetonu (około 10 g/l w temp. 40—50° sączony w tej temperaturze) przez schłodzenie roztworów do -20°.

Żel poliakrylamidowy 2,4% powstaje przez zmieszanie: 4 ml wodnego roztworu zawierającego 15% akrylamidu i 0,75% dwuakrylamidu,

* Dr med., Katedra i Zakład Farmakologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

2,45 ml wody, 8,33 ml buforu 3E (0,12 M Tris, 0,06 M CH_3COONa , 0,003 M sól dwusodowa EDTA) i 6 ml lodowatego kwasu octowego celem ustalenia pH na poziomie 7,2 (1). Po usunięciu pod próżnią powietrza, do mieszaniny dodaje się katalizatory polimeryzacji: 0,02 ml N,N,N',N'-czterometyloetylenodwuaminy i 0,2 ml nadsiarczanu amonu. Po upływie około 20 minut występuje polimeryzacja. Bishop i wsp. (1) prowadzą polimeryzację w rurkach pleksiglasowych (o wewnętrznej średnicy 0,7 cm)*. Celem usunięcia materiałów pochłaniających promienie ultrafioletowe żele umieszcza się następnie na 72 godziny w buforze E (1/3 stężenia buforu 3E), zawierającym 0,2% rekrytalizowanego dodecylo-siarczanu sodowego (SDS). Roztwór używany do sporządzania żelu dwuakrylowego zawiera 15% rekrytalizowanego akrylamidu i 1% etylenu dwuakrylowego.

Loening (12) przygotowując rozcieńczone żele, w których ostateczne stężenie akrylamidu waha się pomiędzy 2% i 5% (wag./obj.) używa 5% dwuakrylamidu a do żeli bardziej stężonych, zawierających 5% i 8% akrylamidu dodaje 2,5% dwuakrylamidu (w stosunku do ogólnej ilości akrylamidu). Zapasowy roztwór wodny złożony z akrylamidu i N,N'-metylenodwuakrylamidu może być przechowywany w ciemności w temperaturze 5° co najmniej przez miesiąc bez widocznej zmiany. Bufor stosowany przez Loeninga zawiera: 0,04M Tris, 0,02M CH_3COONa , 2mM EDTA (sól Na lub K); pH buforu 7,8 ustala się przez dodanie kwasu octowego. Odgazowaną mieszaninę akrylamidów, buforu i wody Loening uzupełnia 0,033 ml N,N,N',N'-czterometyloetylenodwuaminy i 0,33 ml 10% (wag./obj.) nadsiarczanu amonu. Mieszaniny zawierające 2,2—3% akrylamidu żelifikują w temperaturze pokojowej po 10—20 minutach, a zawierające 7,5% akrylamidu — po ok. 1 minucie.

Peacock i Dingman (17) stosując elektroforezę poliakrylamidową do rozdzielania RNA z wątroby, nerki i mózgu używali buforu o pH 8,3 zawierającego 108 g Tris, 9,3 g soli dwusodowej EDTA oraz 55 g kwasu bornego w 1 litrze. Bufor ten przed użyciem do przygotowywania żelu rozcieńcza się 10-krotnie. Zapasowy 20% roztwór wodny monomerów zawiera akrylamid i N,N'-metylenodwuakrylamid w stosunku wagowym 19:1. Jako katalizatory polimeryzacji Peacock i Dingman stosują 6,4% roztwór wodny dwumetyloaminonitrylu kwasu propionowego (DMAPN) oraz 1,6% roztwór nadsiarczanu amonu. Celem przygotowania żelu miesza się: roztwór monomerów (28 ml — żel 3,5% lub 80 ml — żel 10%), DMAPN (10 ml) oraz bufor (16 ml) i uzupełnia się wodą do 150 ml. Mieszanina podgrzewana do 25° polimeryzuje po dodaniu nadsiarczanu amonu (10 ml).

Richards i wsp. (20) podają sposób przygotowywania żelu poli-

* Niskoprocentowy żel poliakrylamidowy stosowany do rozdzielania RNA dość silnie przylega do szkła, natomiast z rurek pleksiglasowych słupki żelu można łatwo wydobyć.

akrylamidowego z wytwarzanego przez *British Drug Houses Ltd.* preparatu pod nazwą *Cyanogum 41*, który jest gotową mieszaniną zawierającą akrylamid i N,N'-metylenodwuakrylamid. Aby uzyskać żel 5% (wag./obj.) sporządzają roztwór zawierający: HCl 0,05 M, Tris 0,0503M i *Cyanogum 41* w ilości 50 g/l. Żel 10% (wag./obj.) przygotowują z roztworu zawierającego HCl 0,05M, Tris 0,243M i *Cyanogum 41* w ilości 100 g/l. Z roztworów tych również usuwa się w próżni powietrze, ponieważ nadmiar tlenu wpływa hamująco na polimeryzację, po czym dodaje się na 40 objętości roztworu 1 objętość 0,01% roztworu ryboflawiny, która jest katalizatorem procesu polimeryzacji.

Elektroforeza związków o wyższym ciężarze drobinowym może być przeprowadzona tylko wtedy, jeżeli stężenie akrylamidu w żelu jest odpowiednio niskie. Żele o niskim stężeniu akrylamidu są jednak wiotkie, co stwarza trudności techniczne przy badaniu elektroforetycznych właściwości niektórych typów kwasów nukleinowych (13, 15). Wprowadzenie agarozy pozwoliło znacznie obniżyć stężenie akrylamidu z zachowaniem odpowiedniej konsystencji i kształtu kolumny żelowej (18). W ten sposób stało się możliwe precyzyjne rozdzielenie RNA jądrowego. Metodyka sporządzania żelu akrylamidowego z dodatkiem agarozy sprowadza się do dwóch sposobów:

- 1) roztwór agarozy utrzymywany jest w temperaturze powyżej 35°C, co zapobiega żelifikacji agarozy zanim akrylamid ulegnie polimeryzacji,
- 2) roztwór agarozy ochładza się do 20°C, tak aby zżelifikował on zanim nastąpi polimeryzacja akrylamidu. Wybór sposobu przy stężeniu akrylamidu powyżej 3% jest bez znaczenia, natomiast przy niższych stężeniach należy stosować sposób drugi, tzn. uprzednią żelifikację agarozy.

2. Przebieg elektroforezy

Czas trwania elektroforezy oraz napięcie i natężenie prądu są różne w doniesieniach różnych autorów w zależności od procentowej zawartości akrylamidu, długości słupka żelu i ciężaru drobinowego RNA, który podlega rozdziałowi elektroforetycznemu.

Według Bishopa i wsp. (1) żel spolimeryzowany w pionową ustawionych rurkach pleksiglasowych zamkniętych od dołu błoną dializacyjną poddaje się, celem usunięcia zanieczyszczeń, wstępnej elektroforezie w buforze E w temperaturze pokojowej przy natężeniu 5mA na jedną kolumnę i napięciu 50 V (1,5 V/cm). Następnie na powierzchnię żelu nawarstwia się badaną próbkę RNA rozpuszczonego w możliwie najmniejszej objętości buforu E z zawartością 10% sacharozy. Maksymalna ilość RNA nie powinna przekraczać 100—200 µg nawarstwionych na jedną kolumnę, najlepszy jednak rozdział można uzyskać dodając RNA w ilości

nie przekraczającej 20 μg . Właściwa elektroforeza trwa 90 minut (lub dłużej, jeżeli zachodzi tego potrzeba) w takich samych warunkach jak przy fazie wstępnej.

Loening (12) przeprowadza elektroforezę w temperaturze około 5°C w lodówce stosując do 10 V/cm i 5mA/kolumnę. Wstępna elektroforeza trwa 60 min., po czym na żel nawarstwia się 5—10 μg RNA w 10—100 μl buforu zawierającego 5% sacharozy. Właściwy rozdział elektroforetyczny RNA trwa 30—60 minut.

Peacock i Dingman (17) frakcjonując zwierzęcy RNA z wątroby, nerki i mózgu stosowali napięcie około 10 V/cm i natężenie około 50 mA. Czas elektroforezy wynosił 90 minut w 3,5% żelu i 4 godziny w 10% żelu.

3. Badanie jakościowe i ilościowe uzyskanych frakcji RNA

Rozdział elektroforetyczny RNA można określać jakościowo oraz ilościowo. Oglądanie żelu pod lampą UV w ciemnym pomieszczeniu lub odpowiednie barwienie pozwala ustalić liczbę otrzymanych frakcji jak również ich rozmieszczenie, wyrażone odległością od czoła kolumny żelowej. Badanie spektrofotometryczne lub densytometryczne oraz pomiar radioaktywności pozwala ustalić stosunki ilościowe uzyskanych frakcji RNA.

Najczęściej używanymi barwnikami są: błękit metylenowy, błękit toluidynowy, tionina, oranż akrydynowy, gallocyjanina. Przed przystąpieniem do barwienia błękitem metylenowym, żełe zanurza się na 10—15 minut w 1M roztworze kwasu octowego (17), po czym umieszcza się na 1 godzinę lub dłużej w 0,2% roztworze barwnika w buforze octanowym o pH 4,7 (mieszanka równych objętości 0,4M octanu sodu i 0,4M kwasu octowego). Odbarwienie tła osiąga się przez płukanie żelu w wielu zmianach wody, albo w wodzie bieżącej.

Innym sposobem jest utrwalenie żelu przez kilkanaście godzin w 15% kwasie octowym zawierającym 1% octanu lantanu (21) a następnie barwienie według opisu de Boera i Sarnakera (2) świeżo sporządzonym roztworem gallocyjanino-chromalowym o pH 1,6. Można też barwić żel zanurzając go na co najmniej 6 godzin w 15% roztworze kwasu octowego zawierającym 2% oranżu akrydynowego i 1% octanu lantanu (21).

Do densytometrycznego ilościowego oznaczania poszczególnych frakcji RNA w słupku żelu można stosować różnego typu aparaty, np. mikrodensytometry *Canalco Model E*(11), czy *Joyce-Loebl* (8), lub spektrofotometr *Gilforda* (24).

Pomiar radioaktywności poszczególnych frakcji RNA przeprowadza się w skrawkach żelu. Żel po uprzednim zamrożeniu tnę się na skrawki grubości 0,5—1 mm mikrotomem mroźniowym (1) lub specjalnie w tym celu skonstruowanymi urządzeniami, np. *Autogeldivider* produkcji *Savant Instruments, Inc.*, albo też po prostu zestawem żyłek umocowanych

prostym sposobem w odpowiedniej odległości jedna od drugiej (5). Obecność SDS (1) lub glicerolu (24) w żelu ułatwia cięcie, gdyż zapobiega tworzeniu się kryształków lodu w czasie zamrażania. Dość uciążliwy proces cięcia zamrożonego żelu można ułatwić stosując zasuszanie żelu w całości na skrawku bibuły *Whatmanna*. Zasuszony żel tnie się na skrawki odpowiedniej szerokości, np. gilotyną używaną do celów fotograficznych (25). Zasuszanie jest też wygodną formą przechowywania żelu dla celów dokumentacyjnych.

Ze skrawków ekstrahuje się następnie RNA przez rozpuszczenie poliakrylamidu w roztworach alkalicznych. Zalecane jest więc działanie na skrawek 0,5 ml stężonym NH_4OH w ciągu 1 godziny (24) lub 1 ml 3N NH_4OH przez 15 godzin z zachowaniem temperatury w granicach 37°C (23), bądź też 0,5 ml 30% H_2O_2 w ciągu 12 godzin w temperaturze 75° (9). Można też inkubować skrawek w 0,2 ml 1M NaOH przez noc w temperaturze pokojowej, a następnie dodawać 1 ml NCS Reagent (*Nuclear Chicago Corp.*) (17) lub też stosować 0,5 ml roztworu piperydiny i hyaminy (9 objętości 1M piperydiny i 1 objętości alkalicznego roztworu hyaminy) przez okres 1—4 godzin (5). Odzyskanie RNA, który mógłby być używany np. do hybrydyzacji wymaga specjalnie ostrożnego postępowania wykluczającego hydrolizę. Watanabe i wsp. (23) ekstrahowali RNA przez inkubowanie skrawków żelu w 0,3 ml buforu STE (0,01M NaCl; 0,01M Tris-HCl; pH 7,4, 0,005M EDTA) przez 18 godzin w temperaturze 4°C . Wydajność tej metody nie przekraczała 50% RNA zawartego w skrawku. Wytrząsanie skrawka z 0,5 ml buforu SCC (0,15M chlorek sodu; 0,015M cytrynian sodu, pH 7) przez noc w temperaturze 4° , a następnie zanurzenie próbki do łaźni o temp. 100°C na okres 5 minut pozwala uzyskać około 53% radioaktywności związanej z RNA (25).

Do wyekstrahowanych ze skrawków żelowych porcji RNA dodaje się po 10 ml płynu scyntylicyjnego, np. toluenu, płynu Braya (3), czy płynu Kinarda (10) i przeprowadza się pomiar radioaktywności w liczniku scyntylicyjnym np. Packarda.

4. Rozdział wirusowego i bakteryjnego RNA

Bishop i wsp. (1) zastosowali żel poliakrylamidowy do rozdziału RNA wirusowego i bakteryjnego. Stwierdzili oni, że RNA o niskim ciężarze cząsteczkowym (4S i 5S) ulega rozdzieleniu w żelu o wysokich stężeniach, natomiast rozdział frakcji o wyższym ciężarze cząsteczkowym (23S i 16S) wymaga żelu o niższych stężeniach akrylamidu.

Elektroforeza mieszaniny wirusowego RNA (MS2, R17 i QB) znakowanego ^{32}P i bakteryjnego RNA znakowanego ^3H wykazała większą ruchliwość QB RNA, niż MS2 RNA. Ten ostatni zlokalizowany jest bliżej bakteryjnego 23S RNA, aniżeli QB. Po 90 minutach elektroforezy, zarówno MS2 RNA, jak i R 17 RNA są umiejscowione 1,5 mm podczas gdy QB

RNA 3,0 mm za bakteryjnym 23S RNA. Taki przebieg rozdziału wirusowego RNA wykazuje dobrą powtarzalność. Określona ruchliwość wirusowych RNA w żelu poliakrylamidowym w stosunku do znanej frakcji bakteryjnego RNA stwarza możliwości rozpoznawania tą metodą konkretnego wirusowego RNA. Należy dodać, że wirusowy RNA eluowany ze skrawków żelu poliakrylamidowego przy pomocy $5 \times 10^{-3}M$ EDTA o pH 7,4 zachowuje swoją aktywność infekcyjną.

Elektroforetyczne frakcjonowanie w żelu poliakrylamidowym bakteryjnego RNA z *E. coli* znakowanego ^{14}C -uracylem umożliwiło precyzyjny rozdziel, przy czym pomiary radioaktywności i ekstynkcji wykazały dokładną zbieżność w zakresie szczytu 23S, natomiast załamek radioaktywności odpowiadający 16S RNA jest szerszy niż odpowiedni załamek ekstynkcji i rozdwojony. Również radioaktywność w zakresie 4S RNA wykazuje wyraźną tendencję do rozdziału na dwie składowe (12). Dane te świadczą, że prostsza i znacznie mniej czasochłonna analiza elektroforetyczna daje rozdziel RNA dokładniejszy, niż wirowanie w gradience gęstości.

Elektroforeza na żelach poliakrylamidowych okazała się też niezwykle przydatną do rozdziału form dojrzałych bakteryjnego RNA rybosomowego (rRNA) od jego prekursorów (9). Różnice ruchliwości elektroforetycznej wskazują na różnice ciężaru cząsteczkowego wykształconych frakcji rRNA i form prekursorowych.

5. Rozdział zwierzęcego RNA

Elektroforetyczne frakcjonowanie w żelu poliakrylamidowym zwierzęcego RNA, które przeprowadzili Peacock i Dingman (17), dało wyniki podważające dotychczasowe poglądy o podziale RNA na trzy główne typy: 30S, 18S i 4S. Autorzy ci wykazali, że cytoplazmatyczny kwas rybonukleinowy (cRNA) złożony jest z wielu frakcji oraz że w wątrobie, nerce i mózgu szczura występują takie same frakcje w podobnych proporcjach. Elektroforeza w 3,5% żelu wykazała, że materiał zaledwie wchodzący do żelu stanowi 30S RNA, a dwa następne dobrze zarysowujące się prążki to 18S RNA w odległości około 1,2 cm i 4S RNA w odległości około 8,2 cm od czoła. Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie licznych prążków RNA występujących pomiędzy 30S i 18S RNA oraz pomiędzy 18S i 4S RNA. Wyraźny prążek znajdujący się w odległości około 7,2 mm od czoła zidentyfikowano jako mikrosomalny 5S RNA. Był on obecny w próbkach RNA wyosobnionego z mikrosomów, ale nie występował we frakcjach sRNA.

W związku ze znaczeniem jądra komórkowego w syntezie i dojrzewaniu cRNA (19) oraz w związku z doniesieniami, że w jądrze komórkowym są frakcje RNA nie występujące w cytoplazmie (22), Dingman i Peacock (7) postanowili wykorzystać znaczną subtelność rozdziału właś-

ciwą elektroforezie żelowej do badania niektórych fizycznych i metabolicznych właściwości jądrowego RNA (nRNA). Wprowadzając do żelu agarozę zdołali znacznie obniżyć stężenie akrylamidu. Stwierdzili oni, że istotnie w jądrach komórek wątroby szczura jest wiele frakcji nRNA, które nie występują w cytoplazmie. Po stronie niższego ciężaru drobinowego, oprócz 18S RNA, jądra zawierały kilka frakcji o ruchliwości nieco mniejszej aniżeli 4S RNA, a po stronie wyższego ciężaru drobinowego kilka frakcji o ruchliwości mniejszej niż 30S RNA. Nowopowstały 30S i 18S RNA pojawiały się również jednocześnie w cytoplazmie. Przeprowadzone badania pozwoliły wysunąć sugestię, że 35S i 45S RNA nie stanowią pojedynczych frakcji, ale raczej są zespołem wielu składników o różnym ciężarze drobinowym.

6. Określanie ciężaru cząsteczkowego

Ruchliwość elektroforetyczna RNA w żelach jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczki RNA. Dzięki jednemu elektroferogramowi można zatem nie tylko jakościowo ocenić typ rozdzielonych frakcji RNA, ale także uzyskać ilościowe dane o ciężarze cząsteczkowym tych frakcji (7). Logarytm (przypuszczalnego) ciężaru cząsteczkowego jest odwrotnie proporcjonalny do ruchliwości RNA w złożonych żelach agarozowo-akrylamidowych (17) i w prostych żelach akrylamidowych (1). Zależność ta ma charakter liniowy nawet przy małej ruchliwości RNA. Ciężar cząsteczkowy RNA nieznanymi rozmiarów można oznaczyć posługując się krzywą wzorcową obrazującą logarytm ciężaru cząsteczkowego dwóch lub trzech znanych typów RNA w funkcji ich ruchliwości elektroforetycznej (17). Ma to szczególne znaczenie dla scharakteryzowania frakcji RNA, które nie dają się rozdzielić innymi metodami, niż elektroforeza w żelu.

7. Uwagi końcowe

Elektroforetyczny rozdział RNA w żelu poliakrylamidowym jest niezwykle przydatną metodą zarówno z uwagi na łatwość i szybkość metody jak i ze względu na większą zdolność rozdzielczą, niż w innych dotychczas znanych metodach rozdzielania. Ponadto frakcje RNA uzyskane metodą elektroforetyczną są lepiej od siebie rozdzielane niż to ma miejsce w przypadku wirowania w gradiencie gęstości.

LITERATURA

1. Bishop D. H. L., Claybrook J. R., Spiegelman S., *J. Mol. Biol.* **26**, 373 (1967).
2. de Boer J., Sarnaker R., *Med. Proc. (South Africa)* **2**, 218 (1956).

3. Bray G., *Anal. Biochem.* **1**, 279 (1960).
4. Britton R. J., Roberts R. B., *Science* **131**, 32 (1960).
5. Choules G. L., Zimm B. H., *Anal. Biochem.* **13**, 336 (1965).
6. Davis B. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
7. Dingman C. W., Peacock A. C., *Biochemistry* **7**, 659 (1968).
8. Grossbach U., Weinstein B., *Anal. Biochem.* **22**, 311 (1968).
9. Hecht N. B., Woese C. R., *J. Bacteriol.* **95**, 986 (1968).
10. Kinard F. E., *Rev. Sci. Instr.* **28**, 293 (1957).
11. King H. W. S., Rischen W., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 32 (1968).
12. Loening U. E., *Biochem. J.* **102**, 251 (1967).
13. Loening U. E., Igle J., *Nature* **215**, 363 (1967).
14. Mandell J. D., Hershey A. D., *Anal. Biochem.* **1**, 66 (1960).
15. Mills D. R., Peterson R. L., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 217 (1967).
16. Ornstein L., *Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S.* **121**, 321 (1964).
17. Peacock A. C., Dingman C. W., *Biochemistry* **6**, 1818 (1967).
18. Peacock A. C., Dingman C. W., *Biochemistry* **7**, 668 (1968).
19. Perry R. P., *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **6**, 219 (1967).
20. Richards E. G., Coll J. A., Gratzer W. B., *Anal. Biochem.* **12**, 452 (1965).
21. Richards E. G., Gratzer W. B., *Nature* **204**, 878 (1964).
22. Shearer R. W., McCarthy B. J. *Biochemistry* **6**, 283 (1962).
23. Watanabe J., Prevec L., Graham A. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1040 (1967).
24. Weinberg R. A., Loening U., Willems M., Penman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1088 (1967).
25. Wójcicki J., *Arch. Immun. Therap. Exp.* **27**, 744 (1969).

JERZY KRAWCZYŃSKI *

Automatyzacja badań w chemii klinicznej i elektroniczne przetwarzanie wyników

Automation in Clinical Chemistry and Electronic Data Processing

Rozwój współczesnej medycyny w coraz większym stopniu zależy od rozwoju techniki badań laboratoryjnych, zwłaszcza biochemicznych. Ustalenie rozpoznania klinicznego, czy też kontrola prowadzonego leczenia wymagają obecnie w wyniku ogólnego postępu medycyny, więcej informacji laboratoryjnych niż w niedalekiej jeszcze przeszłości. Istniejące obecnie laboratoria diagnostyczne nie są już w stanie sprostać temu gwałtownemu wzrostowi zapotrzebowania.

Znacznie wzrosły też wymagania co do jakości wyników badań laboratoryjnych, zwłaszcza ilościowych. Aby każdy wynik był informacją w pełni wiarygodną, metody analityczne powinny cechować się wysokim stopniem swoistości, dokładności i powtarzalności (67).

Z dwu dróg, umożliwiających wyjście z obecnego impasu droga przez ekstensywny rozwój polegający na zwiększeniu liczby pracowników i rozbudowie przestrzennej laboratoriów będzie w najbliższej przyszłości znacznie ograniczona. Intensyfikację pracy laboratoriów chemiczno-klinicznych można więc osiągnąć przez:

1. szerokie zastosowanie badań screeningowych (testy papierkowe, paskowe, tabletkowe itp.), wykonywanych w laboratorium bądź na oddziałach lub w poliklinikach przez lekarzy klinicystów, pielęgniarki i pomoce pielęgniarskie,
2. rozwój techniki badań laboratoryjnych, polegający głównie na automatyzacji z coraz szerszym zastosowaniem komputerów.

Roli badań screeningowych poświęcono ostatnio wiele monografii, i artykułów poglądowych, zarówno w kraju jak i za granicą (27, 30, 31,

* Prof. dr med., Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Studium Doskonalenia Lekarzy, Akademia Medyczna, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: AspAT — aminotransferaza asparaginianowa, AlAT — aminotransferaza alaninowa, LDH — dehydrogenaza mleczanowa, AP — zasadowa fosfataza, HABA — kwas 2-(4-hydroksy-benzeno-azo) benzoesowy, EDP — elektroniczne przetwarzanie danych (ang. *electronic data processing*), MDH — dehydrogenaza jabłczanowa.

32, 33, 46). Temat tego artykułu ograniczy się zatem do zagadnienia automatyzacji badań chemiczno-klinicznych, które było przedmiotem tylko niewielu syntetycznych opracowań, zwłaszcza w piśmiennictwie polskim (19, 24, 30, 38, 39, 66). Czytelnik znajdzie też rozdział o elektronicznym przetwarzaniu wyników laboratoryjnych (ang. *electronic data processing* — EDP), które to zagadnienie nie było jeszcze w polskim piśmiennictwie omawiane.

I. Organizacja pracy w laboratorium chemii klinicznej

Rutynowe laboratorium chemii klinicznej dysponuje zwykle mniejszym lub większym wachlarzem metod analitycznych, które najczęściej są grupowane w ramach poszczególnych stanowisk roboczych (31). W laboratorium takim wykonującym często kilkaset, a nawet więcej badań dziennie, muszą obowiązywać ściśle określone zasady organizacji pracy. Nie przestrzeganie tych zasad nieuchronnie prowadzi do pojawienia się dużej ilości błędnych wyników, bezpośrednio lub pośrednio zagrażających stanowi zdrowia pacjentów.

Pracę laboratorium chemii klinicznej, niezależnie od jego wielkości można podzielić na trzy etapy (22):

1. Wstępne opracowanie materiału obejmujące:
 - a) zbieranie i segregowanie skierowań na badania,
 - b) pobieranie materiału i jego identyfikację,
 - c) rozdział materiału na stanowiska robocze.
2. Analiza właściwa realizowana przez:
 - a) całkowicie zautomatyzowane systemy wielokanałowe, takie jak np. *SMA-12*, *Robot-Chemist*, *Auto-Chemist*, system *Richterich-Greiner*, system *Vickers Multichannel 300*,
 - b) zautomatyzowane systemy jednokanałowe, jak np. *Unicam SC-60*, *Clinomak II*, *Mecolab* itp.,
 - c) systemy półautomatyczne, np. fotokolorymetr *LKB*,
 - d) systemy manualne wspomagane małą automatyzacją,
 - e) klasyczne systemy manualne,
 - f) system kontroli metod ilościowych, pracujący w oparciu o surowice i roztwory wzorcowe oraz surowice kontrolne.
3. Opracowywanie i przekazywanie wyników:
 - a) odczytywanie pierwotnych wartości liczbowych na aparaturze pomiarowo-kontrolnej (ekstynkcja, transmisja) lub wartości ostatecznych, obliczonych przez przeliczniki cyfrowe,
 - b) obliczanie wyników z wartości pierwotnych w wypadkach, kiedy nie korzysta się z przeliczników cyfrowych,
 - c) korekcja wyników zgodnie z aktualnymi danymi systemu kontrolnego,

- d) gromadzenie wyników i ich segregowanie w sposób umożliwiającą wykorzystanie ich w celach sprawozdawczych, statystycznych i naukowych,
- e) przekazywanie wyników lekarzowi.

Proces automatyzacji może obejmować wszystkie trzy wymienione etapy lub tylko niektóre z nich. Historycznie najwcześniej rozpoczęto automatyzację etapu analitycznego.

II. System analizy ciągłej przepływowej (ang. *continuous flow analysis system*)

W rozwoju automatyzacji badań chemiczno-klinicznych szczególną rolę odegrał system analizy ciągłej przepływowej, opracowany przez Skeggsa (62) i wprowadzony w roku 1957 na rynek przez firmę *Technicon Instruments Corp. Ltd. Chauncey NA* pod nazwą *Auto-Analyser (AA)*. Zasadę działania jednokanałowego AA, jego konstrukcję, sposób obsługi, jak również niektóre metody przystosowane do tego aparatu szczegółowo opisał Hankiewicz (19).

Jednokanałowy AA w ciągu ostatnich lat rozwinął się z jednej strony w skomplikowane systemy wielokanałowe, z drugiej zaś przekształcił się w kombajny analityczne przeznaczone do wykonywania specjalnych analiz biochemicznych.

Auto-Analizator SMA-12/60 jest to dwunastokanałowy kombajn analityczny, pozwalający równocześnie oznaczyć w 1,8 ml surowicy 12 spośród następujących składników: AspAT, AP, LDH, bilirubinę, kwas moczowy, azot mocznikowy, Na, albuminy, Cl, CO₂, Ca, P nieorganiczny, białka całkowite, glukozę, cholesterol.

Każdy kanał stanowi autonomiczną jednostkę funkcjonalną. Wyniki otrzymuje się na zbiorczym diagramie w formie zapisu graficznego. Na diagramie tym zakreskowany jest zakres wyników prawidłowych. Tego rodzaju „chemogram” zostaje natychmiast powielony na kserografie i kopię otrzymuje lekarz, a oryginał pozostaje w laboratorium. Maksymalna wydajność aparatu wynosi 54 próbki oraz 6 standardów na godzinę $\times 12$ tj. 432 pełne profile chemiczne lub 5184 badania pojedyncze w ciągu dnia pracy. Czas potrzebny do uzyskania jednego profilu wynosi około 8 minut. Aparat może też pracować z mniejszą szybkością, wykonując 20 względnie 40 badań na godzinę $\times 12$.

Pracą aparatu sterują urządzenia programujące. Prawidłowe funkcjonowanie aparatu można kontrolować przy pomocy urządzenia monitorowego zaopatrzonego w oscyloskop. Aparat umożliwia również korygowanie ostatecznych wyników przez oznaczenie tzw. próby zerowej. Dotyczy to przede wszystkim oznaczania poziomu białka całkowitego, albumin, LDH i bilirubiny. W ten sposób eliminuje się wpływ lipemii względnie hyperbilirubinemii na wynik oznaczenia.

W najnowszym modelu SMA-12/60 zamiast odbieralnika typu II (19) został wmontowany specjalny odbieralnik T-40, który zabezpiecza bezbłędną identyfikację każdej próbki. Kanały elektrolitowe SMA-12/60 (dla Na i K) pracują w połączeniu z fotometrem płomieniowym. SMA-12/60 może być pośrednio (ang. *off line*) względnie bezpośrednio (ang. *on line*) połączony z komputerem (18).

Na aparacie SMA-12/60 przeprowadza się oznaczenia wykorzystując reakcje takie same jak w metodach manualnych, np. przy oznaczaniu aktywności AspAT reakcją Babsona, przy oznaczaniu aktywności AP — reakcją z *p*-nitro-fenylfosforanem, przy oznaczaniu poziomu kwasu moczowego — reakcją z kwasem wolframowym i hydroksylaminą (przy oznaczaniu azotu mocznikowego — reakcją z dwuacetylo-monoksymem, białka całkowitego — reakcją biuretową, albumin — reakcją z odczynnikiem HABA (kwas 2,4-hydrokso-benzeno-azo) benzoesowy).

Auto-Analizator do oznaczania jodu związanego z białkami surowicy (PBJ). Jedyny tego typu aparat znajdujący się obecnie na rynku jest typowym jednokanałowym AA, połączonym z piecem do spalań (ang. *digestor*). Oznaczanie przeprowadza się następująco: z surowicy usuwa się jod nieorganiczny przez zmieszanie z niewielką ilością anionitu i umieszcza się ją w odbieralniku prób. Następnie po zmieszaniu z mieszkanką spalającą (steżony kwas siarkowy, kwas azotowy i nadchlorowy) próbkę spala się w piecu. Zawartość jodu oznacza się wykorzystując jego katalityczne działanie na proces redukcji jonów cerowych przez kwas arsenawy. Dla każdej serii badań sporządza się krzywą kalibracyjną. Wydajność aparatu wynosi 20 próbek na godzinę, a czas analizy 15 minut.

Właściwą eksploatację aparatu zapewnia scentralizowanie oznaczeń w jednym laboratorium obsługującym w tym zakresie określony obszar kraju, zamieszkały przez większą liczbę mieszkańców.

Auto-Analizator do badań fluorymetrycznych. Metody fluorymetryczne ze względu na ich wysoką czułość i swoistość odgrywają coraz większą rolę w chemii klinicznej (57). Firma *Auto-Technicon* skonstruowała więc kombajn wyposażony w czuły fluorymetr z kuwetą przepływową. W aparacie tym można oznaczać poziom amin katecholowych w surowicy, wapnia, magnezu, fenyloalaniny (szybkie rozpoznawanie fenyloketonurii), a także aktywność niektórych enzymów (AspAT, AlAT, LDH, MDH itp.) bezpośrednio lub pośrednio zależnych od układu zređ.NAD/NAD. Przy oznaczaniu aktywności enzymów wykorzystuje się naturalną fluoroescencję zređ.NAD, wzbudzoną naświetleniem próbki światłem o długości fali 340 nm. Maksymalna wydajność aparatu wynosi 60 próbek na godzinę.

Auto-Analizator do badań w skali mikro (pediatryczny). Na jedno oznaczenie w tym aparacie zużywa się 0,1 ml surowicy. Aparat przystosowany jest do metod specjalnie użytecznych w pediatrii (oznaczanie poziomu fenyloalaniny w krwi, aktywności esterazy cholinowej itp.).

System analizy ciągłej przepływowej, reprezentowany głównie przez kombajny analityczne typu AA odgrywa ciągle jeszcze istotną rolę w automatyzacji badań laboratoryjnych (44). Większość obecnie eksploatowanych na całym świecie kombajnów analitycznych należy do grupy AA. W NRD i ZSRR rozpoczęto produkcję aparatów opartych na zasadzie AA.

Niemniej jednak coraz częściej dają się słyszeć opinie, że możliwości technicznego rozwoju systemu analizy ciągłej przepływowej zostały już prawie wyczerpane, a proces automatyzacji laboratoriów analitycznych pójdzie prawdopodobnie inną drogą (42).

System analizy ciągłej przepływowej wykazuje wiele niedogodności. Do ważniejszych należą m. in.:

- zbyt mała wydajność (maksimum 60 próbek jednego rodzaju na godzinę),
- niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki badanej przez próbkę poprzedzającą (przy dużych różnicach stężeń badanego składnika),
- zbyt ścisła zależność użytkownika od producenta aparatury (konieczność częstej wymiany kalibrowanych rurek plastikowych),
- stosunkowo wysokie koszty eksploatacji.

Dlatego też pojawiające się w ostatnich latach na rynku kombajny analityczne reprezentują niemal wyłącznie system analizy indywidualnej, w którym realizowana jest zasada, że każda próbka materiału opracowana jest z osobna, tak jak w metodach manualnych.

III. System analizy indywidualnej (ang. *discrete analysis system*)

Obecnie na rynku światowym znajduje się około 25 różnych kombajnów analitycznych, reprezentujących system analizy indywidualnej (45).

W rozwoju produkcji kombajnów analitycznych obserwuje się dwójakiego rodzaju tendencje, których celem jest:

- a) Skonstruowanie taniego, prostego w obsłudze aparatu (małe kombajny analityczne), o dużej plastyczności funkcjonalnej, ale ograniczonych możliwościach technicznych. Aparaty tego typu mają odgrywać w zasadzie rolę udoskonalonego sita (badania screeningowe) szybko oddzielającego wyniki patologiczne od fizjologicznych (40). Koszt tego typu kombajnów waha się obecnie w granicach 4 000—10 000 dolarów,
- b) Wprowadzenie do użytku, zwłaszcza na potrzeby dużych szpitali i poliklinik wielokanałowych, skomplikowanych, w pełni zautomatyzowanych aparatów, o dużej wydajności, najczęściej połączonych już bezpośrednio z komputerami (duże kombajny analityczne). Aktualna cena tego rodzaju kombajnu wynosi 50 000—350 000 dolarów.

1. Małe kombajny analityczne

Kombajn *Clinomak II* (producent firma *Polimak-Roma*) należy do systemu analizy indywidualnej ciągłej (ang. *continuous discrete analysis system*). Jego nominalna maksymalna wydajność wynosi 300 oznaczeń na godzinę. Wydajność rzeczywista jest mniejsza, zwłaszcza przy pracy na krótkich seriach analiz i nie przekracza 300—700 różnego rodzaju oznaczeń w ciągu dnia pracy.

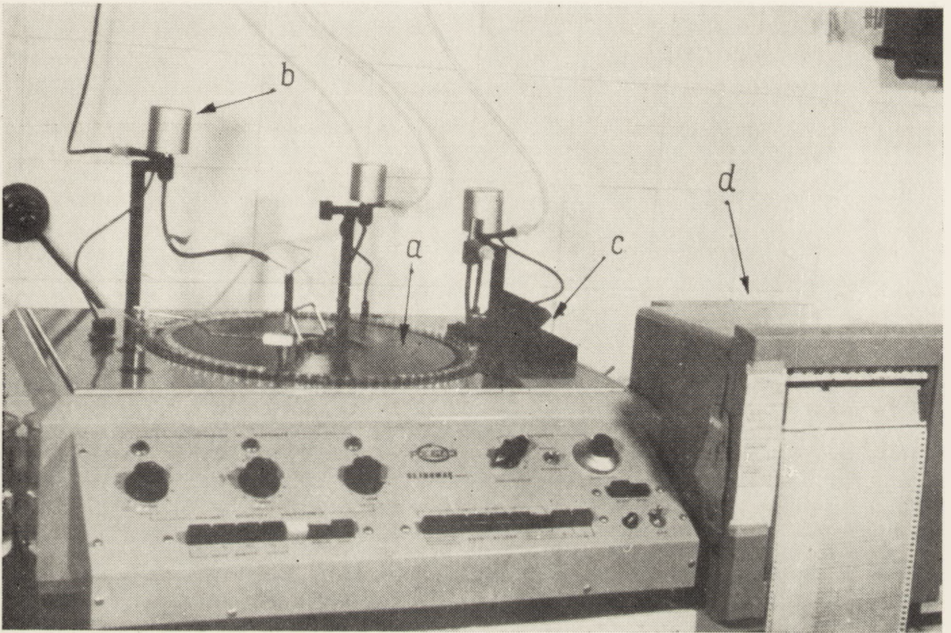
Zasadniczą częścią aparatu jest bęben rozdzielający, w którym znajduje się 90 plastikowych probówek, zawierających badane surowice oraz wzorce (rząd wewnętrzny) oraz 90 szklanych probówek, w których przeprowadza się oznaczenie i które służą równocześnie jako kuwety pomiarowe (rząd zewnętrzny). Surowica w odpowiedniej ilości przenoszona jest z wewnętrznego rzędu do zewnętrznego (rysunek 1) dokąd też doprowadzane są potrzebne odczynniki. Dozowanie surowicy i odczynników regulują magnetyczne wentyle, otwierające się na określony przeciąg czasu. Ilości odmierzanych odczynników wahają się w granicach od 0,5 do 2,5 ml, a surowicy od 20 do 200 μ l. Dokładność pomiaru jest stosunkowo wysoka i błąd nie przekracza 1,5% (24). Mieszanie odbywa się siłą wtrysku odczynnika. Fotokolorymetr wbudowany w aparat zaopatrzonej jest w ciągły filtr interferencyjny o zakresie widma od 400—700 nm. Wyniki badań zapisuje w postaci wykresu aparat rejestrujący (ang. *recorder*), (rysunek 2).

Wyniki odczytuje się przy pomocy specjalnego czytnika. Kombajn *Clinomak II* może też pracować w połączeniu z fotometrem płomieniowym, fluorymetrem oraz spektrofotometrem kwarcowym. W nowszych modelach aparat rejestrujący zastąpiono drukarką wyników. Nowsze modele mogą być też w układzie „*on line*” podłączone do komputera.

Wyprodukowane przez firmę *Polimak* urządzenie do mycia probówek, bez potrzeby wyjmowania ich z bębna, nosi nazwę *Lavomak* i w znacznym stopniu ułatwia obsługę kombajnu.

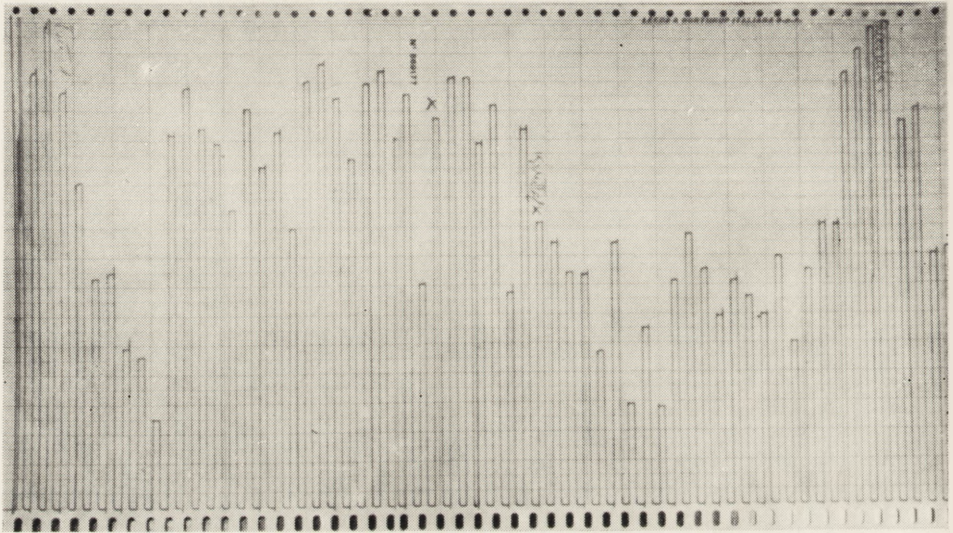
Przy pomocy kombajnu analitycznego *Clinomak II* można wykonywać tylko te badania, w których liczba dodawanych odczynników nie przekracza czterech, a oznaczenie odbywa się w temperaturze pokojowej i nie wymaga odbiażania surowicy. Tego rodzaju ograniczenia nie mają jednak istotnego znaczenia praktycznego, wobec tendencji do stosowania w chemii klinicznej metod jedno-, dwu, a najwyżej trój-odczynnikowych i nie wymagających odbiażania surowicy, jak np. oznaczanie białka całkowitego, cholesterolu itp. (23, 65).

Kombajn *Clinomak II* praktycznie umożliwia wykonywanie wszystkich rutynowych badań chemiczno-klinicznych. Przy jego pomocy można oznaczać: białko w surowicy zmodyfikowaną metodą biuretową (68), albuminy — barwnikiem HABA (40), próbę tymolową i próbę Kunkela z wzorcem zefirolowym względnie sterinolowym (34, 35, 53), mocznik w surowicy metodą ureazową z reakcją Barthelota jako reakcją wskaźni-



Rys. 1. Kombajn *Clinomak II* (widok ogólny)

a — bęben rozdzielający, b — wentyle, c — fotometr, d — rekorder



Rys. 2. Sposób zapisywania wyników na kombajnie *Clinomak II*

kową (13), glukozę w surowicy metodą enzymatyczną z oksydazą D-glukozy (51), chlorki w surowicy metodą Schoenfelda i Lewellena (60) z rodanikiem rtęciowym, bilirubinę w surowicy zmodyfikowaną metodą dwuazową (16, 25, 37, 41), cholesterol w surowicy zmodyfikowaną metodą Pearsona i wsp. (23, 49), aktywność aminotransferaz w surowicy zmodyfikowaną metodą Reitmana i Frankela (52), względnie Babsona i Schapiro (9), wapń w surowicy metodą Connerty i Briggisa (15) z siarczanem alizaryny, aktywność kwaśnej i zasadowej fosfatazy w surowicy metodą Bessey, Lowry, Brock (12), względnie metodą Babsona i Phillipisa (6, 7, 8) itp.

Kombajn *Clinomak II* jest rutynowo eksploatowany w kilku laboratoriach w naszym kraju.

Kombajn *Unicam AC-60* (producent: *Automatic Analytical System-Pye Unicam Ltd*, Cambridge), o nominalnej wydajności 120 analiz na godzinę stanowi właściwie automatyczny układ dozymetryczny (znany też na rynku pod nazwą *Bioanalyst Griffin*) i podobnie jak *Clinomak II* nadaje się jedynie do metod nie wymagających odbiańczania. Surowice i odczynniki odmierzone są przy pomocy wentyli tłokowych. Przewidziano kolejne dodawanie trzech różnych odczynników. W odróżnieniu od kombajnu *Clinomak II* omawiany aparat zaopatrzony jest w mechaniczne mieszadło oraz w termostat, umożliwiający ciągłe regulowanie temperatury w zakresie do 60° z dokładnością do 0,5°. Istnieje możliwość ogrzewania odczynników do odpowiedniej temperatury przed zmieszaniem ich z surowicą. Natężenie powstającego zabarwienia odczytuje się w spektrofotometrze np. *Unicam SP-500*, względnie fotokolorymetrze zaopatrzonym w przepływową kufkę i połączonym z przyrządem rejestrującym względnie z drukarką wyników. Spektrofotometr czy też fotokolorymetr nie stanowią jednak integralnej części systemu analitycznego. W aparacie *AC-60* znajduje się pompa (ang. *transfer station*), która przenosi zabarwiony płyn z próbki reakcyjnej do przepływowej kufki aparatu pomiarowego.

Ilość surowicy potrzebna do wykonania badania wynosi od 10 do 300 μ l. Objętość końcowa próbki 4—4,5 ml.

Na kombajnie *AC-60* wykonuje się oznaczenia białka całkowitego, glukozy, mocznika, nieorganicznych fosforanów i aktywności aminotransferaz w surowicy oraz hemoglobiny w krwi.

W kraju użytkowane są pojedyncze kombajny *Unicam AC-60*.

2. Duże kombajny analityczne

Ogniwem łączącym grupy małych i dużych kombajnów jest system automatyczny produkowany przez firmę *B. Braun Melsungen* — NRF, wypuszczony na rynek pod nazwą *Braun-Systematik*.

System *Braun-SysteMatik* składa się z autonomicznych jednostek funkcjonalnych, które wykonują poszczególne czynności laboratoryjne, takie jak odmierzenie i ewentualnie rozcieńczanie próbki, pipetowanie odczynników (*Dilumatik*, *Dilustatik*), inkubowanie w określonej temperaturze, mieszanie, przenoszenie do kuwety fotometru, fotometrowanie, przeliczanie wyników i ich drukowanie. Poszczególne jednostki funkcjonalne mogą być łączone ze sobą w określonych kombinacjach, zależnych od aktualnego programu pracy, np. do półautomatycznego względnie automatycznego rozcieńczania i pipetowania lub do automatycznego względnie półautomatycznego fotometrowania. Mogą też tworzyć kompletny, całkowicie zautomatyzowany system analityczny. Najmniejsza ilość surowicy potrzebna do wykonania jednego badania wynosi 10 μ l. Odczynniki dodawane są w ilościach od 0,25 do 10 ml. Wydajność aparatu jest różna dla poszczególnych metod. Wynosi ona dla glukozy, białka całkowitego, cholesterolu, hemoglobiny, mocznika — 120 badań na godzinę, dla bilirubiny — 60 badań na godzinę, dla zasadowej i kwaśnej fosfatazy — 36 badań na godzinę, a dla AspAT, AlAT i LDH — 30 badań na godzinę. Specjalna przystawka umożliwia oznaczanie aktywności enzymów metodami kinetycznymi. Wchodzący w skład kombajnu spektralny fotometr daje możliwość wykonywania pomiarów w zakresie od 340 do 620 nm. Powietrzny termostat zabezpiecza inkubację próbek w odpowiedniej temperaturze w zakresie od 27 do 95°.

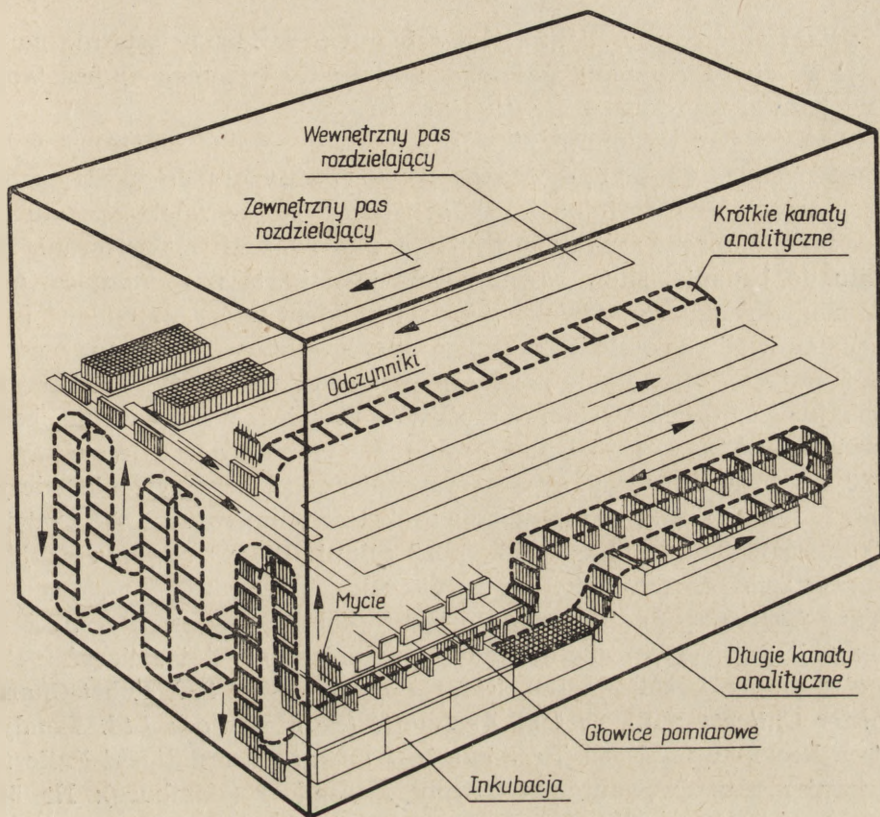
W systemie *Braun-SysteMatik* w interesujący sposób rozwiązano odbiałczanie i wirowanie próbek. Do znajdujących się w bębnie zbiorczym próbek dodaje się automatycznie określoną ilość odczynnika odbiałczającego, a po zmieszaniu bęben w całości przenosi się do specjalnej wirówki, w której spełnia on rolę głowicy wirującej. Po odwirowaniu bęben wstawia się z powrotem na swoje miejsce, skąd supernatant jest pobierany automatycznie do dalszego badania. W systemie *Braun-SysteMatik* zabezpieczono również identyfikację badanych próbek.

Omawiany system cechuje się dużą plastycznością funkcjonalną i wiele metod manualnych daje się do niego stosunkowo łatwo przystosować, np. metoda Jendrasika i Grofa (25) do oznaczania bilirubiny w surowicy, metoda o-toluidynowa do oznaczania glukozy w krwi, metoda ureazowa do oznaczania mocznika itp.

System *Braun-SysteMatik* można bezpośrednio (*on line*) połączyć z komputerem.

System analityczny *Auto-Chemist* produkowany przez firmę AGA — Sztokholm jest głównym reprezentantem grupy dużych kombajnów. Jest to wielokanałowy system indywidualnej analizy ciągłej (1, 20, 26). Surowica w ilości od 3—6 ml zostaje rozdzielona do 6-miejscowych statywów, które mogą być łączone w większe zespoły. Statywy te przy pomocy tzw. zewnętrznego pasa prowadzącego rozdzielane są między 18 długich kanałów analitycznych zgrupowanych na trzech pasach, po 6 na każdym.

Wewnętrzny pas prowadzący rozdziela surowicę między sześć krótkich kanałów analitycznych. Czas wykonania oznaczenia wynosi od 30 do 50 minut. W podstawowej wersji kombajnu *Auto-Chemist* tylko pierwsza próbka poszczególnej serii jest automatycznie identyfikowana. Do identyfikacji każdej badanej próbki potrzebne jest już dodatkowe urządzenie elektroniczne (rysunek 3).



Rys. 3. Schemat działania części analitycznej kombajnu *Auto-Chemist*

Program systemu *Auto-Chemist* obejmuje 24 metody, a wydajność aparatu wynosi 135 próbek/godzinę na każdy kanał, tj. około 26 tys. oznaczeń w ciągu 8-godzinnego dnia pracy, co zastępuje pracę 100 wykwalifikowanych analityków medycznych. Wyniki badań opracowywane są przez komputer PDP-8, połączony bezpośrednio z kombajnem analitycznym. Przekazywanie wyników na oddziały odbywa się przy pomocy dalekopisu (20). Tzw. satelitarne kolorymetry umożliwiają również elektroniczne opracowywanie wyników badań wykonanych metodami manualnymi.

Kombajn *Auto-Chemist* przeznaczony jest w zasadzie do masowych badań profilaktycznych i diagnostycznych, wykonywanych przez duże centralne pracownie, obsługujące szpitale i polikliniki np. dużego miasta.

Mimo wysokiej precyzji i dokładności oznaczeń aparat ten nie znalazł szerszego zastosowania w praktyce laboratoryjnej, prawdopodobnie ze względu na: zbyt wielką wydajność, wysoki koszt aparatu (cena około 360 000 dolarów), wysoki koszt eksploatacji, duże wymiary, sztywność programowania (aparat zawsze wykonuje 24 badania z każdej próbki surowicy), oraz konieczność wstępnego opracowywania materiału (odbiałczanie).

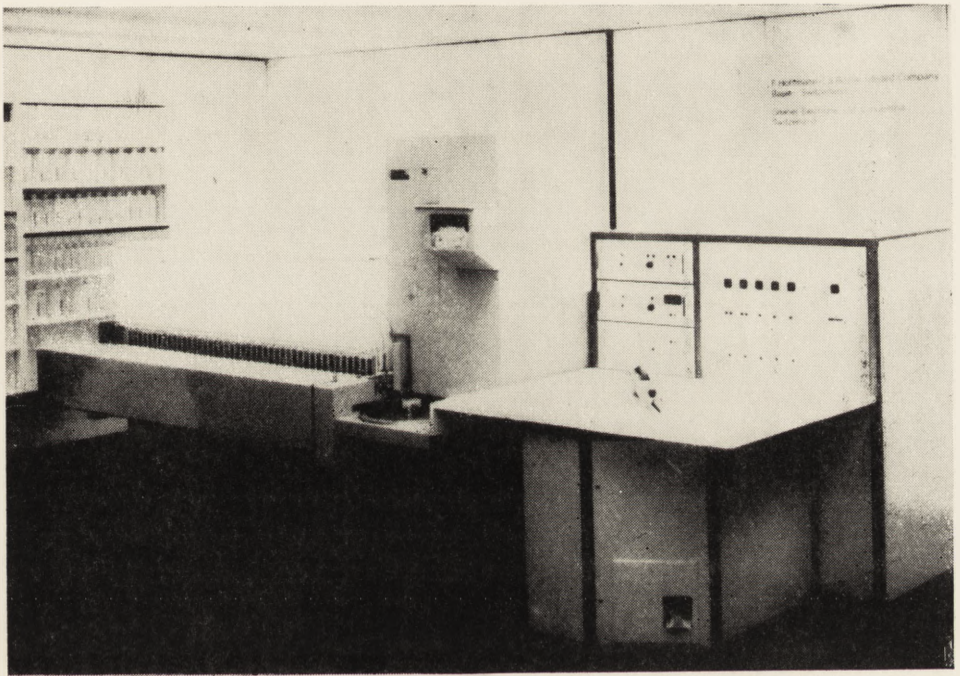
System analityczny *Richterich-Greiner* wprowadzony ostatnio na rynek przez firmę *Hofmann-LaRoche Greiner Co* (rysunek 4) jest wolny od większości wad systemu *Auto-Chemist*.

Kombajn ten wykonuje 30 różnych analiz, dając obliczony wynik w odstępach co 12 sekund. Można go w odniesieniu do każdej próbki zaprogramować na dowolną liczbę oznaczeń. Istotną zaletą aparatu jest maksymalnie uproszczona dokumentacja, ponieważ karta skierowania materiału do badania, służy równocześnie jako karta programująca, a po wykonaniu badania z wydrukowanym wynikiem wraca na oddział (o ile nie przeprowadza się elektronicznego opracowania wyników przy pomocy komputera). W aparacie działa optyczny system identyfikacji próbek. Kombajn *Richterich-Greiner* umożliwia również wykonywanie badań w trybie „*cito*” (wynik już po 10 min.). Na jedno oznaczenie zużywa się od 20 do 200 μ l surowicy. Aparat zabezpiecza przechowywanie odczynników w temperaturze 4° i inkubację próbek w temperaturze 37°. Codzienna kalibracja 30 metod trwa około 15 minut. W opracowaniu znajduje się przystawka do fotometrii płomieniowej.

Inne kombajny analityczne. Do grupy kombajnów analitycznych reprezentujących system analizy indywidualnej należy też zaliczyć system *Mecolab* (*Joyce Loebel*, Anglia), *Vickers Multichannel 300*, *Robot-Chemist* (*Warner Chilcott N.J.*), system *Analmatic* (*Baird Tatlock Ltd.*, Londyn), system *Beckman DSA 560* (*Beckman Instruments International Fullerton*, California) oraz dwa automaty firmy *Eppendorf* (Hamburg): Nr 5030 przeznaczony do analiz fotometrycznych i Nr 5010 — do oznaczania aktywności enzymów przy pomocy optycznego testu Warburga. Wydajność automatów *Eppendorf* wynosi 150 analiz na godzinę. Zgodnie ze specjalizacją tej firmy automaty przystosowane są do badań w skali mikro- i ultra-mikro.

IV. Mała automatyzacja badań laboratoryjnych

Na pograniczu między dużą a małą automatyzacją badań laboratoryjnych znajdują się uproszczone i stosunkowo tanie systemy analityczne, pracujące w oparciu o gotowe zestawy testowe. Systemy te mają ustalony z góry program badań. Przykładami tego rodzaju systemów analitycznych są:



Rys. 4. Kombajn analityczny *Richterich-Greiner* (widok ogólny)

- a) system *Setometer 360* (*Serosonic Laboratories Inc. Bohemia N.Y.*), umożliwiający szybkie wykonanie 36 najważniejszych analiz chemiczno-klinicznych. Wyniki podawane są w postaci cyfrowej. Cena aparatu wynosi 1200 dolarów.
- b) system *Accu-Stat* (do oznaczeń chemiczno-klinicznych), produkowany przez firmę *Clay Adams Parsippany N.J.*). System ten pracuje w skali mikro i umożliwia wykonanie 25 różnych oznaczeń chemiczno-klinicznych. Wynika odczytuje się bezpośrednio na skali aparatu. Dla każdej metody wykonano odpowiednią wkładkę kalibracyjną, która umożliwia szybką jej rekaliczację.

Właściwa mała automatyzacja badań laboratoryjnych (ang. *limited function automation — LFA*) polega na zmechanizowaniu poszczególnych czynności laboratoryjnych, takich jak: pipetowanie, rozcieńczanie itp. Służą temu proste dozymetry strzykawkowe (f-my *Struers*, Kopenhaga), lub dozymetry bardziej skomplikowane, np. *Selectomak* (firma *Polimak*, Roma) lub *Auto-Spenser* (*Warne V. Chilcott Ltd, N.J.*), kuwety przepływowe, drukarki wyników itp. Urządzenia te często łączy się w bardziej skomplikowane układy. Na przykład tak jak w systemie *Braun-Systematik*, lub aparacie *Chematic I, II i III* (*Fa. Prema Stara Tura*), który składa się z automatycznej pipety, wymiennika próbek oraz tzw. zwielokrotniacza czynności.

Innym przykładem ograniczonej automatyzacji badań laboratoryjnych jest np. absorpcjometr firmy *LKB*, Sztokholm, umożliwiający dokonanie 1500 pomiarów kolorymetrycznych w ciągu 1 godziny. W rutynowym użytkowaniu można go zaprogramować na 10 podstawowych analiz, przy czym nastawienie próby zerowej oraz wzorca odbywa się automatycznie. Wyniki drukowane są na załączonej do aparatu drukarce.

Ta sama firma skonstruowała również aparat (*LKB 8600 Reaction Rate Analyser*) do mierzenia aktywności enzymatycznych metodami kinetycznymi, o wydajności 50 badań na godzinę. Aparat ten znajduje coraz szersze zastosowanie w rutynowych pracowniach enzymologii klinicznej (2, 10).

Tzw. mała względnie ograniczona automatyzacja badań laboratoryjnych jest szczególnie korzystna dla niewielkich laboratoriów chemiczno-klinicznych i w krajach nie posiadających odpowiedniego zaplecza technicznego.

V. Nowe rozwiązania techniczne mogące znaleźć zastosowanie w laboratoriach chemii klinicznej

Postęp techniczny w diagnostyce laboratoryjnej charakteryzuje się tendencjami do konstruowania systemów analitycznych o dużej wydajności, dokładności i powtarzalności, a zarazem w znacznym stopniu zmi-

niaturyzowanych i niezbyt kosztownych. Należy zatem przypuszczać, że większość znajdujących się aktualnie na rynku automatycznych systemów analitycznych nie wytrzyma próby czasu. W związku z tym obecny okres należy traktować raczej jako przejściowy w rozwoju automatyzacji badań laboratoryjnych. Już dzisiaj zarysowują się możliwości zupełnie nowych rozwiązań technicznych, które mogą dokonać przewrotu w konstrukcji urządzeń automatycznych przeznaczonych dla laboratoriów diagnostycznych.

Należy tu wymienić:

a) System analizy wirówkowej Andersona (5). Anderson skonstruował niewielkich rozmiarów kombajn analityczny do badań w skali ultramikro, w którym do mieszania odczynników wykorzystana jest siła odśrodkowa. Wydajność takiego aparatu, który został oznaczony symbolem GeMSAEC wynosi około 3000 badań na godzinę. Wyniki rejestrowane są na oscyloskopie,

b) Przewrót w kolorymetrii może wywołać zastosowanie optyki włókna szklanego w fotometrach względnie fotokolorymetrach (28). Odpowiednio cienkie włókna szklane o wysokim współczynniku załamania światła otoczone płaszczem optycznie obojętnym służą do przewodzenia światła od źródła poprzez zabarwiony roztwór do fotokomórki. Włókna szklane razem z końcówką pomiarową, składającą się z pałeczki szklanej i lusterka albo z dwóch pałeczek szklanych tworzą tzw. „fotosondę”, która może całkowicie wyeliminować kuwety optyczne. W czasie pomiaru fotosonda jest zanurzona w próbówce zawierającej badany roztwór barwny. Pomiaru gęstości optycznej przy pomocy fotosondy są znacznie szybsze i bardziej dokładne niż wykonane metodami konwencjonalnymi. Fotosonda może być w zasadzie połączona z każdym fotometrem względnie fotokolorymetrem. Straty energii świetlnej przy pomiarach fotosondą są minimalne. Należy przewidywać, że już w ciągu najbliższych dwóch lat pojawią się na rynku fotokolorymetry zaopatrzone w fotosondę. Wydaje się też, że fotosonda znajdzie szerokie zastosowanie w zminiaturyzowanych automatycznych systemach analitycznych,

c) Coraz szersze zastosowanie w medycynie, jak również w diagnostyce laboratoryjnej znajdują metody biotelemetryczne (14), głównie w postaci urządzeń monitorowych (59) pozwalających w sposób ciągły *in vivo* mierzyć poszczególne parametry fizyko-chemiczne krwi, takie jak *pH*, *pCO₂*, *pO₂* (36), stężenie jonów K, Na i Ca (58), poziom glukozy w krwi (43) itp. Stężenie glukozy w krwi określa się przy pomocy tzw. elektrody enzymatycznej, którą można bezpośrednio wprowadzić do krwioobiegu (63). Zasada działania elektrody enzymatycznej została omówiona gdzie indziej (14).

Elektroda enzymatyczna znalazła już bezpośrednie zastosowanie przy badaniach nad mechanizmami regulacji poziomu glukozy w ustroju chorym i zdrowym po obciążeniu glukozą (29).

Układy biotelemetryczne mogą być też bezpośrednio połączone z komputerami, co pozwala na wnikliwą i ciągłą kontrolę stanu pacjenta np. w czasie ciężkich i niebezpiecznych zabiegów operacyjnych.

VI. Elektroniczne przetwarzanie wyników badań laboratoryjnych

Zwiększenie wydajności pracy w rutynowym laboratorium chemiczno-klinicznym można też osiągnąć przez zautomatyzowanie etapów wstępnego opracowywania materiału, oraz ostatecznego opracowania i przekazywania wyników badań. Odciąża to znacznie fachowy personel laboratoryjny. W warunkach klasycznego laboratorium diagnostycznego około 40% czasu pracy technika laboratoryjnego zostaje zużyte na prace administracyjne, związane bezpośrednio lub pośrednio z opracowywaniem materiału przesłanego do badania i wyników analiz.

Przy wzroście zapotrzebowania na badania laboratoryjne i przy wzroście liczby wykonywanych przez laboratorium badań, praca administracyjna staje się coraz trudniejsza, w związku z czym wzrastają możliwości popełniania tzw. błędów administracyjno-organizacyjnych (np. błędne przepisanie wyniku, błędne wyliczenie, zniekształcenie nazwiska pacjenta itp.). Wykazano, że 88% błędów laboratoryjnych należy właśnie do tej grupy (64). Dlatego też w wielu dużych rutynowych laboratoriach chemii klinicznej wprowadzono elektroniczne przetwarzanie wyników badań laboratoryjnych przy zastosowaniu komputerów (11, 17, 47, 48). Przyniosło to następujące korzyści:

- a) uproszczenie systemu skierowań na badania laboratoryjne i bezbłędną identyfikację poszczególnych próbek,
- b) wyeliminowanie błędów administracyjno-organizacyjnych,
- c) przyspieszenie przekazywania informacji na oddziały,
- d) usprawnienie segregacji wyników badań laboratoryjnych i wstępne ich zróżnicowanie na wyniki fizjologiczne i patologiczne,
- e) zgromadzenie wyników poszczególnego pacjenta na jednej zbiorczej karcie,
- f) zmniejszenie do minimum administracyjnego obciążenia fachowego personelu laboratoryjnego,
- g) możliwość przechowywania wyników w sposób pozwalający na wszechstronne ich wykorzystanie.

Laboratorium, w którym przeprowadza się EDP musi posiadać dodatkowe urządzenia, takie jak: aparat do perforowania taśmy papierowej, dziurkarkę do kart, aparat do sortowania kart, stacje magnetofonowe, dalekopisy oraz odpowiedni komputer, lub stały dostęp do komputera w centralnym ośrodku obliczeniowym.

Przy EDP dotychczas znalazły zastosowanie następujące komputery: *Bull-Gamma 30*, *IBM 402*, *IBM 490*, *IBM 1130*, *Elliott 900*, *Spear Class 300* (50) i inne.

Układ analityczny (automatyczny względnie manualny) może być połączony z komputerem pośrednio przy pomocy kart perforowanych lub dziurkowanej taśmy papierowej (ang. *off line*) względnie bezpośrednio (ang. *on line*) (tylko automatyczne układy analityczne).

Obecnie większość wyników laboratoryjnych przetwarzana jest w układzie *off line*. Układ *on line* znacznie kosztowniejszy od poprzedniego uważany jest jednak za lepszy i przyszłościowy.

W poszczególnych placówkach EDP realizowany jest w różny sposób, przy czym zdecydowanie dominuje system kart perforowanych (ang. *punched card system*).

1. Kodowanie wyników laboratoryjnych

Przy zastosowaniu systemu kart perforowanych proces przetwarzania wyników laboratoryjnych przebiega w ogólnych zarysach następująco*: dla każdego nowego pacjenta laboratorium zakłada tzw. kartę macierzystą, która zawiera dane niezbędne do bezbłędnego zidentyfikowania pacjenta — nr księgi szpitalnej (sześć cyfr), data urodzenia (sześć cyfr — np. 050421 — 5.4.1921) imię i nazwisko chorego (zakodowane w postaci cyfr wg międzynarodowego kodu), płeć (jedna cyfra), nr oddziału (sześć cyfr), datę wpisu i wypisu ze szpitala (zakodowane w ten sam sposób jak data urodzenia).

„Karta macierzysta” jest typową kartą perforowaną o standardowych wymiarach wprowadzoną swojego czasu przez amerykańską firmę IBM (*International Business Machines Corp.*), produkującą komputery. Karta taka zawiera 80 kolumn po 12 pozycji każda (rysunek 5). Na perforowanej karcie IBM można więc zakodować 80 znaków.

Na „karcie macierzystej” używanej w *Inselspital* w Bernie, kolumny 62—80 nie są wydrukowane. Kodowanie cyfr jest w zasadzie proste. Litery natomiast kodowane są wg międzynarodowego kodu, przy czym każdej literze odpowiada jeden a najczęściej dwa znaki w jednej kolumnie; np.: A-7, B-07, C-17, D-27, E-37, F-47, G-57, H-67, IJ-8, K-08, IŁ-18, M-28, N-38, P-48, Q-58, R-68, S-9, T-09, U-19, V-29, W-39, Z, Ž, Ž-49, O-0.

Wynik badania laboratoryjnego zostaje zakodowany na tzw. karcie wynikowej oddzielnej dla każdego badania. Jest to również perforowana karta IBM. Pierwsze 6 rubryk są identyczne jak na „karcie macierzystej”. Obejmują one 55 kolumn. Na pozostałych kolumnach karty wynikowej zostają zakodowane: data badania (sześć cyfr), rodzaj badania (wg odrębnego kodu — patrz niżej — sześć cyfr) oraz właściwy wynik badania (sześć cyfr). W rezerwie pozostaje siedem kolumn, które mogą być wy-

* Opisana procedura jest rutynowo stosowana w Centralnym Laboratorium *Inselspital Bern* — Szwajcaria, kierownik prof. dr med. R. Richterich.

korzystane na dodatkowe informacje dotyczące chorego względnie wyniku badania (np. na informacje diagnostyczne).

Interesujący sposób kodowania badań (tzw. cyfrowo-literowy) opracowali Richterich i Ehrengreber (55, 56). Jak już wspomniano w omawianym systemie EDP na zakodowanie każdego badania przeznaczono sześć kolumn.

Kolumna pierwsza określa rodzaj pracowni, w jakiej zostało wykonane dane badanie, np. C — pracownia chemii klinicznej, U — pracownia analityczna (moczownia), E — pracownia „citowa” (ang. *hot laboratory*) itp. Teoretycznie można zakodować w tej kolumnie 26 różnych typów pracowni.

Kolumna druga i trzecia określają składnik, jaki należy oznaczyć. Każdy składnik określany jest dwoma literami, np.: AM — amylaza, AP — zasadowa fosfataza, BF — bilirubina, CA — wapń itp. W kolumnach drugiej i trzeciej można zakodować 676 różnych badań, co praktycznie daje nieograniczone możliwości rozszerzania ich zakresu. Obecnie dobrze i nowoczesnie prowadzone laboratorium wykonuje rutynowo najwięcej 100—120 różnych badań.

Kolumna czwarta informuje o zastosowanej metodzie, przy czym metoda klasyczna (wystandaryzowana) oznaczana jest zawsze cyfrą 0, a kolejne jej modyfikacje cyframi 1, 2... Np. oznaczanie aktywności AspAT metodą kolorymetryczną koduje się jako 0, a metodą spektrofotometryczną jako 1.

Kolumna piąta określa rodzaj materiału, na którym wykonano badanie, np. B — krew, C — płyn mózgowo-rdzeniowy, D — zawartość dwunastnicza itp.

Kolumna szоста zawiera dodatkowe informacje dotyczące materiału, np. symbol A oznacza krew tętniczą, C — krew kapilarną, V — krew żylną, D — oznacza, że wynik ma być podany w jednostkach wagowych na 24 godziny, F — że materiał został pobrany od chorego znajdującego się na czczo itd.

Karty wynikowe są zarazem kartami łącznikowymi. Procedura ich zakładania jest następująca: materiał (surowica, mocz itp.), przychodzi do laboratorium z odpowiednią kartą skierowania, na której lekarz określa potrzebne mu badania. Takich kart skierowania może być kilka rodzajów, zależnie od wewnętrznej struktury laboratorium i obowiązującego systemu pracy (karta badań biochemicznych, hematologicznych, enzymatycznych, karta badań na cito itp.).

Dane personalne pacjenta zostają przy pomocy maszyny perforującej naniesione na „kartę macierzystą” a z niej przeniesione na karty wynikowe (łącznikowe), których zakłada się tyle, ile poszczególnych badań zażądano dla danego pacjenta. Następnie materiał i towarzyszące mu karty wynikowe zostają rozdzielone na poszczególne stanowiska robocze (zautomatyzowane względnie manualne). Na odwrocie karty wynikowej

wypisywane są zwykle robocze obliczenia technika, wykonującego dane badania (o ile pracuje on przy pomocy metod manualnych). Po wykonaniu badania wynik cyfrowy zostaje wydrukowany automatycznie względnie wypisany przez technika na zadrukowanej stronie karty wynikowej, a następnie zadziurkowany w odpowiednich kolumnach. Tak przygotowane karty wynikowe przekazuje się do własnego komputera względnie do centrum obliczeniowego.

2. Programowanie komputera i realizacja programów

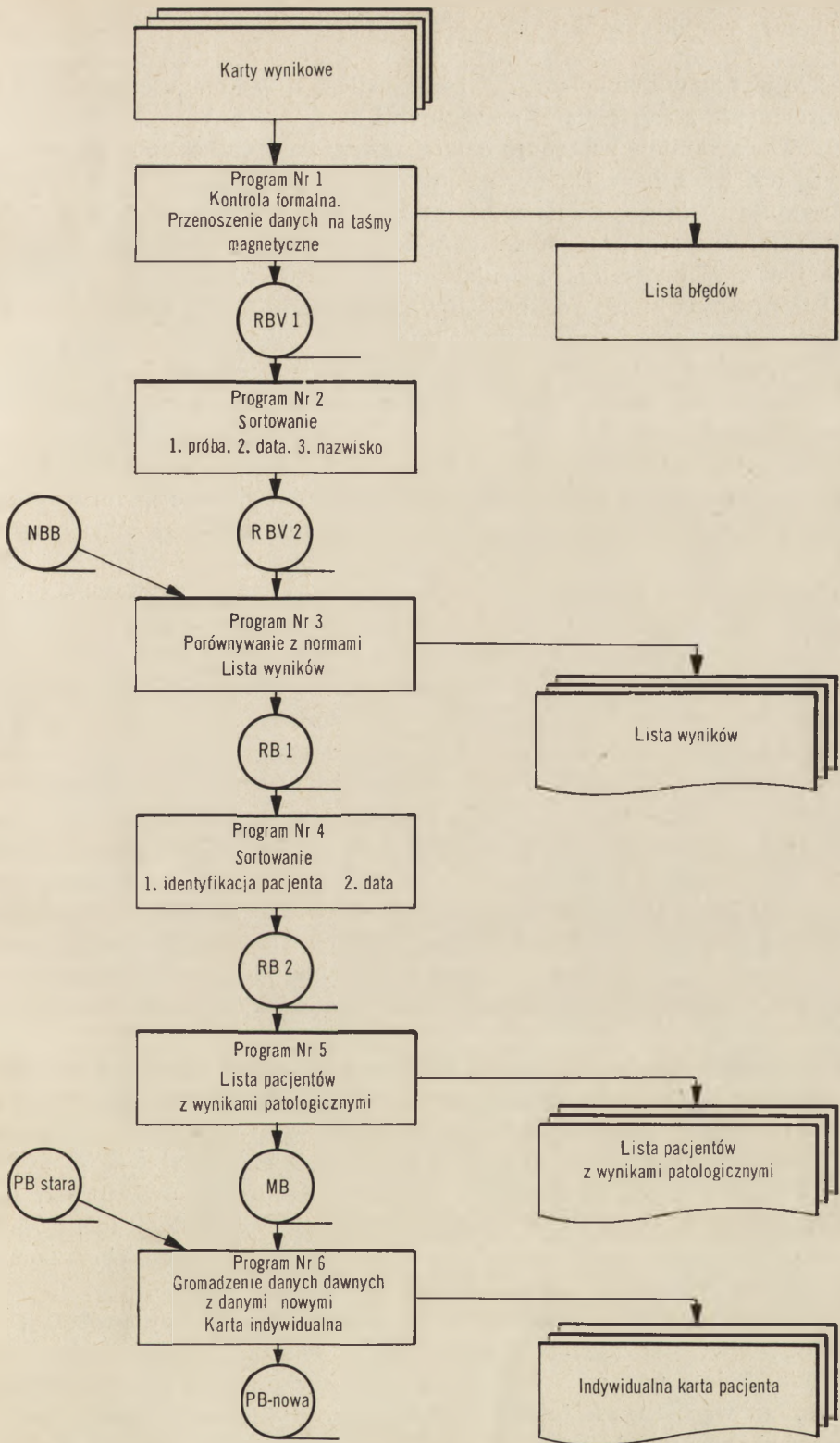
Jednym z najważniejszych etapów EDP jest właściwe zaprogramowanie komputera. W używanym do EDP w *Inselspital* w Bernie komputerze *Bull-Gamma 30* programy opracowane są tzw. językiem *COBOL* (ang. *common business oriented language*) (61). Kompilator *COBOL*, który powstał w roku 1961 jest programem tłumaczącym kod algebraiczny na język maszynowy. Jest on szczególnie użyteczny przy przetwarzaniu danych administracyjnych, do których można też zaliczyć i dane laboratoryjne. Zasadę pracy komputera przedstawiono na schemacie 1.

Praca komputera rozdzielona jest na sześć programów częściowych (54). W ramach programu 1 zostaje przeprowadzona formalna kontrola danych, znajdujących się na kartach wynikowych. Wynikiem tego jest wychwytywanie błędnych danych personalnych i innych danych fałszywie zakodowanych. Wszystkie próbki z błędami formalnymi komputer drukuje na tzw. liście błędów (lista nr 1), która w pierwszej kolejności trafia do rąk kierownika laboratorium. Dane z prawidłowo zakodowanych kart przechodzą na tzw. taśmę wyników wstępnych I (RBV_1) i w programie 2 zostają rozsortowane według rodzaju badań, dat i nazwisk pacjentów, a następnie przeniesione na taśmę wyników wstępnych II (RBV_2).

W programie 3 następuje porównanie aktualnych wyników ze zmagazynowanymi na taśmie *NBB* danymi dotyczącymi norm dla poszczególnych płci i odpowiednich grup wieku oraz wydrukowanie zbiorczej listy wyników laboratoryjnych, wykonanych danego dnia (lista nr 2). Na liście tej gwiazdkami oznaczone są wyniki, które nieznacznie (*) (ponad 2σ) względnie wyraźnie (**) (ponad 3σ) odbiegają od odpowiedniej wartości normalnej. Wszystkie wyniki zostają uporządkowane według rodzaju badań. Włączone do opracowania wyniki badań *na cito* zostają oznaczone na

Schemat 1. Schemat pracy komputera *Bull Gamma 30* przy przetwarzaniu wyników laboratoryjnych (uproszczony)

RBV — taśma z wynikami wstępnymi, *NBB* — taśma z normami, *RB* — taśma z wynikami ostatecznymi, *MB* — zbiorcza taśma wyników laboratoryjnych, *PB* — zbiorcza taśma wyników poszczególnego pacjenta



liście wyników symbolem „E” i nie podlegają w komputerze procedurze porównania z wartościami normalnymi.

W programie 4 następuje dalsza segregacja wyników pod kątem identyfikacji ich z nazwiskiem pacjenta i przy uwzględnieniu daty badania. Znajdujące się na taśmie wynikowej II (RB₂) wyniki zostają następnie w ramach programu 5 zgrupowane pod nazwiskiem poszczególnego pacjenta. W programie 5 drukowana jest lista wyników patologicznych (lista nr 3), na której podane są wyniki poszczególnych pacjentów, u których przynajmniej jeden wynik wyraźnie odbiega od normy (**). Lista taka umożliwi lekarzowi szybką segregację przypadków na oddziale. Lista wyników patologicznych trafia na oddział szpitala jeszcze tego samego dnia.

W programie 6 następuje zestawienie aktualnych wyników laboratoryjnych zmagazynowanych już na taśmie MB z dawniejszymi wynikami danego pacjenta, zmagazynowanymi na taśmie PT (dawna). Wynikiem tej konfrontacji jest wydrukowanie przez komputer indywidualnej karty wyników laboratoryjnych (lista nr 4), która służy jako wkładka do historii choroby i na której zamieszczone są wyniki wszystkich badań laboratoryjnych dla danego pacjenta od początku jego pobytu w szpitalu. Wyniki odbiegające od normy oznaczone są gwiazdkami (* lub**). Po otrzymaniu nowej karty indywidualnej, która trafia na oddział na drugi dzień po wykonaniu badań stara karta zostaje wyjęta z akt chorego i zniszczona. Ostateczne wyniki zostają zmagazynowane na taśmie PT (nowa).

Jeden raz w miesiącu realizowany jest program dodatkowy, mający na celu zebranie wyników wszystkich pacjentów, którzy w czasie tego miesiąca opuścili szpital (wypis, zgon). W ramach tego programu wydrukowana jest miesięczna lista zbiorcza wyników pacjentów, którzy opuścili szpital (lista nr 5). Lista taka przeznaczona jest na potrzeby laboratorium i administracji szpitala (obliczanie kosztów, zestawienia statystyczne).

Przedstawiony wyżej system EDP opracowany przez Richtera i Ehrengrubera (56) jest stosunkowo prosty i umożliwia przetwarzanie wyników zarówno metod zautomatyzowanych jak też manualnych. Opisana procedura jest typową procedurą *off line*.

W Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego w Uppsali przy EDP specjalną uwagę zwrócono na problem bezbłędnej identyfikacji badanych próbek oraz na kontrolę metod analitycznych przy pomocy komputera.

Laboratorium to stosuje optyczny system identyfikacji próbek. Dane umożliwiające identyfikację pacjenta (nr książki szpitalnej, data urodzenia, imię i nazwisko itd.) zostają nadziurkowane wg odpowiedniego kodu na wąski pasek papieru, który jako etykiетка dołączony jest do próbki z materiałem pobranym od tegoż pacjenta. Probówka z etykietaką

zostaje prześwietlona silnym strumieniem światła, a układ dziurek odczytany na specjalnym czytniku zaopatrzonym w fotokomórkę i przekazany do komputera.

Kontrola metod laboratoryjnych przeprowadzana jest przez komputer, np. *IBM 1440* czy też *IBM 1130*, który oblicza m.in. tzw. efekt kontaminacyjny (w procentach) powstający w systemach analizy ciągłej przepływowej, oblicza odchylenie standardowe powtarzalności wyników (z pięciu oznaczeń tego samego roztworu wzorcowego) oraz średnią wszystkich oznaczeń przeprowadzonych przy pomocy kontrolowanej metody w danym dniu wraz z odchyleniem standardowym. Wartość średniej i odchylenia standardowego powinny być każdego dnia jednakowe, względnie bardzo do siebie zbliżone. Dane dotyczące kontroli każdej metody analitycznej drukowane są przez komputer na osobnych kartach.

H j e l m (21) analizując omówiony wyżej system kontroli metod analitycznych wprowadził pojęcie tzw. segmentu analitycznego, który obejmuje: wzorce potrzebne do określenia efektu kontaminacyjnego, wzorce podstawowe (około siedem wzorców), badane próbki (około 300 próbek) i próbki surowicy kontrolnej. Autor ten uważa, że codzienną kontrolę jakości wyników powinno przeprowadzać się w obrębie pojedynczego segmentu analitycznego, niezależnie od ogólnej ilości badań wykonanych w ciągu dnia pracy, przy pomocy danej metody analitycznej.

Ze względu na wysoką wydajność komputerów przeprowadzono też próby scentralizowanego przetwarzania wyników z kilku laboratoriów szpitalnych i poliklinik, co pozwala na pełniejsze wykorzystanie komputera i obniża koszt przetwarzania wyników. Przy scentralizowanym systemie przetwarzania wyłania się sprawa transportu kart perforowanych do centrum obliczeniowego oraz łączności między centrum obliczeniowym a poszczególnymi laboratoriami. Obecnie łączność taką zabezpieczają najczęściej różnego typu dalekopisy.

W niektórych szpitalach główny nacisk kładzie się na szybkie otrzymanie indywidualnej karty wyników, zawierającej wyniki wszystkich badań przeprowadzonych u każdego pacjenta podczas jego pobytu w szpitalu (3, 4). W tych przypadkach zakres badań jest z góry ustalony, zwłaszcza jeśli chodzi o pierwsze badanie laboratoryjne nowego pacjenta. Zakres ten został nazwany „wstępnym profilem laboratoryjnym” (ang. *admission profile*) (3, 4). Wprowadzenie zasady „wstępnego profilu laboratoryjnego” pozwala na lepszą organizację pracy zarówno na etapie analitycznym, jak i przetwarzania wyników. Umożliwia też lekarzowi klinicyście bardziej racjonalny dobór badań specjalnych.

Jednym z ostatnich osiągnięć technicznych na odcinku przetwarzania danych laboratoryjnych jest wprowadzenie na rynek przez firmę *Berteley Scientific Laboratories*, California systemu pod nazwą *Clindata II*, będącego komputerem załączonym w układzie *on line* do kombajnów analitycznych, np. *Auto-Analizator SMA 12/60*. System *Clindata II* można za-

programować na 200 różnych badań. Daje on różnego rodzaju informacje kierownictwu laboratorium (kontrola wyników, wykaz błędów formalnych), lekarzowi klinicyście (wyniki patologiczne, indywidualne karty pacjentów) oraz administracji szpitala (dziennie, miesięczne, roczne zestawienia wykonanych badań na poszczególnych oddziałach, w całym szpitalu, u pojedynczego chorego wraz z obliczeniem kosztów).

Jako system *on line*, tj. pracujący bez pośrednictwa kart perforowanych czy też taśmy perforowanej, system *Clindata II* jest znacznie bardziej wydajny, a zarazem mniej obciąża personel laboratorium niż systemy *off line*.

Wspomnieć też należy o innych jeszcze możliwościach zastosowania komputerów przy przetwarzaniu wyników laboratoryjnych. I tak np. komputer *Spear Class 300* (50) analizuje też niektóre wyniki z diagnostycznego punktu widzenia. Analizując np. zymogram LDH względnie proteinogram podaje lekarzowi odpowiednie sugestie rozpoznawcze, przez wymienienie we właściwej kolejności jednostek chorobowych, w których mniej lub bardziej często spotyka się określone odchylenie od normy.

VII. Wnioski

Automatyzacja badań i komputerowe przetwarzanie wyników znajdują coraz szersze zastosowanie w rutynowych laboratoriach klinicznych i przynoszą duże korzyści organizacyjne i ekonomiczne. EDP ułatwia też lekarzowi klinicyście właściwe wykorzystanie wyników laboratoryjnych, co skraca czas potrzebny na postawienie rozpoznania i możliwe wcześniejsze rozpoznanie właściwego leczenia. Pociąga to za sobą skrócenie okresu hospitalizacji pacjenta i pełniejsze wykorzystanie łóżka szpitalnego. Skraca się też okres niezdolności pacjenta do pracy.

Najefektywniejsze wyniki przynosi EDP wtedy, kiedy stanowi integralną część komputerowego systemu obejmującego działalność całego szpitala.

Ze względu na wysoką wydajność komputerów istnieją nieograniczone niemal możliwości rozszerzania zakresu EDP. W chwili obecnej czynnikiem ograniczającym rozwój EDP są systemy analityczne, których wydajność ogranicza możliwości produkcyjne rutynowych laboratoriów chemiczno-klinicznych. Dlatego też w niedalekiej przyszłości należy oczekiwać wprowadzenia do laboratoriów klinicznych superszybkich, automatycznych systemów analitycznych (system wirówkowy Andersona?) o wydajności kilku tysięcy oznaczeń na godzinę.

Pociągnie to za sobą dalszy rozwój EDP, które prawdopodobnie w coraz większym stopniu będzie obejmować interpretację wyników laboratoryjnych i sam proces diagnozowania.

LITERATURA

1. Ahuja J., Bassis M., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 373 (1969).
2. Algen L., *Med. Hig. Spec. Iss.* **4**, 2 (1969).
3. Algen L., Hellstrom L., Proc. Vth Int. Symp. Aut. u. Anal. Chem., Londyn 1965.
4. Algen L., Nauckhoff F., Hellstrom L., Sandberg K., Särtryck *Lakartioningen* **64**, 1755 (1967).
5. Anderson N., *Med. Hig. Spec. Iss.* **3**, 2 (1969).
6. Babson A., *Clin. Chim. Acta* **11**, 789 (1965).
7. Babson A., *Clin. Chem.* **12**, 482 (1966).
8. Babson A., Phillips G., *Clin. Chim. Acta* **13**, 264 (1966).
9. Babson A., Shapiro P., *Clin. Chim. Acta* **8**, 326 (1963).
10. Bartels H., *Med. Hig. Spec. Iss.* **4**, 2 (1969).
11. Baufeld J., Kohler P., *Deut. Gesundheitswesen* **24**, 1235 (1969).
12. Bessey A., Lowry O., Brock A., *J. Biol. Chem.* **164**, 321 (1946).
13. Chaney A., Marbach E., *Clin. Chem.* **8**, 131 (1962).
14. Chrostowski K., *Diagn. Labor.* **5**, 337 (1969).
15. Connerty H., Briggs A., *Clin. Chem.* **11**, 716 (1965).
16. Fog J., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **10**, 251 (1958).
17. Foss O., Haahrekke O., Rokkenes T., Tilsskrift for den Norske Legeforning, 1967, Nr 4.
18. Griffiths P., *Abstr. Techn. Symp.*, 1969, str. 13.
19. Hankiewicz J., *Post. Biochem.* **14**, 233 (1968).
20. Heedman P., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 372 (1969).
21. Hjelm M., *Z. Anal. Chem.* **243**, 781 (1968).
22. Hjelm M., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **7**, 96 (1969).
23. Huang T., Wefler C., Chen C. Ruffery A., *Anal. Chem.* **33**, 1405 (1961).
24. Janecki J., Krawczyński J., Dukwicz A., *Diagn. Labor.* **5**, 305 (1969).
25. Jendrasik Z., Grof P., *Biochem. Z.* **297**, 81 (1958).
26. Jungner J., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 371 (1969).
27. Krak R., Lawrence J., Pollak V., Pirani C., Muehrcke R., Silva H., *A Primer of Unanalysis*. Harper Row Publ. New York, Evatnston,
28. Keller H., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **7**, 501 (1969).
29. Klingmuller V., Krause Jarres D., VIII Jahreskongr. Gess. klin. Chem u. Labordiagn., Halle, 1969.
30. Krawczyński J., *Post. Hig. Med. Dośw.* **14**, 753 (1965).
31. Krawczyński J., (red.): *Zasady Doboru Badań Laboratoryjnych w Pracy Lekarza*, PZWL, Warszawa 1969, str. 63.
32. Krawczyński J., Osiński T., (red.), *Laboratoryjne Metody Diagnostyczne*, PZWL, Warszawa 1967, str. 563.
33. Krawczyński J., Żelazowska M., *Pol. Tyg. Lek.* **13**, 45 (1958).
34. Kunkel H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **66**, 217 (1947).
35. Lagan M., Mc., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **25**, 234 (1944).
36. Maas J., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 386 (1969).
37. Malloy H., Evelyn K., *J. Biol. Chem.* **119**, 491 (1937).
38. Marsh W., *Advan. Clin. Chem.* **2**, 301 (1959).
39. Marsh W., *Automation in Clinical Chemistry*, Charles Thomas Publish., Springfield 1963.
40. Masek K., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 373 (1969).

41. Mettes S., Hogy C., *Clin. Chem.* **5**, 470 (1959).
42. Mitchell F. L., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 319 (1969).
43. Neff G., Sambucetti C., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 386 (1969).
44. Neill D., Doggart J., *J. Clin. Pathol. suppl.* **3**, 39 (1969).
45. Northam B., *J. Clin. Pathol. suppl.* **3**, 42 (1969).
46. Notes on Clinical side-room Methods. E. S. Livingstone LTD, Edinburgh, Londyn 1966.
47. Peacock A., Bunting S., Brewer D., Cotlove F., Williams G., *Biomed. Sci. Industr.* **1**, 33 (1963).
48. Peacock A., Bunting S., Brewer D., Cotlove F., Williams G., *Clin. Chem.* **11**, 595 (1965).
49. Pearson S., Stren S., Mac Gavack T., *Anal. Chem.* **25**, 813 (1953).
50. Pribor H., Kirkham W., Hoyt R., Modern Hospital, April 1968.
51. Raabo E., Terkildsen T., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **33**, 545 (1960).
52. Reitman S., Frankel S., *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
53. Richterich R., Klinische Chemie, Karger, Basel—New York 1968.
54. Richterich R., Dokumentation zur Einweihung des chemischen Zentrallabors Inselspital Bern, Karger S., Basel 1969.
55. Richterich R., Ehrenguber H., *Clin. Chim. Acta* **22**, 417 (1968).
56. Richterich R., Ehrenguber H., *Naturwissenschaften* **55**, 368 (1968).
57. Rubin M., *Med. Hig. Sp. Iss.* **5**, 4 (1969).
58. Sachs Ch., Bourdeau A., Balsan S., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 388 (1969).
59. Sambucetti G., Neff G., Radke W., Widdowson G., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 387 (1969).
60. Schoenfeld R., Lewellen C., *Clin. Chem.* **10**, 533 (1964).
61. Sherman Ph. M., Programowanie i Kodowanie Maszyn Cyfrowych, PWN, Warszawa 1968.
62. Skeggs L., *Am. J. Pathol.* **28**, 311 (1957).
63. Sternberg J., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 386 (1969).
64. Swiney R. Mc., Woodrown D., *Enzymol. Biol. Clin.* **10**, 392 (1969).
65. Weichselbaum Z., *Wien Z. Inn. Med.* **30**, 248 (1949).
66. Whitehead T. (Ed.), Automation and Data Processing in Pathology, BMA House, Londyn 1969.
67. Whitehead T. P., *J. Clin. Pathol. suppl.* **3** (1969).
68. Wrenn A., Feichtmeir Z., *Tech. Bull. Roy. Med. Tech.* **26**, 175 (1956).



Rys. 1. Podobizna Fryderyka Mieschera (z książki „F. Miescher”, Benno Schwabe a. Co. Verlag, Basel, 1944)



Rys. 2. Widok instytutu Chemicznego F. Wöhlera w Getyndze w latach 1870



Rys. 3. Zamek nad rzeką Neckar w Tybindze, gdzie mieściło się laboratorium biochemiczne F. Hoppe-Seylera i gdzie F. Miescher odkrył nukleinę

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI *

Od nukleiny do DNA

(w setną rocznicę odkrycia kwasów nukleinowych przez Fryderyka Mieschera)

W dotychczasowych badaniach nad kwasami nukleinowymi z punktu widzenia naukowego dwa fakty zasługują na szczególną uwagę: pierwszy, to ich odkrycie, a drugi — to wyjaśnienie struktury DNA, a tym samym umożliwienie odczytania kodu genetycznego. Kwasy nukleinowe odkrył Fryderyk Miescher w 1869 roku, a ich strukturę prawie w 90 lat później, J. Watson i F. Crick. Śledząc historię tych dwóch odkryć, których konsekwencje dla poznania struktury i rozwoju materii żywej były ogromne, należy zaznaczyć, że oba dokonane zostały przez ludzi młodych, będących u progu swej działalności naukowej; Miescher liczył wówczas 22 lata, Watson — 25, a Crick 35 lat.

Johann Fryderyk Miescher-Rusch (pełne nazwisko) urodził się 1 sierpnia 1844 roku w Bazylei. Był synem profesora uniwersytetu Fryderyka Mieschera i Antonii z domu His. Ojciec był z wykształcenia lekarzem ginekologiem i wykładał fizjologię i patologię ogólną w latach 1837—1844 w Bernie, a następnie anatomię patologiczną w latach 1850—1872 w Bazylei. Brat matki Wilhelm His był profesorem anatomii i fizjologii w Bazylei, a później w Lipsku. Ojciec, a zwłaszcza wuj Fryderyk, mieli wybitny wpływ na jego wykształcenie i kierunek później podjętych badań naukowych.

Miescher studiuje medycynę w Bazylei i w Getyndze. Studia te ukończył w 1868 roku. Podczas pobytu w Getyndze w słynnym wówczas laboratorium F. Wöhlera studiuje przez jeden semestr chemię organiczną. Zwyczajem tamtych czasów podróżowania po różnych uniwersytetach, Miescher jeszcze w tym samym roku wyjeżdża do Tybingi, gdzie w znanym na całą Europę laboratorium u F. Hoppe-Seylera rozpoczyna swój staż naukowy. Laboratorium Hoppe-Seylera mieściło się w starożytnym zamku nad brzegiem rzeki Neckar. Grube mury, złe oświetlenie, ciasnota, wszystko to przypominało raczej średniowieczne laboratorium alchemików, a nie słynne pracownie biochemiczne. U Hoppe-Seylera zajmowa-

* Prof. dr, Międzywydziałowa Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Kraków

no się najogólniej mówiąc składem chemicznym organizmów żywych. Składniki chemiczne komórki, tzn. białka, tłuszcze i węglowodany były już w tym czasie na ogół znane a także rozwiązane były liczne problemy morfologiczne odnoszące się do jądra i cytoplazmy.

Miescher rozpoczął pracę od przygotowania jednorodnych pod względem morfologicznym komórek. Po wielu doświadczeniach z ciałek ropnych wypłukiwanych z bandaży chirurgicznych otrzymuje suchą masę, którą następnie poddaje działaniu pepsyny (sok żołądkowy psa). W wyniku tego zabiegu składniki cytoplazmy zostały rozpuszczone, podczas gdy jądra zostały nietknięte i dawały się oddzielić od reszty materiału. Masę jąder traktował następnie alkaliami i rozpuszczony w nich produkt wytrącał kwasem; osad ponownie się rozpuszczał w zasadach. Analiza produktu oprócz C, H, N i O wskazywała na obecność fosforu. Wyosobnioną substancję o własnościach kwaśnych Miescher nazwał „nukleina”. Mogła ona zawierać do 30% czystego DNA, ale o tym można się było przekonać dopiero w 40-tych latach naszego stulecia. Obecność fosforu w substancji pochodzenia biologicznego była dla wszystkich fachowców zaskoczeniem, tym bardziej, iż sądzono wówczas, że wszystko co znajduje się w komórce zostało już poznane, a nukleina swymi własnościami nie była podobna do żadnej innej znanej przedtem substancji. W przekonaniu, że odkryta substancja jest w pełni czymś innym niż dotychczas znane (białka, lipidy, cukrowce) utwierdza Mieschera fakt, że po powrocie do Bazylei substancję o analogicznych własnościach znajduje w spermie łososi. O tym fakcie pisał: „Nie jestem w stanie zaniechać myśli, że tu ujawnia się istotne działanie fizjologiczne fosforu w organizmie”. I później: „Na skutek tego impulsu (odkrycie nukleiny, przyp. autora) powstał przyjęty obecnie na ogół przez histologów pogląd, że jeżeli nie całe plemniki, to przynajmniej ich główki pod względem genetycznym i innych własności mikrochemicznych są zmodyfikowanymi jądrami komórkowymi”.

Tak więc Miescher rozpoczynając badania nad chemią jądra komórkowego dał punkt wyjścia dla fundamentalnych badań nad chemicznymi podstawami życia, czyli biologii molekularnej.

Na drugą połowę 1869 i 1870 roku Miescher wyjechał do słynnego wówczas Instytutu Fizjologii w Lipsku, na czele którego stał Carl Ludwig, i tam przeprowadzał badania nad czuciowymi drogami rdzenia kręgowego. Swojemu wujowi zwierzał się później, że pobytowi u Ludwiga zawdzięcza bardzo dużo, a zwłaszcza pod względem metodycznym. Redakcję pracy o nukleinie ukończył w grudniu 1869 roku i przesłał ją z Lipska Hoppe-Seylerowi, aby ten zamieścił ją na łamach swego czasopisma *Hoppe-Seyler's Medizinische Chemische Untersuchungen* (obecnie *Hoppe-Seyler Zeitschrift für physiologische Chemie*). Jak wiemy z bibliografii prac Mieschera publikacja o nukleinie ukazała się dopiero wiosną 1871 roku. Nie znamy dokładnie przyczyny zwłoki w opublikowaniu wyników Mieschera, ale prawdopodobnie oprócz wrodzonego sceptycyzmu Hoppe-

-Seylera, mogło tu wpłynąć zamieszanie wywołane w tym czasie wybuchem wojny francusko-pruskiej. Podobno Hoppe-Seyler częściowo powtórzył doświadczenia Mieschera i potem powiedział, że wszystkie doświadczenia, które wykonał Miescher są zgodne i poprawne, przeto manuskrypt przekazał do druku bez jakichkolwiek zmian.

Po powrocie z Lipska do Bazylei Miescher habilituje się z zakresu fizjologii w 1871 roku. W tym też roku ukazują się drukiem jego prace wykonane w pracowni Hoppe-Seylera: *Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen* i *Die Kerngebilde im Dotter des Hühnereies*, w których mówi o odkryciu nukleiny i które po raz pierwszy w historii nauki dały wgląd w chemiczną strukturę komórki zwierzęcej, a szczególnie jej jądra. Latem 1872 roku Miescher zostaje powołany na stanowisko kierownika Katedry Fizjologii na uniwersytecie w Bazylei z poleceniem zorganizowania instytutu fizjologii; miał wówczas 28 lat. Współpracując z wujem Wilhelmem Hisem, który badał ikrę łososi pod względem histologiczno-embriologicznym, Miescher kontynuował badania biochemiczne. Studiował głównie sezonowe zmiany w składzie białek i tłuszczów, a zaobserwowane obniżenie ilości białek muskulatury na korzyść rozwoju gonad w okresie tarła nazwał „likwidacją”. Wykorzystując krótki czas tarła u łososi w Renie, do laboratorium przychodził o 5-ej rano i wracał w późnych godzinach nocnych. Ponieważ nie miał asystentów, wszystkie analizy wykonywał sam, co wyczerpywało jego nadwątlone zdrowie. Niemniej jednak uzyskuje szybko dalsze wyniki. W 1874 roku w dojrzałych spermatozoidach łososi stwierdza, że nukleina jest związana z substancją o dużej zawartości azotu (niem. *Stickstoffreiche organische Base*), którą nazwał „protaminą”. Wykazuje dalej, że połączenie pomiędzy nukleiną i protaminą ma charakter soli: amoniakalny roztwór nukleiny i protaminy po wytrąceniu daje osad „nukleo-protaminy”. Stwierdza również, że zarówno nukleina jak i protamina znajduje się tylko w dojrzałej spermie łososi. W okresie przed tarłem (wrzesień) nie można było wyizolować protaminy, tylko substancję o innych własnościach, którą nazwał „albuminem jądra” (niem. *Kernalbuminose*) i którą uważał za prekursora protaminy (niem. *Vorstufe des Protamins*). Substancja albuminopochodna jądra została później dokładniej zbadana przez Albrechta Kossela i nazwana „histonami”. Wyniki powyższych badań ukazują się drukiem w klasycznych pracach Mieschera: „*Die Spermatozoen einiger Wirbeltiere*” (*Verh. d. naturf. Gesellsch. in Basel*, 6, 138, (1874)) i „*Das Protamin, eine neue organische Basis aus den Samenfäden des Rheinlachs*” (*Ber. d. deutschen Chem. Gesellsch.* 7, 376, (1874)).

Z analizy cytowanych prac wynika, że Miescher wiedział np., że nukleina ma charakter kwasu wielozasadowego, tworzącego w komórce z protaminą nierozpuszczalną sól. Wykonał szereg doświadczeń w tym kierunku, a więc podjął problem, który również dziś fascynuje biochemików.

Między innymi wysunął sugestię, że nukleina składa się z bardzo dużych cząsteczek, podczas gdy cząsteczki protaminy są mniejsze, gdyż łatwo przechodzą przez filtry. Wiedział, że protamina jest białkiem i że jej zasadowość spowodowana jest dużą zawartością arginy.

W 1885 roku Miescher zgodnie z życzeniem władz uniwersyteckich wybudował i zorganizował nowy instytut fizjologii, który nazwał „Vesalianum” na cześć Andrzeja Vesaliusza, belgijskiego anatoma XVI wieku, który spędził kilka miesięcy w Bazylei, dopilnowując druku swego dzieła „*De humani corpori fabrica*”.

W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia, kiedy Miescher publikował swe prace o chemii jądra komórkowego, biolodzy czynili również postępy w wyjaśnianiu procesu zapłodnienia jaja. Obserwowano zmiany jakie zachodzą w jądrze komórki podczas jej podziału (prace Waltera Fleminga). Zmiany te były szczególnie dobrze widoczne w komórkach pasożyta koni *Ascaris*. Studiując zachowanie się dwóch jedynie obecnych w komórkach wspomnianej glisty chromosomów Edouard van Beneden z Uniwersytetu w Liege stwierdził, że podczas zapłodnienia dochodzi do fuzji chromosomów komórek męskich i żeńskich. W wyniku tych i dalszych badań w latach 80-tych było już wiadomo, że ciągłość cech organizmu przechodzących z pokolenia na pokolenie jest zapewniona dzięki chromosomom jądra plemnika i jaja. Wiedziano też, że dzięki chromosomom ciągłość cech była przekazywana z jednej komórki do drugiej podczas mitozy. Dlatego Oskar Hertwig z Uniwersytetu Berlińskiego w 1884 roku mógł napisać:

„Sądzę, że wykazałem bezspornie, że nukleina jest tą substancją, która jest odpowiedzialna nie tylko za zapłodnienie, lecz również za przekazywanie właściwości dziedzicznych... Co więcej, nukleina zachowuje ten sam stan przed, podczas i po zapłodnieniu, tak że zapłodnienie jest równocześnie procesem morfologicznym i fizykochemicznym”.

Sam Miescher jednak nie akceptował nowych kierunków w biologii, ani nie doceniał roli nukleiny jaką jej przypisywali inni. Funkcję w przekazywaniu cech dziedzicznych przypisywał jakiejś hipotetycznej substancji, którą jakoby odkrył, ale przede wszystkim wyznawał poglądy fizykalne z pogranicza teorii kinetycznej i stereochemii w odniesieniu do zagadnień biologicznych, nie uznając osiągnięć samej biologii („*The key for sexuality lies for me in stereochemistry*”). Choć dla ścisłości trzeba również podnieść, że Miescher wypowiedział na ten temat i takie oto zdanie: „Jeśli ktoś sądzi, że za zapłodnienie jest odpowiedzialna jakaś jedna substancja, to w pierwszym rzędzie musi myśleć o nukleinie”. Przyczyną takich opinii mógł być między innymi fakt, że zdolność wybarwienia się substancji jądrowej (którą na dwa lata przed odkryciem nukleiny wykazał szwajcarski botanik E. Zacharias, a substancję odpowiedzialną za barwienie nazwał „chromatyną”) nie była stała, lecz zmieniała się w różnych okresach życia komórki. Trzeba jednak przyznać, że powyż-

sze wątpliwości mogły być rozwiązane dopiero w latach 40-tych naszego stulecia, kiedy to drogą chemicznych badań wykazano, że ilość DNA w chromosomach każdej komórki niezależnie od gatunku i rodzaju komórki jest niemal stała, a różne natężenie zabarwienia polega na zmiennej ilości substancji białkowych wiążących się z DNA.

W 1894 roku Miescher zachorował na gruźlicę i udał się na leczenie do Davos, gdzie zmarł w sanatorium „Turban” 16 sierpnia 1895 roku, w 51 roku życia. Miescher przeszedł do historii nauki jako twórca chemii jądra komórkowego i odkrywca kwasów nukleinowych. Wraz ze swoim wujem Wilhelmem Hisem był twórcą histochemicznych metod w medycynie, czyli tzw. „chemicznej embriologii” jak sami określali ten kierunek badań. Poza badaniami biochemicznymi i histochemicznymi, które zapewniły mu nazwisko w historii nauki, Miescher prowadził inne badania fizjologiczne, które dotyczyły oddychania, fizjologii łososia Renu oraz zagadnień fizjologicznych klimatu wysokogórskiego. Był np. pierwszym, który dyskutował mechanizm pobudzenia ośrodka oddechowego na skutek zakwaszenia krwi. I chyba miał rację W. His kiedy pisał: „Uznanie dla Mieschera z biegiem lat nie zmaleje ale wzrośnie i odkryte przez niego fakty i myśli są zarodkami, pod wpływem których jeszcze się zrodzi owocna przyszłość”.

W cztery lata po śmierci Mieschera Ryszard Altmann wprowadza termin „kwasy nukleinowe” a jak widzieliśmy jeszcze za życia ich odkrywcy była dyskutowana funkcja tych substancji w procesie dziedziczenia cech. Altmann również opisał metodę izolowania wolnego od białka kwasu nukleinowego z komórek drożdżowych i zwierzęcych, co umożliwiło rozwój badań nad składem chemicznym polinukleotydów. A. Kossel między innymi wykazuje obecność zasad purynowych i pirymidynowych oraz składnika cukrowego. P. A. Levene w latach 1909—1929 identyfikuje cukrowiec jako pentozę i ustala wzór D-rybozy i D-dezoksyrybozy; wykazuje również, że każdy kwas nukleinowy składa się z mononukleotydów zbudowanych z zasady organicznej, pentozy i kwasu fosforowego. W 1920 roku W. Jones w Baltimore stwierdza, że w przyrodzie występują co najmniej dwa rodzaje kwasów nukleinowych, jeden charakterystyczny dla komórek zwierzęcych, drugi dla komórek roślinnych. Wkrótce jednak w wyniku badań E. Jorpesa, H. O. Calvery'ego, K. C. Blancharda i innych okazało się, że to rozróżnienie nie jest ścisłe, gdyż oba rodzaje kwasów nukleinowych występują w obu typach komórek. Dopiero w latach 40-tych, dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod cytochemicznych i spektrofotometrycznych (J. Brachet, T. Caspersson) można było wykazać, że zarówno DNA jak i RNA są normalnymi składnikami wszystkich komórek.

W 1944 roku O. T. Avery i wsp. z Instytutu Rockefellera w Nowym Yorku po raz pierwszy wykazali, że DNA jest tym czynnikiem, który jest odpowiedzialny za transformację bezotoczkowych komórek *Diplococcus*

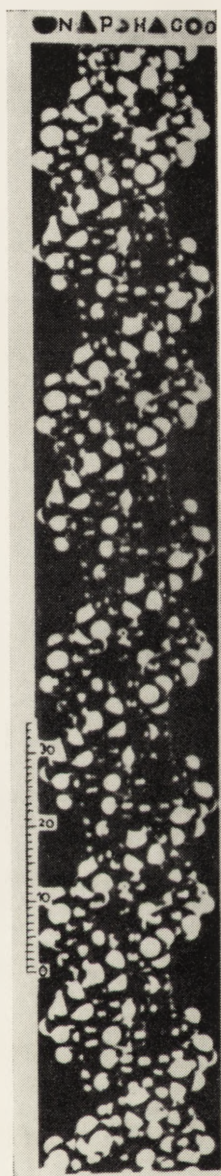
pneumoniae w komórki całkowicie zamknięte otoczką, czyli bakterie typu III. Stwierdzenie tego faktu było równocześnie wykazaniem bezpośredniej genetycznej funkcji kwasów nukleinowych.

Dalszy postęp w badaniu struktury i funkcji kwasów nukleinowych zależał przede wszystkim od osiągnięć technicznych i rozwoju metod analizy biochemicznej. Rozwój w latach 40-tych metod chromatograficznych, mikroskopii elektronowej, rentgenografii strukturalnej oraz zastosowanie enzymów nukleolitycznych jako odczynników chemicznych pozwoliło na szybki postęp w badaniu struktury oraz biologicznej roli kwasów nukleinowych. W 1952 roku Linus Pauling ogłasza wyniki swych badań na temat struktury białek, proponując spiralny model fragmentów łańcucha polipeptydowego, zaś na przełomie 1952/53 Rosalinda Franklin z Kings College w Londynie wykonuje zdjęcie rentgenowskie DNA, które odegrało istotną rolę w wyjaśnieniu struktury tego polinukleotydu. Ze zdjęcia można było odczytać znaczną regularność budowy cząsteczki sugerującą spiralną konfigurację. W następnych miesiącach ten kierunek badań rozwijają Wilkins i wsp. z tego samego ośrodka w Londynie. Na podstawie tych i innych faktów J. D. Watson i F. Crick wyrazili pogląd, że cząsteczka DNA złożona jest z dwóch łańcuchów fosforanowo-cukrowych spiralnie skręconych dokoła tej samej osi i utrzymujących się wzajemnie poprzez wiązania wodorowe odpowiednich par zasad (reguła Chargaffa). W wyniku wielu prób autorom udaje się zestawić model DNA, w którym rdzeń nici, tj., łańcuch fosforanowo-cukrowy znajduje się na zewnątrz, natomiast zasady purynowe i pirymidynowe sterczą do wnętrza podwójnej spirali. Wtedy Watson na ścianie swego pokoju rysuje brzemiennej w konsekwencje schemat:

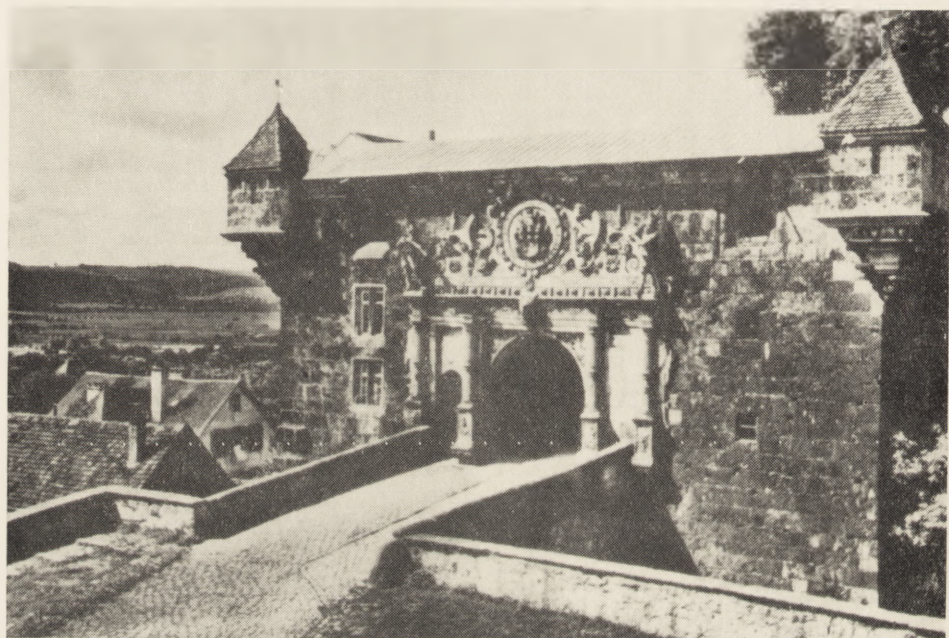
DNA→RNA→Białko

Model podwójnej spirali cząsteczki DNA jaki zaproponowali Watson i Crick umożliwia już stosunkowo łatwo wyjaśnienie mechanizmu replikacji DNA, transkrypcji i syntezy RNA oraz translacji w procesie biosyntezy białka. Jak wiadomo, w myśl powyższych sugestii Watsona, A. Kornberg przeprowadził *in vitro* biosyntezę DNA, a S. Ochoa—RNA. Odpowiednie enzymy—polimerazy DNA i RNA zostały w ostatnich latach wyodrębnione z różnych źródeł naturalnych i w wielu przypadkach dobrze scharakteryzowane. Dzięki poznaniu enzymów syntetyzujących kwasy nukleinowe A. Kornberg przeprowadził *in vitro* biosyntezę kołistego DNA bakteriofaga Φ X174, a S. Spiegelman wirusowego RNA o różnym stopniu wirulencji. Badania te mają między innymi znaczenie w poznaniu mechanizmu ewolucji przedkomórkowej.

W czasie procesu transkrypcji informacja genetyczna przenoszona jest z DNA na komplementarny w stosunku do niego informacyjny RNA. Informacja genetyczna z czteroliterowego alfabetu mRNA jest tłumaczona z kolei (translacja) na 24-ro literowy alfabet białka w procesie jego



Rys. 4. Model struktury DNA (według M. K. F. Wilkinsa)



Rys. 5. Główna brama wejściowa do zamku w Tybindze, laboratorium Hoppe-Seylera

biosyntezy. Stosując mieszane syntetyczne polinukleotydy o znanej sekwencji zasad Nirenberg i wsp., Ochoa i wsp. oraz inni badacze, doświadczalnie wykazali istnienie dla każdego aminokwasu odpowiednich trójek nukleotydów, czyli kodonów o znanym składzie zasad i sekwencji. Odczytanie kodu genetycznego ma ogromne znaczenie dla rozwoju wielu dziedzin wiedzy przyrodniczej i dla samej biochemii. Fakt, że natura w wyniku selekcji działającej przez miliony lat wybrała ten tak stosunkowo prosty sposób samopowielania się materii żywej, umożliwiający jej egzystencję od momentu powstania pierwszych form życia na ziemi świadczy, że sam dobór naturalny w ewolucji oddziaływał poprzez kształtowanie się struktury molekularnej, dziedziczonej za pomocą odpowiedniego zespołu genów i utrwalił wszystkie cechy łącznie ze sferą psychiczną rozumnej istoty. Poznanie mechanizmu przekazywania informacji genetycznej następnym pokoleniom oraz wyjaśnienie procesu biosyntezy białka w komórce pozwala wprost na nieograniczone eksperymentowanie w zakresie powstawania struktur biologicznych, ich funkcji w procesach życiowych i mechanizmu działania. Chromatynę jądra komórki można rozdzielić na poszczególne frakcje (DNA, histony, białka kwaśne), które zmieszane w odpowiednich stosunkach dają na powrót substancję o własnościach chromatyny, zdolną do syntezy *in vitro* określonego RNA. Jeśli do frakcji DNA i frakcji histonowej z grasicy doda się frakcje białek kwaśnych ze szpiku kostnego zwierzęcia, to zsyntetyzowany RNA ma własności RNA szpiku kostnego a nie grasicy. Wskazuje to, że frakcja białek kwaśnych jądra komórkowego ma zdolność aktywacji określonego genu zahamowanego przez nieswoisty histon. Te i podobne badania współczesnej biologii molekularnej fascynują i stwarzają nie dające się ocenić możliwości na przyszłość; oby je wykorzystano we właściwym kierunku.

Tak więc DNA odkryty 100 lat temu znajduje się dziś w centrum uwagi przyrodników i filozofów, lekarzy i poetów, społeczników i dziennikarzy. Każdy osobnik z żyjących dziś ludzi powstał z zapłodnionej komórki zawierającej $6-7 \times 10^{-12}$ g DNA. Jeśli liczbę populacji ludzkiej przyjmujemy na 3×10^9 osobników, to wszystkie komórki rozrodcze, które były punktem wyjścia dla rozwoju dzisiejszego pokolenia zawierały w sumie zaledwie około 20 mg czystego DNA. Dlatego słusznie DNA można nazwać „jednym z najważniejszych czynników wszechświata”.

Prof. dr F. Verzarowi z Zakładu Fizjologii Uniwersytetu w Bazylei składam serdeczne podziękowanie za umożliwienie mi otrzymania materiałów dotyczących działalności naukowej profesora Fryderyka Mieschera.

SPIS TREŚCI

K. Staroń — Funkcja metaboliczna cytochromu P-450	501
A. M. Konecka, J. Rytka — Drogi przemian metyloglioksalu w organizmach żywych	513
R. Lorenc — Biochemiczne właściwości kalcytoniny	527
M. Ombach — Zmiany wyrównawcze w nerce po jednostronnej nefrektomii	539
J. Wójcicki — Rozdział kwasu rybonukleinowego na żelach poliakrylamidowych	551
J. Krawczyński — Automatyzacja badań w chemii klinicznej i elektro- niczne przetwarzanie wyników	559
W. Ostrowski — Od nukleiny do DNA	581

W 1-szym zeszycie 17-go tomu ukażą się:

1. Metabolizm glikolipidów — *B. Czartoryska*
2. Biosynteza cysteiny i jej regulacje w komórce bakteryjnej — *D. Hulanicka*
3. Biosynteza i przemiany kwasu abscysynowego w roślinach — *R. Rudnicki*
4. Biosynteza alkaloidów indolowych — *S. Kohlmünzer*
5. Monoterpeny metylocyklopentanowe — *A. Jerzmanowski*
6. Funkcje i metabolizm kwasu retinowego — *T. Barankiewicz, M. Miler*
7. β -glukuronidaza — *L. Konarska*
8. Kowalencyjne wiązania krzyżowe w kolagenie — *M. M. Jeleńska*
9. Procesy związane z powstawaniem przeciwciał — *E. J. Sikorska*
10. Uorganizowanie strukturalno-metaboliczne jądra komórkowego —
T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski

POSTĘPY BIOCHEMII

November 1970

ARTICLES IN POLISH

Volume 16

Number 4

K. Staroń — Metabolic Function of Cytochrome P-450 (<i>Dep. Enzym. Inst. Biochem. Univ., Warszawa</i>)	501
A. M. Konecka, J. Rytka — The Metabolic Pathway of Methylglyoxal in Living Organisms (<i>Dep. Biochem. Med. School, Warszawa, Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa</i>)	513
R. Lorenc — Calcitonin, its Biochemical Properties (<i>Dep. Biochem. Med. Train. Center, Med. School, Warszawa</i>)	527
M. Om bach — Compensatory Changes in the Remaining Kidney after Unilateral Nephrectomy (<i>Dep. Physiol. Chem. Med. School, Warszawa</i>)	539
J. Wójcicki — Separation of Ribonucleic Acid on Polyacrylamide Gels (<i>Dep. Pharmacol. Med. School, Szczecin</i>)	551
J. Krawczyński — Automation in Clinical Chemistry and Electronic Data Processing (<i>Dep. Lab. Diagn. Med. Train. Center, Med. School, Warszawa</i>)	559
W. Ostrowski — From Nucleine to DNA (<i>Interfac. Dep. Physiol. Chem. Med. School, Kraków</i>)	581

Należy podawać kolejno: Lp., 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). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Barancwski T., Podręcznik Biochemii, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np. Schneider W.C., w Methods in Enzymology, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

SPIS TREŚCI

K. Staroń — Funkcja metaboliczna cytochromu P-450	501
A. M. Konecka, J. Rytka — Drogi przemian metylogliksalu w organizmach żywych	513
R. Lorenc — Biochemiczne właściwości kalcytoniny	527
M. Ombach — Zmiany wyrównawcze w nerce po jednostronnej nefrektomii	539
J. Wójcicki — Rozdział kwasu rybonukleinowego na żelach poliakrylamidowych	551
J. Krawczyński — Automatyzacja badań w chemii klinicznej i elektro- niczne przetwarzanie wyników	559
W. Ostrowski — Od nukleiny do DNA	581