

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

**1973**  
**tom 19**  
**nr 1**

**KWARTALNIK**

PSTBAH 19(1)  
1-168(1973)

<http://rcin.org.pl>

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zaopatrzone w odpowiedni tytuł.

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 3  
tom XIX  
zeszyt 1

KWARTALNIK  
PSTBAH 19(1) 1-168 (1973)

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. Pawełekiewicz (Poz-  
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),  
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
Warszawa, ul. Freta 16

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1972

Nakład 2180 (2047+133)	Oddano do składania 23.XI.1973 r.
Ark. wyd. 12,5, druk. 10,5	Podpisano do druku w lutym 1973r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono w marcu 1973 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1632/73 R-9

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA







## **Bolesław Skarżyński**

(1901—1963)

W dniu 17 marca 1973 roku mija dziesięć lat od śmierci dr med. Bolesława Skarżyńskiego, profesora chemii fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie, członka rzeczywistego Polskiej Akademii Nauk i pierwszego prezesa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Żył lat 62, w czasach gdy biochemia rozwijała się w pasjonującą dziedzinę wiedzy ukazując możliwość zrozumienia najciekawszego tworu kosmosu — organizacji i czynności żywego ustroju. Fascynacja dziedziną nauki, w której pracował, widoczna była w znakomitych wykładach Skarżyńskiego przeżytych emocjonalnym stosunkiem do omawianych problemów. Był jednym z tych, którzy po wojnie zorganizowali polskie badania biochemiczne i rozbudzili zainteresowanie tą dziedziną walcząc o uznanie jej znaczenia dla nauk przyrodniczych a zwłaszcza dla medycyny. Z radością obserwował rosnące szeregi kadry naukowej widoczne zwłaszcza w czasie zjazdów naukowych. Widział w nich naturalny wyraz prężności intelektualnej i uzdolnień narodu polskiego. Uzdolnienia te starał się wykazać w swoich pracach w zakresie historii nauki.

Bolesław Skarżyński został wybrany w roku 1958 pierwszym prezesem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W dziesiątą rocznicę śmierci Polskie Towarzystwo Biochemiczne pragnie przypomnieć postać swojego pierwszego prezesa — postać jeszcze bardzo żywą nie tylko wśród Jego uczniów, ale również wśród wielu polskich i zagranicznych biochemików.





CZESŁAW CIERNIEWSKI\*

## Prostaglandyny

### The Prostaglandins

The prostaglandins, a new important class of biologically active substances are reviewed. Their modulating effect on many physiological processes, mainly intracellular metabolism is discussed.

Prostaglandyny stanowią nową, bardzo ważną grupę związków biologicznie aktywnych o szerokim zakresie działania. Chociaż nie dają się zdefiniować jako hormony, koenzymy czy substancje przewodzące (ang. *transmitters*), mają tak wysoką aktywność, że już stężenia nanomolowe powodują dobrze widoczne efekty *in vivo* i *in vitro*. Nazwa pochodzi od źródła, z którego je po raz pierwszy wyizolowano, tj. męskich gruczołów płciowych i ich wydzielin.

Kurzrok i Lieb (51) zaobserwowali, że ludzka macica może reagować skurczem lub rozkurczem na wprowadzenie świeżego nasienia. Następnie Goldblatt (36, 37) i von Euler (78, 79) niezależnie odkryli zdolność płynu nasiennego do pobudzania mięśnia gładkiego. Okazało się, że zdolność ta jest związana z frakcją zawierającą kwasy tłuszczowe. Von Euler (78, 79) nazwał aktywny czynnik prostaglandyną (PG) i przeprowadził rozległe badania nad jej działaniem fizjologicznym. Późniejsze badania wykazały, że istnieje cała klasa aktywnych związków występujących w wielu płynach i tkankach organizmów żywych.

#### I. Budowa i występowanie

Prostaglandyny są 20-węglowymi kwasami karboksylowymi z pierścieniem cyklopentanu. Ich ciężar cząsteczkowy waha się od 332 do 356. Dają się one wyprowadzić z kwasu prostanowego, który oprócz pierścienia pięciocząłowego ma dwa łańcuchy boczne nazwane  $\alpha$  i  $\omega$ . Łańcuch

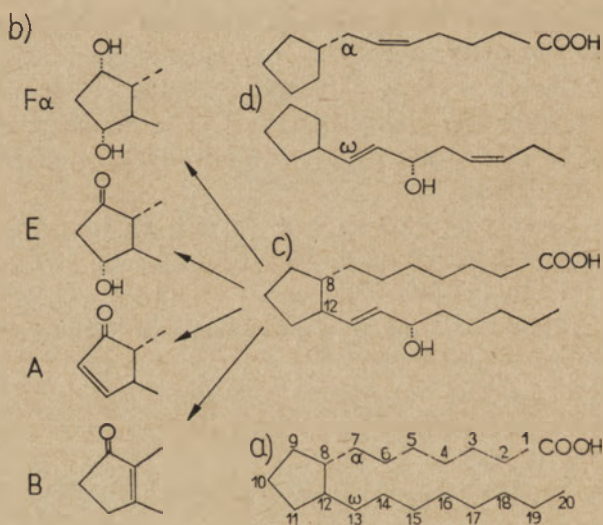
---

\* Mgr, Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: PG — prostaglandyny; ACTH — kortykotropina; TSH — tyreotropina

$\alpha$  zawiera grupę karboksylową, od której rozpoczyna się numerację atomów węgla (rysunek 1a). Wszystkie naturalnie występujące prostaglandyny mają w łańcuchu  $\omega$  podwójne wiązanie o konfiguracji *trans* ( $\Delta^{18}$ ) i podstawnik hydroksylowy przy C-15 w pozycji  $\alpha$ . Poszczególne prostaglandyny różnią się strukturą pierścienia cyklopentanu i łańcuchów bocznych. Ze względu na budowę pierścienia pięciocząonowego wyróżnia się 4 klasy prostaglandyn: PGA, PGB, PGE i PGF $_{\alpha}$  (rysunek 1b). Na rysunku 1c przedstawione są niezmienione łańcuchy boczne; ich modyfikacje w zasadzie polegają na obecności dodatkowych wiązań podwójnych o konfiguracji *cis* (rysunek 1d). PGE $_2$  i PGF $_{2\alpha}$  mają dodatkowo jedno podwójne wiązanie o konfiguracji *cis* ( $\Delta^5$ ), a PGE $_3$  i PGF $_{3\alpha}$  jeszcze drugie między C-17 i C-18. PGA $_1$ , PGA $_2$ , PGB $_1$ , PGB $_2$  mogą mieć dodatkowy podstawnik hydroksylowy przy C-19 w pozycji  $\alpha$ . Dotychczas nie stwierdzono występowania w przyrodzie PGF z grupą hydroksylową przy C-9 w pozycji  $\beta$ .

Van Dorp i wsp. (76) oraz Bergström i wsp. (12) wykazali



**Rys. 1.** Zasady nomenklatury prostaglandyn

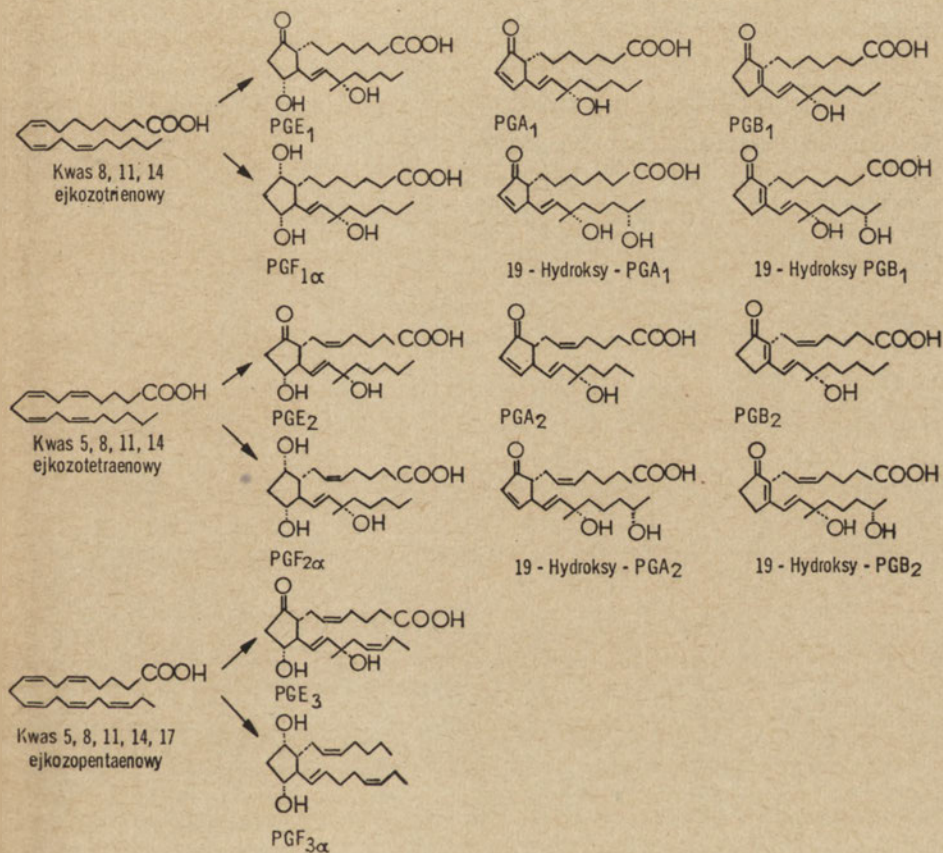
Budowa kwasu prostanowego (a), pierścieni cyklopentanu (b), łańcuchów bocznych przed (c) i po zmodyfikowaniu (d) (wg 59)

niezależnie od siebie, że prostaglandyny powstają z wolnych, nienasyconych kwasów tłuszczowych. Biosynteza PGE $_1$  polega na cyklizacji i utlenianiu kwasu 8,11,14-ejkozotrienowego (kwas homo- $\gamma$ -linolenowy), PGE $_2$  — kwasu 5,8,11,14-ejkozotetraenowego (kwas arachidonowy), a PGE $_3$  — kwasu 5,8,11,14,17-ejkozopentaenowego. Na rysunku 2 podano wzory najważniejszych prostaglandyn i ich bezpośrednich prekursorów.

W wyniku immunizowania królików za pomocą PGA $_1$ , PGA $_2$ , PGE $_1$  w połączeniu z białkami, Jaffe i wsp. (45) otrzymali specyficzne suro-



wice odpornościowe, w których występowały dwa rodzaje przeciwciał. Jedne były specyficzne dla pierścienia cyklopentanu i przy ich pomocy odróżniano typy A, E i F $\alpha$ . Drugi rodzaj przeciwciał skierowany był przeciw bocznemu łańcuchowi, co pozwalało odróżnić PGE $_1$  i PGA $_1$  od PGE $_2$  i PGA $_2$ . W odczynach zahamowania prostaglandyny homologiczne pod względem struktury były silnymi inhibitorami. Za pomocą surowicy odpornościowej przeciw PGE $_1$  nie można było odróżnić PGE $_1$  od PGA $_1$ , prawdopodobnie z powodu konwersji zachodzącej *in vitro* i *in vivo*.



Rys. 2. Budowa najważniejszych prostaglandyn i ich bezpośrednich prekursorów (wg 16)

Bergström (11) zbadał różne tkanki na obecność prostaglandyn. Wykorzystał w tym celu ich właściwości stymulowania skurczów mięśnia gładkiego, co sprawdzał w teście z dwunastnicą. We wszystkich badanych tkankach znalazł aktywność odpowiadającą prostaglandynom. W późniejszym okresie udało się wyizolować z gruczołów pęcherzykowych barana PGE $_1$  i PGF $_{1\alpha}$  (17, 18, 19) oraz PGE $_2$  i PGE $_3$  (14, 68) w postaci kry-

stalicznej. Jak się jednak okazało, pierwotnie zastosowany test był mało specyficzny, ponieważ cały szereg związków stymuluje mięsień gładki, w tym także produkty autooksydacji niektórych kwasów tłuszczowych.

Tablica 1

Występowanie prostaglandyn w różnych tkankach zwierzęcych wg Bergströma i Samuelssona (16)

Źródło	PGE <sub>1</sub>	PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>3</sub>	PGF <sub>1α</sub>	PGF <sub>2α</sub>	PGF <sub>3α</sub>
Gruczoł pęcherzykowy (baran)	+	+	+	+		
Plazma nasienna (człowiek)	+	+	+	+	+	
Plazma nasienna (baran)	+	+	+	+	+	
Płyn menstruacyjny, (człowiek)		+	+	+	+	
Płuca (owca)		+			+	
Płuca (byk)					+	+
Płuca (świnia, świnka morska, małpa, człowiek)					+	
Tęczęwka oka (baran)					+	
Mózg (byk)					+	
Grasica (ciele)	+					
Trzustka (byk)		+				
Nerka (świnia)		+				
Śledziona (pies)		+				

Tablica 2

Przybliżone ilości prostaglandyn występujących w ludzkim nasieniu wg Bergströma (11)

Prostaglandyna	Stężenie (μg/ml)
PGE <sub>1</sub>	25
PGE <sub>2</sub>	23
PGE <sub>3</sub>	5,5
PGA <sub>1</sub>	50
PGA <sub>2</sub>	50
PGB <sub>1</sub>	50
PGB <sub>2</sub>	50
19-hydroksy PGA <sub>1</sub>	200
19-hydroksy PGA <sub>2</sub>	200
19-hydroksy PGB <sub>1</sub>	200
19-hydroksy PGB <sub>2</sub>	200
PGF <sub>1α</sub>	3,6
PGF <sub>2</sub>	4,4

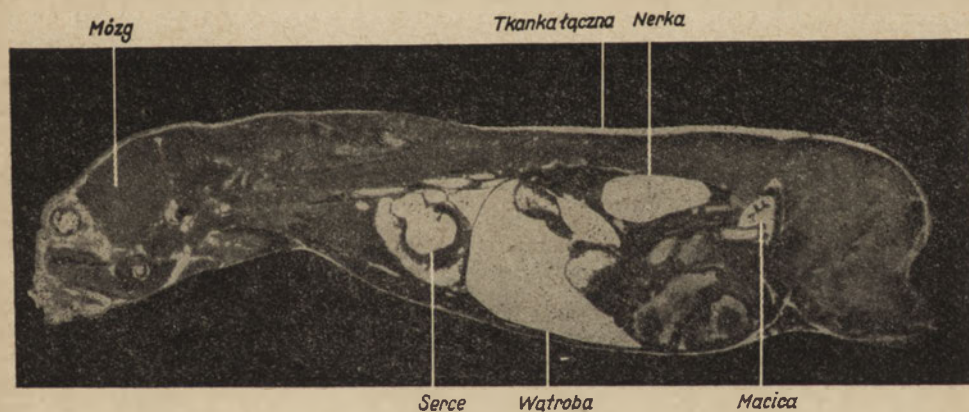


Dopiero badania za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej i jednocześnie specyficznie zmodyfikowanej mikrometody badania mięśnia gładkiego (63) bezspornie wykazały obecność prostaglandyn w płucach (13, 70), trzustce (15), mózgu (63, 69), nerce (53), tęczęwce oka (4), tkance tłuszczowej (23) i płynie menstruacyjnym (28, 29). W tabelicy 1 przedstawiono występowanie prostaglandyn w rozmaitych tkankach. Są one zasadniczo takie same jak w nasieniu, występują tylko w mniejszych ilościach (0,5-1,0 $\mu$ g/g świeżej tkanki) i w innych proporcjach. Wyjątek stanowi PGF<sub>3 $\alpha$</sub>  otrzymana z płuc, która nie występuje w gruczołach płciowych i nasieniu. W największych ilościach prostaglandyny występują w męskich gruczołach płciowych i ich wydzielinach (tablica 2).

Nieoczekiwanie stwierdzono obecność izomerów prostaglandyn u zwierząt bardzo odległych systematycznie od ssaków np. u koralu *Plexaura homomalla* (60).

## II. Metabolizm

Badania autoradiograficzne po dożylnym podaniu PGE<sub>1</sub> znakowanej <sup>3</sup>H szczurom (11) i myszom (16) wykazały, że w 15 minut po iniekcji najwyższa radioaktywność występuje w nerkach i wątrobie. Znakowana <sup>3</sup>H



**Rys. 3.** Rozmieszczenie autoradiograficzne <sup>3</sup>H-PGE<sub>1</sub> u myszy po 15 min. od dożylniej iniekcji (wg 16)

PGE<sub>1</sub> była selektywnie zagęszczona także w mózgu, mięśniach, płucach, tkance tłuszczowej, myometrium, sercu i licznych gruczołach wydzielania dokrewnego. Niespodziewanie wysokie stężenie izotopu stwierdzono w podskórnej tkance łącznej (rysunek 3).

Wysokie stężenie prostaglandyny w płucach jest interesujące w połączeniu z wynikami badań nad ich metabolizmem. Okazało się, że PGE<sub>1</sub>,

$\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGE}_3$  tracą aktywność w obecności homogenatów płuca (10, 54, 55, 62). Inaktywacja może zachodzić w wyniku trzech różnych reakcji:

- a) utlenienia grupy hydroksylowej przy C-15,
- b) redukcji podwójnego wiązania  $\Delta^{13}$ ,
- c) dwóch pierwszych etapów  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych.

Reakcje te wykazano *in vitro* używając różnych prostaglandyn (2, 5, 7). Zależnie od gatunku przebiegają one osobno lub równolegle, np. w płucach świnki morskiej inaktywacja prostaglandyn polega na redukcji  $\Delta^{13}$  i utlenieniu grupy hydroksylowej przy C-15, a w płucach świni tylko na tej ostatniej reakcji (38). W toku dalszych badań udało się wyizolować i zbadać właściwości enzymów katalizujących te reakcje (3, 6). Okazało się, że dehydrogenaza prostaglandyn ma wysoką aktywność w stosunku do grupy hydroksylowej przy C-15 w prostaglandynach typu A, E i  $\text{F}_\alpha$ . Ostatnio zastosowano ją do enzymatycznego oznaczania prostaglandyn z czułością około 0,3 ng/ml. Bardzo wysoką aktywność tego enzymu stwierdzono w mózgu (1). Najwyższe stężenie było w korze mózdku, szczególnie w warstwie drobinowej i komórek Purkinje, gdzie przeważają włókna „noradrenaliny”. Jest to interesujące z uwagi na to, że  $\text{PGE}_1$  i  $\text{PGE}_2$  blokują odwracalnie reakcje komórek Purkinje na noradrenalinę w mózdku szczura i królika. Ostatnio doniesiono, że podczas przemiany prostaglandyn w ustroju ludzkim zachodzi również utlenienie atomu C-20, prowadzące do powstania kwasu dwukarboksylowego (38).

W 40 godzin po podaniu szczurom znakowanej  $^3\text{H}$   $\text{PGE}_1$ , około 50% radioaktywności wydala się z moczem, 10% z kałem, a metabolity wykryte w krwi powstają głównie w płucach (11). Zidentyfikowano zasadnicze metabolity  $\text{PGE}_2$  występujące w moczu ludzkim i świnki morskiej (40, 41). Ostatnio również określono strukturę metabolitów  $\text{PGF}_{2\alpha}$  wydalanych z moczem szczura (38). W przypadku inaktywacji  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zachodzi jeszcze hydroksylowanie przy C-19 i C-20, jak to już wcześniej wykazano *in vitro* dla  $\text{PGA}_2$  (44, 62). Analiza metabolitów w moczu człowieka wykazała, że w ciągu doby w organizmie człowieka powstaje około 100  $\mu\text{g}$  prostaglandyn typu E, a stężenie endogenego  $\text{PGE}_2$  w osoczu wynosi 700 pg/ml. Piper i Vane (61) zaobserwowali jednak uwalnianie  $\text{PGE}_2$  i  $\text{PGF}_{2\alpha}$  w wyniku pewnych zmian w błonie komórkowej, wywołanych przez skurcz mięśni gładkich, anafilaksję lub uszkodzenia mechaniczne, wobec czego można przypuszczać, że w warunkach fizjologicznych ilości prostaglandyn mogą być dużo niższe.

### III. Rola fizjologiczna

Wstępne prace nad właściwościami prostaglandyn ograniczały się do badania reakcji mięśnia gładkiego oraz systemu naczyniowo-sercowego. Zgodnie z pierwszą hipotezą von Eulera (78, 79) prostaglandyny



miały ułatwiać wydzielanie męskich hormonów płciowych przez pobudzenie skurczów tkanki gruczołowej. Eliasson (30) zaobserwował, że prostaglandyny są resorbowane z pochwy do krwiobiegu i wywołują skurcze żeńskich dróg płciowych. Nieciążarna macica reaguje rozkurczem na nasienie, natomiast zgodnie z ostatnimi doniesieniami Karima (46) oraz Karima i Sharne (47),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  syntetyzowana przez endometrium ułatwia pod koniec ciąży wydalenie płodu. Ciągłe podawanie dożylnie małych dawek  $\text{PGE}_1$  ( $0,01\mu\text{g}/\text{kg}$  ciała/min) kobietom ciężarnym wywołuje podobną aktywność macicy jak podczas porodu (11). Nie zaobserwowano przy tym żadnych efektów ubocznych. Istnieją więc perspektywy praktycznych zastosowań w klinice.

$\text{PGF}_{2\alpha}$  jest identyczna z czynnikiem stymulującym menstruację (28, 29). Pobudzając rytmiczne skurcze macicy, umożliwia usunięcie złuszczonej błony śluzowej.

Prostaglandyny syntetyzowane przez jelito kontrolują ruchy perystaltyczne układu pokarmowego (77). Prostaglandyny  $\text{E}_1$  i  $\text{E}_2$  hamują wydzielanie soku żołądkowego (60). Wykazano to w doświadczeniach na psach, którym najpierw podawano czynniki pobudzające sekrecję (histaminę, pokarm), a następnie dożylnie jedną z prostaglandyn. Zaobserwowano całkowite zablokowanie wydzielania kwasu solnego i pepsyny, a następnie stwierdzono, że prostaglandyny  $\text{E}_1$  i  $\text{E}_2$  zapobiegają powstawaniu wrzodów żołądka i dwunastnicy. Okazało się, że żołądek wytwarza właśnie prostaglandyny typu E, które ograniczając wydzielanie soku żołądkowego ochraniają ścianę żołądka przed owrzodzeniem.

$\text{PGE}_1$  i  $\text{PGF}_{1\alpha}$  oprócz pobudzania mięśnia gładkiego, obniżają ciśnienie krwi, przy czym  $\text{PGE}_1$  jest około 10-krotnie aktywniejsza niż  $\text{PGF}_{1\alpha}$ . Typowym efektem działania prostaglandyn typu E jest rozszerzanie drobnych, obwodowych naczyń krwionośnych, co powoduje obniżenie ciśnienia krwi (11). Odwrotnie natomiast działa  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , która zwężając drobne naczynia obwodowe podwyższa ciśnienie krwi.  $\text{PGE}_1$  ponadto przyspiesza pracę serca (11). Również  $\text{PGA}_1$  i  $\text{PGA}_2$  obniżają ciśnienie krwi i nieznacznie wpływają na mięsień gładki oraz metabolizm lipidów (11).

Jedną z właściwości  $\text{PGE}_1$  i  $\text{PGE}_2$  jest wpływ na agregację płytek krwi indukowaną przez ADP, noradrenalinę, trombinę i ekstrakty tkanki łącznej (8, 25, 26, 27, 31, 39, 48). Efekt ich działania jest przeciwstawny, mianowicie  $\text{PGE}_1$  hamuje, a  $\text{PGE}_2$  stymuluje powyższe zjawisko. Kloeze (49) przeprowadził wnikliwe badania nad związkiem między strukturą chemiczną prostaglandyn a ich wpływem na agregację płytek wywołaną przez ADP. Pobudzające działanie  $\text{PGE}_2$  osiąga maksimum przy stężeniu  $0,5\text{--}1,0\mu\text{g}/\text{ml}$ , przy wyższym stężeniu  $\text{PGE}_2$  wykazuje mniejsze działanie. Jest to prawdopodobnie spowodowane zanieczyszczeniem preparatu przez  $\text{PGE}_1$ , której zdolność do hamowania agregacji jest kilkakrotnie wyższa niż zdolność stymulująca  $\text{PGE}_2$ .

Kloeze (49) stwierdził, że dla odpowiedniego działania prostaglan-

dyn konieczna jest struktura cyklopentanu typu E. Redukcja grupy ketonowej przy C-9 do grupy hydroksylowej ( $\alpha$  i  $\beta$  izomery PGF) inaktywuje cząsteczkę. Odwodorowanie i wprowadzenie podwójnego wiązania  $\Delta^{10}$  (PGA<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>) daje 10-krotnie niższą aktywność powstałego produktu. Przesunięcie podwójnego wiązania między C-8 i C-12 (PGB<sub>1</sub>, PGB<sub>2</sub>) daje płaską strukturę pierścienia i całkowity zanik aktywności prostaglandyny.

Istotne znaczenie dla działania prostaglandyny ma długość łańcuchów bocznych. Skrócenie lub wydłużenie o jeden atom węgla łańcucha  $\alpha$  w cząsteczce inaktywuje PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub>. Pewne różnice między nimi występują przy zmianie długości łańcucha  $\omega$ . W przypadku PGE<sub>1</sub> skrócenie o jeden atom węgla łańcucha  $\omega$  zmniejsza hamowanie przez nią agregacji płytek prawie o połowę, podczas gdy wydłużenie zwiększa je 4-krotnie. Skrócenie bocznego łańcucha  $\omega$  w PGE<sub>2</sub> obniża aktywność 10-krotnie, natomiast wydłużenie nie ma żadnego wpływu. Doświadczenia z estrami metylowymi PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> dowiodły, że istotne znaczenie dla wpływu tych prostaglandyn na agregację płytek ma grupa karbonylowa.

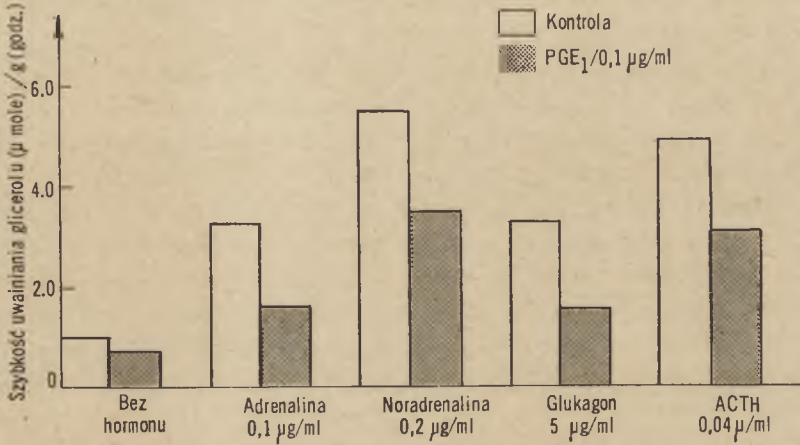
Trzecim ugrupowaniem w cząsteczce niezbędnym dla odpowiedniej aktywności jest podstawnik hydroksylowy przy C-15; jego utlenienie inaktywuje PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub>. Ponieważ te prostaglandyny różnią się tylko obecnością wiązania podwójnego  $\Delta^5$ , prawdopodobnie właśnie to wiązanie warunkuje różnice w działaniu obu prostaglandyn. Podwójne wiązanie między C-13 i C-14, które występuje zarówno w PGE<sub>1</sub> jak i PGE<sub>2</sub>, ma mniejsze znaczenie. Nasylenie go nie wpływa na aktywność prostaglandyny. Zaawansowane ostatnio prace wielu firm chemicznych nad syntezą prostaglandyn ułatwią z pewnością rozstrzygnięcie wielu zagadnień tego rodzaju.

PGE<sub>1</sub> hamuje *in vitro* retrakcję skrzepu, efekt ten całkowicie znosi do datek równoważnej ilości CaCl<sub>2</sub> (57).

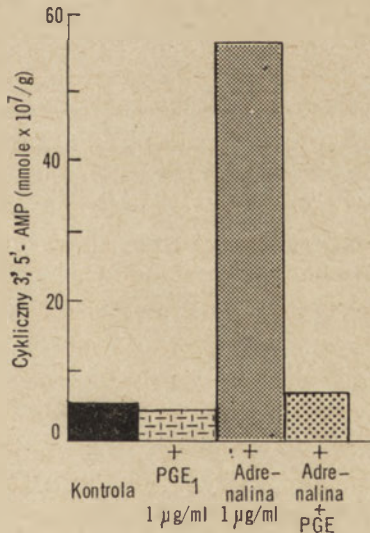
PGE<sub>1</sub> *in vitro* silnie hamuje stymulujące działanie wielu hormonów na uwalnianie kwasów tłuszczowych i glicerolu z poduszek tłuszczowych łąpek szczura (11, 23, 24, 58, 74). W preparatach tej tkanki zachodzi ciągła hydroliza trójglicerydów. Część uwolnionych kwasów tłuszczowych zostaje zużyta do resyntezy, natomiast reszta oraz praktycznie cały glicerol ulega wydaleniowi z komórek tłuszczowych. Ilość glicerolu w środowisku inkubacyjnym jest zatem daleko lepszym wskaźnikiem szybkości przebiegającej lipolizy, niż ilość wolnych kwasów tłuszczowych. Lipaza trójglicerydów występuje głównie w formie nieaktywnej. Ulega gwałtownej aktywacji w obecności adrenaliny, bądź noradrenaliny, czy glukagonu, ACTH, TSH i wazopresyny (11, 16). PGE<sub>1</sub> silnie hamuje przyspieszoną w ten sposób lipolizę (rysunek 4). Nawet przy niższym stężeniu ta sama prostaglandyna blokuje uwalnianie kwasów tłuszczowych i glicerolu indukowane przez drażnienie włókien unerwiających poduszki tłuszczowe u szczurów (73). Wpływ PGE<sub>1</sub> na lipolizę prawdopodobnie polega na blokowaniu aktywacji lipazy trójglicerydów (16). Zaobserwowano także, że



adrenalina podwyższa stężenie cyklicznego 3',5'-AMP (cAMP) proporcjonalnie do szybkości lipolizy (21, 22). Wykazano również, że PGE<sub>1</sub> całkowicie znosi syntezę cAMP stymulowana przez adrenalinę w różnych stężeniach w izolowanych komórkach tłuszczowych (rysunek 5). Ponieważ jednak dwubutylo-cAMP, który stymuluje lipolizę w podszkach tłuszczowych (21), nie znosi całkowicie tego efektu (11), istnieje prawdopodobieństwo, że PGE<sub>1</sub> działa bezpośrednio na cyklazę adenylową.



Rys. 4. Wpływ PGE<sub>1</sub> na hormonalnie stymulowane uwalnianie glicerolu z podszek tłuszczowych łap szczura (wg 11)



Rys. 5. Wpływ adrenaliny i PGE<sub>1</sub> na syntezę cyklicznego 3',5'-AMP w izolowanych komórkach tłuszczowych (22)

Zgodnie z koncepcją tzw. „pośrednika drugiego rzędu” Sutherlanda i Robinsona (75) w działaniu hormonów na specyficzne tkanki pośredniczy cyklaza adenylova, katalizująca wytwarzanie cyklicznego 3',5'-AMP. W rezultacie reakcje metaboliczne regulowane są przez zmiany stężeń tego nukleotydu w komórkach. Sutherland i Robinson (75) zestawili hormony wpływające na poziom cAMP we wrażliwych tkankach (tablica 3). Okazało się, że prostaglandyny są antagonistami każdego z wyżej wymienionych hormonów. Wydaje się więc bardzo prawdopodobne, że prostaglandyny są modulatorami cyklazy adenylowej w różnych tkankach.

Tablica 3

Hormony wpływające na syntezę cyklicznego 3',5'-AMP w specyficznych tkankach wg Sutherlanda i Robinsona (75)

Hormon	Tkanka
Glukagon	wątroba
ACTH	kora nadnerczy
Wazopresyna	pęcherz ropuchy
Wazopresyna	nerka
Wazopresyna	skóra żaby
Hormon luteinizujący	ciałko żółte
TSH	tarczyca
Glukagon, ACTH, TSH, wazopresyna, adrenalina	tkanka tłuszczowa
Serotonina	przywra wątrobiania
Acetylocholina	serce
Histamina	mózg

Ostatnio doniesiono, że prostaglandyny mogą przyspieszać syntezę cyklicznego 3',5'-AMP. Stwierdzono to np. dla płytek, ale wykazano równocześnie, że żaden z hormonów wymienionych w tablicy 3 nie zmienia poziomu tego nukleotydu w płytkach. PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> stymulują cyklazę adenylową w limfocytach grasicy i przez podwyższenie poziomu cAMP wpływają na proliferację komórek w hodowli *in vitro* (34). Podobny efekt zaobserwowano z limfocytami krwi obwodowej (20). Frank s i wsp. (34) przypuszczają, że zdolność podwyższania aktywności cyklazy adenylowej uzależniona jest od obecności grupy ketonowej przy C-9 (PGE<sub>1</sub>, PGA<sub>1</sub>). PGF<sub>1α</sub> i PGF<sub>2α</sub>, które mają w tym miejscu grupę hydroksylową, są niezdolne do uaktywnienia cyklazy adenylowej i proliferacji komórek.

PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> stymulują cyklazę adenylową w homogenatach ciała żółtego krowy w tym samym stopniu co hormon luteinizujący (11). Prostaglandyny i cAMP zwiększały dwukrotnie wpływ ACTH na steroidogenezę (33, 50). Według Harbona i Clausera (42) prostaglandyny-



ny typu E, podobnie jak adrenalina, uaktywniają cyklazę adenylową w myometrium działając przez ten sam receptor.

Rozważania nad funkcją tych związków można znacznie rozbudować, jeżeli uwzględni się odkrycie, że są one uwalniane z różnych tkanek w wyniku pobudzenia nerwowego lub działania hormonów i leków (61). Stwierdzono to w mózdku (25), korze mózgowej (63), rdzeniu kręgowym (66), nadnerczach (65), tkance tłuszczowej (72), przeponie (52, 67, 72), żołądku (9, 25), śledzionie (26, 27, 32). Nie udało się jednak ustalić miejsca, z którego mogą być one uwalniane. Wszystkie wymienione tkanki są unerwione i unaczynione, niektóre zawierają komórki gruczołowe, mięśnie gładkie lub prążkowane. Gilmore i wsp. (35) zaobserwowali, że  $PGE_2$  i  $PGF_{2\alpha}$  uwalniane są głównie z komórek mięśnia gładkiego podczas skurczu śledziony wywołanego drażnieniem nerwu lub przez dodanie adrenaliny. Ponieważ zasadniczą prostaglandyną centralnego układu nerwowego jest  $PGF_{2\alpha}$ , a w niektórych gruczołach występują tylko prostaglandyny typu E (10, 15), istnieje duże prawdopodobieństwo, że poszczególne tkanki uwalniają różne prostaglandyny.

Istnieje hipoteza, że prostaglandyny włączają się w łańcuch procesów, w których acetylocholina bądź adrenalina powoduje skurcz mięśni gładkich lub poprzecznie prążkowanych (23). Potwierdzeniem tej hipotezy jest obserwacja Ramwella i wsp. (65), że pod wpływem acetylcholiny z nadnerczy uwolniona zostaje  $PGF_{1\alpha}$ . Z drugiej strony podanie tej ostatniej powinno spowodować skurcz tkanki, czego nie stwierdzono w doświadczeniach przeprowadzonych ze śledzioną (35).

Występowanie prostaglandyn w podwzgórzu psa (43) pozwala przypuszczać, że odgrywają one ważną rolę w regulacji wydzielania hormonów przysadki mózgowej. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że wykazano znaczny wpływ  $PGE_1$  na uwalnianie hormonu wzrostowego podczas inkubacji z przednim płatem tego gruczołu. W podobnych warunkach  $PGE_2$  i  $PGA_1$  podwyższają syntezę hormonu bez uwalniania go do środowiska (56). Prostaglandyny badane przez Zora i Kaneko (80) podwyższają aktywność cyklazy adenylowej i przypuszczalnie za pośrednictwem cAMP wpływają na wydzielanie hormonu, niezależnie od syntezy białek. Stymulacja nie jest specyficzna dla jednego typu komórek lub jednego hormonu (71). Prostaglandyny działają prawdopodobnie na poziomie receptora przysadki, jako modulatory „czynników uwalniających” (neurosekrety) syntetyzowanych w podwzgórzu.

Pochodzenie prostaglandyn z nienasyconych kwasów tłuszczowych wskazuje następną, bardzo ważną funkcję tych związków. Wiadomo, że kwas arachidonowy, będący prekursorem ważniejszych prostaglandyn (w tym  $PGE_{2\alpha}$ ), pospolicie występuje w fosfolipidach, które z kolei są zasadniczym składnikiem błony komórkowej. W związku z tym wydaje się, że przemiana kwasu arachidonowego do prostaglandyny może odgrywać istotną rolę w regulowaniu funkcji błony komórkowej. Tym bar-

dziej, że w tej ostatniej prawdopodobnie zlokalizowana jest także cykloza adenylowa. Właśnie błona komórkowa może być pierwotnym miejscem syntezy prostaglandyn, które prawdopodobnie są jeszcze jednym ogniwem wiążącym regulację hormonalną i nerwową zjawisk życiowych. Prostaglandyny nie są syntetyzowane w sposób ciągły, lecz tylko w odpowiednich momentach. Potwierdza to fakt, że dotychczas nie stwierdzono, aby mogły być magazynowane w komórkach.

Obecnie prowadzone są rozległe badania nad skutkami, jakie wywołuje w żywym organizmie zablokowanie syntezy prostaglandyn. Uważa się, że właśnie z tym związane jest przeciwzapalne działanie aspiryny (60).

Dotychczasowe badania pozwalają stwierdzić, że prostaglandyny regulują wpływ hormonów na specyficzne tkanki na zasadzie zarówno ujemnego jak i dodatniego sprzężenia zwrotnego (64). Możliwie szybkie ich powstawanie z nienasyconych kwasów tłuszczowych, jak to stwierdzono w większości badanych tkanek, czyni z nich wewnątrz-komórkowy modulator metaboliczny, działający tym skuteczniej, że niewielki ciężar cząsteczkowy pozwala dyfundować im z komórki do komórki.

#### LITERATURA

1. Anderson G., Speroff L., *Science* **171**, 502 (1971).
2. Ångard E., Green K., Samuelsson B., *J. Biol. Chem.* **240**, 1932 (1965).
3. Ångard E., Larsson C., Samuelsson B., *Acta Phys. Scand.* (1971), cyt. wg
4. Ångard E., Samuelsson B., *Biochem. Pharmacol.* **13**, 281 (1964).
5. Ångard E., Samuelsson B., *J. Biol. Chem.* **239**, 4097 (1964).
6. Ångard E., Samuelsson B., *Ark. Kem.* **25**, 293 (1965).
7. Ångard E., Samuelsson B., *Biochemistry* **4**, 1864 (1965).
8. Ball G., Brereton G. G., Fulwood M., Ireland D. M., Yates P., *Biochem. J.* **120**, 709 (1970).
9. Bennet A., Friedman C. A., Vane J., *Nature* **216**, 873 (1967).
10. Bennet A., Murray J. G., Wyllie J. H., *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **32**, 339 (1968), cyt. wg
11. Bergström S., *Science* **157**, 382 (1967).
12. Bergström S., Danielsson H., Samuelsson B., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 207 (1964).
13. Bergström S., Dressler F., Krabisch L., Ryhage R., Sjövall J., *Ark. Kem.* **20**, 63 (1962).
14. Bergström S., Dressler F., Ryhage R., Samuelsson B., Sjövall J., *Ark. Kem.* **19**, 562 (1961).
15. Bergström S., Samuelsson B., *Acta Chem. Scand.* **17**, S282 (1963).
16. Bergström S., Samuelsson B., *Endeavour* **27**, 109 (1968).
17. Bergström S., Sjövall J., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1401 (1960).
18. Bergström S., Sjövall J., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1693 (1950).
19. Bergström S., Sjövall J., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1706 (1960).
20. Bourne H. R., Lehrer R. J., Cline H. J., Melmon K. L., *J. Clin. Invest.* **50**, 920 (1971).



21. Butcher R. W., *Pharmacol. Rev.* **18**, 237 (1966).
22. Butcher R. W., Ho R. J., Meng H. C., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 1515 (1965).
23. Carlsson L. A., Halberg D., *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 368 (1968).
24. Carlsson L. A., Micheli H., *Acta Phys. Scand.* **80**, 289 (1970).
25. Cocceani F., Pace-Asciak C., Volta F., Wolfe L. S., *Am. J. Physiol.* **213**, 1056 (1967).
26. Davies B. N., Horton E. W., Withrington P. G., *J. Physiol.* **188**, 38P (1967).
27. Davies B. N., Horton E. W., Withrington P. G., *J. Pharmacol. Chemother.* **32**, 127 (1968).
28. Eglinton G., Raphael R. A., Smith G. N., Hall W. J., Pickles V. R., *Nature* **200**, 960 (1963).
29. Eglinton G., Raphael R. A., Smith G. N., Hall W. J., Pickles V. R., *Nature* **200**, 993 (1963).
30. Eliasson R., *Acta Physiol. Scand.* **46**, Suppl. 158, 1 (1959).
31. Emmons P. R., Hampton J. R., Harrison M. J., Honour A. J., Mitchele J. R., *Brit. J. Med.* **2**, 468 (1968).
32. Ferreira S. H., Vane J. R., *Nature* **216**, 868 (1967).
33. Flack J. D., Jassup R., Ramwell P. W., *Science* **163**; 681 (1969).
34. Franks D. J., Macmanus J. P., Whitfield J. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1774 (1971).
35. Gilmore N., Vane J. R., Wyllie J. H., *Nature* **218**, 1135 (1968).
36. Goldblatt M. W., *Chem. Ind. (London)* **52**, 1056 (1963), cyt. wg 11.
37. Goldblatt M. W., *J. Physiol. (London)* **84**, 204 (1935), cyt. wg 11.
38. Green K., *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 419 (1971).
39. Gronström E., Samuelsson B., *European J. Biochem.* **10**, 411 (1969).
40. Hamberg M., Samuelsson B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 22 (1969).
41. Hamberg M., Samuelsson B., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2177 (1969).
42. Harbon S., Clauser H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1496 (1971).
43. Holmes S. W., Horton E. W., *J. Physiol.* **191**, 134P (1967).
44. Israelsson U., Hamberg M., Samuelsson B., *European J., Biochem.* **11**, 390 (1969).
45. Jaffe B. M., Jay W. S., Newton W. T., Parker C. W., *Science* **171**, 494 (1971).
46. Karim S. M., *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonwlth.* **73**, 906 (1966).
47. Karim S. M., Sharne S. D., *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonwlth.* **78**, 251 (1971).
48. Kinlough-Rathbone R. L., Packham M. A., Mustard J. F., *Brit. J. Haematol.* **19**, 559 (1970).
49. Kloeze J., *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 285 (1969).
50. Kuehl E. A., Humes J. L., Tarnoff J., Cirillo V. J., Hann E. A., *Science* **169**, 883 (1970).
51. Kurzrok R., Lieb C. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **28**, 268 (1930) cyt. wg 11.
52. Laity J. L. *Brit. J. Pharmacol.* **37**, 698 (1969).
53. Lee J. B., *J. Clin. Invest.* **45**, 433 (1969).
54. McGift J. C., Crowshaw K., Terragno N. A., Langro A. J., *Nature* **227**, 1255 (1970).
55. McGift J. C., Terragno N. A., Strand J. C., Lee J. B., Lonigro A. J., *Nature* **223**, 742 (1969).

56. McLeod P. M., Lehmayr J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **67**, 1172 (1970).
57. Mürer E. H., *Nature* **229**, 112 (1971).
58. Pavor S. S., Tidwell H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 167 (1968).
59. Pickles V. R., *Nature* **224**, 221 (1969).
60. Pike J. E., *Sci. Am.* **225**, 84 (1971).
61. Piper J.R., Vane J. R., *Nature* **223**, 29 (1968)
62. Piper J. R., Vane J. R., Wyllie J. H., *Nature* **225**, 600 (1970).
63. Ramwell P. W., Shaw J. E., *Am. J. Physiol.* **211**, 125 (1966).
64. Ramwell P. W., Shaw J. E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **180**, 10 (1971).
65. Ramwell P. W., Shaw J. E., Douglas W., Poisner A. H., *Nature* **210**, 273 (1966).
66. Ramwell P. W., Shaw J. E., Jessup R., *Am. J. Physiol.* **211**, 198 (1966).
67. Ramwell P. W., Shaw J. E., Kucharski J., *Science* **149**, 1390 (1965).
68. Samuelsson B., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1878 (1963).
69. Samuelsson B., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 218 (1964).
70. Samuelsson B., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 707 (1964).
71. Schofield J. G., *Nature* **228**, 179 (1970).
72. Shaw J. E., *Federation Proc.* **25**, 770 (1966).
73. Shaw J. E., Ramwell P. W., *J. Biol. Chem.* **243**, 1493 (1968).
74. Steinberg H., Vaugham A. P., Nestel P. J., Strand S. J., Bergström S., *J. Clin. Invest.* **43**, 1533 (1964).
75. Sutherland E. W., Robinson G. A., *Pharmacol. Rev.* **18**, 145 (1966).
76. Van Dorp D. A., Beerthius R. K., Nugteren D. H., Vonkeman H., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 204 (1964).
77. Vogt W., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **206**, 1 (1949).
78. Von Euler U. S., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **175**, 78 (1934), cyt. wg 59.
79. Von Euler U. S., *Klin. Wochschr.* **14**, 1182 (1935), cyt. wg 59.
80. Zor U., Kaneko T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **63**, 918 (1969).

JÓZEF GRYSZKIEWICZ\*

## Elektrody enzymatyczne

### Enzymatic Electrodes

The properties and uses of two types of enzymatic electrodes: enzyme and substrate electrodes, are reviewed. The perspectives of their applications to the future research are discussed.

Przykładem wzajemnej integracji elektrochemii, enzymologii i chemii analitycznej są elektrody enzymatyczne. Stanowią one bowiem rezultat wykorzystania własności elektrody szklanej (14, 30) oraz reakcji enzymatycznej do konkretnych zadań analitycznych. Rozwój badań w dziedzinie elektrod posiadających wysoką specyficzność względem kationów i anionów doprowadził do stworzenia elektrod jono-selektywnych, nazywanych także elektrodami jonospecyficznymi (33, 37, 39—42).

Podobnie eksperymenty dotyczące modyfikacji chemicznej białek zapoczątkowały badania nad tak zwanymi enzymami nierozpuszczalnymi (15, 29, 38). W efekcie na bazie doświadczeń elektrochemii i enzymologii powstały elektrody enzymatyczne znajdujące zastosowanie w chemii analitycznej (17, 36, 40, 41) i klinicznej (12, 17, 21, 41, 45).

#### I. Przegląd historyczny

Pojęcie elektrody enzymatycznej wprowadzili po raz pierwszy Clark i Lyons (12) w 1962 roku. Wskazali oni na możliwość połączenia elektrody z warstwą enzymatyczną zamkniętą pomiędzy dwiema membranami i zastosowaniem takiego urządzenia w analizie klinicznej. Schemat proponowanego układu przedstawia rysunek 1.

Specyficzność odpowiedzi takiego układu może być regulowana rodza-

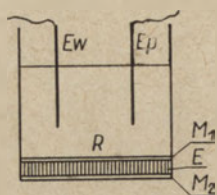
---

\* Mgr, Instytut Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: a — asparaginaza, ChE — cholinesteraza, E — stacjonarna siła elektromotoryczna mierzona względem elektrody kalomelowej, FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy, g — glutaminaza, i — natężenie prądu, k — katalaza, LDH — dehydrogenaza mleczanowa, D(L)-OA — oksydaza D(L)-aminokwasowa, og — oksydaza glukozy, u — ureaza.



jem i umiejscowieniem enzymu, rodzajem elektrody i membrany. Przykładem zastosowania jest natomiast oznaczenie glukozy. Pomiedzy membranami wykonanymi z kuprofanu znajduje się oksydaza glukozy, a w przestrzeni elektrodowej umieszczono roztwór glukozy i szklaną elektrodę pH-metru. Glukoza dyfunduje do przestrzeni międzymembranowej i już w postaci kwasu glukonowego powraca z powrotem do roztworu pierwotnego.



Rys. 1. Projekt elektrody enzymatycznej Clarka—Lyonsa (wg 12)

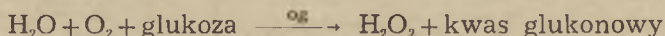
$E_w$  — elektroda wskaźnikowa,  $E_p$  — elektroda porównawcza, R — roztwór substratu,  $M_1$ ,  $M_2$  — membrany, E — roztwór enzymu

Uzyskany wzrost kwasowości zależy od stężenia glukozy, szybkości przepływu substratu, pH i pojemności buforowej roztworu glukozy, temperatury. Czulość systemu można regulować dobierając odpowiednio wymienione parametry (12). Cały układ jest trwały przez godzinę nieprzerwanego pomiaru, a zwiększenie stężenia enzymu zamkniętego między membranami pozwala przedłużyć jego stabilność do tygodnia (12).

Jeżeli w opisanym układzie jedna membrana będzie hydrofobowa (np. polietylenowa), druga zaś będzie błoną dializacyjną, a elektrodę szklaną zastąpi się elektrodą tlenową, to mierzone  $pO_2$  będzie proporcjonalne do stężenia glukozy.

Autorzy proponują użycie układu: membrana—roztwór ureazy—membrana i odpowiednia elektroda (np. do mierzenia pH lub przewodnictwa) do pomiaru stężenia mocznika w próbkach krwi. Dokładniej budowy i własności takiego urządzenia autorzy nie podają (12).

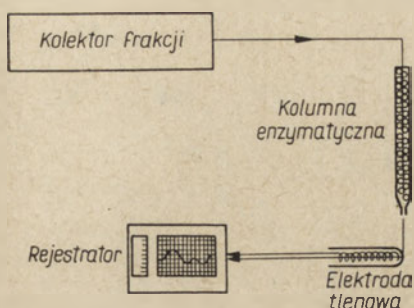
Pomysł użycia elektrody tlenowej wykorzystany został przez Clarka i Sachsa (13) do pomiaru poziomu glukozy w krwi. Podjęty on został także przez Updike'a i Hicksa (44), którzy oksydazę glukozy (EC 1.1.3.4) inkludowali w żelu poliakrylamidowym, rozdrabniali żel, napełniali nim kolumnkę chromatograficzną i przemywając ją roztworem glukozy mierzyli, przy pomocy elektrody tlenowej, zużycie tlenu w reakcji (I):



Schemat takiego urządzenia przedstawia rysunek 2.

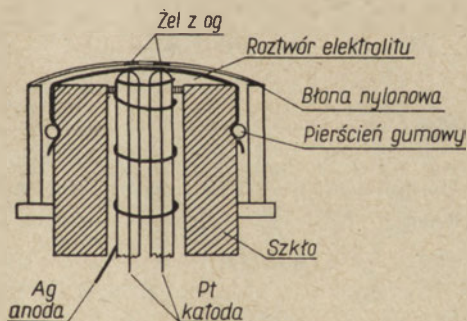
Metoda ta pozwala na bezodczynnikową analizę substratu przy pomocy nierozpuszczalnego enzymu. W analizie tej bowiem wykorzystuje

się jedynie pomiar zużycia tlenu, zawartego zawsze w badanym roztworze glukozy, a jedynym odczynnikiem jest oksydaza glukozowa uwięziona w poliakrylamidzie i praktycznie nie zużywana podczas reakcji. Pomiar zależy między innymi od stężenia enzymu, rozmiaru ziaren żelu, szybkości przepływu roztworu glukozy przez kolumnę (44).



Rys. 2. Bezodczynnikowa analiza glukozy (wg 44)

Updike i Hicks (43) sporządzili także ulepszoną elektrodę tlenową, której istotnym elementem była cienka membrana ze spolimeryzowanego bezpośrednio na niej akrylamidowego roztworu oksydazy glukozowej. Budowę jej przedstawia rysunek 3.



Rys. 3. Ulepszona elektroda tlenowa z nierozpuszczalną oksydazą glukozową (wg 43)

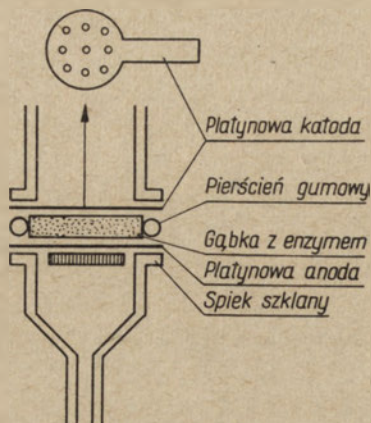
Elektrodą tą można, według autorów, dokonywać pomiarów stężenia glukozy w krwi i tkankach *in vivo* (po implantacji) lub w moczu *in vitro*.

Inne urządzenie (rysunek 4) do potencjometrycznego kontrolowania aktywności enzymatycznej zbudowali Baumani wsp. (6).

Cholinesteraza (EC 3.1.1.8), została inkludowana w żelu skrobiowym,

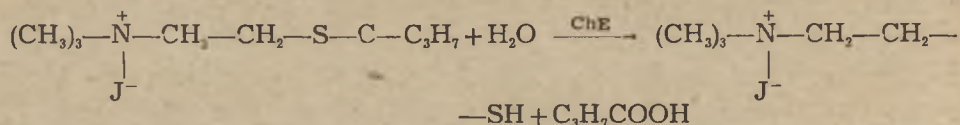


którym nawilżono porowate tworzywo poliuretanowe. Gąbka uretanowa umieszczona w pierścieniu gumowym znajdowała się pomiędzy dwiema dyskowymi elektrodami platynowymi posiadającymi kilkanaście małych otworów. Cały układ umieszczono w małym lejku ze szkła spiekanego



Rys. 4. Urządzenie do elektrochemicznego śledzenia aktywności cholinesterazy (wg 6)

i doprowadzono napięcie 24V. Podczas przepływu substratu przez złożo uretanowe z zawartą w nim nierozpuszczalną cholinesterazą ustala się po 10 minutach napięcie 150mV. Enzym katalizuje tu reakcję (II):



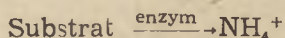
Elektrooksydacja grupy tiolowej w tiocholinie (powstałej z jodku butyrylotiocholiny) zachodzi przy 150mV. Jeśli enzym jest nieaktywny następuje reakcja utlenienia jodku do jodu i potencjał wzrasta do 400mV. Przedstawiony układ może zatem służyć do wykrywania obecności fosfoorganicznych inhibitorów cholinesterazy (np. pestycydów), jeśli w układ pompujący roztwór substratu włączy się odpowiednio dmuchawę pobierającą powietrze z otoczenia (6). Wykreślając zależność logarytmu stężenia substratu od napięcia można także oznaczać stężenie jodku acetylo- lub butyrylocholinylu.

Równoległe z opisanymi powyżej badaniami prowadzono badania w dziedzinie szklanych elektrod specyficznych dla kationów innych niż jon wodorowy (2, 33, 40, 41).

Kat z i wsp. (31, 32) zastosowali elektrodę specyficzną dla  $\text{NH}_4^+$  do potencjometrycznego śledzenia reakcji katalizowanej przez ureazę i zaproponowali użycie swojej metody do łatwego i szybkiego oznaczania mocznika (32) lub ureazy (31). Szczegółowe prace nad warunkami zasto-



sowania specyficznych elektrod szklanych do oznaczania enzymów i ich substratów podjęli Guilbault, Smith i Montalvo (27). Wykorzystano w tym celu katalizowaną przez rozpuszczalny enzym reakcję (III):



zachodzącą w naczyniu pomiarowym wyposażonym w elektrodę kalomelową oraz w elektrodę szklaną odwracalną względem  $\text{NH}_4^+$ . Opisany powyżej układ elektro-enzymatyczny pomimo zalet, jak np. szybkość i dokładność analizy, posiada także jedną zasadniczą wadę — jest zbyt drogi. Wymagane są tu bowiem duże ilości kosztownych enzymów.

Problem ten został rozwiązany z chwilą otrzymania enzymów nierozpuszczalnych (15, 29, 36), które można po zakończeniu danej reakcji ponownie użyć do katalizy następnej reakcji. Czynność ta powtarzana może być wielokrotnie.

Od tej pory prace nad elektrodami posunęły się szybko naprzód, a tematowi temu poświęcono nawet uwagę w przeglądowych artykułach enzymologicznych (29, 36) i analitycznych (17, 41).

W 1969 roku Montalvo (34) wprowadził podział elektrod enzymatycznych na elektrody substratowe i enzymowe.

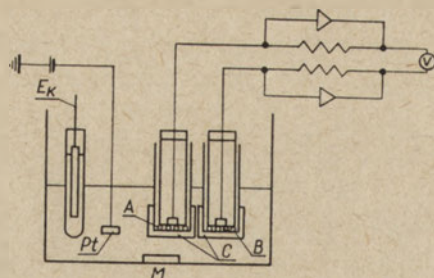
## II. Elektrody substratowe

Według nomenklatury Montalvo (34) elektroda posiadająca na swojej aktywnej powierzchni związany enzym i służąca do elektrochemicznego oznaczania stężenia substratu jest elektrodą substratową.

### 1. Elektrody glukozowe

Działanie swoje opierają one na wykorzystaniu katalitycznych własności oksydazy glukozowej. Ich pierwowzorem były omówione już układy Clarka — Lyonsa (12, 13) i Updike'a — Hicksa (43, 44). W 1970 roku Williams, Doig i Korosi (45) zbudowali urządzenie przedstawione na rysunku 5.

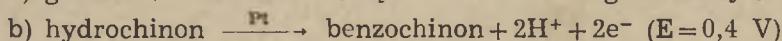
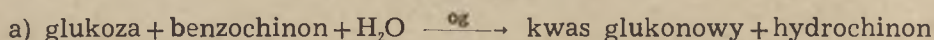
Elektroda złożona jest z czujnika elektrochemicznego (druć platynowy o powierzchni czynnej  $0,23\text{cm}^2$ ), enzymu uwięzionego w żelu lub materiale porowatym (warstwa reakcyjna) oraz błony dializacyjnej (warstwa dyfuzyjno-dializacyjna). Elektrodę umieszcza się w  $0,04\text{M}$  buforze fosforanowym o  $\text{pH}$  7,4 zawierającym  $0,026\text{M}$   $\text{NaCl}$  i  $0,004\text{M}$   $\text{KCl}$  oraz składniki reakcji enzymatycznej o wyrównanym, przy pomocy mieszaniny, stężeniu. Reagenty dyfundują poprzez błonę dializacyjną do warstwy reak-



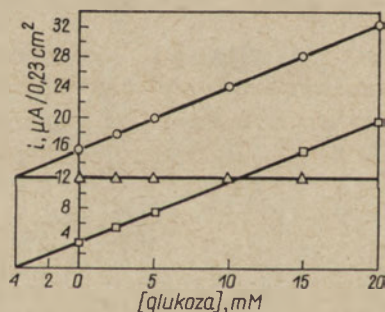
**Rys. 5.** Elektrochemiczno — enzymatyczna analiza glukozy i kwasu mlekowego w krwi (wg 45)

M — mieszadło, Ek — elektroda kalomelowa, A — warstwa reakcyjna z enzymem, utleniaczem i buforem, B — warstwa reakcyjna bez enzymu, C — błona celofanowa

cyjnej, a czujnik elektrochemiczny mierzy stacjonarne stężenie produktu elektrochemicznie aktywnego. Wykorzystano tu reakcję (IV):



w której tlen, naturalny akceptor enzymu, zastąpiony został benzochinonem. Zaletą tej metody jest, że stężenie utleniacza może być łatwo kontrolowane, a zakres oznaczanych stężeń glukozy jest szerszy niż w przypadku pomiaru zużycia tlenu. Reakcja ta będzie jednak kompetycyjnie



**Rys. 6.** Pomiar stężenia glukozy w krwi (wg 45)

Próbka krwi (50 ml) zawierała 1,4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,13g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,06g benzochinonu; warstwa enzymatyczna zawierała 0,5mg oksydazy glukozy w 0,5ml buforu fosforanowego pH 7,4  
o — enzym, Δ — ślepa, □ — różnica

hamowana przez tlen atmosferyczny, co objawia się obniżeniem natężenia prądu. Efekt ten jest niewielki przy stężeniu 100mg benzochinonu/100ml roztworu.

Podobne wyniki uzyskuje się w przypadku pomiarów dokonywanych w krwi, gdyż błona dializacyjna, zabezpieczająca enzym przed dyfuzją do roztworu, stanowi równocześnie przeszkodę dla oksyhemoglobiny. Prób-

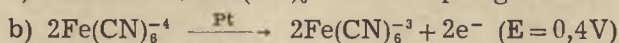


ka krwi musi być jednak zbuforowana podanym wyżej buforem fosforanowym (węglany zawarte w krwi łatwo się rozkładają, a bufony białczanowe nie przenikają przez membranę) oraz zawierać benzochinon.

Wynik takiego oznaczenia trwającego 3—10 minut, uzyskany z różnicy w natężeniu prądu elektrody z enzymem i bez enzymu, pokazuje rysunek 6.

## 2. Elektroda mleczanowa

Elektroda ta ma podobną konstrukcję do opisanej wyżej elektrody glukozowej (rysunek 5) i sporządzona została również przez Williamsa i wsp. (45). Zastosowano tutaj reakcję (V):



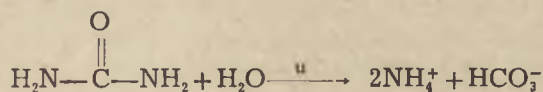
w której dehydrogenaza mleczanowa (cytochrom  $\text{b}_2$ ; EC 1.1.2.3.) w obecności żelazicyjanku utlenia mleczan do pirogonianu. Ponieważ w normalnej krwi stężenie mleczanu wynosi około 1mM a  $K_m$ —1,2mM, próbkę krwi należy rozcieńczyć. Miesza się ją w tym celu z 10mM roztworem buforowym w stosunku 20:1. Stężenie mleczanu określa się identycznie jak w przypadku elektrody glukozowej Williamsa i wsp. (45).

## 3. Elektrody mocznikowe

Elektrody te wykonane zostały po raz pierwszy przez Guilbaulta i wsp. (23, 34) i są naturalnym następstwem badań nad możliwością zastosowania amono-selektywnej elektrody szklanej do śledzenia reakcji enzymatycznej prowadzącej do powstawania jonu amonowego (27, 34).

Elektroda mocznikowa wykonana jest ze szklanej elektrody odwracalnej względem  $\text{NH}_4^+$  (*Beckman Elektrode 39137* lub *39047*), w której bańkę szklaną pokryto odpowiednio umocowaną błonką nylonową nasyconą roztworem ureazy (EC 3.5.1.5) w żelu akrylamidowym. Po polimeryzacji warstwa żelu poliakrylamidowego z zainkludowaną ureazą przylega bezpośrednio do aktywnej powierzchni szkła elektrody. Błona nylonowa wzmacnia wytrzymałość warstwy żelu oraz reguluje jej grubość, która wynosi zwykle 60—350 $\mu$  (24, 25).

Gdy elektrodę mocznikową umieści się w roztworze mocznika, substrat dyfunduje do warstwy żelu i tam zachodzi reakcja (VI):





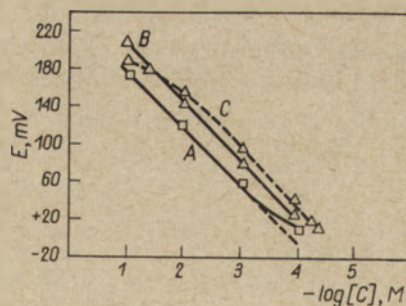
Szko elektrody uczulone jest na zmiany  $[\text{NH}_4^+]$  i cały proces oznaczenia przypomina pomiar  $\text{pH}$  przy pomocy zwykłej elektrody szklanej.

Schemat elektrody mocznikowej, nazywanej przez Guilbaulta i Montalvo (25) elektrodą typu I, przedstawia rysunek 7.



Rys. 7. Schemat elektrody mocznikowej typu I

W elektrodzie typu II warstwa żelo-enzymowa przykryta jest dodatkowo od strony badanego roztworu błoną celofanową (szko, warstwa żelu z enzymem, celofan), a w elektrodzie typu III dodano jeszcze jedną błonę celofanową okrywającą bezpośrednio powierzchnię bańki szklanej (szko, celofan, żel z enzymem, celofan). Porównanie wskazań elektrody szklanej z taką samą elektrodą, ale powleczoną warstwą żelu z inkludowaną ureazą (elektroda typu I) przedstawia rysunek 8.



Rys. 8. Wskazania różnych elektrod w zależności od stężenia chlorku amonu lub mocznika (wg 17)

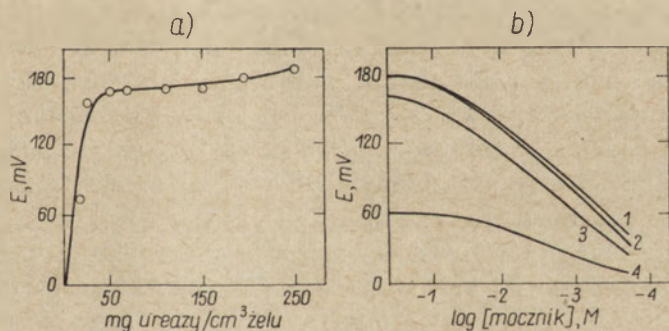
Żel poliakrylamidowy zawierał 175mg ureazy/1ml; stosowano 0,1M bufor Tris  $\text{pH}$  7,0  
A, B —  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , C — mocznik,  $\Delta$  — enzymatyczna elektroda,  $\square$  — elektroda kationowa

Na podstawie krzywych A i B widoczne jest, że wskazania elektrody typu I (w roztworze  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) są większe niż elektrody pokrytej samym żelazem lub nie pokrytej wcale oraz, że na wartość uzyskiwanego napięcia wpływ ma nie żel, a enzym w nim zawarty. Ponadto w przypadku elektrody typu I liniowy przebieg krzywej zachowany jest dla niższych wartości stężenia  $c$  jonów amonowych. Wyższa czułość tej elektrody w porównaniu z elektrodą amonową jest wynikiem tego, że inkludowany w żel enzym posiada własności kationitu (17, 25).

Liniowość wskazań elektrody mocznikowej uzyskuje się w zakresie stężeń  $10^{-3}$ — $5 \times 10^{-5} \text{M}$  mocznika. Krzywa C leży powyżej krzywej B, gdyż mocznik hydrolizując dostarcza dwa jony  $\text{NH}_4^+$ . Teoretycznie różnica odległości pomiędzy tymi krzywymi powinna wynosić 15mV wynosi jednak tylko 9mV (17).

Należy dodać, że przed każdym kolejnym pomiarem E, w różnym  $\text{NH}_4^+$ , elektrodę mocznikową automatycznie przepłukuje się od zanieczyszczeń jonami amonowymi (25, 34).

Wskazania E są dla elektrody prawie natychmiastowe, ale zależne od grubości żelu poliakrylamidowego zawierającego ureazę. Dla warstwy o grubości  $60\mu$  czas uzyskania wskazania 98% E wynosi 26sek, a dla  $350\mu$  — 59sek, jeśli pomiary wykonywano w  $8,33 \times 10^{-2} \text{M}$  mocznika, a na 1ml żelu poliakrylamidowego przypadało 175mg ureazy. Podobne wyniki uzyskiwano dla elektrod typu II i III. Dla elektrody nie pokrytej żelazem



Rys. 9. Wpływ stężenia ureazy w żelu na wskazania elektrod mocznikowej (typ I) przy: a) stałym stężeniu mocznika b) zmiennym stężeniu mocznika (1 — 233, 2 — 175, 3 — 140, 4 — 8 mg ureazy/ml żelu) (wg 17, 25)

czas odpowiedzi wynosi 23sek. Sprawdzone także wpływ składu i usieciowania żelu poliakrylamidowego (przy stężeniu ureazy 175mg/1ml żelu) na uzyskiwane wartości potencjału. W badanych warunkach różnice w pomiarach elektrodami o różnych żelach nie przekraczały 2% (25). Dla sprawdzenia wpływu stężenia ureazy w żelu na własności elektrody mocznikowej wykonano elektrody o  $250\mu$  warstwie żelu zawierającej ureazę w stężeniach od 8—292mg enzymu/ml żelu.



Wynik doświadczenia przedstawia rys. 9b, z którego wynika, że ze wzrostem stężenia enzymu rośnie nachylenie krzywej, ale przy dużych stężeniach ureazy następuje tylko niewielki przyrost aktywności warstwy enzymowej. Natomiast z rys. 9a wynika, że przy ustalonym stężeniu mocznika maksymalną wartość  $E$  osiąga się przy 20mg ureazy/1ml żelu. Powyżej tego stężenia przyrost  $E$  jest już mały (25).

Istotną własnością elektrody mocznikowej jest jej stabilność. Czynniki, które między innymi wpływają na trwałość i aktywność elektrody są: stężenie mocznika, aktywność i stężenie ureazy w żelu, czas przechowywania roztworu żelu przed polimeryzacją, skład, rodzaj i grubość warstwy żelu, czas, temperatura i intensywność światła fotopolimeryzacji, typ elektrody (25). Nie omawiając dokładniej tych czynników należy zaznaczyć, że elektroda typu I nadaje się do użycia jeszcze po 14 dniach, a elektroda typu II i III, w której celofan zapobiega wymywaniu się enzymu do roztworu, stabilna jest 21—30 dni.

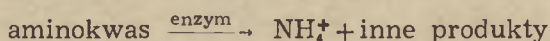
Okazało się także, że spośród 10 stosowanych elektrod mocznikowych, wskazania 9 były zgodne między sobą z dokładnością do 3—5% (21).

Niedogodnością użycia elektrody mocznikowej jest konieczność dokonywania pomiarów w buforze zawierającym Tris, gdyż działanie jej zakłóca obecność jonów sodowych i potasowych oraz srebrowych (92). Jony  $Ag^+$  inaktywują ureazę, a gdy  $[Na^+]$  jest większe od połowy stężenia mocznika lub gdy  $[K^+]$  jest większe od jednej piątej stężenia mocznika, to elektroda zaczyna mierzyć stężenie tych kationów. Jeśli stężenia  $Na^+$  i  $K^+$  nie przekraczają  $10^{-4}M$ , to stosując zamiast elektrody kalomelowej elektrodę szklaną (taką samą jaką użyto do budowy elektrody mocznikowej), osiągnąć można zadowalające wskazania elektrody enzymatycznej (17). Interferujący wpływ większych stężeń jonów jednododatnich usunąć można przez dodanie kationitu (np. *Dowex 50 W*  $\times$  8) do badanego roztworu lub przez zastąpienie błony dializacyjnej w elektrodzie typu II membraną jonowymienną (22, 25).

Elektrodę mocznikową zastosowano z powodzeniem do pomiaru stężenia mocznika w krwi i moczu *in vitro* (22). Uzyskane wartości różnią się średnio o 2,3—2,8% od wartości otrzymanych metodą spektrofotometryczną, ale są bardziej powtarzalne niż te ostatnie (22). Użycie mikroelektrod pozwala oznaczyć mocznik w 0,1ml krwi i moczu w obecności 0,2g jonowymieniacza i 5ml buforu (22).

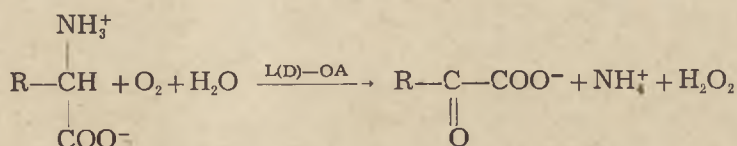
#### 4. Elektrody do oznaczania aminokwasów

Elektrody te wykonane są w sposób analogiczny do elektrody mocznikowej. Stosuje się tu także elektrodę szklaną czułą na jony amonowe, które powstają w reakcji (VII):

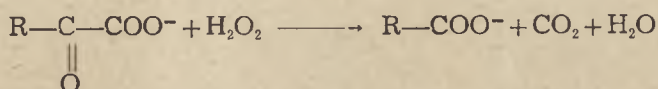




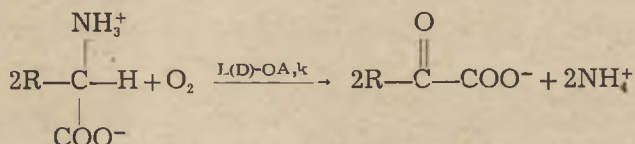
Jeśli enzymem jest oksydaza L- lub D-aminokwasowa (EC 1.4.3.2 lub 1.4.3.3), to reakcja (VIII) zachodząca w warstwie enzymatycznej elektrody aminokwasowej (19, 20) ma przebieg:



Następnie zachodzi nieenzymatyczny rozkład  $\alpha$ -ketokwasu (IX):

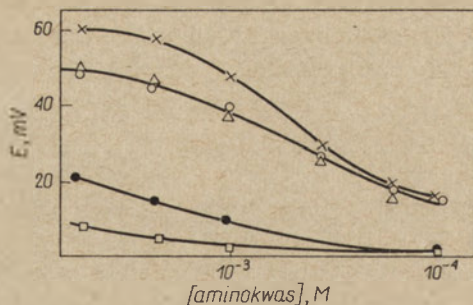


Jeśli w elektrodzie do warstwy enzymatycznej doda się katalazę, to uzyskuje się ulepszoną elektrodę enzymatyczną (20), a sumaryczna reakcja przedstawia się następująco (X):



Elektroda aminokwasowa typu I odpowiada w konstrukcji mocnikowej elektrodzie typu II. W elektrodzie aminokwasowej typu II siatka nylonowa napojona jest roztworem enzymu i pokryta błoną dializacyjną. Elektrodę tę nazywają autorzy także „ciekłą elektrodą membranową” (20). Elektroda typu II jest łatwiejsza w budowie (nie jest wymagana polimeryzacja) i bardziej stabilna, gdyż spadek potencjału mierzonego tą elektrodą wynosi 0,13mV/dzień, a elektrodą typu I — 2,5mV/dzień dla  $2 \times 10^{-4}\text{M}$  roztworu L-fenylalaniny w 0,1M buforze Tris pH 7,2 i przy 100mg L-OA/ml żelu. Na stabilność elektrody mają wpływ temperatura, pH, stężenie enzymu i substratu, rodzaju buforu, obecność tlenu. Niemniej, w optymalnych warunkach stabilność elektrody typu II wynosi 2 tygodnie (17) i związana jest prawdopodobnie z faktem, że konstrukcja jej wyklucza częściową denaturację enzymu jaka zachodziłaby podczas fotopolimeryzacji akrylamidu.

Elektrodę L-aminokwasową (z L-OA w warstwie enzymatycznej) zastosowano do oznaczania L-fenylalaniny, L-leucyny, L-metioniny, L-alaniny, L-proliny. Z uwagi na różną specyficzność enzymu w stosunku do wymienionych substratów reakcja enzymatyczna zachodzi z różną szybkością i czułość elektrody jest inna dla różnych aminokwasów (rysunek 10).

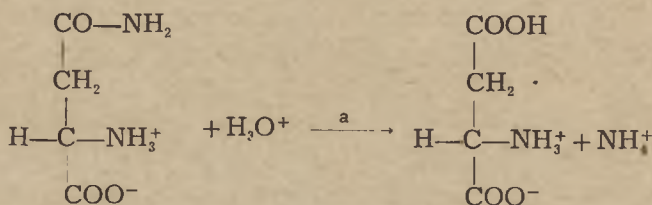


**Rys. 10.** Krzywa kalibracyjna dla elektrody L-aminokwasowej (typ II) w 0,1 M buforze Tris pH 7,2 (wg 20)

x-x — L-fenylalanina, Δ-Δ — L-leucyna, o-o — L-metionina, ●-● — L-alanina, □-□ — L-prolina

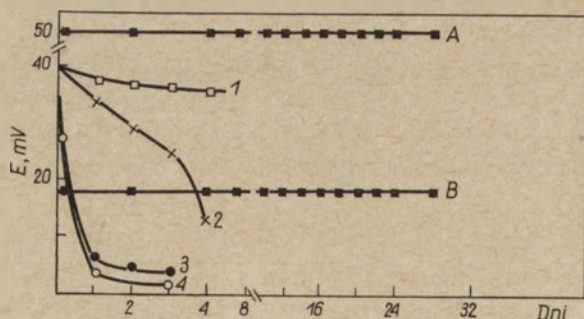
Zależność potencjału od lg stężenia aminokwasu jest liniowa jeśli stężenie to jest niższe od  $K_m$ , ale wyższe od  $10^{-4}M$  (19).

Elektroda asparaginowa (22) wykorzystuje reakcję katalizowaną przez asparaginazę (EC 3.5.1.1.; reakcja XI):



W tym przypadku jednak okazało się, że stabilność elektrody jest wyższa dla elektrody typu I (rysunek 11) i elektroda nadaje się do użycia przez okres 3—4 tygodni (22).

Podobnie przedstawia się stabilność elektrody D-aminokwasowej (22). Zwiększenie trwałości elektrody zyskuje się jednakże nie tylko przez poli-



**Rys. 11.** Stabilność elektrody typu I: D-aminokwasowej krzywe 1—4) i L-asparaginowej (krzywe A i B) (wg 22)

Stosowano 0,1M bufor trisowy pH 8,0. 1— $2,5 \times 10^{-4}M$  FAD, 2— $5 \times 10^{-5}M$  FAD, 3— $2 \times 10^{-6}M$  FAD, 4— $0M$  FAD; A —  $2 \times 10^{-3}M$  asparagina, B —  $2 \times 10^{-4}M$  asparagina







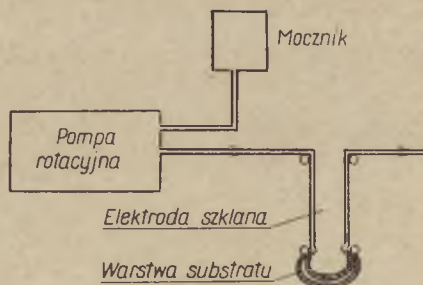
(np.  $\text{NH}_4^+$ ). Dodać jednak trzeba, że elektroda B a u m a nie posiada jako części składowej warstwy enzymatycznej. Służy natomiast jako elektroda substrato-selektywna (4) do oznaczania acetylocholinesterazy w roztworze. Przy jej pomocy wyznaczono także stałą Michaelisa dla acetylocholinoliny (5).

### III. Elektrody enzymowe

Zgodnie z propozycją M o n t a l v o (34) elektroda posiadająca na swojej aktywnej powierzchni związany specyficzny substrat i służąca do elektrochemicznego śledzenia reakcji enzymatycznej, a tym samym do oznaczania stężenia (aktywności) enzymu, jest elektrodą enzymową.

#### 1. Elektrody ureazowe

Pierwszą elektrodę do oznaczania aktywności ureazowej i zarazem pierwszą elektrodę enzymową, skonstruował w 1969 r. M o n t a l v o (34). Składała się ona z kationowej elektrody Beckman 39137 pokrytej błoną nylonową o grubości  $150\mu$  i błoną celofanową grubości  $15\mu$ . Z boku elektrody, nad bańką szklaną, pomiędzy szkłem i tworzywem nylonowym, umieszczono dwie rurki nylonowe. Pod ciśnieniem grawitacyjnym przepływa przez nie mocznik zapewniając stałe stężenie substratu. Jeśli elektrodę umieścić w roztworze ureazy, mocznik dyfunduje do roztworu i ulega hydrolizie enzymatycznej (reakcja VI). Powstałe jony amonowe przenikają poprzez celofan do przestrzeni przyelektrodowej co powoduje zmianę potencjału amono-czułej elektrody względem elektrody porównawczej. Ulepszoną elektrodę ureazową przedstawia rysunek 12.



Rys. 12. Schemat ureazowej elektrody M o n t a l v o (wg 35)

Tworzywo nylonowe jest w tej elektrodzie umieszczone między dwiema warstwami celofanu, a stałe stężenie mocznika zapewnia pompa (35). Oznaczenie ureazy przy pomocy elektrody ureazowej zależy od szybkości

przepływu mocznika w przestrzeni między szkłem a celofanem, od stężenia i objętości mocznika w warstwie substratowej, mieszania roztworu ureazy. Zależność uzyskiwanego potencjału od logarytmu stężenia enzymu (wyrażonego w jedn. Sumnera/ml) zmienia się liniowo w zakresie  $6 \times 10^{-4}$ — $10^{-1}$  jedn./ml. Czulość oznaczeń aktywności ureazy tą metodą jest powtarzalna i duża. Zwiększa się, jeśli roztwór jest mieszany podczas pomiaru. Czas oznaczenia wynosi 3—5 minut. Oznaczenie ureazy może być przeprowadzone przy użyciu  $30 \mu\text{l}$   $0,5\text{M}$  mocznika, tzn. jedynie  $900 \mu\text{g}$  substratu. Miniaturyzacja elektrody (przy zastosowaniu elektrody typu *Beckman 39047*) pozwala wykonać to samo oznaczenie z  $67 \mu\text{g}$  mocznika (35).

#### IV. Uwagi końcowe

Omówione powyżej wyniki prac doświadczalnych nad zastosowaniem elektrochemii do oznaczeń enzymatycznych i odwrotnie pozwalają wnioskować, że elektrody enzymatyczne staną się już wkrótce jeszcze jednym narzędziem pracy współczesnego laboratorium analitycznego.

Elektrody substratowe wymagają do działania niewielkich ilości enzymu, gdyż wykorzystanie w ich konstrukcji własności enzymów nierozpuszczalnych (15, 29, 38, 41) umożliwia wielokrotne ich użycie. Ważne to jest z uwagi na obserwowany obecnie rozwój enzymatycznych metod analitycznych (1, 16). Ponadto czulość, powtarzalność i szybkość wykonanych przy ich pomocy oznaczeń dorównuje lub niejednokrotnie przewyższa oznaczenia dokonywane metodami kolorymetrycznymi lub potencjometrycznymi (4, 17, 26, 31, 32, 45). W chwili obecnej jedynym ograniczeniem szerokiego ich stosowania w chemii analitycznej jest brak odpowiednio specyficznych elektrod. Osiągnięcia *B a u m a* (3—5) z acetylocholino-selektywną elektrodą wskazują, że trudności te będą pokonane w przyszłości.

Podobnie elektrody enzymowe umożliwiają powtarzalne i dokładne oznaczenie aktywności enzymu. Wymagane ilości substratu w tej metodzie są zminimalizowane i niezależne od objętości badanego roztworu enzymu, a czas oznaczenia jest krótki (35). Mały wybór jono-selektywnych elektrod jest powodem niewielkiego rozpowszechnienia elektrod enzymowych w badaniach biochemicznych. Niemniej połączenie własności nierozpuszczalnej cholinesterazy (18) i elektrody acetylocholino-selektywnej (3) doprowadzić powinno do stworzenia nowej elektrody enzymatycznej.

Postęp w miniaturyzacji elektrod (7, 9, 13, 28, 37) i ich implantacji do tkanek (7, 12, 28) oraz rozwój elektrod membranowych złożonych z membran jonowymiennych (9, 40, 41, 42) pozwala przypuszczać, że w przyszłości uda się dokonywać ciągłego pomiaru stężenia enzymów i metabolitów w krwi *in vivo* przy pomocy odpowiednio zmodyfikowanej



elektrody enzymatycznej. W ten sposób otwierałyby się szerokie perspektywy dla badań histologów, fizjologów, lekarzy.

Elektroda mocznikowa mogłaby np. służyć jako czuły wskaźnik efektywności działania ureazowych mikrokapsulek  $\text{C h a n g a}$  (8, 10) w sztucznej nerce (11). Natomiast elektroda glukozowa mierząca stężenie glukozy w tkankach *in situ* niewątpliwie stałaby się użyteczna w diabetologii.

Stworzenie urządzeń wykorzystujących jednocześnie oba typy elektrod enzymatycznych: substratową i enzymową, będzie zapewne uwieńczeniem możliwości zastosowania tych elektrod.

#### Podziękowania:

Autor wyraża serdeczne podziękowanie Profesorowi dr W. Ostrowskiemu z Instytutu Biochemii Lekarskiej AM w Krakowie za życzliwe uwagi i dyskusję w trakcie przygotowywania artykułu. Równocześnie dziękuję Prof. G. G. Guilbault z *Louisiana State University* w Nowym Orleanie, USA, za udostępnienie źródłowych prac i pozwolenie na wykorzystanie wykresów tam publikowanych.

#### LITERATURA

1. Asatiani V. S., Fermentnyjne metody analiza, Nauka, Moskwa, 1969.
2. Bates R. G., Opriedielenije *pH*, Chimija, Leningrad 1969, str. 319.
3. Baum G., *Anal. Letters* **3**, 105 (1970).
4. Baum G., *Anal. Biochem.* **39**, 65 (1971).
5. Baum G., Ward F. B., *Anal. Biochem.* **42**, 487 (1971).
6. Bauman E. K., Goodson L. H., Guilbault G. G., Kromer D. N., *Anal. Chem.* **37**, 1378 (1965).
7. Bielawski J., *Post. Biochem.* **17**, 565 (1971).
8. Bolewski K., Rychły B., Zastosowanie polimerów i biopolimerów w farmacji i medycynie. PZWL, Warszawa 1971, str. 174.
9. Carr C. W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 180 (1968).
10. Chang T. M. S., *Science* **146**, 524 (1964).
11. Chang T. M. S., Gonda A., Dirks J. R., Malave N., *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs* **17**, 171 (1971).
12. Clark L. C., Jr., Lyons C., *Ann. N.Y., Acad. Sci.* **102**, 29 (1962).
13. Clark L. C., Jr., Sachs G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 133 (1968).
14. Cremer M., *Z. Biol.* **47**, 562 (1906).
15. Crook E. M., *FEBS Symposia* **19**, 297 (1969).
16. Guilbault G. G., *Anal. Chem.* **40**, 459R (1968).
17. Guilbault G. G., *Pure Appl. Chem.* **25**, 727 (1971).
18. Guilbault G. G., Das J., *Anal. Biochem.* **33**, 341 (1970).
19. Guilbault G. G., Hrabankova E., *Anal. Letters* **3**, 53 (1970).
20. Guilbault G. G., Hrabankova E., *Anal. Chem.* **42**, 1779 (1970).
21. Guilbault G. G., Hrabankova E., *Anal. Chim. Acta* **52**, 287 (1970).
22. Guilbault G. G., Hrabankova E., *Anal. Chim. Acta* **56**, 285 (1971).
23. Guilbault G. G., Montalvo J. G. Jr., *Anal. Letters* **2**, 283 (1969).
24. Guilbault G. G., Montalvo J. G. Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2164 (1969).
25. Guilbault G. G., Montalvo J. G., Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2533 (1970).



26. Guilbault G. G., Shu F. R., *Anal. Chim. Acta* **56**, 533 (1971).
27. Guilbault G. G., Smith R. K., Montalvo J. G., Jr., *Anal. Chem.* **41**, 600 (1969).
28. Greatbatch W., Chardack W. M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 234 (1968).
29. Gryszkiewicz J., *Folia Biol.* **19**, 119 (1971).
30. Haber F., Klemensiewicz Z., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **67**, 385 (1909).
31. Katz S. A., *Anal. Chem.* **36**, 2500 (1964).
32. Katz S. A., Rechnitz G. A., *Z. Anal. Chem.* **196**, 248 (1963).
33. Modrzejewski B., *Pomiary pH*, WNT, Warszawa 1971, str. 270.
34. Montalvo J. G., Jr., *Anal. Chem.* **41**, 2093 (1969).
35. Montalvo J. G., Jr., *Anal. Biochem.* **38**, 357 (1970).
36. Montalvo J. G., Jr., Guilbault G. G., *Anal. Chem.*, **41**, 1897 (1969).
37. Moore E. W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 93 (1968).
38. Mosbach K., *Sci. Am.* **224**, 26 (1971).
39. Pungor E., *Anal. Chem.* **39**, 28A (1967).
40. Rechnitz G. A., *Chem. Eng. News.* **45** (25), 146 (1967).
41. Simon W., *Pure Appl. Chem.* **25**, 811 (1971).
42. Sollner K., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 154 (1968).
43. Updike S. J., Hicks G. P., *Nature* **214**, 986 (1967).
44. Updike S. J., Hicks G. P., *Science* **158**, 270 (1967).
45. Williams D. L., Doig A. R., Jr., Korosi A., *Anal. Chem.*, **42**, 118 (1970).



Aleksandra Kubicz \*

## Kwaśne fosfatazy — heterogenność, budowa chemiczna oraz właściwości fizyko-chemiczne

### Acid Phosphatases, their Heterogeneity, Structure and Properties

Multiple forms of acid phosphatases from animal, plant and microorganism sources are described and the basis of heterogeneity of some of them is explained. The biological role of the unspecific acid phosphatases is discussed.

#### I. Wstęp

Kwaśne fosfatazy (fosfohydrolazy monoestrów ortofosforowych, EC 3.1.3.2) zostały wyosobnione w różnym stopniu oczyszczenia z wielu tkanek pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz z mikroorganizmów. Do bliżej scharakteryzowanych należą kwaśne fosfatazy wyizolowane z prostaty ludzkiej (13, 47, 48, 50), z wątroby wołu (23) oraz szczura (28), z łożyska ludzkiego (15, 16, 17), z erytrocytów ludzkich (54, 64, 65), ze śledziony wieprza (10), z liści tytoniu (55), z kiełków fasoli (19) oraz pszenicy (62), z *Escherichia coli* (24, 26), z *Neurospora crassa* (35) i z *Fusarium monili forme* (66).

Kwaśne fosfatazy cechuje mała specyficzność wobec substratów fosfomonoestrowych, a wiele z nich przejawia również aktywność transferazową (kwaśne fosfatazy z drożdży (14), z owoców cytrusowych (8), z prostaty (7, 8, 43), z erytrocytów ludzkich (30), z erytrocytów królików (9) i z *Neurospora crassa* (35)).

Spośród fosfomonoestrów, prócz typowych substratów, takich jak fenylfosforan, *p*-nitrofenylfosforan i  $\beta$ -glicerofosforan, ulegają hydrolizie pod wpływem kwaśnych fosfataz również glukozo- i fruktozofosforany, a wiele spośród tych enzymów przejawia dużą aktywność nukleotydazową (tablica 1), co zostało wykorzystane do oznaczania sekwencji nukleotydów oraz określania długości łańcucha polinukleotydowego (53).

---

\* Dr, Zakład Biochemii Molekularnej, Instytut Botaniki i Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław.

Wykaz stosowanych skrótów: DTT — dwutiotreitol;  $\beta$ -Me —  $\beta$ -merkaptioetanol; p-CMB — p-chlorortęciobenzoesan



## Specyficzność substratowa kwaśnych fosfatyz pochodzących z różnych źródeł

Lp.	Źródło enzymu	Substrat	p-NPP	PP-Na	$\beta$ -GP	$\alpha$ -GP	5'-AMP	3'-AMP	2'(3')-AMP	2'(3')-CMP	2'(3')-UMP
1.	Prostata ludzka	Kwaśna fosfataza I	100		60	21	35	107			
	"	"	II	100	83	30	48	122			
2.	Łożysko ludzkie	Kwaśna fosfataza I	100								
	"	"	II	100							
	"	"	III	100		10					
3.	Wątroba wołu	Kwaśna fosfataza III	100		0	3	0				
4.	Wątroba szczura	Kwaśna fosfataza I	100		33		20				
	"	"	II	100	35		27				
5.	Krwinki ludzkie	forma molekul. E <sub>2</sub> <sup>B</sup>	100	75		28					
	"	"	E <sub>3</sub> <sup>B</sup>	100	74	40					
	"	"	E <sub>4</sub> <sup>B</sup>	100	71	37					
	"	"	E <sub>5</sub> <sup>B</sup>	100	73	43					
	"	"	E <sub>7</sub> <sup>B</sup>	100	76	39					
6.	Śledziona z wieprza		100		60		63		196		
7.	Zarodki pszenicy	Kwaśna fosfataza I	100								
	"	"	II	100							
	"	"	III	100							
8.	Liście tytoniu		90	91	59	51	22	62			
9.	<i>Fusarium moniliforme</i>	kwaśna fosfataza I	100		<1		8		38		
	"	"	II	100	1,2		6		44	14	14
10.	<i>Aspergillus ficuum</i>	kwaśna fosfataza I	100		62						
	"	"	II	1,2	0						
11.	<i>Staphylococcus aureus</i>		100							10,4	
12.	<i>Escherichia coli</i> (niesp. kw. fosfataza)		100				3	21			
13.	<i>Neurospora crassa</i>				94	100	30	35	30	24	16

\* Aktywność wyrażono jako procent  $\mu$ moli  $P_i$  zwolnionego z różnych substratów w stosunku do  $P_i$  zwolnionego z p-NPP, lub ATP (w przypadku kwaśnej fosfatazy z liści tytoniu) i  $\alpha$ -GP (w przypadku *Neurospora crassa*).

Tablica 1

5-fosforan ryboflawiny	G-1-P	G-6-P	F-6-P	F-1, 6-P	R-5-P	ATP	bis p-NPP	Pirofosforan	Substrat specyficzny	Litera- tura
	2 5	1 2		2 3		0 1	2 3	1 2		57
	4 <2	3 9 3		27 <5		18 <1		8 3	3-fosforan- 17-β-estradolu 120	15
	14	4	4		2		0	0		23
	7 5	5 2		15 14		0 0		0 0		28
				—					fosforan- 112 4-metyloum- 105 biliferonu 100 116 106	64
29	9					0	0			10
						112 93 109		225 225 150		62
	21	36	42			100	6	97		55
	<2 <1	<0.5 <0.5				19 26	58	60 54	cykliczny 2'3'-AMP 23	66
74 5,5	57 2,6	97 5,5	86 2,6	76 5,5	43 2,6	64 1,2			fosforan kwasu 26 fitynowego 18	18 56
		3,5	38	13,8	0	0		0		40
	1,6	8,2	16			3		0		18
96	23	45	66		28	0		0		35

Niektóre właściwości fizyko-chemiczne kwaśnych fosfatyz pochodzących z różnych źródeł

L.p	Źródło enzymu	Ilość form molek.	Ciężar cząsteczkowy	Optimum pH	Aktywatory
1.	Prostata ludzka Kwaśna fosfataza I	2	102 000	4,5—6,0	
2.	Łożysko ludzkie Kwaśna fosfataza I " " II " " III	3	200 000 105 000 35 000	5,5 4,0 5,5	
3.	Wątroba wołu Kwaśna fosfataza niskocząsteczkowa	3	16 590	5,5	
4.	Wątroba szczura Kwaśna fosfataza I	2	100 000		
5.	Serce szczura Kwaśna fosfataza rozpuszczalna  Kwaśna fosfataza nierozpuszczalna			5,6—5,8  4,8—5,0	Mg <sup>2+</sup> (b. słabo) Mg <sup>2+</sup> (znacznie)
6.	Śledziona z wieprza		prawdopodobnie około 100 000	3,0—4,8	
7.	Erytrocyty ludzkie	7	13 000	5,6—6,0	
8.	Kiełki fasoli	2	55 000		
9.	Zarodki z pszenicy Kwaśna fosfataza I " " II " " III	3	55 000	5,5 4,5 4,0	EDTA
10.	Liście tytoniu			5,5—5,7	
11.	Ziemniaki Kwaśna fosfataza III	3	98 000	5,3—6,5	L-cysteina (b. słabo) β-Me, DTT
12.	<i>Neurospora crassa</i>			5,4—5,6	
13.	<i>Fusarium moniliforme</i> Kwaśna fosfataza II	2		5,3	
14.	<i>Aspergillus ficuum</i> Kwaśna fosfataza I " " II	2		2,0 5,5	
15.	<i>Staphylococcus aureus</i>		58 000	5,2—5,3	Cu <sup>2+</sup> β-Me
16.	<i>Escherichia coli</i>		13—14000	4,7	
17.	<i>Escherichia coli</i> niespec. kwaśna fosfataza	2		5,0	



Tablica 2

Inhibitory	Czynniki nie wpływające na aktywność enzymatyczną	Literatura
$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{MoO}_4^{2-}$ , L(+) winian, <i>p</i> -CMB	-	2, 59 13
$\text{F}^{1-}$ , $\text{MoO}_4^{2-}$ L(+) winian, <i>p</i> -CMB (nieznacznie) $\text{F}^{1-}$ , $\text{MoO}_4^{2-}$ L(+) winian (b. silnie), <i>p</i> -CMB (nieznacznie) <i>p</i> -CMB (całk.) jodoctan	L(+) winian, $\text{F}^{1-}$	15
$\text{Mg}^{2+}$ , $\beta$ -Me		23
$\text{F}^{1-}$ , L(+) winian	EDTA	28
$\text{Ca}^{2+}$ (nieznacznie), $\text{F}^{1-}$ (częściowo) $\text{F}^{1-}$ (całkowicie)	$\text{Ca}^{2+}$	38
$\text{Mg}^{2+}$ (słabo), $\text{Mo}^{+2}$ , $\text{F}^{1-}$ , L(+) winian	L-cysteina, EDTA	10
$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{F}^{1-}$ , Formaldehyd	L(+) winian	64,65
$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$		19
L(+) winian (silnie) $\text{MoO}_4^{2-}$ L(+) winian, L-cysteina, <i>p</i> -CMB $\text{F}^{1-}$ L(+) winian, L-cysteina, <i>p</i> -CMB $\text{PO}_4^{3-}$	$\text{Mg}^{2+}$ , $\beta$ -Me, L-cyst. <i>p</i> -CMB $\text{Mg}^{2+}$ , $\beta$ -Me, EDTA $\text{Mg}^{2+}$ , $\beta$ -Me, EDTA	62
$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{F}^{1-}$ , $\text{MoO}_4^{2-}$	$\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ EDTA, <i>p</i> -CMB, L-cysteina	55
$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{MoO}_4^{2-}$	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , EDTA	5,37 )
$\text{F}^{1-}$ , L(+) winian, <i>p</i> -CMB		35
$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Mo}^{2+}$ , $\text{F}^{1-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ba}^{2+}$ , EDTA $\beta$ -Me	66
		56, 39, 40
EDTA, $\text{F}^{1-}$ , jodoctan, $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$	L (+) winian	48
		24
$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	18

Kwaśne fosfatasy znacznie różnią się zdolnością hydrolizowania wielu ufosforylowanych związków. Zwierzęce kwaśne fosfatasy hydrolizują zwykle najlepiej *p*-nitrofenylofosforan a nie rozszczepiają wiązania pirofosforanowego. Roślinne natomiast, są najbardziej aktywne względem *p*-nitrofenylofosforanu oraz nieorganicznego pirofosforanu. Ponadto wiele spośród kwaśnych fosfataz wyróżnia się preferencyjną aktywnością wobec szczególnego substratu, co pozwala je odróżnić od innych kwaśnych fosfataz. Np. kwaśna fosfataza z krwinek ludzkich najszybciej rozkłada fosforan 4-metyloumbiliferonu (64), kwaśna fosfataza III z łożyska ludzkiego przejawia dużą aktywność wobec 3-fosforanu 17- $\beta$ -estradiolu (16), kwaśna fosfataza z *Fusarium moniliforme* hydrolizuje cykliczny 2'3'-AMP (66), a kwaśna fosfataza z *Aspergillus ficuum* rozszczepia estry fosforowe kwasu fitynowego (56). Specyficzność substratową kwaśnych fosfataz pochodzących z różnych źródeł przedstawiono w tablicy 1.

Szeroki wachlarz hydrolizowanych substratów jest cechą charakterystyczną dla kwaśnych fosfataz, gdyż w wielu wypadkach przedstawiono wystarczającą ilość dowodów na to, że tylko jeden enzym jest odpowiedzialny za przejawienie tych aktywności (10, 23, 28).

Kwaśne fosfatasy odmiennego pochodzenia różnią się również optimum *pH*, aktywatorami oraz wrażliwością wobec inhibitorów. Niektóre właściwości kwaśnych fosfataz pochodzących z różnych źródeł przedstawiono w tablicy 2.

Kwaśne fosfatasy wykazują duże zróżnicowanie pod względem ciężarów cząsteczkowych. Na podstawie dotychczas znanych ciężarów cząsteczkowych kwaśnych fosfataz można je podzielić na trzy grupy:

1. Kwaśne fosfatasy niskocząsteczkowe, o ciężarach od 13 000 do 16 000 daltonów (z *E. coli*, z krwinek ludzkich, z wątroby wołu).
2. Kwaśne fosfatasy o pośrednim ciężarze cząsteczkowym, od 35 000 do 55 000 daltonów (z kiełków fasoli i zarodków pszenicy, ze *Staphylococcus aureus*, kwaśna fosfataza III z łożyska ludzkiego).
3. Kwaśne fosfatasy o wysokim ciężarze cząsteczkowym, około 100 000 (z ludzkiej prostaty, wątroby szczura, śledziony wieprza, kwaśna fosfataza II z łożyska ludzkiego oraz kwaśna fosfataza III z ziemniaka).

Nasuwa się podejrzenie, że kwaśne fosfatasy o wysokim ciężarze cząsteczkowym mogą składać się z dwóch podjednostek. Taką budowę zaobserwowano dotychczas u kwaśnej fosfatazy z ziemniaka (34), *Physarum polycephalum* (M. Wolny — doniesienie prywatne) oraz prawdopodobnie u kwaśnej fosfatazy ze sterczu ludzkiego (13).

Różnice w ciężarach cząsteczkowych nie mogą być jednak kryterium podziału filogenetycznego, ponieważ kwaśne fosfatasy nisko- i wyskocząsteczkowe występują na każdym stopniu rozwoju filogenetycznego, a nawet w obrębie jednej tkanki (np. w wątrobie, nerkach oraz śledzionie wołu i wieprza (23) i w łożysku ludzkim, (15)).



## II. Heterogenność i budowa chemiczna kwaśnych fosfatyz

Wiele kwaśnych fosfatyz, zarówno zwierzęcych, roślinnych jak i pochodzących z mikroorganizmów, występuje pod postacią kilku form molekularnych. Większość obserwacji dotyczy elektroforetycznej niejednorodności tego enzymu. Tylko dla niewielu kwaśnych fosfatyz znane są podstawy molekularne ich heterogenności, a w bardzo nielicznych przypadkach wyosobniono czyste formy.

Wśród dotychczas opisanych heterogennych kwaśnych fosfatyz można odróżnić następujące rodzaje różnych form molekularnych (klasyfikacja oparta na ostatnich zaleceniach Komisji do Nomenklatury Biochemicznej (11)):

alleliczne warianty genetyczne — np. kwaśne fosfatazy u muchy domowej (46) i *Tetrahymena pyriformis* (3),

warianty polimeryczne — np. kwaśne fosfatazy z łożyska ludzkiego (15),

formy molekularne powstałe na skutek przyłączenia innych cząsteczek — np. kwaśna fosfataza ze sterczu ludzkiego (49, 57),

warianty konformacyjne — np. kwaśne fosfatazy z krwinek ludzkich (22, 64).

Budowa chemiczna kwaśnych fosfatyz oraz ich grupy funkcyjne zostały poznane w nielicznych przypadkach. Głównym problemem w tych badaniach są trudności związane w uzyskaniu odpowiednio czystych preparatów, zawierających tylko jedną formę molekularną kwaśnej fosfatyz. Dotychczas uzyskano homogenne formy molekularne kwaśnych fosfatyz z wątroby szczura (28) i wołu (23), z prostaty ludzkiej (13, 48, 50) z *Escherichia coli* (24), z *Fusarium moniliforme* (66) oraz z kiełków fasoli (19).

### 1. Kwaśne fosfatazy zwierzęce

Przykładem allelicznych wariantów genetycznych są izoenzymy kwaśnej fosfatyz u muchy domowej (46). Po elektroforezie na żelu agarowym kwaśna fosfataza występowała u dorosłych okazów much w postaci dwóch grup izoenzymów różniących się szybkością wędrowania w kierunku anody, a każda z nich składa się z kilku form molekularnych. Badania genetyczne wykazały, że obie grupy izoenzymów jako całość („szybsza” oraz „wolniejsza”) są wytworem dwóch różnych alleli tego samego locus genetycznego, natomiast formy molekularne występujące w obrębie tych grup powstały pod kontrolą tego samego genu.

Allen (3) opisał warianty genetyczne kwaśnej fosfatyz u *Tetrahymena pyriformis*. U tych pierwotniaków występuje 5 izoenzymów kwaśnej fosfatyz, które są pod kontrolą kodominujących alleli locus genetycznego P—1. Autor przypuszcza, że kwaśna fosfataza występująca u *Tetrahyme-*



na składa się z 4 podjednostek. Tetramery powstają przez asocjację 3 rodzajów dimerów: AA, BB i AB, a typy komórkowe tego pierwotniaka różnią się zdolnością syntetyzowania odpowiedniego dimeru; jedno z nich syntetyzuje jeden, inne dwa, a niektóre wszystkie typy dimerów.

Przykładem polimerycznych kwaśnych fosfataz są kwaśne fosfatazy łożyska ludzkiego, które występują jako 3 formy molekularne o różnym ciężarze cząsteczkowym. Za pomocą rozdziału na *Sefadeksie G—200 DiPetro i Zengerle* (15) wyizolowali, a następnie bliżej scharakteryzowali poszczególne formy tego enzymu. Ciężar cząsteczkowy fosfatazy I jest większy od 200 000 daltonów, fosfatazy II wynosi 105 000, a fosfatazy III — 35 000 daltonów. Optymalne wartości *pH* dla aktywności tych enzymów wynoszą odpowiednio 5,5, 4,0 i 5,5. Poszczególne enzymy różnią się wrażliwością wobec winianu, *p*-chlorortęciobenzoesu oraz jonów  $Mg^{2+}$  (tab. 2). Fosfatazy I i II są raczej typowymi, niespecyficznymi fosfohydrolazami, podczas gdy fosfataza III jest bardziej specyficzna i przejawia również dużą aktywność wobec 3-fosforanu 17- $\beta$ -estradiolu (16). Na tej podstawie *DiPetro i Zengerle* rozważają możliwość pośredniczenia tego związku w metabolizmie łożyska. Oczyszczona kwaśna fosfataza III jest silnie hamowana metalemami ciężkimi (17).

Heterogenność kwaśnej fosfatazy ze sterca ludzkiego uwarunkowana jest obecnością w cząsteczce enzymu komponenty cukrowej, a przede wszystkim kwasu sialowego. W zależności od ilości związanego kwasu, enzym ten występuje w kilku formach różniących się szybkością wędrowki w polu elektrycznym (57). *Ostrowski i in.* (49) wykazali, że neuraminidaza odszczepia od kwaśnej fosfatazy 80% kwasu sialowego co nie powoduje utraty aktywności enzymatycznej, lecz znosi heterogenność elektroforetyczną i wpływa na przesunięcie punktów izoelektrycznych poszczególnych form w kierunku wyższego *pH*.

Po rozdziale na *DEAE—celulozie* uzyskano z kwaśnej fosfatazy sterca dwa aktywne składniki (47, 49). Jeden z nich, kwaśna fosfataza I został uzyskany w homogennej formie i bliżej scharakteryzowany (13, 48, 50). *Ostrowski i wsp.* (13, 50) wykazali, że enzym ten jest glikoproteidem zawierającym w swojej cząsteczce 13 reszt cukrów obojętnych, 10 reszt heksozoamin i 6 reszt kwasu *N*-acetyloneuraminowego. Tak duża zawartość kwasu sialowego wpływa na niski punkt izoelektryczny enzymu, którego wartość wynosi 4,9. Ze składu aminokwasowego kwaśnej fosfatazy I wynika, że cząsteczka jej zawiera 16 reszt półcystyn, z których dwie występują prawdopodobnie pod postacią cysteiny. Ciężar cząsteczkowy kwaśnej fosfatazy I w *pH* 5,5 wynosi 102 000 daltonów, a w wyższych i niższych obszarach *pH* zaobserwowano dysocjację enzymu, której towarzyszy agregacja podjednostek. Autorzy nie przeprowadzali bliższych badań struktury podjednostkowej, przypuszczają jednak, że rozpad enzymu co najmniej do stadium dwóch połówek może następować bez rozerwania mostków dwusiarczkowych.

Do heterogennych form molekularnych różniących się prawdopodobnie konformacją należą kwaśne fosfatazy wyizolowane z krwinek ludzkich. Hopkinson, Spencer i Harris (25) zaobserwowali, że kwaśna fosfataza występuje w erytrocytach ludzkich w postaci kilku izoenzymów, które można rozdzielić w elektroforezie na żelu skrobiowym. Enzym ten przejawia u ludzi polimorfizm, który jest genetycznie kontrolowany. Opisano już 9 wyraźnych fenotypów, każdy z nich wykazuje obecność od 2 do 4 pasm aktywności enzymatycznej po elektroforezie na żelu skrobiowym. Hemolizaty fenotypów różnią się całkowitym poziomem aktywności enzymatycznej (26). Scott (54) oczyścił kwaśne fosfatazy z homozygotycznych erytrocytów fenotypów AA i BB i porównywał niektóre ich właściwości kinetyczne (specyficzność substratową, wpływ  $pH$  na  $V_{max}$  i  $K_M$ , wpływ temperatury, termostabilność). Różnice między kwaśnymi fosfatazami badanych fenotypów były nieznaczne, wykrywalne tylko w równoległe przeprowadzonych eksperymentach. White i Butterworth (64, 65) rozdzielili kwaśną fosfatazę erytrocytów ludzkich na DEAE-celulozie na poszczególne komponenty: fenotyp B na 5, a fenotyp BA na 7 różnych form molekularnych. Ciężary cząsteczkowe badanych komponent były jednakowe i wynosiły 13 000 daltonów. Poszczególne formy molekularne są podobne pod względem specyficzności substratowej, stopnia denaturacji cieplnej oraz trwałości wobec mocznika, różnią się jedynie optimum  $pH$ . Inkubacja z neuraminidazą nie wpływa na ich ruchliwość elektroforetyczną, a zatem heterogenność kwaśnej fosfatazy krwinek ludzkich, w odróżnieniu od kwaśnej fosfatazy z prostaty, nie jest spowodowana przyłączeniem różnych ilości kwasu sialowego do cząsteczki enzymu. Autorzy przypuszczają, że kwaśne fosfatazy ludzkich krwinek są izomerami konformacyjnymi, co zostało już wcześniej zasugerowane przez Harrisa i Hopkinsona (22).

Podstawy heterogenności pozostałych kwaśnych fosfataz, które będą przedmiotem dalszego omówienia nie są dokładnie poznane. Na ogół, z kilku form molekularnych dokładniejszym badaniom chemicznym została poddana tylko jedna z nich, jeśli więc występują różnice w budowie lub składzie chemicznym, to ujawnią się one dopiero po dokładnej analizie wszystkich form molekularnych enzymu.

Kwaśne fosfatazy różniące się ciężarem cząsteczkowym zostały zaobserwowane w wątrobie, nerkach oraz śledzionie wołu i wieprza (36). W wątrobie wołu występują trzy kwaśne fosfatazy, które rozdzielono za pomocą filtracji na *Sefadeksie* G—75. Dominująca forma molekularna o niższym ciężarze cząsteczkowym została wydzielona, oczyszczona i scharakteryzowana. Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wynosi 16 590 daltonów a optimum  $pH$  5,5. Oznaczono również jego skład aminokwasowy, który okazał się podobny do składu aminokwasowego kwaśnej fosfatazy wydzielonej z *E. coli* (24). Oba enzymy zawierają po 2 reszty histydyny, 4 tyrozyny oraz 4 metioniny, ponadto enzym z *E. coli* posiada 1 resztę kwasu



cysteinowego, a fosfataza III wątroby wołu 2 reszty półcystyny. Podobne są również ciężary cząsteczkowe obu enzymów. W kwaśnej fosfatazie III z wątroby wołu występuje od strony wolnej grupy aminowej tylko jedna reszta aminokwasowa, a mianowicie arginina. Enzym ten przejawia dużą aktywność wobec mononukleotydu flawinowego i galaktozo-6-fosforanu, a nie hydrolizuje pirofosforanu, ani AMP, CMP oraz GMP. Przypuszcza się, że centrum aktywności tego enzymu jest związane z obecnością jonu fosforanowego.

Z wątroby szczura uzyskano 2 formy molekularne kwaśnej fosfatazy rozdzielone za pomocą *DEAE*—celulozy (28). Obie charakteryzowały się podobną specyficznością substratową, różniły się natomiast punktami izoelektrycznymi, dla fosfatazy I wynosi on 7,7 a dla fosfatazy II — 4,5. Ciężary cząsteczkowe obu form są mniej więcej równe i wynoszą około 100 000 daltonów. Fosfatazy I oraz II były hamowane całkowicie  $L(+)$ -winianem i fluorkami. Fosfataza I została otrzymana w formie krystalicznej. Igarashi i wsp. (29) badając charakter centrum aktywnego dowiedli, że w cząsteczce enzymu występuje tylko jedno miejsce aktywne. Znalaziono jedną resztę histydyny, która ma istotne znaczenie dla aktywności katalitycznej kwaśnej fosfatazy wątroby szczura.

Kwaśne fosfatazy charakteryzują się również znacznym zróżnicowaniem w obrębie jednej komórki. W sercu szczura (38) zaobserwowano występowanie odmiennych kwaśnych fosfataz w supernatancie i w strukturach subkomórkowych. Enzymy te różniły się zachowaniem wobec badanych substratów. Używając *p*-nitrofenylofosforanu jako substratu, aktywność w supernatancie była 4 razy większa aniżeli we frakcji zawierającej struktury subkomórkowe, ponadto zaobserwowano nieznaczne podwyższenie aktywności jonami  $Mg^{2+}$ , niewielkie hamowanie jonami  $Ca^{2+}$  i tylko częściowe przez NaF w stężeniu 100mM. Optymalne *pH* wynosiło 5,6—5,8. Jeśli natomiast substratem był  $\beta$ -glicerofosforan, nie stwierdzono żadnej aktywności w supernatancie, a we frakcji strukturalnej aktywność była niższa niż w poprzednim przypadku. Uzyskano znaczną aktywację jonami  $Mg^{2+}$ , jony  $Ca^{2+}$  były bez wpływu, a zupełne zahamowanie aktywności następowało pod wpływem NaF już w stężeniu 10mM. Optimum *pH* tego enzymu wynosiło 4,8—5,0.

W mikrosomalnej frakcji wątroby świnki morskiej oraz myszy zaobserwowano kwaśną fosfatazę, która w bardzo małym stopniu hydrolizuje  $\beta$ -glicerofosforan (52, 53). Enzym ten różni się od kwaśnej fosfatazy występującej w supernatancie, która jest w mniejszym stopniu hamowana fluorkami. Liczne badania wykazały, że wobec hamującego działania fluorków rozpuszczalne kwaśne fosfatazy różnych tkanek odmiennych gatunków zachowują się podobnie, lecz różnią się pod tym względem od kwaśnych fosfataz lizosomalnych lub mikrosomalnych.

Wang (79) badał rozmieszczenie kwaśnych fosfataz oraz ich heterogenność w różnych frakcjach subkomórkowych wątroby w czasie rozwoju



embrionalnego kurczenia. Oprócz normalnej kwaśnej fosfatazy (EC 3.1.3.2) w wątrobie kurczenia występuje jeszcze kwaśna fosfataza aktywowana jonami  $Zn^{2+}$ . Heterogenność obu kwaśnych fosfataz jest związana z różnym rozmieszczeniem w komórce, a manifestuje się w odmiennym zachowaniu się wobec niektórych inhibitorów, takich jak fluorki i L(+)-winian.

## 2. Kwaśne fosfatazy z mikroorganizmów

Jeszcze w roku 1957 Tsuboi i in. (60) zauważyli, że homogenna kwaśna fosfataza z drożdży, występowała w 4 formach molekularnych różniących się ruchliwością elektroforetyczną. Formy te miały ten sam ciężar cząsteczkowy, różnice więc w ruchliwości elektroforetycznej były następstwem różnic w ładunkach elektrycznych.

Van Hofsten i Porath (24) zaobserwowali, że w *Escherichia coli* występują 3 frakcje białkowe o aktywności kwaśnej fosfatazy. Z filtracji żelowej wynikało, że główna część aktywności enzymatycznej jest związana z białkiem o niskim ciężarze cząsteczkowym. Ta frakcja dzieli się w elektroforezie na 2 aktywne komponenty. Szybciej wędrująca z tych komponent została poddana dalszemu oczyszczaniu i uzyskano ją w homogennej postaci. Enzym ten jest niezwykle trwały w rozcieńczonych kwasach i tym różni się od pozostałych form kwaśnej fosfatazy. Za pomocą ultrawierowania preparatów zawierających niskocząsteczkową kwaśną fosfatazę wykazano, że ulega ona polimeryzacji. Ciężar cząsteczkowy monomeru wyznaczony ze składu aminokwasowego i analizy sedymentacyjnej wynosi 13 000—14 000 daltonów. Fosfataza ta jest bardzo aktywna wobec heksozofosforanów.

Dvorak i wsp. (18) wyodrębnili z *E. coli* 2 różne kwaśne fosfatazy za pomocą rozdziału na DEAE — celulozie. Jedna z nich (kwaśna heksozofosfataza) była wysoce specyficzna wobec niektórych heksozo- i pentozofosforanów, w bardzo małym stopniu hydrolizowała *p*-nitrofenylofosforan i była nieaktywna wobec fenylofosforanu. Druga frakcja o aktywności fosfatazowej zawierała niespecyficzną kwaśną fosfatazę, która w odróżnieniu od kwaśnej fosfatazy wyizolowanej z *E. coli* przez Von Hofstena i Poratha (24), w bardzo małym stopniu rozszczepiała wiązania estrowe heksozofosforanów. Ponadto autorzy ci wyodrębnili cykliczną fosfodwuesterazę, która hydrolizowała również *p*-nitrofenylofosforan, co jest raczej niezwykle dla tego enzymu.

*Aspergillus ficuum* wytwarza dwie zewnątrzkomórkowe kwaśne fosfatazy, które wykazują tak znaczne różnice, że autorzy wykluczają możliwość, iż są to izoenzymy (56). Różnią się one optimum *pH* (2,0 oraz 5,5), odpornością na denaturację cieplną oraz zachowaniem się w chromatografii jonowymiennej. Jeden z nich, o optimum *pH* 5,5 jest stosunkowo specyficzną fosfohydrolazą, gdyż w znacznie większym stopniu niż inne substraty hydrolizuje estry fosforanowe kwasu fitynowego (patrz tabli-

ca 1), podczas gdy enzym o optimum  $pH$  2,0 jest raczej typową kwaśną fosfatazą hydrolizującą w równym stopniu cały szereg fosfomonoestrów. Biosynteza obu enzymów jest kontrolowana przez stężenie nieorganicznego fosforanu w pożywce; wysoka zawartość tego jonu powoduje represję obu enzymów, z tym, że w miarę wzrostu stężenia fosforanu w pożywce stosunek enzymu o optimum  $pH$  2,0 do enzymu o optimum  $pH$  5,5 spada. Stężenie fosforanu w pożywce kontroluje więc nie tylko całkowitą ilość syntetyzowanej kwaśnej fosfatazy, lecz również jej typ.

Z *Fusarium moniliforme* wyodrębniono również 2 formy kwaśnej fosfatazy po chromatografii na *DEAE*—celulozie, fosfatazę I oraz fosfatazę II (66). Obie przejawiały podobną aktywność wobec różnych substratów. Dalszemu oczyszczeniu poddano fosfatazę II, którą uzyskano w homogennej postaci w analizie na żelu poliakrylamidowym. Fosfataza ta odznacza się znaczną termolabilnością, gdyż przez pięciominutowe ogrzewanie w temperaturze  $55^{\circ}$  traci już połowę swej aktywności biologicznej. Fosfataza II, podobnie jak kwaśne fosfatazy roślinne rozszczepia wiązanie pirofosforanowe. Ponadto charakteryzuje się wysoką aktywnością wobec bis-*p*-nitrofenylofosforanu oraz zdolnością hydrolizowania cyklicznego fosforanu 2',3'-AMP. Aktywność kwaśnej fosfatazy II jest zależna od obecności wolnej grupy hydroksylowej seryny, gdyż pod wpływem fosforanu fluorku dwuizopropylowego zaobserwowano silne zahamowanie aktywności enzymu.

### 3. Kwaśne fosfatazy roślin wyższych

Wiadomości dotyczące heterogennych kwaśnych fosfataz pochodzenia roślinnego są bardzo skąpe. Podobnie do kwaśnych fosfataz zwierzęcych, występują one zarówno we frakcji rozpuszczalnej jak i struktur komórkowych. W komórkach korzenia zarodkowego dyni największą aktywność kwaśnej fosfatazy zaobserwowano we frakcji zawierającej mitochondria oraz struktury podobne do lizosomów (12). Za pomocą metod histochemicznych Pitt i in. (52) stwierdzili w tkance ziemniaka struktury podobne do lizosomów zawierające między innymi kwaśną fosfatazę. Po zakażeniu ziemniaka za pomocą *Phytophthora erythroseptica* nastąpiło rozerwanie tych struktur w komórkach gospodarza i uwolnienie kwaśnej fosfatazy do frakcji rozpuszczalnej. U niektórych roślin kwaśne fosfatazy występują również w ścianach komórkowych; w kielkach jęczmienia np. stwierdzono w ścianach komórkowych około 20% całkowitej aktywności kwaśnej fosfatazy (21).

Kwaśne fosfatazy, choć szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym, występują jednak w małym stężeniu, a zatem są trudne do uzyskania w odpowiedniej ilości oraz stopniu oczyszczenia wystarczającym do przeprowadzenia dokładniejszych badań. W zarodkach pszenicy (62) i kiel-



kach fasoli (19) zaobserwowano chromatograficznie odmienne formy molekularnej kwaśnej fosfatazy, lecz nie podano źródła ich heterogenności.

F e l e n b o c k (19) uzyskała kilka aktywnych form kwaśnej fosfatazy z kielków fasoli po chromatografii na *DEAE*—celulozie. Dalszymi badaniami poddawała jeden z najaktywniejszych szczytów zawierających kwaśną fosfatazę i stwierdziła, że enzym ten jest glikoproteidem zawierającym 8% cukrów redukujących oraz 3% aminocukrów. Autorka nie wykazała w enzymie obecności kwasu sialowego. Kwaśna fosfataza z kielków fasoli jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o ciężarze cząsteczkowym 55 000 daltonów. Od strony wolnej grupy karboksylowej enzym ten posiada leucynę, a jako N-końcowy aminokwas występuje seryna.

W zarodkach pszenicy występują trzy kwaśne fosfatazy (62), które również zostały rozdzielone za pomocą chromatografii na *DEAE*—celulozie. Mają one ten sam ciężar cząsteczkowy, który, podobnie jak kwaśna fosfataza z kielków fasoli, wynosi 55 000 daltonów. Kwaśne fosfatazy z kielków pszenicy różnią się optimum *pH*, stałymi Michaelisa, zachowaniem się wobec aktywatorów i inhibitorów, specyficznością substratową oraz ruchliwością elektroforetyczną.

Heterogenność kwaśnej fosfatazy ziemniaka została wykazana przez K u b i c z i M o r a w i e c k ą (32). Obecność trzech form molekularnych o dodatkowej mikroheterogenności stwierdzono za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, adsorpcji na żelu fosforanowo—wapniowym oraz w izoelektrycznym frakcjonowaniu (32, 33, 34). W dalszych badaniach Kubicz (34) wykazała na elektroforogramach, że poszczególne formy molekularne różnią się optimum *pH*, wrażliwością na hamujące działanie molibdenianu oraz stopniem aktywacji  $\beta$ -merkaptotanołem. Nie wiadomo, co leży u źródeł heterogenności kwaśnej fosfatazy ziemniaka; w każdym razie nie są to polimery, gdyż formy molekularne mają ten sam ciężar cząsteczkowy, a różnią się ładunkami elektrycznymi, które są odzwierciedleniem różnic w punktach izoelektrycznych poszczególnych form.

W pracowni L o r a - T a m a y o otrzymano wysoko oczyszczoną kwaśną fosfatazę z ziemniaka, na której przeprowadzono szereg badań kinetycznych oraz scharakteryzowano grupy funkcyjne tego enzymu (4, 5).

Z badań A n d r e u i n. (5) wynika, że kwas jodooctowy, woda utleniona oraz kwas *p*-chlorortęciobenzoesowy nie wpływają na aktywność kwaśnej fosfatazy ziemniaka. Autorzy wnioskują z tego, że grupy sulfhydryłowe nie są istotne dla aktywności enzymu, choć należałoby raczej wnioskować, że kwaśna fosfataza ziemniaka nie posiada wolnych grup -SH. Jak się okazało z późniejszych naszych badań (34), obecność wolnych grup sulfhydrylowych znacznie podnosi aktywność tego enzymu, gdyż pod wpływem  $\beta$ -merkaptotanolu oraz dwutiotreitolu zaobserwowano zwiększenie aktywności enzymatycznej o 150%.



Andreu i in. (5) wykazali ponadto, że czynniki blokujące grupy aminowe i fenolowe również nie powodowały utraty aktywności enzymatycznej, a więc nie są one grupami funkcyjnymi enzymu. Z drugiej strony, estryfikacja enzymu doprowadziła do utraty aktywności, wskazując, że w procesie katalizy ważna jest obecność wolnych grup karboksylowych. Hamujące działanie jodu, 2,4-dwunitrofluorobenzenu oraz kwasu dwuazobenzenosulfonowego wykazało, że ugrupowanie imidazolowe histydyny również jest istotne dla aktywności kwaśnej fosfatazy. Enzym ten okazał się niewrażliwy na działanie EDTA oraz dializę, co z kolei sugeruje, że jego aktywność nie jest zależna od metali, które można odzielić od enzymu przez dializę lub chelatowanie.

Na podstawie tych wyników oraz badając wpływ  $pH$  na kinetykę reakcji enzymatycznej, autorzy próbowali wydedukować charakter centrum aktywnego (4, 5). Stwierdzono, że aktywność kwaśnej fosfatazy ziemniaka zależy od co najmniej trzech zjonizowanych grup:

- a) ( $pK$  4,6—4,8) — grupa karboksylowa odpowiadająca prawdopodobnie  $\gamma$ - lub  $\delta$ -karboksylowym grupom kwasu glutaminowego lub asparaginowego.
- b) ( $pK$  4,9—5,3) — prawdopodobnie zjonizowany pierścień imidazolowy histydyny.
- c) ( $pK$  6,8) — monozjonizowana grupa monofosforanowa.

W dalszych pracach Lora-Tamayo i wsp. (36) badali wpływ  $pH$  na aktywność kwaśnej fosfatazy ziemniaka w różnych układach buforowych i wobec różnych substratów. Uzyskane wyniki sugerowały, że w kwaśnym zakresie krzywej  $pH$  aktywność enzymu zależy od obecności w cząsteczce pierścienia imidazolowego, natomiast w przedziale alkalicznym, od grupy fosforanowej. Następnie wykazano, że jony  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  hamowały aktywność enzymatyczną po kwaśnej stronie krzywej  $pH$ , a jony molibdenianowe i wolframianowe po stronie alkalicznej (45). Zaobserwowano również (45), że kwaśna fosfataza ziemniaków wykazywała podwójne optimum  $pH$ : 5,5 oraz 6,4 podczas hydrolizy  $\beta$ -glicerofosforanu, a 5,3 oraz 6,5 wobec fenylofosforanu. Natomiast enzymatyczna hydroliza  $p$ -nitrofenylofosforanu charakteryzuje się tylko jedną optymalną wartością  $pH$ , która wynosi 5,0. W naszej pracowni wykazaliśmy (32, 33), że kwaśna fosfataza ziemniaków zawiera trzy formy molekularne tego enzymu. Kubicz (34) w swych badaniach nad heterogennością kwaśnej fosfatazy ziemniaka wydzieliła dominującą formę tego enzymu, kwaśną fosfatazę III i opisała niektóre jej właściwości fizyko-chemiczne. Optimum  $pH$  kwaśnej fosfatazy III wobec fenylofosforanu wynosi 5,0, jest enzymem termostabilnym, oraz dość odpornym na denaturujące działanie mocznika, ulega znacznej aktywacji pod wpływem  $\beta$ -merkaptioetanolu i dwutiotreitolu. Ciężar cząsteczkowy kwaśnej fosfatazy III oznaczony na żelu poliakrylamidowym leży w granicach 92 000 do 98 000 daltonów. Ponadto stwierdzono, że składa się ona z dwóch jednakowych lub prawie

jednakowych podjednostek o masie cząsteczkowej około 46 000 daltonów.

Badania nad mechanizmem działania kwaśnej fosfatazy ziemniaka były zapoczątkowane przez Jørgensena (31) oraz Alvareza (4), jednak dopiero Hsu i wsp. (27) dokładnie wyjaśnili to zagadnienie. Przy użyciu dwóch substratów — *p*-nitrofenylofosforanu i  $\beta$ -glicerofosforanu — autorzy ci badali charakter hamowania produktami reakcji, fosforanem nieorganicznym oraz *p*-nitrofenolem. W przypadku użycia fosforanu nieorganicznego jako inhibitora zaobserwowano hamowanie typu współzawodniczego przy zastosowaniu obydwóch substratów; natomiast hamowanie reakcji za pomocą *p*-nitrofenolu miało charakter inhibicji niewspółzawodniczej zarówno w czasie hydrolizy *p*-nitrofenylofosforanu jak i  $\beta$ -glicerofosforanu. Autorzy wysuwają przypuszczenie, że zwalnianie produktów z kompleksów przebiega w sposób uporządkowany i w pierw pojawia się alkohol, a potem fosforan. Za takim modelem reakcji enzymatycznej przemawiają również identyczne stałe inhibicji dla fosforanu wobec *p*-nitrofenylofosforanu lub  $\beta$ -glicerofosforanu.

### III. Rola biologiczna niespecyficznych kwaśnych fosfataz

Rola biologiczna niespecyficznych kwaśnych fosfataz nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Mogą one brać udział w mechanizmach kontrolnych różnego typu. Przypuszczenie to nasunęło się w związku ze stwierdzeniem, że różne formy molekularnej kwaśnej fosfatazy pochodzące z tego samego źródła mogą różnić się znacznie wrażliwością wobec szeregu inhibitorów oraz specyficznością wobec odpowiednich substratów. Ogólnie przypisuje się tym enzymom pewną rolę regulacyjną w kontrolowaniu poziomu nieorganicznego fosforanu w komórce, dostarczając go dla celów metabolicznych, wydalniczych i wydzielniczych. Stąd obserwuje się wysoką zawartość kwaśnej fosfatazy w nerkach oraz w niektórych komórkach związanych z sekrecją hormonów. Pośrednich dowodów na udział kwaśnej fosfatazy w procesach wydzielniczych dostarczyły doświadczenia Fostera (20) i Pearse'a (50). Autorzy ci stwierdzili, że w tarczycach perfundowanych krwią bogatą w jony wapnia nastąpił znaczny wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy w komórkach C (okółopęcherzykowych), które wytwarzają tyreokalcytoninę, tym samym więc wykazano związek pomiędzy aktywnością kwaśnej fosfatazy z produkcją hormonu. Przypuszcza się, że niektóre niespecyficzne kwaśne fosfatazy w związku z ich preferencyjnym rozszczepieniem pewnych substratów mogą odgrywać istotną rolę w szczególnych etapach metabolicznych. Np. kwaśna fosfataza III wydzielona z łożyska ludzkiego (11) charakteryzuje się zdolnością odszczepiania fosforanu od 3-fosforanu 17- $\beta$ -estradiolu, może więc brać istotny udział w przemianach zachodzących w łożysku.



Turner postuluje udział kwaśnych fosfataz niektórych tkanek zwierzęcych i roślinnych w regulacji aktywności enzymów wymagających obecności witaminy B<sub>6</sub> (61). Niektóre bowiem niespecyficzne kwaśne fosfatazy hydrolizują w dużym stopniu fosforany pirydoksalu, pirydoksyny i pirydoksaminy. Wykazano, że kwaśna fosfataza ze sterczu ludzkiego hydrolizuje fosforan pirydoksalu (57), a kwaśna fosfataza z łożyska ludzkiego odszczepia resztę fosforanową od fosforanu pirydoksyny (15).

Andrews i Turner (6) zaobserwowali, że kwaśna fosfataza z zarodków pszenicy w znacznym stopniu hydrolizuje fosforan pirydoksalu, a w mniejszym — fosforan pirydoksaminy. Inaktywacja koenzymu przez kwaśną fosfatazę może mieć szczególne znaczenie, jeśli się weźmie pod uwagę fakt, że aminowa forma koenzymu oddysocjowuje od połączenia z apoenzymem jak to ma miejsce np. u aminotransferazy asparaginianowej (44) oraz dekarboksylazy asparaginianowej (45). Kwaśna fosfataza z *Escherichia freundii* charakteryzuje się z kolei zdolnością fosforylacji pirydoksyny, w ten sposób włączając się w metabolizm witaminy B<sub>6</sub> (58).

Ostatnio mówi się również często o udziale niespecyficznych kwaśnych fosfataz w przemianach kwasów nukleinowych. Wiele z tych enzymów hydrolizuje bowiem w znacznym stopniu fosforany różnych nukleotydów (19, 35, 55, 57, 66). Kwaśna fosfataza z *Neurospora crassa* (35) hydrolizuje dezoksyrybonukleotydy, w związku z czym przypisuje się jej rolę we wzbogacaniu puli tych związków. W błonach komórkowych krwinek króliczych występuje niespecyficzna kwaśna fosfataza wykazująca wysoką aktywność wobec monofosforanów nukleotydowych (9), przy czym stwierdzono, że aktywność jej jest wyższa w populacji młodych komórek. Fakty te niewątpliwie sugerują, że kwaśna fosfataza może być związana z wykorzystywaniem przez komórki nukleotydów.

#### LITERATURA

1. Abdul-Fadl M. A. M., King E. J., *Biochem. J.* **42**, XXVIII (1948).
2. Abdul-Fadl M. A. M., King E. J., *Biochem. J.* **45**, 51 (1949).
3. Allen S. L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**, 190 (1968).
4. Alvarez F. E., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 663 (1962).
5. Andreu M., Alvarez E., Lora-Tamayo M., *An. R. Soc. Espan. Fis. Quim.* **56-B**, 67 (1960).
6. Andrews M. J., Turner J. M., *Nature* **210**, 1159 (1966).
7. Appleyard J., *Biochem. J.* **42**, 596 (1948).
8. Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **172**, 1 (1948).
9. Berry D. D., Hochstein P., *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 170 (1969).
10. Chersi A., Bernardi A., Bernardi G., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 12 (1966).



11. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), Recommendations (1971), *Eur. J. Biochem.* **24**, 1 (1971).
12. Coulomb P., *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D* **267**, 2133 (1968).
13. Derechin M., Ostrowski W., Gałka M., Barnard E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **250**, 143 (1971).
14. Desnuelle P., w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, New York, 1960, str. 119.
15. DiPetro D. L., Zengerle F. S., *J. Biol. Chem.* **242**, 3391 (1967).
16. DiPetro D. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 1303 (1968).
17. DiPetro D. L., *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 458 (1971).
18. Dvorak H. F., Brockman R. W., Heppel L. A., *Biochemistry* **6**, 1743 (1967).
19. Felenbock B., *Eur. J. Biochem.* **17**, 165 (1970).
20. Foster G. V., MacIntyre I., Pearse A. G. E., *Nature* **203**, 1029 (1964).
21. Hall J. L., Butt V. S., *J. Exp. Bot.* **19**, 276 (1968).
22. Harris H., Hopkinson D. A., Luffman J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**, 232 (1968).
23. Henrikson R. L., *J. Biol. Chem.* **244**, 299 (1969).
24. Hofsten B. V., Porath J., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 1 (1962).
25. Hopkinson D. A., Spencer N., *Nature* **199**, 969 (1963).
26. Hopkinson D. A., Spencer N., Harris H., *Am. J. Hum. Genet.* **16**, 141 (1964).
27. Hsu R. Y., Cleland W. W., Anderson L., *Biochemistry* **5**, 799 (1966).
28. Igarashi M., Hollander V. P., *J. Biol. Chem.* **243**, 6084 (1968).
29. Igarashi M., Takahashi H., Tsuyama N., *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 85 (1970).
31. Jørgensen O. B., *Acta Chem. Scand.* **13**, 900 (1959).
32. Kubicz A., Morawiecka B., VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochem., Szczecin 1970, Streszczenie prac, str. 7.
33. Kubicz A., Morawiecka B., VII Zjazd Europejskich Towarzystw Biochemicznych, Warna 1971, FEBS Abstracts, str. 262.
34. Kubicz A., VIII Zjazd Europejskich Towarzystw Biochemicznych, Amsterdam 1972, FEBS Abstracts.
35. Kuo M., Blumenthal H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 13 (1961).
36. Lora-Tamayo M., Alvarez F. E., Porque G. P., *An. Quim.* **65**, 69 (1969).
37. Lora-Tamayo M., Alvarez F. E., Porque G. P., *An. Quim.* **65**, 81 (1969).
38. Maggi V., *Biochem. J.* **115**, 51P (1969).
39. Malveaux F. J., San Clemente C. L., *J. Bacteriol.* **97**, 1209 (1969).
40. Malveaux F. J., San Clemente C. L., *J. Bacteriol.* **97**, 1215 (1969).
41. Neil M. W., Horner M. W., *Biochem. J.* **92**, 217 (1964).
42. Neil M. W., Horner M. W., *Biochem. J.* **93**, 220 (1964).
43. Nigam V. N., Fishman W. H., *J. Biol. Chem.* **234**, 2394 (1959).
44. Novogrodzky A., Meister A., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 605 (1964).
45. Novogrodzky A., Meister A., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 170 (1964).
46. Ogita Z., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**, 234 (1968).
47. Ostrowski W., Rybarska J., *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 196 (1965).
48. Ostrowski W., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 213 (1968).
49. Ostrowski W., Wasyl Z., Weber M., Gumińska M., Luchter E., *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 297 (1970).

50. Ostrowski W., Barnard E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **250**, 131 (1971).
51. Pearse A. G. E., *Proc. R. Soc. Ser. B*, **164**, 478 (1965).
52. Pitt D., Coombes C., *J. Gen. Microbiol.* **53**, 197 (1968).
53. Privat de Garlhe M., *Les Nucleases*, Hermann, Paryż (1964).
54. Scott E. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 3049 (1966).
55. Shaw J. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 1 (1966).
56. Shich T. R., Wodziński R. J., Ware J. H., *J. Bacteriol.* **100**, 2262 (1969).
57. Smith J. K., Whitby L. G., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 607 (1968).
58. Tani Y., Tochikura T., Yamada H., Ogata K., *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **32**, 1220 (1968).
59. Tsuboi K. K., Hudson P. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **55**, 191 (1955).
60. Tsuboi K. K., Wiener G., Hudson P. B., *J. Biol. Chem.* **224**, 621 (1957).
61. Turner J. M., *Biochem. J.* **95**, 3P (1965)
62. Verjee Z. H. M., *Eur. J. Biochem.* **9**, 439 (1969).
63. Wang K. M., *Biochem. J.* **115**, 191 (1961).
64. White I. N. H., Butterworth P. J., *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 193 (1971).
65. White I. N. H., Butterworth P. J., *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 202 (1971).
66. Yoshida H., Tamiya N., *Biochem. J.* **69**, 525 (1971).

KRYSTYNA OBOJSKA \*

## Antybiotyki oligo- i polipeptydowe

### Oligo- and polypeptide antibiotics

The review deals with chemical systematic of peptide antibiotics and their production by various strains. Their chemical structure, physico-chemical properties and their action on microorganisms and microbial enzymes and toxins are reviewed. Various problems of biosynthesis of this group of antibiotics are discussed as well as hypotheses on the importance of the antibiotic for the producing cell.

W niniejszym przeglądzie omówiono budowę i właściwości antybiotyków oligo- i polipeptydowych; do pierwszych zalicza się antybiotyki zawierające nie więcej niż dziesięć aminokwasów w cząsteczce, do drugich zawierające ponad dziesięć aminokwasów. Nie uwzględniono penicylin ani cefalosporyn, mimo że starano się omówić przede wszystkim antybiotyki, które znalazły zastosowanie w lecznictwie.

Zainteresowanie antybiotykami peptydowymi datuje się od 1939 roku. W tym czasie D u b o s wyodrębnił z hodowli *Bacillus brevis* substancję biologicznie aktywną przeciw stafilocokom i streptokokom, nazwaną tyrotrycyną, która w trakcie oczyszczania okazała się substancją złożoną z gramicydyny i tyrocydyny (53, 54, 92). W 1940 roku W a k s m a n i W o o d r u f f (249) zapoczątkowali serię odkryć aktynomycyn izolując aktynomycynę A. W 1945 roku wydzielono z hodowli *Bacillus subtilis* nowy antybiotyk polipeptydowy — bacytracynę (98). W kilka lat później opisano właściwości polimiksyn wyodrębnionych z hodowli *Bacillus polymyxa* (7, 218, 219, 256, 257). Prace prowadzono dalej nad antybiotykami tego typu w latach pięćdziesiątych (236). W 1950 roku K o y a m a i wsp. (114) opisał kolistynę, w 1951 roku wyodrębniono wiomycynę z hodowli *Streptomyces vinaceus* (64), a w dwa lata później H e i n e m a n i wsp. (81) wykryli amfomycynę. Kolistyna, polimiksyna, wiomycyna i amfomycyna są dotychczas stosowane w terapii człowieka. Substancje czynne

---

\* Dr, Samodzielna Pracownia Farmakopei Polskiej, Instytut Leków, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: MIC — najniższe stężenie hamujące (ang. *Minimum* lub *Minimal Inhibitory Concentration*), FP — flawoproteid, Pir — pirydyna, Sar — sarkozyna, b, c, a — cytochromy a, b, c, Me Cys — N-metylocysteina, MeWal — N-metylowalina, L-4-okso-Pip — kwas 4-okso-L-pipecolinowy, HyPik — kwas 3-hydroksypipecolinowy.



o charakterze peptydowym nie znalazły zbyt szerokiego zastosowania klinicznego, ponieważ mają nefrotoksyczne właściwości przy podaniu parenteralnym (32, 33, 37, 58, 66, 83, 89, 97, 102, 155, 184, 187, 212, 217, 247, 267). W 1952 roku K r y ń s k i i w s p. (118) wykryli tetainę, polipeptyd przeciw drobnoustrojom gramujemnym i gramodatnim. W 1955 roku O t a n i i S a i t o (164) opisali gramicydynę J. W 1959 roku K u r y ło — B o r o w s k a (121) wyodrębniła z *Bacillus brevis* edeinę, a w 1964 roku wprowadzono do lecznictwa kapreomycynę (84), rufomycyny (ilamycyny) (38, 134). W 1966 roku W h a l e y i w s p. (254, 255) opisali nowy peptyd o właściwościach antybiotycznych, a B i e ł o w a i S t o ł p k i n (18) w tym samym czasie donieśli o wyizolowaniu przez nich neotelomycyny. W 1967—68 roku wyodrębniono także szereg nowych antybiotyków oligo- i polipeptydowych, jak: suszymycynę, enduramycynę, leucynamycynę, peptiomycynę A, B, fenomycynę, makromycynę, monamycynę, stendomycynę (16, 43, 87, 143, 151, 162, 180, 209). Nieco później wykryto dwa antybiotyki peptydowe bacylizynę i antykapsynę (156, 251). Oligo- i polipeptydy tego typu tworzą grupę, zasługującą na wyodrębnienie w systematyce antybiotyków, gdyż ich budowa, właściwości fizyko-chemiczne oraz biosynteza przez komórkę gospodarza stanowią odrębne, specyficzne zagadnienia.

### I. Podział systematyczny

Substancje czynne należące do omawianej grupy antybiotyków, to przeważnie peptydy cykliczne. B r i c a s i F r o m a g e o t (30) zaproponowali klasyfikację chemiczną opartą na strukturze składników cząsteczki peptydów i zastosowali ją do antybiotyków oligo- i polipeptydowych. Podzielili je na homeomeryczne peptydy, zbudowane z samych aminokwasów i peptydy heteromeryczne zawierające inne związki chemiczne prócz aminokwasów (30, 36, 105, 106, 222, 228, 229, 237, 262, 263). Większość antybiotyków oligo- i polipeptydowych to peptydy heteromeryczne. Składnikami nieaminokwasowymi peptydów heteromerycznych są aminy, cukry, kwasy itp. Niektóre składniki występujące w cząsteczce antybiotyków oligo- i polipeptydowych, należących do grupy peptydów heteromerycznych, przedstawia tablica 1.

W obrębie homeomerycznych peptydów rozróżnia się dwie grupy, biorąc za podstawę wiązania, jakimi te składniki są połączone w cząsteczce. Homodetami nazywa się takie peptydy cykliczne, w których składniki połączone są w cząsteczce wiązaniami peptydowymi (30, 205), heterodetami zaś te, w których aminokwasy połączone są innymi wiązaniami. W obrębie peptydów heteromerycznych wyróżniono także jedną grupę antybiotyków, gdzie składniki cząsteczki połączone są wiązaniami pepty-

dowymi, mimo, że nie same aminokwasy wchodzą w skład cząsteczki, i drugą grupę, gdzie składniki połączone są innymi wiązaniami niż peptydowe.

Obecnie autorzy omawiający antybiotyki homeo- i heteromeryczne raczej ograniczają pojęcia antybiotyków poli- i oligopeptydowych do homo-

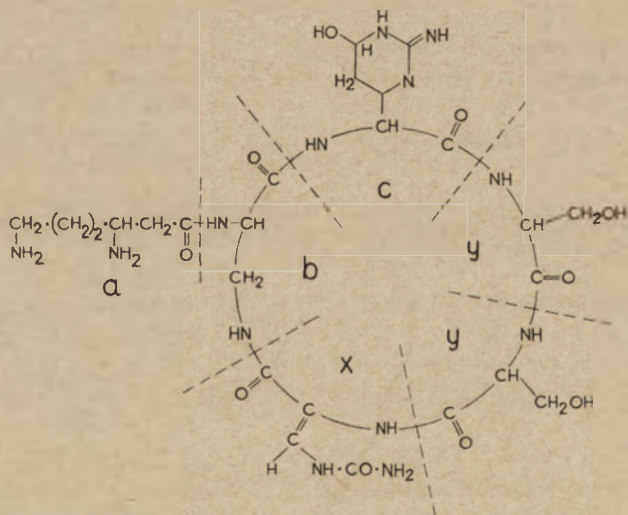
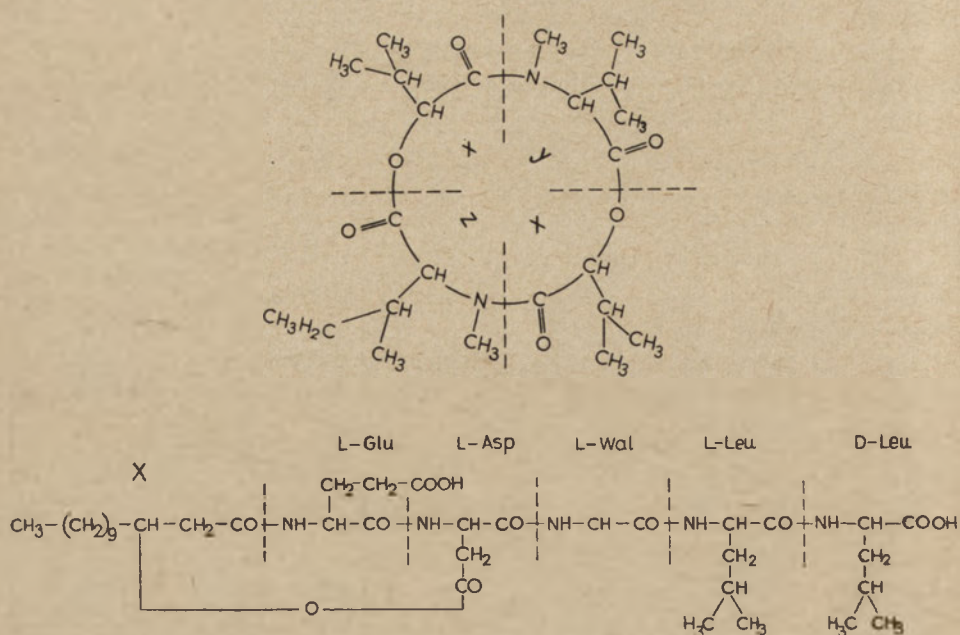
Tablica 1

Niektóre nieaminokwasowe składniki antybiotyków należących do peptydów heteromerycznych

Grupa związków	Nazwa występującego związku	Nazwa antybiotyku, w którym związek wykryto
Aminy	Etanoloamina	Gramicydyna A, B, C, D
	Kadaweryna	Ferrimycyna
Cukry	1-amino-5-hydroksyloaminopentan	Norcardamina, Ferrimycyna A
	N-guanylo-N <sup>1</sup> -(3-aminopropyl)-1, 4-dwuaminobutan	Edeina A i B
Kwasy organiczne	D-glukozoamina	Streptolina
	Glukoza	Koliformina
	Ksyloza	
	Bursztynowy	Syderomycyny
	Mrówkowy	Gramicydyny A i D, A atymycyny
	Mlekowy	Walimocyny
	Propionowy	Mikrokokcyna P,
	D- $\alpha$ -hydroksyzizowalerianowy	Walimocyna, Amidomycyna
	L- $\alpha$ -hydroksyzizowalerianowy	Monamycyna D <sub>1</sub>
	(+)-6-metylooktanowy	Cyrkuliny A, B, Polimiksyny A, B, C, D
Inne trudne do klasyfikacji	3-hydroksypikolinowy	Wernamycyna B, Pirydomycyna, Etamycyna, Stafilomycyna S
	6-metyloheptanowy	Polimiksyna E <sub>2</sub> (kolistyna B)
	Izotetradecenowy	
	Izopentadecenowy	Suszumycyna
	Piperydazyno-3-karboksylowy	Monamycyna D <sub>1</sub>
	11-metylo-laurynowy	Stendomycyna
	Pierścień pirydynowy zawierający siarkę	Albomycyna

detów i heterodetów w rzędzie peptydów homomerycznych oraz do homodetów cyklicznych i peptydów o budowie liniowej w rzędzie peptydów heteromerycznych. Antybiotyki peptydowe heteromeryczne, które zawierają w cząsteczce hydroksykwas i aminokwasy połączone wiązaniami amidowymi i estrowymi, nazwano depsi-peptydami (16, 178, 189, 203, 204, 222). Budowę antybiotyków o strukturze depsi-peptydów przedstawia rysunek 1 a, b, c.

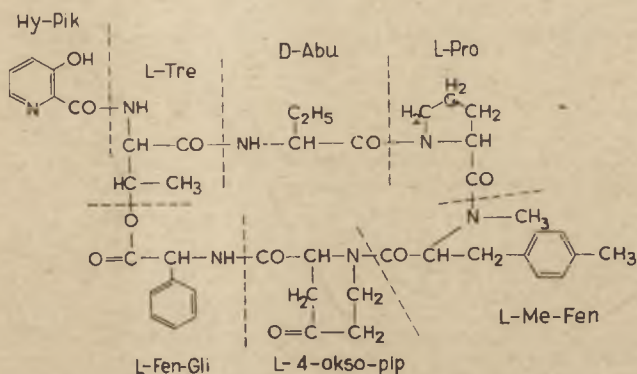




**Rys. 1.** Wzory strukturalne niektórych cyklicznych antybiotyków peptydowych  
 a – wzór strukturalny depsiptydu laterityny (2)  
 x – kwas D-α-hydroksyizowalerianowy, y – L(+)-N-metylowalina, z – L(+)-N-metyloizoleucyna  
 b – wzór strukturalny depsiptydu esperyny  
 x – kwas D-β-hydroksytrisdecylowy  
 c – wzór strukturalny zasadowego peptydu wiomycyny (wg 36)  
 x – ureid dehydroseryny, y – seryna, c – α-(2-imino-6-hydroksy-heksahydro-4-pyrimidyl)-  
 glicyna, b – kwas α, β-dwuaminopropinowy, a – L-β-Liz



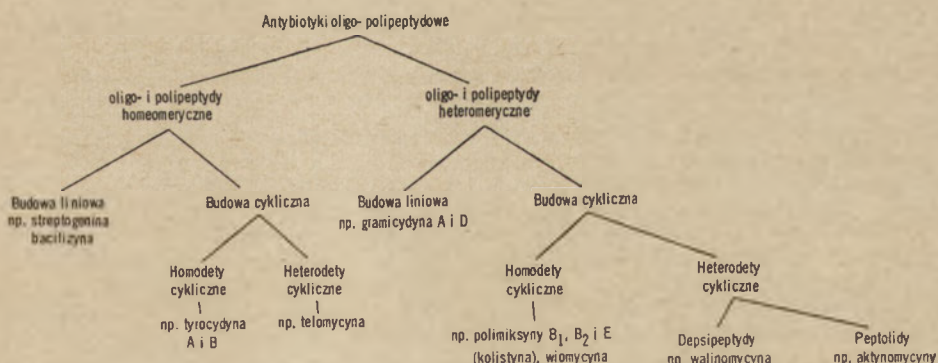
Obok pojęcia depsiptydów wprowadzono pojęcie peptolidów, które zawierają w cząsteczce wiązania peptydowe i laktonowe (26, 111, 112, 113, 201, 240). Do tej grupy należą między innymi aktynomycyny i stafilomycyny S<sub>1</sub> (rysunek 2).



Rys. 2. Antybiotyk peptolidowy stafilomycyna

HyPik — kwas 3-hydroksypikolinowy, L-4-okso-Pip — kwas 4-okso-L-pipekolinowy, D-Abu — kwas D- $\alpha$ -aminomasłowy

Wśród homeomerycznych antybiotyków peptydowych wyodrębniono w 1970 roku bacylizynę (250, 251). Nie wykryto dotychczas polipeptydu homeomerycznego o budowie liniowej. Antybiotyki tej grupy to przeważnie oligo- i polipeptydy cykliczne. W grupie heteromerycznych peptydów liniową budowę wykazuje np. gramicydyna D.



Schemat 1. Schemat chemicznego podziału antybiotyków oligo- i polipeptydowych

Podział antybiotyków oligo- i polipeptydowych wg budowy podaje schemat 1. Według tego schematu bacytracyny (A, F i in.) są trudne do zakwalifikowania, pomimo że składają się z samych aminokwasów; wią-

zania między cysteiną a izoleucyną w cząsteczce są kowalენტne, ale nie peptydowe, oba aminokwasy tworzą połączenia w formie pierścienia tiazolinowego (rysunek 3) (71, 128).

Tabela 2

Niektóre rodzaje i gatunki drobnoustrojów jako podstawa systematyki biologicznej antybiotyków oligo- i polipeptydowych

A. Królestwo *Procaryota*I. Klasa *Eubacteriales*1. Rząd *Eubacteriales*a. Antybiotyki produkowane przez rodzinę *Eubacteriaceae*

M. cz.

<i>Bacillus brevis</i>	Brewina	—
	Edeina A	754
	Edeina B	796
	Tyrocydyny	1270—1390
	Gramicydyny	1060—1340
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacytracyny A i F	1400
	Licheniforminy	380—4800
<i>Bacillus subtilis</i>	Subtyliny	3420—7000
	Bacylomycyny	960
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polimiksyny	969—1200
	Cyrkuliny	1200
b. Antybiotyki produkowane przez rodzinę <i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Koliformina	4000
c. Antybiotyki produkowane przez rodzinę <i>Lactobacillaceae</i>		
<i>Streptococcus lactis</i>	Nizyny	7000
<i>Streptococcus cremoris</i>		

2. Rząd *Actinomycetales*a. Antybiotyki produkowane przez rodzinę *Streptomycetaceae*

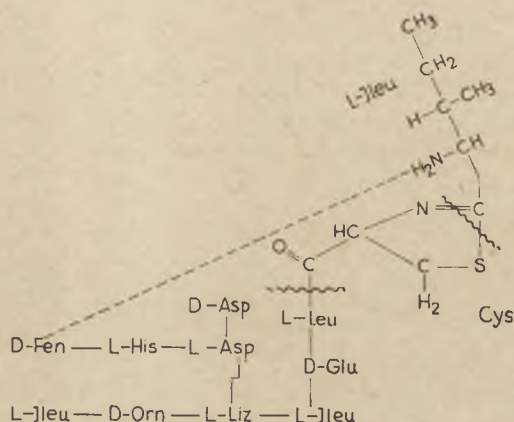
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Aktynomycyny A, B, C, D, J. K. B. i X	1246—1298
<i>Streptomyces vinaceus</i>	Wiomycyna	689
<i>Streptomyces virginiae</i>	Stafilomycyna	740—750
b. Antybiotyki produkowane przez rodzinę <i>Actinomycetaceae</i>		
<i>Actinomyces subtropicus</i>	Albomycyna	—

B. Królestwo *Eucaryota*I. Klasa *Eumycetes*1. Podklasa *Fungi Imperfecti*1. Rząd *Moniliales*

Antybiotyki produkowane przez rodzinę <i>Tuberculariaceae</i>		M. cz.
<i>Fusarium oxosporum</i>	Enniatyna A, B, C	650
<i>Fusarium licopersici</i>	Likomarazmina	277

W tablicy 2 przedstawiono masy cząsteczkowe antybiotyków oligo- i polipeptydowych, należących do różnych grup w klasyfikacji Bricasa i Fromageota, a wytwarzanych przez drobnoustroje z identycznych grup taksonomicznych (tablica 2). Nie stwierdzono korelacji między działaniem antybiotyku a jego rosnącym lub malejącym ciężarem cząsteczkowym.

Systematyki Bricasa i Fromageota (30) oparta na budowie chemicznej oraz Korzybskiego i wsp. (111, 112), której podstawą jest rodzaj i gatunek drobnoustroju — producenta, przestają być przydatne, gdy dzieli się antybiotyki wg spektrum ich działania. Na przykład gramicydyny A, B i C działają wyłącznie na drobnoustroje gramodat-



**Rys. 3.** Budowa bacytracyny A. Charakterystyczne wiązania izoleucyny z cysteiną w postaci pierścienia tiazolinowego

nie, podczas gdy edeiny A i B hamują rozwój drobnoustrojów gramodatnich i gramujemnych. Także etamycyna należąca do grup heterodetów peptydów homeomerycznych (schemat 1) i telomycyna, należąca do grupy heteropeptydów peptydów heteromerycznych, wykazują podobny zakres działania wobec bakterii gramodatnich. Najbardziej przydatną systematyką antybiotyków wydaje się ta, która grupuje te biologicznie czynne substancje według miejsca ich zadziałania na komórkę drobnoustroju (103, 194, 195).

## II. Budowa antybiotyków oligo- i polipeptydowych

Zarówno homeomeryczne jak i heteromeryczne antybiotyki peptydowe nie mają ściśle określonej ilości aminokwasów w cząsteczce. Np. z homeomerycznych antybiotyków tyrocydina A zawiera 10, a bacytracyna 12 aminokwasów w cząsteczce. W grupie heteromerycznych antybiotyków edeina zawiera 5, mykobacyna 13, polimiksyna 4—5, aktynomycyna w dwóch pierścieniach 10 aminokwasów. Ogólnie w omawianych grupach antybiotyków przeważają związki o parzystej ilości aminokwasów (28, 52, 58, 71, 84, 85, 86, 120, 121, 124, 190).

W skład substancji czynnych tego typu wchodzi nie tylko L(—), lecz także D(—) aminokwasy, które nie występują w białkach badanych do-



tychczas (1), choć wykryto je w formie wolnej u niektórych zwierząt i roślin (115, 116, 148). Niektóre antybiotyki peptydowe są zbudowane z samych aminokwasów i hydroksykwasów o konfiguracji D, jak np. amidomycyna (84). Wyodrębniono także aminokwasy o budowie nie spotykanej w innych poza antybiotykami związkach (tablica 3).

Tablica 3

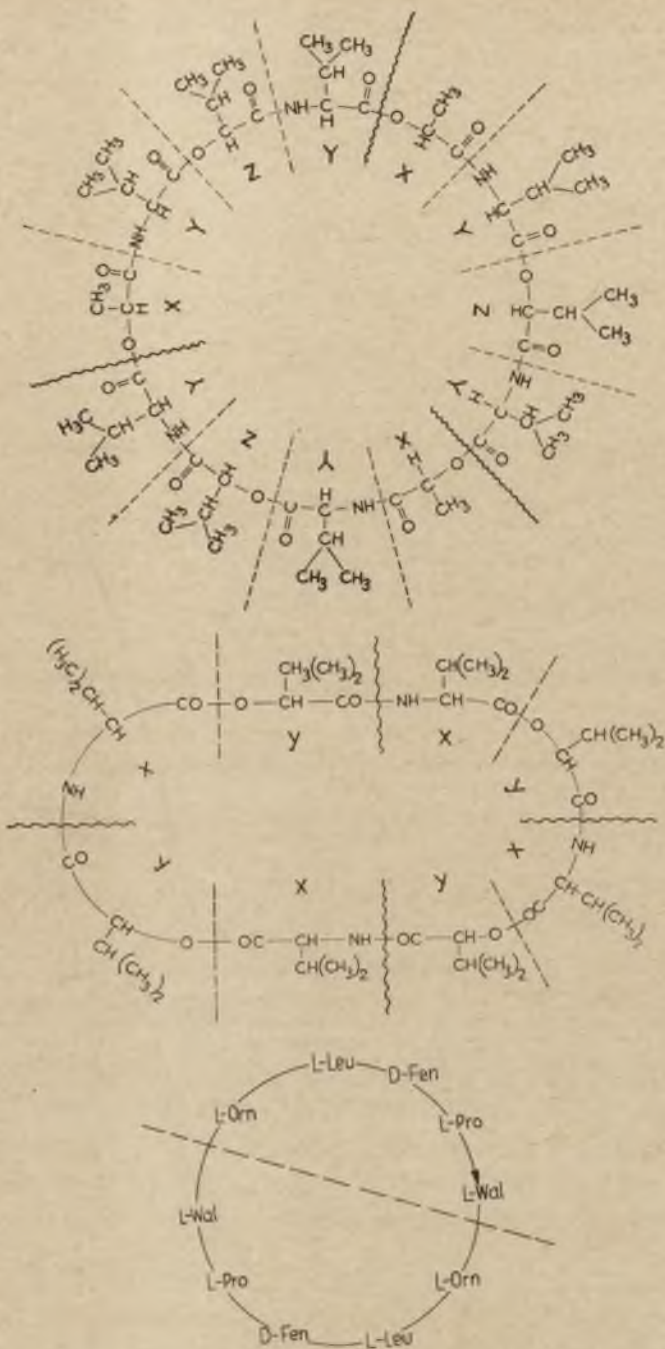
Niektóre aminokwasy spotykane tylko w antybiotykach oligo- i polipeptydowych

Aminkwasy niebiałkowe występujące w antybiotykach	Antybiotyk
$\beta$ -Alanina	Botromycyna A, B
$\beta$ -1(2-tiazolo)- $\beta$ -alanina	Botromycyna A, B
Kwas $\alpha$ - $\beta$ -dwuamino-propionowy	Wiomycyna, Kapreomycyna, Edeina A i B
L- $\beta$ -Lizyna	Wiomycyna, Mykotrycyna, Kapreomycyna, Geomycyna
Nitrotyrozyna	Ilamycyny
Sarkozyna	Aktynomycyny i Etamycyna
L-fenylosarkozyna	
$\alpha$ -(2-iminoheksa-hydro-4-pirydylo)-glicyna	Kapreomycyna
$\beta$ -Metylo-L-tryptofan	Telomycyna- Neotelomycyna
Dehydrotryptofan	Neotelomycyna
L-hydroksyleucyna	LL-AO341A, LL-A0341B, Telomycyna
N-metyloleucyna	Monomycyna D <sub>1</sub>
6-dwuazo-5-keto-L-norleucyna	Dwuazomycyna B
L- $\gamma$ -formylometylonorwalina	Rufomycyny (Ilamycyny)
3-nitro-4-hydroksy-L-feniloalanina	Rufomycyny (Ilamycyny)
N-metylotreonina	Stendomycyna
Kwas 2, 6-dwuamino-7-hydroksyazelainowy	Edeina A i B

Charakterystyczną cechą budowy antybiotyków polipeptydowych jest występowanie pewnych fragmentów kilkakrotnie, np. czterokrotnie waliny i kwasu D- $\alpha$ -hydroksyzowalerianowego w cząsteczce amidomycyny (84). Znany antybiotyk, w którym skład wchodzi kilka związków podstawowych powtarzających się w różnych kombinacjach (rysunek 4 a, b, c).

W niektórych cyklicznych heterodetach peptydowych występują także metale, np. żelazo. Do tego typu substancji należą albomycyna i ferrimycyna (ogólna nazwa sideromycyny) wyodrębnione z hodowli drobnoustrojów należących do rodziny *Aspergillaceae* (105, 106, 107, 185, 238) (rysunek 5).

Występowanie struktur cyklicznych nie jest cechą specyficzną antybiotyków peptydowych, gdyż spotyka się ją także np. w hormonach peptydowych przysadki mózgowej i trzustki (oksytocyna, wazopresyna) oraz tarczycy (kalcytoniny) (1, 75, 99, 119, 125, 192). Znane są także pep-



**Rys. 4.** Budowa antybiotyków peptydowych złożonych z dwóch lub więcej fragmentów powtarzalnych

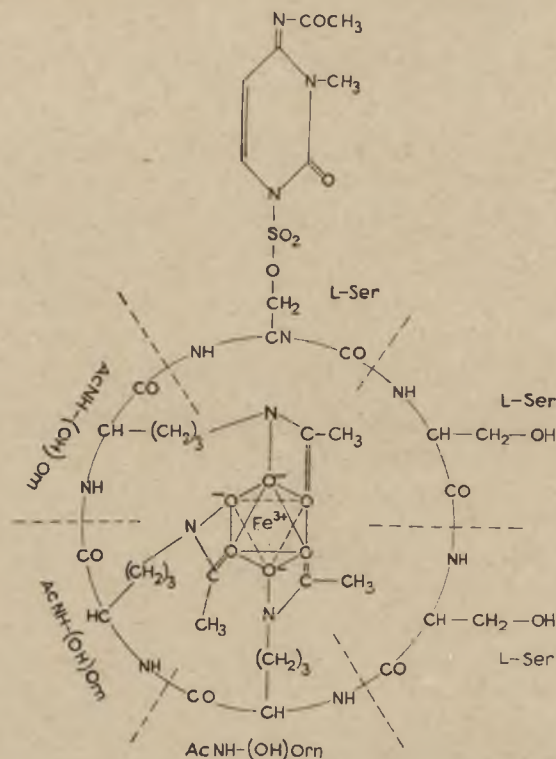
a. Walinomicyna (wg 31)

x – kwas L-mlekowy, y – D- lub L-walina, z – kwas D- $\alpha$ -hydroksyzizowalerianowy

b. Amidomicyna (wg 84)

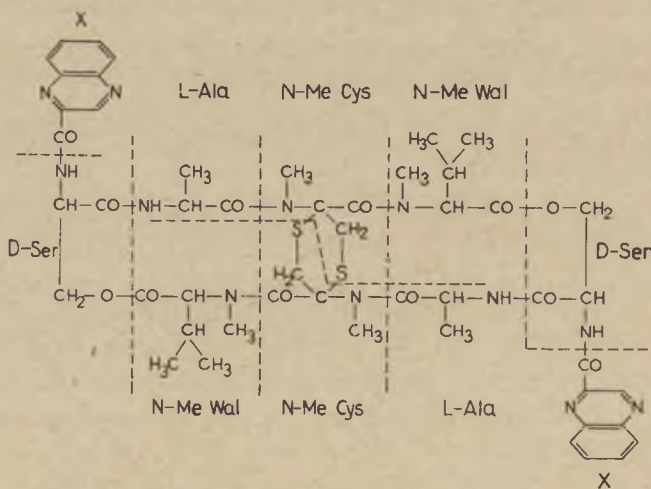
x – D-walina, y – kwas D- $\alpha$ -hydroksyzizowalerianowy

c. Gramicydyna S – homodetek dekapetydowy złożony z dwóch części o identycznej budowie (wg 67)

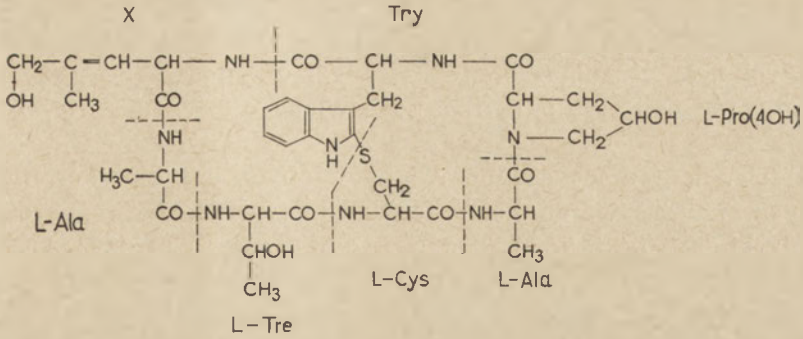


Rys. 5. Budowa cyklicznego heterodetu albomycyny (wg 185, 238)  
 AcNH-(OH)Orn = N<sup>6</sup> — acetylohydroksyornityna, x — pierścień pirymidynowy

tydy cykliczne pochodzenia roślinnego, na przykład heksapeptyd — faloïdyna z grzyba *Amanita phalloides* (cyt. wg 30) obecnie zaliczana do antybiotyków (24) oraz heptapeptyd — ewolidyna z liści *Evodia Xanthoxyloï-*







Rys. 6. Hipercyklizacja występująca w antybiotykach peptydowych echinomycynie (a) i faloidynie (b) (wg 24, 107)

(a) x — kwas chinoksalowy, (b) x — kwas 9(2-hydroksyizopropylideno)- $\alpha$ -aminopropionowy

*des* (*Rutaceae*) (93), złożona z aminokwasów o konfiguracji L (25, 27, 93, 126, 140, 229). Podobnie jak w wielu związkach pochodzenia naturalnego, np. terpenach, w antybiotykach polipeptydowych występuje tzw. hypercyklizacja struktury. Tym terminem Bodanszky i wsp. (22, 24) określają występowanie małych związków cyklicznych w makrocyklicznym wzorze. Hypercykliczną strukturę wykazują między innymi echinomycyna i faloidyna (rysunek 6 a, b).

### III. Właściwości

Budowa cykliczna oraz niespotykane na ogół w przyrodzie wiązania chemiczne między poszczególnymi składnikami, np. w bacytracynie A (rysunek 3), powodują, że antybiotyki polipeptydowe są na ogół odporne na działanie enzymów proteolitycznych pochodzenia zwierzęcego (trypsyna, pepsyna, pankreatyna i erypsyna) (218, 219). Antybiotyki z grupy polimyksyn rozkładają się jednak pod wpływem enzymów proteolitycznych pochodzenia roślinnego: pronazy, papajotyny (syn. papainy) oraz bakteryjnego — nagarsy czyli subtylopeptydazy A (57, 80, 168, 224, 225, 226, 227). O enzymatycznym rozkładzie decyduje m.in. rozmieszczenie D- i L-aminokwasów i grup hydrofobowych w cząsteczce. Na przykład ułożenie powierzchniowe grup hydrofobowych i naprzemienne D- i L-aminokwasów powoduje nierozpuszczalność w wodzie gramicydyny A i S i ich oporność na działanie nie tylko chymotrypsyny i pepsyny, lecz także pronazy i nagarsy. Również tyrotrycyna nie ulega ze względu na swą budowę całkowitemu trawieniu przez proteazę bakteryjną oraz papainę (78, 207, 256).

Wśród enzymów rozkładających antybiotyki polipeptydowe na uwagę zasługują specyficzne enzymy wytwarzane przez komórkę producenta danego antybiotyku — peptydazy i esterazy. Szczep *Bacillus colistinus*

produkujący kolistyny A i B wytwarza kolistynazę — enzym rozkładający oba rodzaje kolistyny (51, 95), Katz i Peinta (101) zauważyli w 1957 roku, że *Achromobacter* sp. rozkłada aktynomycynę D (IV) z wytworzeniem czerwonego barwnika pozbawionego aktywności mikrobiologicznej.

Pierścień laktonowy aktynomycyny i innych antybiotyków polipeptydowych, należących do heterodetów, jest rozkładany przez esterazy wielu drobnoustrojów. W 1966 roku Perlman i wsp. (172, 173) zaobserwowali rozkład aktynomycyny D i C<sub>3</sub> do kwasu aktynomycynowego i monolaktonu pod wpływem enzymów szczepu *Actinoplanes* (IMRU-F3-15). Na te same związki rozkłada aktynomycyny indukowana laktonaza wytwarzana przez szczep *Actinoplanes missouriensis* (102, 171, 174, 247). Perlman i Capek (171) przypuszczają, że chromoforowy składnik aktynomycyny odgrywa główną rolę w procesie indukowania laktonazy. Konstytucyjna laktonaza *A. missouriensis* nie rozkłada żadnej aktynomycyny, rozkłada natomiast dwuhydrostafylomycynę oraz hydrolizuje wiązanie laktonowe echinomycyny, etamycyny, stendomycyny, wernamycyny B i albomycynę (92).

Tablica 4

Ilość wolnych grup zasadowych w antybiotyku, a obserwowane oddziaływanie w zależności od typu barwienia komórek wg (84)

Nazwa antybiotyku	Ilość grup zasadowych	Reakcja Grama badanego drobnoustroju
Cyrkulina	5	—
Polimiksyna	6	—
Etamycyna	0	+
Tyrocydyna	1	+
Gramicydyna S	2	±
Kapreomycyna	4	±
Walinomycyna	0	+
Stafilomycyna	0	+
Kolistyna	5	—

W zależności od charakteru wolnych grup w cząsteczce antybiotyków rozróżnia się antybiotyki oligo- i polipeptydowe kwaśne, zasadowe i obojętne. Antybiotyki zasadowe, np. polimiksyny A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, M i P, cyrkuliny A, B, działają głównie na bakterie gramujemne (20, 48, 59, 108, 183). Wyjątek stanowią antybiotyki zasadowe, gramicydyna S i kapreomycyna, działające w różnym stopniu na bakterie gramodatnie jak i gramujemne (84, 91, 181). Gramicydyna A, B i C są antybiotykami obojętnymi (112, 221). Antybiotyki kwaśne, jak amfomycyna, tyrocydyna, etamycyna, wernamycyna B, dorycyna, działają zasadniczo na bakterie gramodatnie (5, 23, 25, 34, 38, 39, 84, 130, 169, 237). Podobne działanie



mają duramycyna, cinnamycyna i aspartocyna (52, 130, 139, 147). Zależność działania na drobnoustroje od ilości grup zasadowych i kwaśnych w antybiotyku podają tablica 4 i 5.

Tablica 5

Spektrum antybiotyków zasadowych i kwaśnych badane *in vitro* wg (84)

Rodzaj drobnoustroju	Stosowany antybiotyk w $\mu\text{g/ml}$ i rodzaj jego oddziaływania				
	Cyrkulina zasadowy	Polimiksyna zasadowy	Etamycyna kwaśny	Tyrocydyna kwaśny	Gramicydyna S zasadowy
<i>Salmonella sp.</i>	0,4—6,2	0,02	200	800	50
<i>Shigella sp.</i>	0,4	0,02	200	—	12
<i>Escherichia coli</i>	3,1	0,02	200	300	25
<i>Streptococcus sp.</i>	10	50	0,04—1,25	—	10
<i>Diplococcus sp.</i>	—	50	0,04—1,25	2,5	10

Niektóre antybiotyki peptydowe znane są jako antagoniści aminokwasów (262). Zestawienie antybiotyków — inhibitorów konkurencyjnych aminokwasów opracowali Nass i wsp. (152) w 1971 roku; m.in. dwuazomycyna jest antagonistą glutaminy, a kanamycyna argininy.

Wiele antybiotyków peptydowych po rozpuszczeniu powoduje znaczne zmiany napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika działając podobnie jak powierzchniowoczynne detergenty (62, 94, 123, 129, 175). Gramicydyny, tyrocydyny, polimiksyny i cyrkuliny w roztworze (6, 175) wykazują podobny mechanizm działania na komórkę wrażliwą jak tenzydy; czy detergenty niejonowe lub kationowe. Efekty działania polimiksyn na błony cytoplazmatyczne drobnoustrojów wrażliwych porównuje się z efektami działania detergentu kationowego — bromku cetylotrójmetyloamoniowego (198, 199). Antybiotyki wykazują jednak pewną specyfikę działania. Podczas gdy przy  $\text{pH}$  7 detergenty kationowe są bardziej aktywne w stosunku do bakterii gramodatnich, to polimiksyny działają głównie na bakterie gramujemne (6, 21, 62, 184). Właściwości powierzchniowoczynne może warunkować cała cząsteczka antybiotyku lub jej ściśle określony fragment. W grupie cyrkulin i polimiksyn przypisuje się te właściwości całej cząsteczce, chociaż Burger (35) uważa, że w polimiksynach warunkuje je tylko kwas (+)-6-metylooktanowy, który sam ma właściwości substancji powierzchniowoczynnej (179). Rola tego kwasu w antybiotyku wg innych badaczy jest bliżej nieokreślona (48, 112, 155). Zamiast kwasu (+)-6-metylooktanowego w skład polimiksyny B<sub>2</sub> wchodzi kwas izooktanowy (223, 224).

Charakter zasadowy nadaje cząsteczce polimiksyn kwas L- $\alpha$ , $\gamma$ -dwuaminomasłowy (242, 243, 244). Acetylacja wolnej grupy aminowej kwasu



L- $\alpha$ , $\gamma$ -dwuaminomasłowego lub metylosulfonowanie powodują utratę aktywności przeciwbakteryjnej (89, 240, 243, 244, 257). Zmiana w polimiksynie B<sub>1</sub> kwasu L- $\alpha$ , $\gamma$ -dwuaminomasłowego na D- $\alpha$ , $\gamma$ -dwuaminomasłowy daje sześciokrotne zmniejszenie aktywności w porównaniu z polimiksyną B<sub>1</sub> w stosunku do testowego szczepu *Klebsiella pneumoniae* ATCC 100131 *in vitro* oraz *in vivo* u myszy; aby uzyskać tę samą bakteriobójczość szczepu *E.coli*, którym w celach doświadczalnych zakażono zwierzęta, należało dać trzykrotnie większą dawkę (241, 242, 243, 244, 257). Polimiksyny A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>, które mają w cząsteczce resztę kwasu dwuaminomasłowego o konfiguracji D, wykazują mniejszą niż polimiksyna B aktywność przeciwbakteryjną (139, 241, 242, 243).

Wprowadzenie niewielkich zmian w budowie antybiotyku powoduje zmianę jego działania nie tylko na drobnoustroje, lecz także i zwierzęta doświadczalne. Short (210) w 1952 roku zauważył, że acetylowanie i metylowanie polimiksyny A pozbawia ją nefrotoksyczności przejawiającej się jako białkomocz u zwierząt doświadczalnych. Brownlee i wsp. (32, 33) stwierdzili, że można całkowicie zapobiec pojawianiu się białkomoczu u psów i szczurów podając jednocześnie z antybiotykiem DL-metioninę lub S-metylo-L-cysteinę. Przed toksycznym działaniem polimiksyny A na szczury chronią ponadto cholina i S-metylotiomocznik. Znoszenie działania toksycznego przypisuje się obecności labilnych grup metylowych w podawanych związkach, jednak mechanizm tego działania nie jest dotychczas zbadany (32, 210). Także glutation powoduje obniżenie nefrotoksyczności polimiksyn u zwierząt doświadczalnych (33, 66).

Brownlee i Short (33), Florey i wsp. (66) oraz Pratt i Defrenoy (184) przypisują działanie toksyczne polimiksyn głównie obecności w ich cząsteczce D-seryny.

Omawiana grupa peptydowych antybiotyków heteromerycznych ma w swej cząsteczce zarówno grupy lipofilne (kwasy tłuszczowe) jak i hydrofilne (niektóre aminokwasy), co umożliwia łączenie się antybiotyku z różnymi składnikami błony komórkowej wrażliwych mikroorganizmów (82, 89, 108, 155, 159, 223, 256). Na działanie antybiotyków oligo- i polipeptydowych wpływają również ich jonowe właściwości. Antybiotyki tego typu mają silne powinowactwo do błony cytoplazmatycznej (11, 62, 67, 104, 109, 123, 129, 160, 175, 217, 239), przy łączeniu się z nią najpierw zobojętnia się ładunek własny komórki bakteryjnej, a następnie może nastąpić jego zmiana na pewnych odcinkach ściany komórkowej (56, 123, 160, 206). Wynikiem tego działania na powierzchnię błony jest aglutynacja komórek zarówno wrażliwych jak i opornych mikroorganizmów (55, 61, 62, 123, 159, 160). Aglutynacja połączona z utratą ruchliwości występuje pod wpływem polimiksyn i cyrkulin. Bacyltracyna nie ma właściwości aglutynowania (11, 123). Efekt zlepiania komórek jest bardziej widoczny w przypadku szorstkich form R niż gładkich S, co wykazano u *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (61, 123, 159, 203).

Okazało się, że aglutynacja komórek gramujemnych związana jest z brakiem antygeny O (123).

Polimiksyna B i E *in vitro* tworzy podobnie jak streptomycyna kompleksy z kwasami nukleinowymi (55, 123). Ponadto polimiksyna B wykazuje także zdolność tworzenia nierozpuszczalnych kompleksów z mononukleotydami, czego nie obserwowano w przypadku innych antybiotyków (120). Kompleksy tego typu są najbardziej trwałe przy pH 7,5. Trwałe kompleksy daje polimiksyna także z niektórymi fosfolipidami, heparyną i kwasami żółciowymi (123).

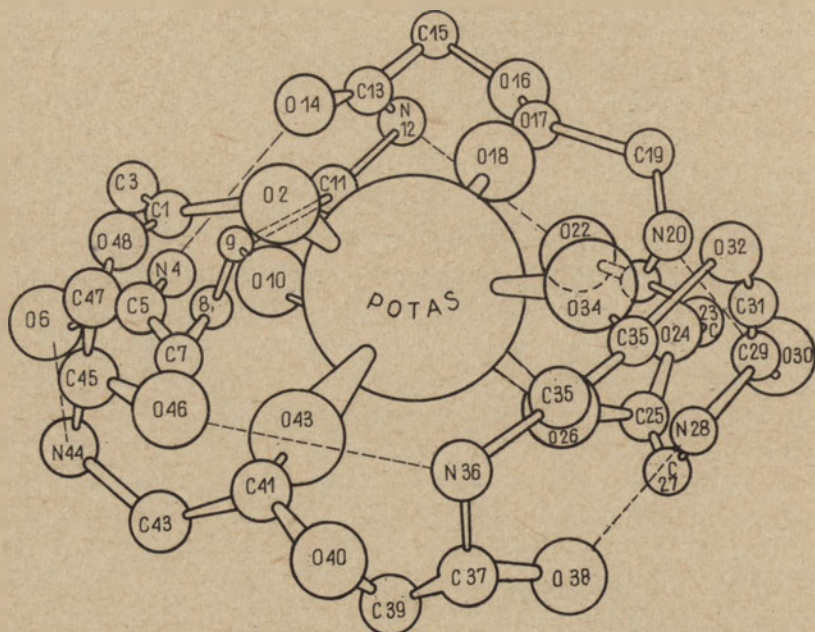
Wiele antybiotyków ma zdolność łączenia się i tworzenia kompleksów z kationami jedno- i dwuwartościowymi (21, 51, 157, 197, 239, 250, 261), szczególnie bacytracyna tworzy tego typu połączenia z cynkiem, kadmem i magnezem (82, 239, 252), przy czym kompleksowanie z cynkiem i kadmem wzmacnia jej aktywność biologiczną (176, 216, 252). Kompleksy z kationami jednowartościowymi (litem, sodem, potasem, rubidem i cezem) tworzą: eniatyna B, nonaktyna, walinomycyna, monamycyna i gramicydyny A, B i C (74, 176, 177, 178, 204, 220, 239, 252). Polimiksyny tworzą połączenia z jonami wapnia  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  (65, 79, 157, 252). Te właściwości powodują, że antybiotyki oligo- i polipeptydowe używane są m.in. jako sztuczne nośniki kationów do wnętrza komórki (42, 82, 146, 235, 239, 260) i przez błony mitochondrialne. Sztucznym nośnikiem, na którym badano transport jonów alkalicznych do komórki, jest walinomycyna. Powoduje ona regulowane fizjologicznie przenikanie jonów przez błonę mitochondrialną i nadmierne gromadzenie potasu w mitochondriach komórek wątroby szczura (235). Zjawisku temu towarzyszy wzmożone gromadzenie się wody, co daje w efekcie pęcznienie mitochondriów. Podobne działanie stwierdzono dla gramicydyny (42, 82, 146).

Massari i Azzone oraz Urry omawiają udział walinomycyny w transporcie jonów  $H^+$  i  $K^+$  przez błony komórkowe i mitochondrialne dyskutując zagadnienie transportu biernego i aktywnego (cyt. wg 194, 195 i 239). Antybiotyki działające wybiórczo na transport metali alkalicznych do komórki nazwano antybiotykami jonoforowymi (82, 186, 239, 252). Używając do badań syntetycznych fragmentów antybiotyków peptydowych stwierdzono, że pewne pentapeptydy podobne do występujących w homodetach cyklicznych mają także właściwości wiązania kationów *in vitro* (204). Powinowactwo do kationów jedno- i dwuwartościowych niektórych depsiptydów, np. walinomycyny, maleje w szeregu  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Ca^{2+}$  (16, 51, 82, 220, 239) co wyjaśnia łatwość tworzenia połączeń niektórych depsiptydów z potasem. Tosteson i wsp. (235) oraz Urry (239) tłumaczą uszeregowanie potasu przed sodem właściwościami fizykochemicznymi jonu potasowego. Uwodniona cząsteczka tego jonu jest znacznie mniejsza niż jony innych pierwiastków znajdujących się w szeregu, co znacznie ułatwia jej przenikanie do cząsteczki antybiotyku. Połączenia antybiotyków z kationami jednowartościowymi



mają charakter trwałego kompleksu (51, 82, 220, 239, 252). Budowę takiego kompleksu przedstawia rysunek 7.

U r r y (239) sugeruje, że w powstawaniu kompleksu walinomycyny z po-

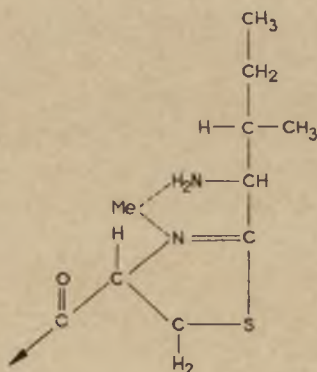


**Rys. 7.** Kompleks walinomycyny z  $\text{KAuCl}_4$  (chlorozłocieniem potasu) przedstawiony wg 176

Linie przerywane oznaczają wiązania wodorowe

Grupy metylowe znajdują się przy węglu (C): 5, 31 i 47, grupy izopropylowe występują przy atomach węgla 3, 7, 11, 19, 23, 27, 35, 39 i 43

Srednica atomów przesadnie powiększona celem bardziej ilustratywnego przedstawienia zachodzącego zjawiska kompleksowania



**Rys. 8.** Hipotetyczne centrum wiązania cynku ( $\text{Zn}^{2+}$ ) w cząsteczce bacytracyny A (wg 236)

Centrum znajduje się w cząsteczce przy peptydzie powstałym z połączenia cysteiny z izoleucyną



tasem główną rolę odgrywają trzy grupy metylowe. Kationy mogą działać w dwojaki sposób: albo są absorbowane przez wrażliwe centra w cząsteczce antybiotyku (rysunek 8), albo przez wrażliwe na antybiotyki miejsce w błonie komórkowej lub cytoplazmatycznej drobnoustroju. W obu przypadkach działanie antybiotyku na drobnoustrój jest słabsze. Antybiotyk może także tworzyć odwracalny kompleks z kationem, co również częściowo osłabia jego działanie na komórkę (21, 79, 82, 157, 252).

W przypadku polimiksyn tworzenie nieaktywnego kompleksu z pewnymi kationami można wykluczyć na drodze teoretycznej. Tworzenie np. trwałego kompleksu polimiksyny B z magnezem jest mało prawdopodobne, ponieważ dla odwracalnego zinaktywowania antybiotyku stosunek atomów magnezu do cząsteczki polimiksyny musiałby wynosić aż 400:1. Działanie kationów może być znoszone przez odpowiednie aniony, np. działanie chelatujące magnezu jest znoszone przez jon cytrynianowy (157).

Działanie antybiotyków polipeptydowych osłabiają lub znoszą wszelkiego typu anionity (21), niektóre syntetyczne związki dodawane do organopreparatów, np. związki hamujące krzepliwość krwi wydatnie znoszą działanie polimiksyny B (236). Antybiotyki oligo- i polipeptydowe łatwo łączą się z jonami fosforanów i polifosforanów jak np. krystalomycyna i amfomycyna (35, 130). Jony fosforanowe oraz fosfolipidy i zjonizowane grupy fosforanowe błony cytoplazmatycznej tworzą kompleksy z polimiksynami (39, 62, 129, 217).

Polimiksyny i cyrkuliny ulegają w znacznym stopniu inaktywacji pod wpływem kefaliny (a w pewnym stopniu lecytyny i lizolecytyny) (200) oraz fosfolipidów ekstrahowanych z ziaren soi i komórek bakteryjnych (21, 60, 61, 62, 67, 76, 129). Również polifosforany oraz pewne frakcje tkanek zwierzęcych w wydatnym stopniu znoszą działanie w/w antybiotyków (61, 206—217, 218). Fosfatydyloseryna hamuje *in vitro* i *in vivo* działanie gramicydyny na komórki bakterii wrażliwych (89), a lecytyna i sfingomielina — działanie tyrocydyny (6). Również polifosforany, a także frakcje fosfolipidowe komórek roślinnych i zwierzęcych inaktywują działanie gramicydyny i tyrocydyny (6, 89). Zdolność kolistyn (polimiksyny E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub>) i polimiksyn do tworzenia kompleksów z anionami organicznymi i nieorganicznymi wykorzystano do syntezy nowych mniej toksycznych form obu antybiotyków, m.in. siarczanu polimiksyny B oraz metanosulfonianu kolistyny, stosowanych do chwili obecnej w terapii człowieka. Metanosulfonian ma mniejszą aktywność przeciwbakteryjną (241, 242, 244), jednakże związek ten łatwo ulega hydrolizie pod wpływem surowicy ludzkiej w 37° i przechodzi w aktywną zasadę (17). W weterynarii stosuje się również połączenia antybiotyków polipeptydowych z anionami organicznymi, nie ulegającymi rozpadowi w organizmie zwierzęcym. Davison i Williams (49, 258) zastosowali połączenie bacytracyny z kwasem 5,5'-metylenodwusalicylowym dla zwiększania tuszy zwierząt pod wpływem bacytracyny. Związek ten podaje się w karmie dla prosiąt,

drobiu i nerek (258). Sam kwas metylenodwusalicylowy nie ulega przemianom w organizmie zwierząt hodowlanych.

#### IV. Mechanizm działania antybiotyków oligo- i polipeptydowych na komórkę drobnoustroju

Antybiotyki oligo- i polipeptydowe wykazują różnorodne działanie na wrażliwe mikroorganizmy:

- a) hamują syntezę ściany komórkowej lub niszczą jej budowę, np. bacytracyna (221), wankomycyna, rystocetyna A i B (189),
- b) niszczą bądź funkcje bądź syntezę błony cytoplazmatycznej albo jedno i drugie, np. cyrkuliny i polimiksyny (35, 72, 96, 145, 150, 155, 158, 159),
- c) hamują syntezę białek lub kwasów nukleinowych, np. botromycyny, enomycyna, mikamycyna i aktynomycyna (47, 127, 144, 166, 232, 264, 265),
- d) działają na transport jonów przez błony komórkowe i mitochondrialne drobnoustrojów, np. walinomycyna, gramicydyna, (82),
- e) hamują procesy fosforylacji oksydacyjnej i oddychania (165), np. antymycyny, walinomycyna, gramicydyna (81, 194, 195).

Działanie, które omówiono w punkcie a obserwuje się w stosunku do komórek będących w fazie intensywnego wzrostu. Natomiast sposób działania wymieniony w punkcie b obserwowano głównie w stosunku do komórek bakteryjnych będących w stacjonarnej fazie wzrostu (35). Antybiotyki o działaniu wymienionym w punkcie c, d, i e są aktywne w stosunku do rosnących i dzielących się komórek. Efekt działania antybiotyków tej grupy w najniższym stężeniu hamującym (MIC — ang. *minimal inhibitory concentration*) i powyżej jest zwykle bakteriobójczy. Antybiotyki jak polimiksyny i cyrkuliny powodują ekstrakcję pewnych składników komórki na skutek zmian w przepuszczalności błony cytoplazmatycznej. W wyniku działania np. polimiksyny B, E i A (232) następuje ekstrakcja zasad purynowych i pirymidynowych oraz białka komórkowego, D-rybozy i nieorganicznego fosforu zarówno z komórek wrażliwych jak i opornych (59, 61, 106, 109, 155, 156, 157, 160). Po hydrolizie klarownych supernatantów zawiesin komórkowych wyodrębniono pentozę, adeninę, guaninę, adenozyne, guanozyne, uracyl i kwas glutaminowy (19, 40, 41, 145, 159, 160, 167, 198, 199).

Antybiotyki peptydowe wybiórczo działają na niektóre struktury komórkowe, powodując w nich charakterystyczne zmiany (rysunek 9 a, b).

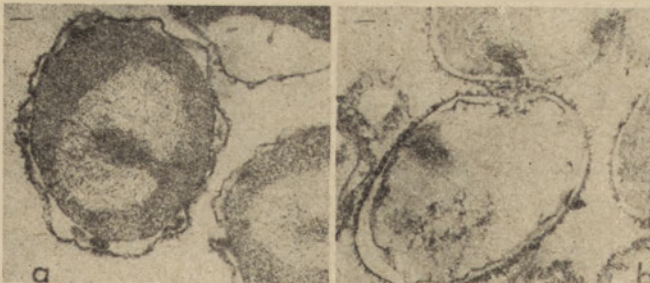
Polimiksyna powoduje lizę protoplastów bakteryjnych w roztworze 0,1—0,5M sacharozy zawierającym sole magnezu i stabilizującym ciśnienie osmotyczne (109, 157, 158, 159, 190). Wygląd protoplastów po zadziałaniu polimiksyny B przedstawia rysunek 10 a, b.





**Rys. 9.** Efekty działania siarczanu polimiksyny B na komórki *E. coli* obserwowane w mikroskopie elektronowym (wg 105)

- a — komórki zawieszone w buforze Tris o pH 7,2 pow. około 63000x  
 b — komórki po zadziałaniu polimiksyny w stężeniu 25µg/ml przez 30 min. Widoczne podobne do pęcherzy wybrzuszenia w ścianie komórkowej pow. około 95000x  
 c — powiększony 190000x fragment komórki z rys. a; „pęcherze” są uformowane z zewnętrznej warstwy ściany komórkowej  
 kreska na rys. a, b i c oznacza wielkość 0,1µm



**Rys. 10.** Wygląd sferoplastu komórek *E. coli* po zadziałaniu polimiksyny B w stężeniu 25µg/ml (wg 109)

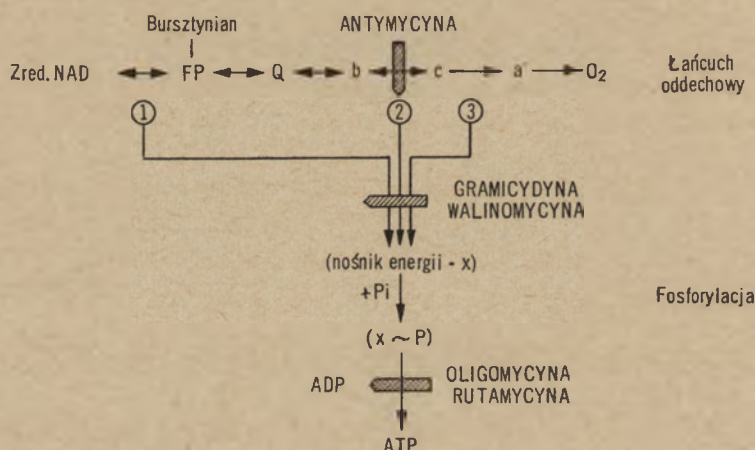
- a — obraz uzyskany w mikroskopie elektronowym natychmiast po zadziałaniu antybiotyku pow. 45000x, widoczne wybrzuszenie błony cytoplazmatycznej  
 b — obraz uzyskany po 30 min. działania polimiksyny. Powiększony 45000x, sferoplasty widoczne pozbawione są cytoplazmy  
 Długość odcinka prostej zamieszczona na rysunku a i b odpowiada 0,1µm



Gramicydyna D powoduje pęcznienie mitochondriów z wątroby szczura a następnie ich liżę w roztworze izotonicznym sacharozy i buforu Tris—(hydroksy-metylo)aminometanu (253).

Doniesiono także o działaniu antybiotyków tej grupy na aktywność enzymów. Polimiksyna B hamuje aktywność esteraz *Mycobacterium* sp. i innych (46, 47). Polimiksyna E (kolistyna) w stężeniu poniżej MIC hamuje w komórkach szczepu wrażliwego *Pseudomonas aeruginosa*, utlenianie glukozy, bursztynianu, kwasu pirogronowego oraz działanie dekarboksylazy pirogronianowej (145).

Wpływ antybiotyków na biosyntezę białka badano w celu wyciągnięcia ogólnych wniosków o właściwościach zasadowych antybiotyków oligo- i polipeptydowych. Okazało się, że antybiotyki aminoglikozydowe, np. neomycyna, kanamycyna, streptomycyna i gentamycyna hamują biosyntezę białka w obecności rybosomów bakteryjnych, powodując fałszywe odczytywanie kodonów.



**Rys. 11.** Specyfika działania antybiotyków w odniesieniu do układu oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej (wg 160)

Strzałki zakreskowane — miejsca blokowania reakcji, X — nośnik energii o nieznannej budowie,  $x\sim P$  — energia związana w nieznanym związku  
Gramicydyna i walinomycyna rozkojarzają proces fosforylacji i oddychania. Oligomycyna i walinomycyna hamują oksydacyjną fosforylację i ATPazę

Lin i Tanaka (127) oraz Tanaka, Iguso i wsp. (231) badali wpływ antybiotyków na biosyntezę białka w układach modelowych złożonych z rybosomów *E. coli*, mRNA i sRNA komórkowego oraz odpowiednich aktywatorów. W obecności polinukleotydu adenylowego (poliA) śledzili wbudowywanie lizyny, argininy, treoniny i seryny do łańcucha peptydowego, a w obecności polinukleotydu urydylowego (poliU) — fenyloalaniny, leucyny, seryny i treoniny. Okazało się, że wiomycyna, polimiksyna B i botromycyna A<sub>2</sub> hamują syntezę białka, ale nie powodują fałszywego odczytywania kodonu. Mechanizm procesu hamowania biosyn-

tezy białka przez te antybiotyki nie został dokładnie wyjaśniony (127, 138, 231, 233). Przypuszcza się, że botromycyna A<sub>2</sub> hamuje przenoszenie aminokwasów z aminoacylo-sRNA na polipeptydy, których biosynteza przebiega na rybosomach (127). Stosunkowo najsłabsze hamowanie biosyntezy następowało w obecności polimiksyny B. Działanie wielu innych antybiotyków na mechanizm biosyntezy białka obserwowano na podobnych układach modelowych (22, 133, 234).

Antybiotyki działają także na łańcuch oddechowy. Gramicydyna i walinomycyna powodują przez tworzenie bloku metabolicznego między procesem oddychania i fosforylacji oksydacyjnej rozkojarzenie w mitochondriach tych dwóch procesów.

Antymycyna 1, 2, 3 hamuje przenoszenie elektronów z cytochromu b na c (rysunek 11). Gramicydyna S hamuje powstawanie ATP w chromoforach drobnoustroju *Rhodospirillum rubrum* oraz proces przenoszenia elektronów indukowany za pomocą energii świetlnej (82).

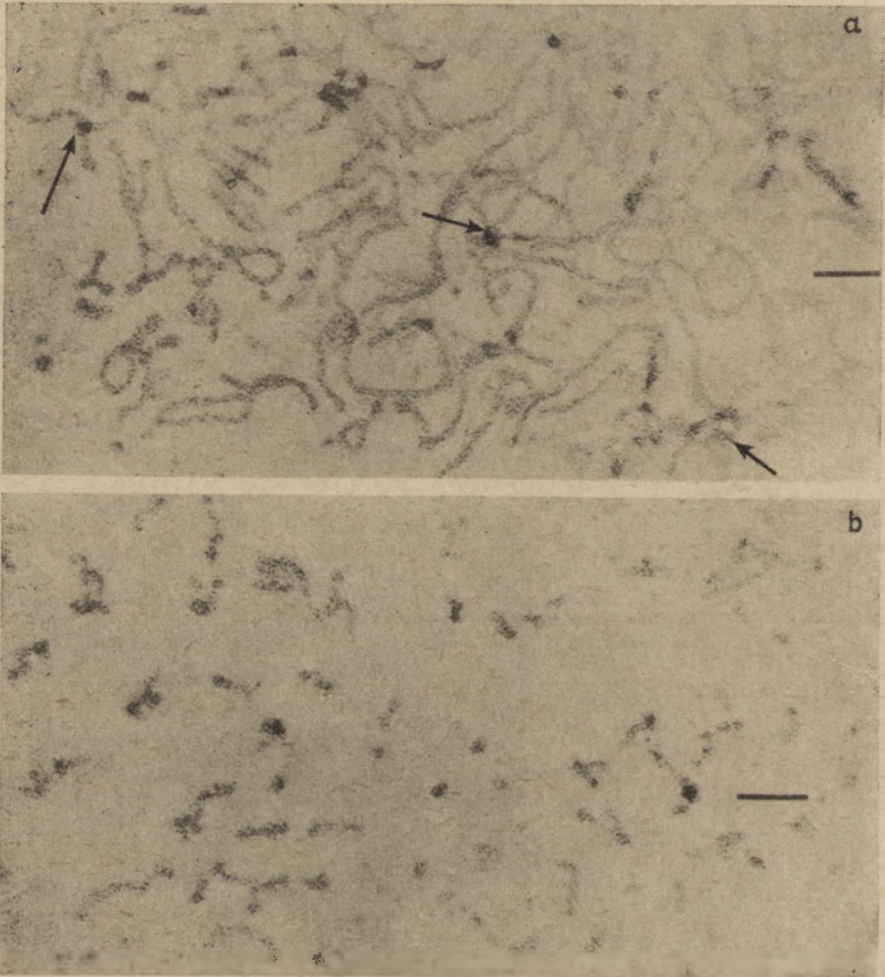
Pewne antybiotyki mają właściwości ochrony komórek przed promieniowaniem, np. gramicydyna chroni komórki drożdżowe przed szkodliwym promieniowaniem gamma (117). Właściwość ta nie jest związana z jej aktywnością przeciwbakteryjną, ponieważ właściwości ochronne miał też roztwór antybiotyku, który po przechowaniu przez 50 dni nie wykazywał żadnego działania hamującego na komórki drobnoustrojów. Kriger i wsp. (117) wysunęli przypuszczenie, że albo nieaktywny antybiotyk dzięki swej budowie lub produkty jego rozpadu mają zdolność inaktywacji rodników chemicznych powstałych w układzie biologicznym po napromieniowaniu. Właściwości tego typu wykazują także penicylina, chloramfenikol, streptomycyna i aureomycyna (117).

Antybiotyki polipeptydowe niszczące funkcje błony cytoplazmatycznej lub hamujące proces jej syntezy mają specjalne działanie nie tylko na morfotyczne i funkcjonalne składniki komórki chorobotwórczego drobnoustroju, ale i na aktywność wytwarzanych przez nie substancji biologicznie czynnych, np. endotoksyn, co ujawnia się niekiedy w odmiennych odczynach serologicznych (129). Bacyltracyna w stężeniu poniżej MIC hamuje wydzielanie  $\alpha$ -hemolizyn z komórek *Staphylococcus aureus* (88). Tyrotrycyna z *Bacillus brevis* oraz aktynomycyna A hamują fibrynolizę  $\beta$ -hemolitycznych streptokoków (*Streptococcus hemolyticus*, grupy A (Lancefield)). Oba antybiotyki hamują również koagulację plazmy przez patogenne szczepy hemolitycznego stafylokokka (153, 154). Wymienione antybiotyki inaktywują streptolizyny i koagulazę patogennych szczepów. Tyrotrycyna w określonych warunkach znosi całkowicie lub częściowo objawy działania toksyny tężcowej i błoniczej na myszy i świnki morskie (154). Podobnie na toksynę tężcową działa chlorek alkilodwumetylobenzylu-amoniowy, detergent kationowy Zefiran, w rozcieńczeniu  $10^{-5}$  (94, 156).

Lopes i Innis (129) stwierdzili, że polimiksyna B powoduje zmia-



nę morfologiczną cząsteczki lipopolisacharydów ze szczepu *E. coli* 018 wyizolowanego z ptaków i powoduje jednocześnie utratę właściwości toksycznych tego kompleksu (129). Pod wpływem polimiksyny B następuje „pocięcie” nitkowatej endotoksyny i zwinięcie w kłębek powstałych fragmentów (rysunek 12 a, b).



**Rys. 12.** Wpływ polimiksyny B na lipopolisacharydy izolowane ze szczepu *E. coli* 018. Badania wykonano w mikroskopie elektronowym Philips 300 (wg 129)  
 a — Przedstawia lipopolisacharydy o budowie podobnej do skupiska wstążek. Widoczna większa gęstość optyczna linii zewnętrznych, powstających w przypadku skrzyżowania „wstążek” (strzałki) mniejsza samych „wstążek” z ich zawartością wewnętrzną  
 b — Zmiany kształtu cząstek lipopolisacharydów po zadziałaniu roztworem polimiksyny B o stężeniu 25 $\mu$ g/ml przez 60 min. Kreska pozioma na rysunku 1 i 2 przedstawia odcinek równy długości 0,1 $\mu$ m

Badania nad oddziaływaniem białek surowiczych na aktywność polimiksyn B, E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> nie doprowadziły do jednoznacznych wyników. Jedni autorzy twierdzą, że surowica zwierząt ciepłokrwistych w 50% inakty-

wuje działanie antybiotyków *in vitro*, podczas gdy drudzy negują jakikolwiek wpływ białek surowiczych (34, 160, 161, 216).

## V. Biosynteza

Mechanizm powstawania antybiotyków oligo- i polipeptydowych jest przedmiotem intensywnych badań (10, 12, 13, 14, 78, 93, 132, 133, 142, 161, 182, 188, 189, 291, 213, 214, 229). Prawie wszyscy badacze zgadzają się, że synteza tych antybiotyków przebiega inaczej niż biosynteza łańcuchów peptydowych białek komórkowych drobnoustrojów (66, 68, 115, 177, 178, 179), przypuszczalnie podobnie do syntezy endotoksyn bakteryjnych, mukopeptydowych składników błony komórkowej i jej fragmentów peptydowych (141, 191). Odmienny przebieg biosyntezy wykazano między innymi dla polimiksyny B (168), tyrocydyny (132, 133), gramicydyny S (56) i antybiotyku U-22, 324 (191).

Za odmiennym schematem syntezy antybiotyków peptydowych od innych dotychczas poznanych peptydów i białek komórkowych przemawiały do 1971 roku następujące fakty:

a) występowanie w antybiotykach różnorodnych aminokwasów i innych składników, których nie spotyka się w żadnych dotąd poznanych peptydach czy białkach,

b) cykliczna budowa i niekiedy jeszcze dodatkowo hypercyklizacja cząsteczki antybiotyków peptydowych, nie obejmująca jedynie jednego lub kilku aminokwasów, które w pewnych antybiotykach tworzą ich łańcuch boczny; ponadto częste występowanie w łańcuchu polipeptydowych antybiotyków cyklicznych i niecyklicznych innych wiązań niż  $\alpha$ -amino-peptydowe, powszechnie spotykane w białkach (np. antybiotyki należące do grupy chinoksalin (111, 112, 137), telomycyna (208), albomycyna (2, 238),

c) występowanie w antybiotykach peptydowych powtarzających się wielokrotnie fragmentów dwu- lub trójpeptydowych (2, 24). Takie wielokrotne sekwencje nie są spotykane w łańcuchach polipeptydowych białek,

d) brak matryc nukleinowych określających sekwencję aminokwasów w cząsteczce antybiotyku co wykazano dla bacytracyny, gramicydyny, tyrocydyny, edeiny, cyrkuliny i polimiksyn (10, 22, 70, 133, 230). Niezidentyfikowany bliżej RNA ma znaczenie przy biosyntezie mykobicyliny (7, 9),

e) mała specyficzność enzymu lub szeregu enzymów biorących udział w syntezie antybiotyku (45, 70, 132, 152, 189), o czym świadczy zmienność produktu w zależności od składu aminokwasów w podłożu. Podając L-tryptofan zamiast L-fenylalaniny udało się otrzymać zamiast tyrocy-



dyny antybiotyków o zmienionej sekwencji aminokwasów. Podobne doświadczenia wykonano dla aktynomycyn (45),

f) hamowanie powstawania antybiotyków bez hamowania biosyntezy białek komórkowych (76, 100, 213, 214) przez określone aminokwasy w podłożu, syntezy tyrocydyny przez 2-metylo-tryptofan i norwalinę, gramicydyny S przez norleucynę, norwalinę i hydroksyprolinę (259), aktynomycyny D (IV) przez 3-metylo-DL-prolinę (266) i bacytracyny przez D-fenylalaninę (214),

g) produkcja antybiotyków oligo- i polipeptydowych dopiero w końcu logarytmicznej fazy wzrostu lub na początku stacjonarnej fazy wzrostu, gdy substancje konieczne dla wcześniej zachodzącej biosyntezy białka i dla wzrostu drobnoustrojów jak np. aminokwasy peptydy, cukry oraz mikroelementy zostały zużyte. Produkty metabolizmu komórkowego znajdujące się w podłożu niejednokrotnie hamują biosyntezę białek nie hamując syntezy antybiotyków i *vice versa*,

h) selektywne hamowanie biosyntezy białka przez jakiś antybiotyk bez hamowania biosyntezy innego antybiotyku, np. przez chloramfenikol czy puromycynę u *Bacillus brevis* syntetyzującego tyrocydynę (131, 132). Cykloheksimid hamuje syntezę antybiotyku U-22, 324 przez grzyb *Trichoderma viride* tylko nieznacznie, natomiast syntezę białka w dużym stopniu (43, 191). Chloramfenikol i aktynomycyna D stymulują włączanie L-treoniny do polimiksyny B, hamując silnie proces włączania aminokwasów do białek komórkowych. Podobnie działa w obecności treoniny borelidyna stymulując biosyntezę polimiksyny B, a hamując syntezę treonylo-tRNA (152).

Przypuszczano początkowo, że w procesach biosyntezy antybiotyków może odgrywać pewną rolę błona komórkowa szczepu produkcyjnego. Dokonano jednak syntezy wielu antybiotyków przy użyciu ekstraktów bezkomórkowych np. tyrocydyny i gramicydyny (26, 70, 163, 193), edeiny (63, 121, 122), aktynomycyny D (103). Przeprowadzono także wiele procesów biosyntezy na protoplastach (10, 136, 170, 182, 189, 204, 214, 215). Niespodziewanie biosynteza była hamowana już w początkowym stadium (15, 76, 100, 141, 152, 213, 214) przez aminokwasy o konfiguracji D, mimo że te właśnie aminokwasy wchodziły w skład antybiotyków. Działanie D-aminokwasów można było znieść podając analogiczny L-aminokwas, np., w przypadku produkcji bacytracyny w komórkach *Bacillus licheniformis* (214) L-fenylalanina znosiła hamujące działanie D-fenylalaniny. Obserwacje tego typu dowodzą, że zmiana konfiguracji aminokwasu L na D następuje w czasie biosyntezy dopiero na poziomie peptydu (3, 4, 76, 204, 205, 213, 214). Wiele teorii powstawania D-aminokwasów w komórkach producentów oraz mechanizmy ich wbudowywania w strukturę antybiotyku przedstawił M a u g e r (141).

W 1971 roku F u j i k a w a i wsp. (70) opisał biosyntezę tyrocydyny przy udziale układów nierybosomalnych i pozbawionych tRNA. Układ

syntetyzujący składał się z dwóch komponent. Jedna z nich aktywująca L- i D-fenylalaninę mogła być w układzie zastąpiona racemazą fenylalaninową. Druga komponenta miała właściwości aktywowania innych aminokwasów i zawierała racemazę zależną od ATP.

Poznano także szereg procesów ubocznych prowadzących do różnego typu przekształceń aminokwasów w cząsteczce antybiotyku, np. walina w cząsteczce aktynomycyny jest metylowana za pomocą metioniny (44, 142, 211); metionina jest także źródłem grup metylowych przy C<sub>4</sub> i C<sub>6</sub> w części chromoforowej aktynomycyny D (103).

## VI. Znaczenie produkowanego antybiotyku dla komórki producenta

Zagadnieniem znaczenia produktu — antybiotyku dla komórki producenta zajęli się w 1946 roku W a k s m a n i wsp. (248), zapoczątkowując badania nad wpływem aktynomycyny na *Streptomyces antibioticus* oraz streptotrycyny na *S. lavendulae*, szczepy wrażliwe na produkowane przez siebie antybiotyki.

Problem postawił już w 1947 roku K o r z y b s k i (110) jeszcze przed wyjaśnieniem zagadnień związanych z zastosowaniem antybiotyków w lecznictwie oraz efektów ich działania na komórki mikroorganizmów wrażliwych. Istnieje wiele hipotez na temat roli, jaką pełni produkowany antybiotyk w komórce producenta. Trzy z nich mają stosunkowo największe poparcie doświadczalne:

- a) antybiotyk jest ubocznym produktem metabolizmu komórki nagromadzonym w czasie jej intensywnego rozwoju,
- b) antybiotyk może powstać z rozpadu makrocząsteczek i białka komórkowego nagromadzonego we wczesnej fazie wzrostu,
- c) antybiotyk może pojawiać się jako produkt metabolizmu związanego ściśle z powstawaniem błony sporewej egzyny czy intyny lub według F o r t n a g e l a (69), błony zewnętrznej i wewnętrznej (50, 86, 245, 250, 251).

W pewnych przypadkach można wykluczyć powstawanie antybiotyku polipeptydu w wyniku rozpadu nagromadzonej uprzednio makrocząsteczki białka. Na przykład mykobacyliny powstają w piątym dniu fermentacji, kiedy obserwuje się znaczny spadek aktywności metabolicznej komórek. W fazie produkcji mykobacyliny następuje wyczerpanie nagromadzonej w fazie logarytmicznej puli aminokwasowej z cytoplazmy. Antybiotyk w piątym dniu fermentacji jest syntetyzowany *de novo* właśnie z tych aminokwasów, gdyż znikaniu aminokwasów z cytoplazmy nie towarzyszy wzmożone pobieranie ich z podłoża (135, 136).

Najwięcej danych nagromadzono na potwierdzenie trzeciej hipotezy, która odnosi się tylko do laseczek sporulujących (*Bacillus*) — produkujących antybiotyki oligo- i polipeptydowe (12). Okazało się, że produkcja



cyrkulin, bacytracyny, bacylizyny i antykapsyny (156, 202, 250) jest ściśle związana z procesem tworzenia przetrwalników komórek producenta. Niektóre związki hamujące proces tworzenia przetrwalników komórek hamują także powstawanie antybiotyku, np. kwas  $\alpha$ -pikolinowy hamuje przetrwalnikowanie szczepu i syntezę polimiksyny (7, 12, 15, 50, 69, 70, 73, 168). Ponadto polimiksyna B i gramicydyna lub ich fragmenty wchodzi w skład otoczki przetrwalników powstałych w komórkach producenta (14, 15, 69, 96). Zjawiska tworzenia się przetrwalników rozpatrywano jako skutek pojawiania się antybiotyku w środowisku. Antybiotyki oligo- i polipeptydowe jako związki powierzchniowo czynne wywołują bowiem szereg zmian, których efektem są procesy autolityczne, nasilające tworzenie endospor (50, 69, 168, 251). Pewne doświadczenia negują znaczenie kwasu L- $\alpha$ , $\gamma$ -dwuaminomasłowego i peptydów polimiksynowych w powstawaniu endospor B polimyxa (29).

Teoria rozpadu autolitycznego białek komórkowych, w którego wyniku miałyby powstawać antybiotyki polipeptydowe, wydaje się z punktu teoretycznego także uzasadniona. Przepuszczalność komórki dla antybiotyku rośnie wraz ze wzrostem jego stężenia wewnątrzkomórkowego. W fazie stacjonarnej wzrostu (faza równowagi), gdy zwiększa się stężenie antybiotyku wewnątrz komórki i wobec tego błona staje się dla niego bardziej przepuszczalna, jednocześnie obserwuje się nasilenie procesów autolitycznych w komórce i podwyższenie stężenia antybiotyku w środowisku (189, 197, 206, 215, 264).

## VII. Działanie antybiotyku na komórkę producenta

Niewiele wykonano prac z tego zakresu. W działaniu antybiotyku na komórkę jego producenta Katz (103) obserwował dwie fazy. W fazie początkowej szczep nie wytwarza substancji czynnej lub wytwarza jej tak mało, że aby zaobserwować efekty jej działania należy dodać antybiotyk do środowiska. Okazało się, że komórki szczepu produkcyjnego są wrażliwe przede wszystkim na antybiotyk w początkowej fazie (fazie zastoju, ang. *lag phase*), ale w nieco mniejszym stopniu niż inne mikroorganizmy wrażliwe. Dopiero w końcu fazy logarytmicznej wzrostu lub w początkach fazy stacjonarnej obserwuje się coraz mniejsze działanie efektu antybiotyku dodanego z zewnątrz. Ma to miejsce wówczas, gdy sama komórka zaczyna stopniowo produkować coraz więcej antybiotyku, i jego stężenie w środowisku zwiększa się znacznie. Produkcja dużych ilości antybiotyku w komórce otwiera drugi etap, w którym następuje zupełny brak wrażliwości komórek na antybiotyk dodany z zewnątrz. Wyżej wymienione etapy obserwowano np. w działaniu aktynomycyny D (IV) na *Streptomyces antibioticus*. Po zaszczepieniu *inoculum* i dodaniu z zewnątrz 4,2 $\mu$ g/ml podłoża aktynomycyny D obserwowano w hodowli

zahamowanie w 50% w budowywania aminokwasów do białek komórkowych. W 12-godzinnej hodowli *S. antibioticus* osiąga się ten sam efekt po dodaniu 10µg/ml. Do 24-godzinnej hodowli, produkującej 3µg/ml aktynomycyny, należy dodać aż 20µg/ml aby otrzymać zahamowanie 50% w budowywania aminokwasów. Natomiast bakterie z 48-godzinnej hodowli, syntetyzujące 40µg/ml aktynomycyny D, są zupełnie niewrażliwe na dodatek antybiotyku z zewnątrz (103, 266).

Yoshida i wsp. (266) stwierdzili, że działanie aktynomycyny D na *S. antibioticus* w fazie wrażliwości komórek jest analogiczne jak do jej działania na komórki innych drobnoustrojów. Antynomycyna hamuje włączanie aminokwasów do łańcuchów peptydowych białek w wyniku bezpośredniego oddziaływania antybiotyku na mRNA.

Opisane stadia działania antybiotyku na komórkę producenta obserwowali również Snocke i Cornell (215) oraz Russel (197) dodając bacytracynę do hodowli laseczki *Bacillus licheniformis*. Dodatek antybiotyku w stężeniu od 1,25 do 25j./ml we wczesnej fazie wzrostu komórek producenta (od 0—10 minut po zaszczepieniu podłoża) powoduje rozpuszczenie błony komórkowej, powstawanie protoplastu, następnie rozpuszczenie protoplastu umieszczonego w 0,5M sacharozie. Nasilenie tych efektów jest największe w 1 minutę od chwili wprowadzenia *inoculum* do podłoża. Dodatek bacytracyny 50j/ml w logarytmicznej fazie wzrostu *B. licheniformis* powoduje natomiast tylko zahamowanie wzrostu hodowli 12-godzinnej bez lizy komórkowej (215). Koncentracja dodanego antybiotyku w końcu fazy logarytmicznej musi być 50 razy większa, aby spowodowała zahamowanie wzrostu komórek *B. licheniformis* (197, 214, 215). W końcu tej fazy wzrostu ponadto następuje znaczna produkcja bacytracyny w komórkach *B. licheniformis* i przechodzenie antybiotyku do podłoża aż do stężenia 50j./ml i więcej, co nie wpływa na procesy fizjologiczne. Wyodrębnienie dokładne stadiów oddziaływania antybiotyku jest szczególnie trudne, gdyż po upływie 4-ch godzin następuje produkcja bacytracyny w stosunkowo znacznych ilościach przez *B. licheniformis*.

Ruczaj (196) wykazał, że wiomycyna powoduje hamowanie endogennego oddychania oraz utleniania glukozy w komórkach *Streptomyces vinaceus*. Oba procesy były tylko nieznacznie hamowane w 24 i 48 godzinnych hodowlach. Maksymalne efekty osiągnięto w 72 godzinnej hodowli przy stężeniu 500j./ml wiomycyny. Ruczaj podkreślił zależność oddziaływania produktu na komórkę producenta od wydajności szczepu produkcyjnego. Szczep wysokowydajny *S. vinaceus* wykazywał w grzybni 50-procentowe hamowanie utleniania glukozy pod wpływem wiomycyny, podczas gdy niskowydajny tylko 20-procentowe obniżenie procesu przy analogicznym stężeniu wiomycyny.

Głazer i wsp. (77) opublikowali dane o efektach działania gramicydyny S na jej producenta — *Bacillus brevis*. Wykazali, że antybiotyk powoduje uwalnianie w nadmiernych ilościach nukleotydów komórko-



wych rozpuszczalnych w kwasach. Szczepy produkujące antybiotyki uwalniają z komórek do podłoża znacznie więcej nukleotydów niż nie produkujące.

Wzajemne oddziaływanie tego typu w układzie antybiotyków — producent nie jest swoiste dla układu antybiotyków oligo- i polipeptydowy — szczep produkujący, gdyż podobne oddziaływanie produktu na producenta obserwuje się w wielu innych układach, np. działanie kolicyn na *E.coli* (1, 149, 150), neomycyny na *Streptomyces fradiae* (1, 246).

W niniejszym przeglądzie pragnęliśmy podkreślić znaczną różnorodność budowy antybiotyków peptydowych i polipeptydowych, ich właściwości oraz mechanizm działania na morfotyczne części komórki i na izolowane układy enzymatyczne drobnoustrojów wrażliwych i opornych. Przedstawiono tylko niektóre wzory strukturalne tych związków. Wskazują one, jak dalece zróżnicowana i odrębna jest budowa oligo- i polipeptydów antybiotycznych w porównaniu z innymi dotychczas znanymi związkami pochodzenia naturalnego.

Odrębne też są zagadnienia biochemiczne związane z biosyntezą antybiotyków oligo- i polipeptydowych, a problemem czekającym na wyjaśnienie jest rola antybiotyku dla komórki jego producenta.

#### LITERATURA

1. Abraham E. P., *Biochemistry of Some Peptides and Steroid Hormones*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1957.
2. *Die Antibiotika* red. R. Brunner, G. Machek: *Die kleinen Antibiotika*, Verlag Hans Carl, Nürnberg 3, 1970.
3. Armstein H. R. V., Margreiter H., *Biochem. J.* 68, 339 (1958).
4. Armstein H. R. V., Morris D., *Biochem. J.* 76, 357 (1960).
5. Arnold R. B., Johnson W., Manger A. B., *J. Chem. Soc.* str. 4446, (1958).
6. Banerjee A. B., Bose S. K., *J. Bacteriol.* 54, 24 (1947).
7. Backer Z. R., Harrison W., Miller B. F., *J. Exptl. Med.* 74, 621 (1941).
8. Benedict R. G., Langlykke A. F., *J. Bacteriol.* 54, 24 (1947).
9. Banerjee A. B., Bose S. K., *Naturwissenschaften* 51, 140 (1964).
10. Berg T. L., Froholm L. O., Laland S. G., *Biochem. J.* 96, 43 (1965).
11. Bergamini N., Fowst G., *Arzneim. Forsch.* 15, 951 (1965).
12. Bernlohr R. W., Novelli G. D., *Nature* 184, 1256 (1959).
13. Bernlohr R. W., Novelli G. D., *Arch. Biochem. Biophys.* 87, 232 (1960).
14. Bernlohr W. R., Novelli G. D., *Biochim. Biophys. Acta* 41, 541 (1962).
15. Bernlohr W. R., Novelli G. D., *Arch. Biochem. Biophys.* 103, 94 (1963).
16. Bevan K., Davies J. S., Hall M. J., Hassal C. H., Morton R. B., Philips D. A. S., Ogihara Y., Thomas W. A., *Experientia* 26, 122 (1970).
17. Beveridge E. G., Martin A. J., *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 29, 125 (1967).
18. Bielowa Z. N., Stołpnik W. G., *Antibiotiki* 11, 21 (1966).
19. Biswas K., Mridha N., Mukerjee S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 126,

- 103 (1967).
20. Bizerte G., Dautrevaux M., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **151**, 1888 (1957).
  21. Bliss E. A., Chandler C. A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 944 (1949).
  22. Bodanszky M., Izdebski J., Muramatsu J., Bodanszky A., w Peptides. Proceedings of the Ninth European, Peptide Symposium, Orsay, France April 1968, red. E. Bricas, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1968, str. 306.
  23. Bodanszky M., Odetti M. A., w Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1963, red. J. C. Sylvester, American Society for Mikrobiologi, Michigan 1964, str. 360.
  24. Bodanszky M., Perlman D., w Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1967, red. G. L. Hobby, American Society for Microbiology, Michigan 1968, 464.
  25. Bodanszky M., Sheehan J. T., w Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1963, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan 1964, str. 38.
  26. Bodley J. W., Kemura J., Adiga P. R., Okuda K., Winnick T., *Biochemistry* **3**, 1492 (1964).
  27. Boit H. G., *Ergebnisse der Alkaloidchemie bis 1960*, Akademie Verlag, Berlin, 1961, str. 953.
  28. Bory J., Desvignes A. Y., *Pharmaceutiques Fran.* **18**, 413 (1963).
  29. Brenner M., Gray E., Paulus H., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 401 (1964).
  30. Bricas E., Fromageot C., *Advan. Protein Chem.* **8**, 1 (1953).
  31. Brockmann H., Springorum M., Träxler G., Höfer I., *Naturwissenschaften* **50**, 689 (1963).
  32. Brownlee G., Bushby S. R. M., Short E. I., *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 170 (1952).
  33. Brownlee G., Short E. J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 952 (1949).
  34. Brunner R., w *Die Antibiotica* red. Brunner R., Machek D., Verlag Hans Carl, Nurnberg 1965, tom 2, str. 167.
  35. Burger M., *Schweiz. Med. Wochschr.* **96**, 1 (1966).
  36. Bycroft B. W., Cameron D., Croft L. R., Hassanali-Walji A., Johnson A. W., Webb T., *Experientia* **27**, 501 (1971).
  37. Chabbert Y. A., *Minerva Medica* **2**, 4482 (1958).
  38. Chabbert Y. A., *Chemotherapia* (Basel) **7**, 280 (1963).
  39. Chabbert Y. A., Congress on Antibiotics in Prague 15—19 June 1964, red. M. Herold, L. Gabriel, Medical Press Czechoslovak, London—Butterworths—Prague, 1966, str. 137.
  40. Chapman G. B., *J. Bacteriol.* **84**, 169 (1962).
  41. Chapman G. B., *J. Bacteriol.* **84**, 180 (1962).
  42. Chappell J. B., Crofts A. R., *Biochem. J.* **95**, 393 (1965).
  43. Chimura H., Ishizuka M., Hamada M., Horis G., Kimura K., Iwanaga J., Takeuchi T., Umezawa H., *J. Antibiotics* **21**, 44 (1968).
  44. Cifferi O., Albertini A., Cassani G., *Biochem. J.* **90**, 82 (1964).
  45. Cifferi O., Albertini A., Cassani G., w Biosynthesis of Antibiotics, red. J. F. Snell, Academic Press, New York, London, 1966, tom 1, str. 23.
  46. Cohen S. C., Purdy V., Kushnick J. B., *Federation Proc.* **11**, 463 (1952).
  47. Cohen S. C., Purdy V., Kushnick J. B., *Antibiotics Chemother.* **4**, 8 (1954).
  48. Craig L. C., w 3-ème Congres International de Biochemie Bruxelles du 1er and 6 aout, H. Vaillant-Carmanne S. A., Liege, 1955, str. 21.
  49. Davison C., Williams R. T., *J. Pharm. Pharmacol.* **20**, 12 (1968).



50. Dickscheit R., Janke A., Handbuch der Mikrobiologischen Laboratoriumstechnik, Verlag Theodor Steinkopf, Dresden, 1967, str. 9, 10, 337.
51. Dobler M., Dunitz J. D., Krajewski J., *J. Mol. Biol.* **42**, 603 (1969).
52. Dronch W., Shotwell O. L., Benedict R. G., Pridham T. G., Lindenfelser L. A., *Antibiot. Chemother.* **4**, 1135 (1954).
53. Dubos R. J., *J. Exptl. Med.* **70**, 11 (1939).
54. Dubos R. J., Hotchkiss R. D., *J. Exptl. Med.* **73**, 629 (1941).
55. Dyar M. T., Ordal J., *J. Bacteriol.* **51**, 149 (1946).
56. Eikhom T. S., Laland S., *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 451 (1965).
57. Endo R. M., Santos M., Carlini E. A., *Experientia* **22**, 757 (1966).
58. Evans R. M., w *The Chemistry of the Antibiotics in Medicine*, Pergamon Press, Oxford-London, Edinburgh New York, Paris, Frankfurt, 1965.
59. Few A. V., *J. Gen. Microbiol.* **10**, 304 (1954).
60. Few A. V., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 137 (1955).
61. Few A. V., Schulman J. H., *J. Gen. Microbiol.* **9**, 454 (1953).
62. Few A. V., Schulman J. H., *Nature* **171**, 644 (1953).
63. Fieser L. F., Fieser M., Topics in Organic Chemistry, Reinhold Publishing Corporation, Chapman Hale Ltd, New York, London, 1963.
64. Finley A. C., Hobby G. L., Hochstein F., Less T. M., Lenert T. F., Means J. A., P' Au' S. Y., Regna P. P., Routien J. B., Sabin B. A., Tate K. W., Kane J. H., *Am. Rev. Tuberc.* **1**, 63 (1951).
65. Flierl C., Sigel H., Erlenmeyer H., *Experientia* **22**, 784 (1966).
66. Florey H. W., Chain E., Heatley N. G., Jenning M. A., Sanders A. G., Abraham E. P., Florey M. E., *Antibiotics*, Geoffrey Cumberlega, Oxford, University Press, London, New York, Toronto, 1949, str. 486.
67. Florey M. E., *The Clinical Application of Antibiotics*, Oxford University Press, London, New York, Toronto, 1960, tom 4, str. 96.
68. Forget B. G., Jordan B., *Science* **167**, 382 (1970).
69. Fortnagel P., *Naturwiss. Rund* **24**, 426 (1971).
70. Fujikawa K., Sakamoto Y., Kurahashi K., *J. Biochem.* **69**, 869 (1971).
71. Galardy R. E., Printz M. P., Craig L. C., *Biochemistry* **10**, 2429 (1971).
72. Gale E. P., *Pharmacol. Rev.* **15**, 481 (1963).
73. Gallakota K. G., Halvorson H. O., *J. Bacteriol.* **79**, 1 (1960).
74. Gaumann E., Roth S., Ettliger L., Platner P. A., Nager U., *Experientia* **3**, 202 (1947).
75. Geisler J., *Post. Biochem.* **16**, 3 (1970).
76. Girolano Di M., Cifferi O., Di Girolano A. B., Albertini A., *J. Biol. Chem.* **239**, 502 (1964).
77. Głazer W. M., Siłajewa S. A., Szestakow S. W., *Biochimia* **31**, 1135 (1966).
78. Golub E. E., Ward E. A., Nishimura J. S., *J. Bacteriol.* **100**, 977 (1969).
79. Gotoff S. P., Lepper M. H., w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy — 1962*, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan 1963, str. 447.
80. Hall J. B., Sedat J. W., Adiga R. P., Uemura J., Vinnick T., *J. Mol. Biol.* **12**, 162 (1965).
81. Heineman B., Kaplan M. A., Muir R. D., Hooper M. E., *Antibiot. Chemother.* **3**, 1239 (1953).
82. Henderson P. J. F., *Ann. Rev. Microbiol.* **25**, 393 (1971).

83. Herold M., Vandracek M., Necasek J., Doskoul J., *Antibiotica*, Nakladatelstvi Ceskoslovenske Akademie Ved, Praga 1965.
84. Herr E. B. Jr., w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1962, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan, 1963, str. 201.
85. Hettinger T. P., Craig L. C., *Biochemistry* 7, 4147 (1968).
86. Hettinger T. P., Craig L. C., *Biochemistry* 7, 4153 (1968).
87. Higashide E., Hatano K., Shibata M., Nakazawa K., *J. Antibiotics* 21, 126 (1968).
88. Hinton N. A., Orr J. H., *Antibiot. Chemother.* 10, 779 (1960).
89. Hotchkiss R. D., *Advan. Enzymol.* 4, 153 (1944).
90. Hotchkiss R. D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 46, 479 (1946).
91. Hotchkiss R. D., Dubos R. J., *J. Biol. Chem.* 136, 803 (1940).
92. Hou C. T., Perlman D., Schallock M. R., *J. Antibiot. (J.)* 23, 35 (1970).
93. Hughes G. R., Neil K. G., *Austr. J. Sci. Res. Ser. A*, 5, 401 (1952).
94. Hummel D., Identification and Analysis of Surface-active Agents by Infrared and Chemical Methods, Interscience Publishers A, Division of John Wiley a Sons, New York, London, Sydney 1962.
95. Ito M., Aida T., Koyama Y., *Agr. Biol. Chem.* 30, 1112 (1966).
96. Jann G. J., Eichhorn H. H., *Bacteriol. Proc.* 1964, 13.
97. Jawetz E., Polymyxin, Neomycin, Bacitracin, Antibiotics Monographs No 5. Medical Encyklopedia Inc., New York 1956.
98. Johnson F. G., Anker H. S., Meleney F. L., *Science* 102, 376 (1945).
99. Kamber B., Rittel W., *Chim. Helv. Acta* 52, 1074 (1969).
100. Katz E., *J. Biol. Chem.* 235, 1090 (1960).
101. Katz E., Peinta P., *Science* 126, 402 (1957).
102. Katz E., Weissbach H., *J. Biol. Chem.* 238, 666 (1963).
103. Katz E., Actinomycin w *Antibiotics Biosynthesis*, red. D. Gottlieb, P. D. Shaw Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2, 1967 276.
104. Kaye J. J., Chapman G. B., *J. Bacteriol.* 86, 536 (1963).
105. Keller-Schierlein W., *Helv. Chim. Acta* 46, 1920 (1963).
106. Keller-Schierlein W., Maurer B., *Helv. Chim. Acta* 52, 603 (1969).
107. Keller-Schierlein W., Mikailovic Lj., Prelog V., *Helv. Chim. Acta* 42, 305 (1959).
108. Kimura Y., Mursi E., Tujisawa M., Taksuki T., Nobue F., *J. Antibiot. (Tokyo)* 22, 449 (1969).
109. Koike M., Lida K., Matsuo T., *J. Bacteriol.* 97, 448 (1969).
110. Korzybski T., *Przegl. Lek.* 3, 17—18, 1 (1947).
111. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz Wł., *Antibiotics*, Pergamon Press, PWN, Polish Scientific Publishers, Warszawa 1967.
112. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W., *Antibiotyki, Proischozhdienie, priroda i svojstva*, Varsava, 1969, Polskoe Gosud. Med. Izd.
113. Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W., *Onkostatyny*, Instytut Antybiotyków, Warszawa, 1960.
114. Koyama Y., Kurosawa A., Tshuchija A., Takakuta K., *J. Antibiotics Ser. A*, 3, 457 (1950).
115. Krajewska E., *Post. Biochem.* 16, 119 (1970).
116. Krietowicz W., *Biochemia Roślin*, PWRiL, Warszawa 1955.
117. Kriger A., Tambiew A. H., Le Suan Tu, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, 149, 1190 (1963).
118. Kryński S., Borowski E., Kuchta A., Borowski J., Beda E., *Biul. Państw. Inst. Med. Morskiej Trop.* 4, 301 (1952).



119. Kubicz A., Wieczorek E., Materiały Symposium Analiza Biochemiczna i Fizjologiczna w Ośrodkach Farmaceutycznych, Wrocław 17—18.X.1969, str. 17.
120. Kurihara R., Suzuki K., *Ann. Rep. Tohoku Coll. Pharm.* **3**, 1 (1956).
121. Kuryło-Borowska Z., *Biul. Inst. Med. Morskiej* **10**, 83 (1959).
122. Kuryło-Borowska Z., Tatum E. L., *Biochem. Biophys. Acta* **113**, 206 (1966).
123. Latterade C., Macheboeuf M., *Ann. Inst. Pasteur* **78**, 753 (1950).
124. Lavranova G. J., Poddubnaja N. A., *J. Allg. Chem.* **34**, 2864 (1964).
125. Law H. D., w *Progress in Medicinal Chemistry*, red. G. P. Ellis, G. B. West, London Butterworths 1965, tom 4, str. 86.
126. Law H. D., Millar I. T., Springal H. D., Birch A. J., *Proc. Chem. Soc.* 198 (1958).
127. Lin Y. C., Tanaka N., *J. Biochem. (Tokyo)* **63**, 1 (1968).
128. Lockhart J. M., Abraham E. P., Newton G. G., *Biochem. J.* **61**, 534 (1955).
129. Lopes J., Innis W. F., *J. Bacteriol.* **100**, 1128 (1969).
130. Łomakina N. N., Braźnikowa M. G., *Biochimia* **24**, 425 (1959).
131. Mach B., Reich E., Tatum E. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 175 (1963).
132. Mach B., Tatum E. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 876 (1964).
133. Mach B., Tatum E. L., w IX International Congress for Microbiology Moscow—1966, Symposia, Oxford 1966, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Edinburgh, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig 1966, str. 57.
134. Maeda K., *Streptomyces Products Inhibiting Mycobacteria*, John Wiley and Sons, New York, London 1965, 120.
135. Majumdar S. K., Bose S. K., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 509 (1958).
136. Majumdar S. K., Bose S. K., *Nature* **181**, 134 (1958).
137. Maksimowa T., *Antibiotiki* **10**, 298 (1965).
138. Mao J. C., Wiegand R. G., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 404 (1968).
139. Martin J. H., Hausmann W. K., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2079 (1960).
140. Mathieson A. M., *Acta Chem.* **12**, 478 (1959).
141. Mauger A. B., *Experientia* **24**, 1068 (1968).
142. Meierhof J., *Experientia* **24**, 776 (1968).
143. Mizuno K., Ohkubo Y., Yokoyama S., Hamada M., Maeda K., Umezawa H., *J. Antibiotics* **20**, 194 (1967).
144. Mizuno S., Nitta K., Umezawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 382 (1967).
145. Mohan R. R., Pianotti R. S., Leverett R., Schwarz B., w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy — 1962*, red. J. G. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan 1963, str. 801.
146. Moore C., Pressman B. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 562 (1964).
147. Moubasher A. H., *Nature* **200**, 492 (1963).
148. Müller G., *Klin. Wochschr.* **41**, 1018 (1963).
149. Nagel de Zweig R., *J. Bacteriol.* **99**, 913 (1969).
150. Nagel de Zweig R., Luria S. E., *J. Bacteriol.* **94**, 1112 (1967).
151. Nakamura S., Yajima T., Hamada M., Nishimura T., Ishizuka M., Takeuchi T., Tanaka N., Umezawa H., *J. Antibiotics* **20**, 216 (1967).
152. Nass G., Poralla K., Zahner H., *Naturwissenschaften* **58**, 603 (1971).
153. Neter E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **49**, 163 (1942).
154. Neter E., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **51**, 256 (1942).
155. Neuss N., Molloy B. B., Shah R., DeLaHiguera N., *Biochem. J.* **118**, 571 (1970).

156. Newton B. A., *Nature* **172**, 160 (1953).
157. Newton B. A., *J. Gen. Microbiol.* **10**, 491 (1954).
158. Newton B. A., *J. Gen. Microbiol.* **12**, 226 (1955).
159. Newton B. A., *Bacteriol. Rev.* **20**, 15 (1956).
160. Obojska K., Praca niepublikowana.
161. Ogawara H., Maeda K., Umezawa H., *Biochemistry* **7**, 3296 (1968).
162. Okomoto S., Mayama M., Tanaka Y., Tawara K., Shimacka N., Kato H., Nishimura H., Kwata M., Ohtsuka H., *J. Antibiotics* **21**, 320 (1968).
163. Okuda K., Kemura J., Bodley J. W., Winnick T., *Biochemistry* **3**, 100 (1964).
164. Otani S., Saito Y., Studies on Gramicidin J., *Congres International de Biochemie Bruxelles, Resumes des Communications 1955*, 88.
165. Parthier B., *Nova Acta Leopoldina* **34**, 188 (1969).
166. Passent J., *Post. Biochem.* **15**, 227 (1969).
167. Patte J. C., Chabbert Y. A., *Ann. Inst. Pasteur Suppl.* **4**, 32 (1961).
168. Paulus H., Gray E., *J. Biol. Chem.* **239**, 865 (1964).
169. Penn W. A., Truant P. J., Hessburg F. C., w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy — 1963*, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan 1964, str. 411.
170. Perlman D. w *Biosynthesis of Antibiotics*, red. J. F. Snell, Academic Press, New York, London 1966, tom 1, str. 23.
171. Perlman D., Capek A., *J. Antibiotics* **21**, 421 (1968).
172. Perlman D., Capek A., *Hindustan Antibiot. Bull.* **10**, 269 (1968).
173. Perlman D., Mauger A. B., Weissbach H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 513 (1966).
174. Perlman D., Mauger A. B., Weissbach H., w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy — 1966* red. G. L. Hobby, American Society for Microbiology, Michigan 1967, str. 581.
175. Pethica B. A., Schulman J. H., *Biochem. J.* **53**, 177 (1953).
176. Pinkerton M., Steinrauf M., Dawkins L. K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**, 512 (1969).
177. Platner P. A., Nager U., *Helv. Chim. Acta* **31**, 2203 (1948).
178. Platner P. A., Vogler K., Studer R. O., Quitt P., Keller-Schierlein W., *Helv. Chim. Acta* **46**, 927 (1963).
179. Plempel M., *Arch. Pharm.* **300**, 225 (1967).
180. Płóciennik Z., Kowszyk-Gindifer Z., *Biul. Inform. Instytutu Antybiotyków*, Warszawa **12**, 3 (1969).
181. Polin A. N., *Antibiotiki* **5**, 29 (1960).
182. Pollard L. W., Bhagawan N. V., Hall J. B., *Biochemistry* **7**, 1153 (1968).
183. Postępy w Dziedzinie Antybiotyków: Materiały Symposium odbytego dnia 12-go grudnia 1968 roku w Warszawie. Polskie Tow. Lek. Sekcja Chemioterapii i Ośrodek Informacji Naukowej Polfa, Warszawa 1969.
184. Pratt R., Defrenoy J., *Antibiotics*, J. B. Lippincot Company, Philadelphia, London, Montreal, 1949, str. 167.
185. Prelog V., w *Chemistry of Natural Products, Seventh International Symposium on the Chemistry of Natural Products*. Butterworths London 1971, 7, str. 197.
186. Pressman B. C., *Federation Proc.* **27**, 1283 (1968).
187. Pulaski E. J., Baker H. J., Rosenberg N. L., Connell J. C. Jr., *J. Clin. Invest.* **28**, 1028 (1949).



188. Quitt P., Studer R. O., Vogler K., *Helv. Chim. Acta* **46**, 1715 (1963).
189. Rao R. K., Bhagavan N. V., Rao K. R., Hall J. B., *Biochemistry* **7**, 3072 (1968).
190. Regna P. P., w *Antibiotics Their Chemistry and Non Medical Uses*, red. H. S. Goldberg Princention 1959, D. Van Nostrand Comp. Inc., New York 1959, str. 58.
191. Rensser E. F., *J. Biol. Chem.* **242**, 243 (1967).
192. Riniker B., Brugger M., Kamber B., Rittel W., *Helv. Chim. Acta* **52**, 1058 (1969).
193. Roszkowski R., Gevers W., Kleinkauf H., Lipmann F., *Biochemistry* **9**, 4839 (1970).
194. Roszkowski R., *Biul. Inst. Antybiot.* **13**, 2, 37 (1970).
195. Roszkowski R., *Biul. Inst. Antybiot.* **13**, 4, 25 (1970).
196. Ruczaj Z., *Arch. Immunol. Ther. Exper.* **16**, 902 (1968).
197. Russel A. D., w *Progress in Medical Chemistry* red. G. P. Ellis, G. B. West, Butterowrths London, 1969, tom 6, str. 135.
198. Salton M. R. J., *J. Gen. Microbiol.* **5**, 391 (1951).
199. Salton M. R. J., Horne W., Cosslett E. V., *J. Gen. Microbiol.* **5**, 405 (1951).
200. Sandvick O., Hoem T., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 283 (1969).
201. Shaeffer P., *Bacteriol. Rev.* **33**, 48 (1969).
202. Schmitt R., Treese E., *J. Bacteriol.* **96**, 1255 (1968).
203. Shroder E., Luebke K., *Experientia* **19**, 57 (1963).
204. Schwyzer R., Aung Tun-Kyi, Cavierel M., Moser P., *Helv. Chim. Acta* **53**, 15 (1970).
205. Schwyzer R., Ludescher U., *Helv. Chim. Acta* **52**, 2033 (1969).
206. Sebek O. K. w *Antibiotics, Mechanism of Action* red. D. Gottlieb, P. D. Shaw, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967, tom 1, str. 142.
207. Sedat J. W., Hall J. B., *J. Mol. Biol.* **12**, 162 (1965).
208. Sheehan J. C., Drummond P. E., Gardner J. N., Maeda K., Mania D., Makamura S., Sen A. K., Stock J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2867 (1963).
209. Shoji Jun-Ichi, Kozuki Sh., Okamoto S., Sakaceki R., Ohtsuka H., *J. Antibiotics*, **21**, 439 (1968).
210. Short E. J., *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 248 (1952).
211. Sivak A., Meloni M. L., Nobili F., Katz E., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 283 (1962).
212. Smith K. W., Schultz F. H. Jr., Ott W. L., Payne H. G., *J. Clin. Invest.* **28**, 1018 (1949).
213. Snoke J. E., *J. Bacteriol.* **80**, 552 (1960).
214. Snoke J. E., Cornell N., *J. Bacteriol.* **81**, 986 (1961).
215. Snoke J. E., Cornell N., *J. Bacteriol.* **89**, 415 (1965).
216. Sons H., Löschner H., Lagler F., Muckter H., *Arzneimittel-Forsch.* **11**, 395 (1961).
217. Spranger J., *Kinderheilk.* **85**, 505 (1961).
218. Stansly P. G., Ananenko N. H., *Arch. Biochem.* **15**, 473 (1947).
219. Stansly P. G., Shephard R. G., Whitte H. J., *John Hopkins Hosp. Bull.* **81**, 43 (1947).
220. Stefanac Z., Simon W., *Microchem. J.* **12**, 125 (1967).
221. Strominger J. L., *Federation Proc.*, **21**, 134 (1962).
222. Studer R. O., w *Progress in Medical Chemistry* red. G. P. Ellis, G. B. West Butterworths, London 1967, tom 5, str. 1.

223. Suzuki T., Inouye H., Fujikawa K., Suketa Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 25 (1963).
224. Suzuki T., Fujikawa K., *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 182 (1964).
225. Suzuki T., Hayashi K., Fujikawa K., Tsukomato K., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 412 (1963).
226. Suzuki T., Hayashi K., Fujikawa K., Tsukomato K., *J. Biochem.* **54**, 555 (1963).
227. Suzuki T., Hayashi K., Fujikawa K., *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 335 (1964).
228. Szemiakin M. M., Ovhinnikov Ju A., Recent Development in the Chemistry of Natural Carbon Compounds vol. II Dipeptides, Akademia Kiado, Budapest 1967.
229. Szemiakin M. M., Szhukina L. A., Winogradowa E. J., Randel G. A., Ovhinnikov Ju A., *Experientia* **22**, 35 (1963).
230. Takahashi H., Sato E., Kurahashi Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **69**, 937 (1971).
231. Tanaka N., Iguso S., *J. Antibiotics* **21**, 239 (1968).
232. Tanaka K., Teraoka H., *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 635 (1968).
233. Tanaka N., Sashikata R., Yamaguchi H., Umezawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 405 (1966).
234. Taubman S. B., So A. G., Young F. E., Davie E. W., Corcoran J. W. w Antimicrobial Agents and Chemotherapy—1963, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan 1964, str. 395.
235. Tosteson D. C., Andreoli T. E., Tieffenberg M., Cook P., *J. Gen. Physiology*, **51**, 373 (1968).
236. Traub W. H., *Experientia* **25**, 206 (1969).
237. Truant J. P., Penn W. P., Peast A. C., w Antimicrobial Agents and Chemotherapy — 1963, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan 1964, str. 420.
238. Turkova J., Mikes O., Sorm F., *Experientia* **19**, 633 (1963).
239. Urry D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 115 (1971).
240. Vanderhaeghe H., Parmentier G., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4414 (1960).
241. Vogler K., Studer R. O., *Experientia* **22**, 345 (1966).
242. Vogler K., Studer R. O., Lanz P., Lergier W., Bohni E., *Experientia* **17**, 223 (1961).
243. Vogler K., Studer R. O., Lanz P., Lergier W., Bohni E., *Experientia* **20**, 365 (1964).
244. Vogler K., Studer R. O., Lanz P., Lergier W., Bohni E., Fust B., *Helv. Chim. Acta* **46**, 2823 (1963).
245. Waites M. V., Kay D., Dawes J. W., Wood D. A., Warren S. C., Mandelstam J., *Biochem. J.* **118**, 667 (1970).
246. Waksman S. A., Neomycin, Rutgers University Press, New Brunswick N. J. 1953, str. 110.
247. Waksman S. A., Katz E., Vining L. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 602 (1958).
248. Waksman S. A., Reilly H., Johnson D. B., *J. Bacteriol.* **52**, 393 (1946).
249. Waksman S. A., Woodruff H., *J. Bacteriol.* **40**, 581 (1940).
250. Walker E. J., *Biochem. J.* **121**, 571 (1971).
251. Walker E. J., Abraham E. P., *Biochem. J.* **118**, 563 (1970).
252. Weinberg D. E. w Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1964, red. J. C. Sylvester, American Society for Microbiology, Michigan, 1965, str. 120.
253. Weinstein J. Scott A., Hunter F. E., Jr., *J. Biol. Chem.* **239**, 9 (1964).



254. Whaley H. A., Patterson E. L., Dann M., Shu P., Swift M. E., Porter J. N., Redni G. w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy-1966*, red. G. L. Hobby, American Society for Microbiology, Michigan, 1967, str. 587.
255. Whaley H. A., Patterson E. L., Kunstmann M. P., Bohonos W., w *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1966*, red. G. L. Hobby, American Society for Microbiology, Michigan 1967, str. 591.
256. Wilkinson S., *Nature* **164**, 622 (1949).
257. Wilkinson S., Love L. A., *Nature* **202**, 12111 (1964).
258. Williams R. T., *Pure Appl. Chem.* **18**, 129 (1969).
259. Winnick R. E., Lis H., Winnick T., *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 451 (1961).
260. Wipf H. K., Pacha W., Jordan P., Zahner A., Keller-Schierlein W., Simon W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 387 (1969).
261. Wipf H. K., Pioda L. A. R., Stefanac Z., Simon W., *Helv. Chim. Acta* **51**, 377 (1968).
262. Wodley D. W., *J. Biol. Chem.* **163**, 481 (1946).
263. Woolley D. W., *J. Bioch. Chem.* **171**, 443 (1948).
264. Yamaguchi H., Tanaka N., *Nature* **201**, 499 (1964).
265. Yamaguchi H., Yoshida Y., Tanaka N., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 246 (1966).
266. Yoshida T., Weissbach H., Katz E., *Arch. Biochim. Biophys.* **114**, 252 (1966).
267. Zintel H. A., Ma R. A., Nichols A. C., Ellis H., *Am. J. Med. Sci.* **218**, 439 (1949).

LESZEK TOMASZEWSKI \*

## Wrodzone wady metaboliczne w przemianie aminokwasów

### The Inborn Errors of Metabolism of Amino Acids

The biochemical principles of inborn errors of metabolism of aminoacids in human are discussed.

Pojęcie „wrodzone wady metaboliczne” wprowadził Garrod (49) w 1908 r. w oparciu o analizę ówczesnie znanych czterech chorób: cystynurii, fruktozemii, pentozurii i alkaptonurii. W 1934 roku lekarz i biochemik norweski A. Fölling (45) wykrył fenyloketonurię a w ciągu następnych 35 lat wykryto u ludzi tylko w przemianach aminokwasów 38 wad metabolicznych.

Pod terminem wrodzone wady metaboliczne rozumiemy, zupełnie zresztą umownie, stany lub choroby będące wynikiem zmienionej funkcji katalitycznej białka — katalizopatie — w odróżnieniu od strukturopatii odnoszących się do zmian struktury białka nie obdarzonego funkcją enzymatyczną. Artykuł ten obejmuje zatem wady wrodzone dotyczące zarówno przemiany aminokwasów jak też przenikania tych związków przez przegrody ustrojowe, ponieważ przenikanie jest również procesem enzymatycznym. Badania wad metabolicznych łączące elementy medycyny i biochemii wnoszą nowe wartości poznawcze do wielu działów biologii.

### I. Wady przemiany glicyny

Przemianę glicyny przedstawia schemat 1.

#### 1. Glicynoza (Hiperglicynemia idiopatyczna)

Chorobę tę opisano w 1961 r. (18, 101, 103), a do roku 1967 ogłoszono 11 przypadków (47). Do objawów biochemicznych tego schorzenia należą: w krwi — 4—20 razy wyższa niż normalnie zawartość glicyny, zwiększona

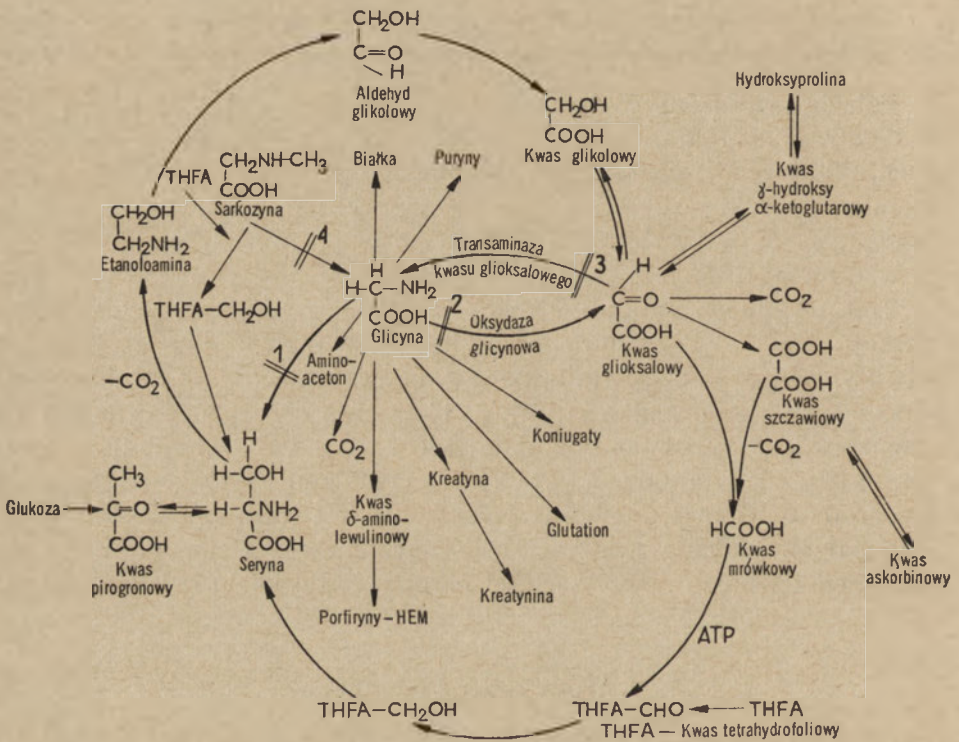
---

\* Doc. dr hab. med., Zakład Analityki Klinicznej, Instytut Biofarmacji, Akademia Medyczna, Warszawa



zawartość wolnych kwasów tłuszczowych, kwasu mlekowego i amoniaku, a także kwasica metaboliczna, w moczu zaś — silnie zwiększone wydalenie glicyny oraz ketonuria spowodowana obecnością acetonu, kwasu acetoctowego, ketonów wielowęglowych (2-butanonu, 2- i 3-pentanonu i 2-heksanonu) (93) i kwasu metylomalonowego.

Postawową nieprawidłowością w glicynozie jest zahamowanie przemiany glicyny w serynę (102). Pierwsza pula metaboliczna glicyny (tzn. ta pula, w której bezpośrednio rozmieszcza się podana dożylnie piętnowana glicyna) wynosi u dzieci zdrowych około 16,3mg/kg, podczas gdy u chorych na glicynozę 27,6mg/kg ciężaru ciała. Przemiana glicyny w serynę jest w glicynozie sześciokrotnie wolniejsza niż u zdrowych.



1. Glicynozia. Nieustalona lokalizacja bloku w przejściu glicyny w serynę
2. Hiperglycynemia z hipoaśluracją
3. Oksaloza
4. Hipersarkozynemia. Blok dehydrogenazy sarkozyny
5. Glicynuria De Vries. Upośledzenie wchłaniania zwrotnego glicyny

Schemat 1. Przemiana glicyny

Chorzy na glicynozę nie tolerują białek. Po obfitych posiłkach białkowych częstsze są napady choroby przebiegające z ketozą przy swoistych objawach klinicznych. Spośród aminokwasów najregularniej wywołują

zaostżenia choroby: leucyna, izoleucyna, walina, treonina i metionina (17, 18). Podane doustnie pojawiają się u chorych w wysokich stężeniach we krwi. Toksyczność i ketogeny wpływ tych aminokwasów zależy od podaży białka: przy diecie wysokobiałkowej niewielka ilość leucyny sprowadza silne objawy nietolerancji a przy diecie niskobiałkowej duża ilość tego aminokwasu wywołuje tylko ketozę. Podobny wpływ jak dieta wysokobiałkowa wywiera infekcja. Nietolerancja białek jest raczej skutkiem niż przyczyną zaburzeń w przemianie glicyny.

Doustne podanie białek podnosi u chorych stężenie glicyny we krwi znacznie wyżej niż u zdrowych. Po doustnym podaniu glicyny u chorych wzrasta wydalanie seryny w moczu znacznie słabiej niż u zdrowych. Po obciążeniu seryną wzrasta zarówno stężenie glicyny we krwi jak i jej wydalanie w moczu.

Wyniki prób obciążeniowych świadczą, że upośledzona jest droga przemiany glicyny w serynę, natomiast odwrotna droga seryna—glicyna jest zachowana. Są to jednak tylko dowody pośrednie. Dowodów bezpośrednich dostarczyły badania przemiany glicyny w serynę w homogenatach tkankowych, potwierdzające upośledzenie tej przemiany u chorych z glicy노zą. Badania te wykazały również, że w glicy노zie jest zachowana odwracalna droga glicyna—kwas glioksalowy. Szczegółowy mechanizm bloku przejścia glicyny w serynę jest jeszcze nieznan.

## 2. Hiperglicynemia z hipooksalurią

Ten typ wady w przemianie glicyny wyodrębnili Gerritsen i wsp. (52). Od glicy노zy różni się on obrazem klinicznym i wynikami biochemicznych prób czynnościowych. Hiperglicynemia z hiperglicynurią są wprawdzie objawem wspólnym dla obu jednostek chorobowych, jednak mechanizm powstawania hiperglicynemii jest w każdej z tych wad inny.

W hiperglicynemii z hipooksalurią jest prawdopodobnie upośledzona aktywność oksydazy glicynowej. Enzym ten znajdujący się w wątrobie i nerkach katalizuje przejście glicyny w kwas glioksalowy. O istnieniu bloku między tymi dwoma kwasami świadczą następujące fakty. Wydalanie kwasu szczawiowego w moczu dzieci z omawianą wadą jest obniżone do 1/5—1/10 wartości obserwowanej u zdrowych. Doustne podawanie seryny, czy leucyny nie wzmacnia wydalania kwasu szczawiowego w moczu u chorych, natomiast podanie kwasu glioksalowego wzmacnia wzrost wydalania do wartości prawidłowych. Upośledzenie przemiany glicyny prowadzi do wzrostu pierwszej puli metabolicznej tego aminokwasu, z której to puli pochodzi 40% wydalanego kwasu szczawiowego. Obciążenia doustne glicyną osobników zdrowych wzmacnia znacznie wydalanie kwasu szczawiowego.



### 3. Oxalosis (Pierwotna hiperoksaluria. Szczawica)

Wadę tę opisano w 1954 roku (42), a do 1970 roku zanotowano ponad 65 przypadków oksalozy. Jest to wrodzona, dziedziczna wada metaboliczna przebiegająca z nadmiernym wydalaniem w moczu kwasu szczawowego, kwasu glikolowego (47), kwasu glioksalowego (69) i glicyny z kamicią szczawianową i odkładaniem się złogów szczawianowych w różnych narządach a przede wszystkim w nerkach. Wydalanie kwasu szczawowego w moczu przekracza normę 3—10-krotnie. Jest ono niezależne od zawartości kwasu szczawowego w pożywieniu, zależy natomiast od zawartości białka a przede wszystkim od zawartości glicyny w diecie. Istnieje ścisła dodatnia korelacja między wydalaniem w moczu azotu i wydalaniem kwasu szczawowego.

Próby czynnościowe wskazują, że kwas szczawowy jest metabolicznie nieczynny. Podany doustnie wchłania się bardzo łatwo i w całości wydalana się w moczu. Wstrzyknięty dożylnie kwas szczawowy znakowany  $^{14}\text{C}$  przechodzi niezmienny do moczu, a w powietrzu wydychanym nie ma piętnowanego dwutlenku węgla. Natomiast doustne podanie większej ilości glicyny zwiększa wydalanie kwasu szczawowego w moczu. Pirydoksyna u chorych na oksalozę zmniejsza nieco a duże ilości kwasu askorbinowego wzmagają wydalanie kwasu szczawowego.

Wyniki badań *in vivo* pozwalają wnosić, że oksaloza jest skutkiem upośledzonej transaminacji kwasu glioksalowego w glicynę (64, 65). De an i wsp. (31) potwierdzili ten wniosek wykazując *in vitro* w homogenatach narządów chorych na oksalurię zahamowanie przemiany kwasu glioksalowego w glicynę oraz upośledzoną produkcję  $\text{CO}_2$ . Skutkiem zablokowania tej drogi jest wsteczne gromadzenie się metabolitów przed-blokowych. Jest to ciekawy przykład rozkojarzenia reakcji odwracalnej gdzie tylko jeden jej kierunek jest zahamowany. Być może każdy kierunek tej reakcji jest katalizowany przez inne układy enzymatyczne. Bezpośrednim prekursorem kwasu szczawowego jest przede wszystkim kwas glioksalowy, chociaż udowodniono też możliwość przejścia 1 i 2 węgla kwasu askorbinowego w kwas szczawowy z pominięciem kwasu glioksalowego (8). Prekursorami kwasu glioksalowego mogą być: kwas glikolowy pochodzący z seryny oraz glicyna. Kwas  $\gamma$ -hydrokso- $\alpha$ -ketoglutarynowy — metabolit hydroksyproliny — który ulega przemianie głównie poprzez kwas malonowy zapewne nie odgrywa większej roli w oksalurii.

Ponieważ w oksalozie jest wzmożone wydalanie kwasu glikolowego odpada więc możliwość bloku na tej drodze. Znaczącym prekursorem kwasu szczawowego jest glicyna. Ilość powstającego kwasu szczawowego z glicyny w oksalozie jest taka sama jak u ludzi zdrowych (24, 25). Równowaga między glicyną i kwasem glioksalowym jest przesunięta ku glicynie. Po dożylnym podaniu glikolanu z piętnowanym  $^{14}\text{C}$  węglem karboksylowym odnaleziono w moczu więcej znakowanego kwasu szcza-

wiowego, glioksalowego i glikolowego, a mniej kwasu hipurowego i glicyny, wynik podobny zresztą jak w doświadczeniach z ciągłą infuzją piętnowanego  $^{14}\text{C}$  glioksyalanu (64).

Spotykane w oksalozie zwiększenie zawartości kwasu moczowego we krwi tłumaczy się niewydolnością nerek albo też nieprawidłowościami w powstawaniu kwasu szczawiowego z puryn.

#### 4. Hipersarkozynemia

Dotychczas opisano tylko jeden przypadek tej wady (54, 55). W krwi i moczu dziecka z upośledzonym rozwojem motorycznym i umysłowym stwierdzono zwiększoną zawartość sarkozyny. Doustne obciążenie sarkozyną i dwumetyloglicyną wywoływało u chorego wydalanie dużych ilości sarkozyny a w narządach badanych *post mortem* stwierdzono wzmogoną zawartość sarkozyny szczególnie w mózgu i w wątrobie. W rodzinie chorego stwierdzono u siostry wysokie stężenie sarkozyny w osoczu a u matki wzmogone wydalanie po obciążeniu.

Brak jest narazie bliższych badań biochemicznych tej wady. Przypuszcza się, że jej przyczyną jest upośledzenie aktywności wątrobowej dehydrogenazy sarkozyny.

#### 5. Glicynuria z kamlą szczawianową *de Vries*

Chorobę opisano dotychczas u członków tylko jednej rodziny (138). Trzy kobiety reprezentujące w tej rodzinie trzy kolejne pokolenia wydalaly po 600—900mg glicyny w moczu na dobę, przy prawidłowej zawartości tego aminokwasu w krwi. U chorych z tą wadą wchłania się zwrotnie tylko 30% przesączonej glicyny, reszta zaś przechodzi do moczu. Upośledzenie wchłaniania zwrotnego glicyny jest ściśle wybiórcze i nie dotyczy innych aminokwasów. Znaczne ograniczenie białek w diecie nie ma wpływu, natomiast dożylne podanie glicyny w postaci kroplówki wzmaga wybitnie jej wydalanie w moczu. Opisana wybiórcza niewydolność kanalikowa wchłaniania zwrotnego glicyny jest chorobą dziedziczną, związaną z płcią, o dominującym trybie dziedziczenia.

## II. Wady przemian aminokwasów rozgałęzionych

### 1. Leucynoza (Choroba moczu o zapachu liścia klonowego).

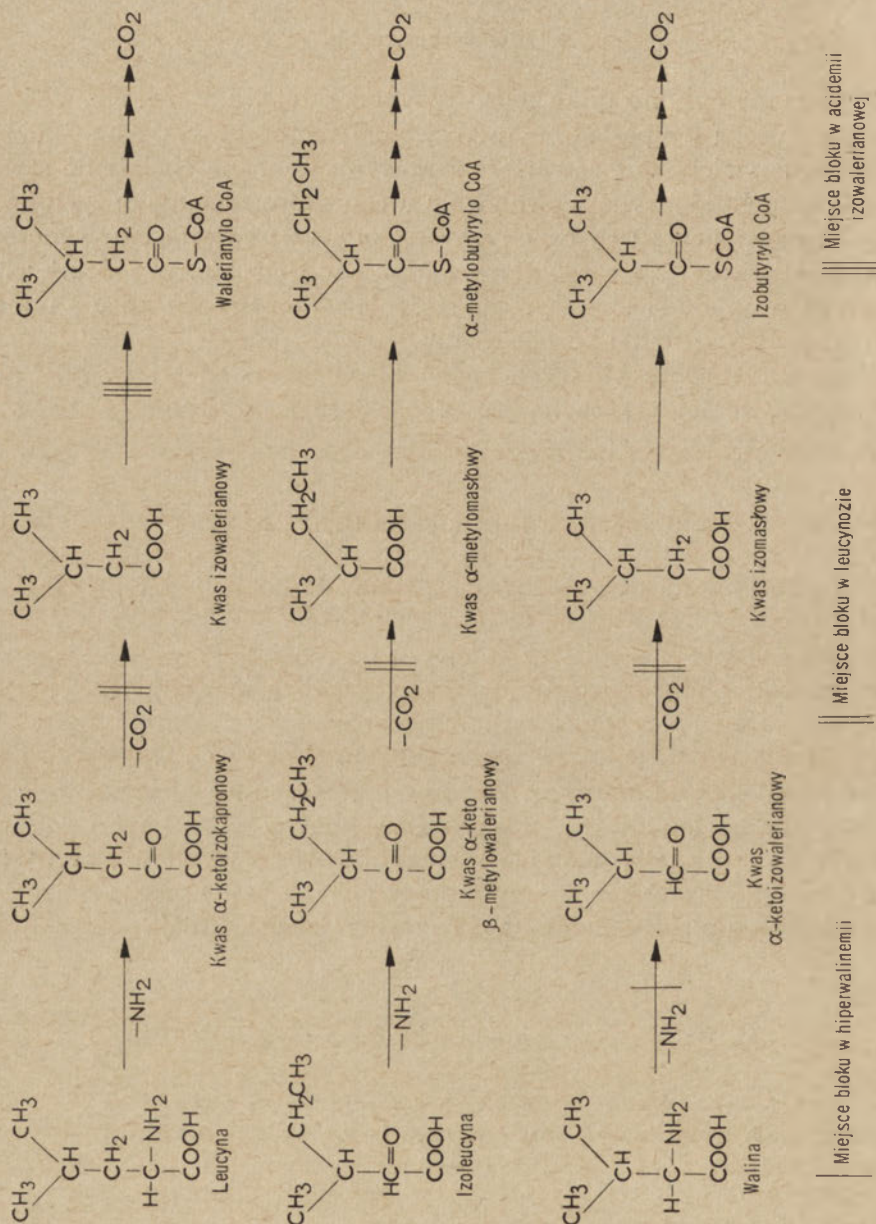
#### **Ketoaciduria aminokwasów rozgałęzionych (ang. *Maple Syrup Urine Disease*)**

Chorobę wykryto w 1934 r. (94), do 1964 roku opisano ponad 30 przypadków (134) z tego dwa z Polski (75, 92).

Wodzącym objawem biochemicznym, decydującym o rozpoznaniu,



jest zwiększona zawartość w moczu leucyny, waliny i izoleucyny i ich keto-analogów kwasów ( $\alpha$ -ketoizokapronowego,  $\alpha$ -ketoizowalerianowego i  $\alpha$ -keto- $\beta$ -metylowalerianowego). W zwiększonych ilościach wydalana jest też fenyloalanina i tyrozyna. Donoszono wprawdzie o zwiększonym wydalaniu metioniny ale badany aminokwas okazał się alloizoleucyną



Schemat 2. Przemiany aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach

(100). Również w zwiększonych ilościach wydalone są z moczu kwasy indoloctowy, indolomlekowy oraz  $\alpha$ -ketoglutazarowy (105, 134). Często, występuje ketonuria zwłaszcza w postaciach z późną manifestacją (29). Charakterystyczny zapach moczu, od którego choroba otrzymała nazwę pochodzi przede wszystkim z polimeru estru kwasu  $\alpha$ -hydroksymasłowego, pochodnej metioniny, i innych kwasów organicznych.

W krwi, erytrocytach, płynie mózgowo-rdzeniowym, ślinie i stolcu zawartość rozgałęzionych aminokwasów, ich keto-analogów i alloizoleucyny jest kilkakrotnie podwyższona (119). Występowanie alloizoleucyny w stolcu świadczy o obciążeniu wadą śluzówki jelitowej. Niekiedy spotyka się wyraźną hipoglikemię.

Przyczyną choroby jest blok dekarboksylaz aminokwasów rozgałęzionych. Świadczą o tym następujące obserwacje: homogenaty tkanek i leukocytów chorych na leucynozę nie metabolizują aminokwasów rozgałęzionych poza  $\alpha$ -ketokwasy (33) i wykazują zaledwie 10—20% aktywności dekarboksylazy znajduwanej w tkance prawidłowej (29, 30) a kultura fibroblastów chorego z tą wadą, podobnie jak leukocyty, nie potrafi metabolizować aminokwasów rozgałęzionych (29).

Przemiany tych aminokwasów przedstawia schemat 2. Dla każdego aminokwasu istnieje odrębna dekarboksylaza (63).

Pierwszy etap przemiany — dezaminacja, przebiega prawidłowo. Przy bloku dekarboksylacji prawidłowej metabolity — ketokwasy nagromadzają się w nadmiarze i hamują inne enzymy np. dekarboksylazę kwasu glutaminowego i też wywierają wpływ farmakologiczny, np. hipoglikemizujący.

Biochemiczne próby czynnościowe w leucynozie mają znaczenie badawcze, rozpoznawcze, a także umożliwiają określenie heterozygot w rodzinach chorych i ustalania toru dziedziczenia.

Po obciążeniu doustnym walną wybitnie wzrasta jej stężenie w krwi, jednak bez klinicznych objawów nietolerancji. Po obciążeniu leucyną natomiast jej stężenie w krwi silnie wzrasta w 3 godziny po podaniu, czemu towarzyszy krótkotrwałe i przemijające zaostrzenie objawów neurologicznych. Po izoleucynie zapach moczu nasila się, może wystąpić pobudliwość lub senność oraz wzrasta zawartość alloizoleucyny we krwi na okres kilku tygodni (33, 119).

## 2. Oligofrenia z wydalaniem oksykwasów w moczu (Choroba moczu o zapachu suszonego chmielu, ang. *Ousthouse Disease*)

Jedyny dotychczas opisany przypadek (71, 116) cechował się swoistym przenikliwym zapachem moczu. Mocz ten zawierał duże ilości kwasów: fenylopirogronowego, fenyloctowego,  $\alpha$ -hydroksymasłowego (decydującego o zapachu) oraz fenyloalaniny, metioniny i tyrozyny. Tło biochemiczne wady jest nieznanne.



### 3. Acidemia izowalerianowa

Chorobę opisano u dwojga rodzeństwa (125, 126). U chorych zwracał uwagę charakterystyczny zapach oddechu i płynów ustrojowych określany jako zapach sera lub „spoconych stóp”. Po obfitym posiłku lub w czasie infekcji objaw ten nasilał się a także częstsze stawały się napady wymiotów.

We krwi chorych stwierdzono do 500 razy zwiększone stężenie kwasu izowalerianowego, wzrastające w okresach napadów. W moczu stwierdzono wzmożone wydalanie tego kwasu a ponadto znaleziono też N-izowaleryloglicynę (127). Doustne obciążenie waliną i izowaliną nie powodowało żadnych zmian. Natomiast po podaniu L-leucyny nasilały się objawy neurologiczne i charakterystyczny zapach moczu a zawartość kwasu izowalerianowego wzrastała dwukrotnie i dłużej niż normalnie utrzymywała się na tym poziomie. W leukocytach osobnika chorego stwierdzono znacznie obniżone utlenianie  $^{14}\text{C}$  kwasu izowalerianowego zarówno podczas ataku jak i w remisji. U chorych z tą wadą zatem jest blok na etapie przemiany izowaleryloCoA do  $\beta$ -metylokrotonyloCoA. Enzym katalizujący tę reakcję jest odmienny od enzymów utleniających keto-analogi waliny i izoleucyny do krótszych kwasów tłuszczowych.

### 4. Hiperwalinemia

Chorobę tę opisaną w 1963 r. (130) charakteryzuje przekraczająca 10-krotnie normę hiperwalinemia i hiperwalinuria, przy prawidłowej zawartości innych aminokwasów. U rodziców chorego stwierdzono także hiperwalinurię a ponadto u matki zwiększone wydalanie w moczu kwasu  $\beta$ -aminoizomasłowego. Po doustnym obciążeniu waliną, leucyną i izoleucyną tylko po walinie wystąpiło podwyższone stężenie tego aminokwasu w krwi utrzymujące się dość długo, natomiast nie było nagromadzenia się ketokwasów, co wyraźnie różni tę wadę od leucynozy, gdyż świadczy o prawidłowej dekarboksylacji aminokwasów rozgałęzionych. W okresie podawania diety z niską zawartością waliny stężenie tego aminokwasu w krwi obniża się, ustępują też wymioty i hiperkineza. W leukocytach chorego stwierdzono blok transaminacji waliny, przy prawidłowej aktywności aminotransferazy leucyny i dekarboksylazy leucyny (121).

Przyczyną hiperwalinemii jest więc upośledzenie początkowego etapu degradacji waliny, tj. transaminacji waliny do kwasu  $\alpha$ -ketoizowalerianowego. Zgodnie z zasadą bloku metabolicznego walina nagromadza się w tkankach, przestrzeni pozakomórkowej i przedostaje się do moczu.

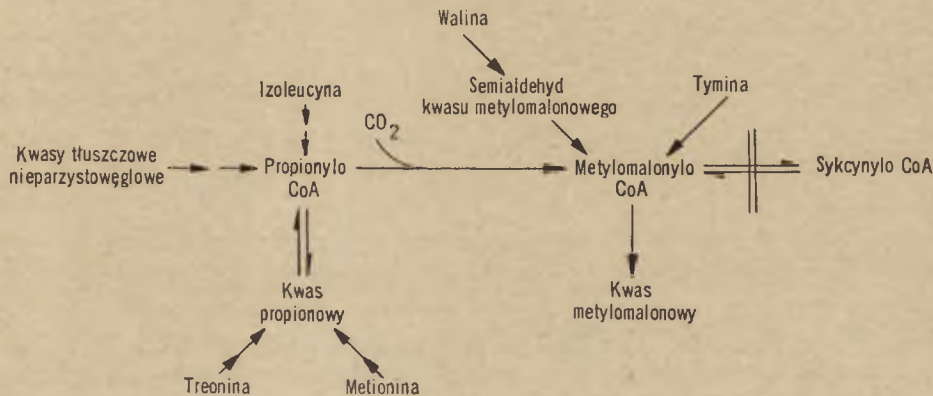
### 5. Metylomalonaciduria (Metylomalonacidemia)

Chorobę wykryto w 1967 r. (87, 104) po czym wkrótce opisano trzy dalsze jej przypadki (70, 89, 120).

Zasadniczym objawem jest przewlekła kwasica metaboliczna ustępująca częściowo po ograniczeniu białek w diecie a zaostrzająca się przy przekarmianiu białkiem i w infekcji. W krwi zwiększona jest zawartość kwasu metylomalonowego, kwasu mlekowego i glicyny. W czasie zaostrzeń występuje ketonuria spowodowana obecnością kwasu metylomalonowego w ilościach gramowych, oraz znaczna hiperglicynuria bez zwyżki zawartości aminokwasów rozgałęzionych.

Próby obciążeniowe (104) wykazały, że w krwi po obciążeniu L-walinalą wzrasta stężenie kwasów metylomalonowego, pirogronowego i  $\alpha$ -ketoglutazarowego a po obciążeniu białkiem obniża się stężenie glukozy, wzrasta stężenie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych i opada stężenie kwasu metylomalonowego, przy czym wzrasta jego wydalanie w moczu. Przy niskiej podaży białek potrzeba mniej dwuwęglanów do skorygowania kwasicy. Po doustnym obciążeniu propionianem sodowym, który jest prekursorem kwasu metylomalonowego wzrasta we krwi stężenie tego ostatniego i ciał ketonowych a także wydalanie kwasu metylomalonowego w moczu.

Kwas metylomalonowy jest metabolitem kwasów tłuszczowych o nieparzystej ilości atomów węgla, aminokwasów: izoleucyny, treoniny, metioniny, waliny oraz tyminy i kwasu propionowego (schemat 3).



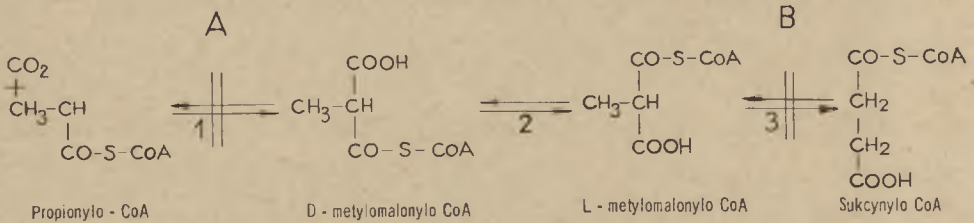
**Schemat 3.** Prekursory kwasu metylomalonowego

Nagromadzenie się kwasu metylomalonowego w krwi jest wynikiem bloku w dwuetapowej przemianie metylomalonyloCoA do sukcynyloCoA. W pierwszym etapie metylomalonyloCoA racemaza (EC 5.1.99.1.) przekształca w odwracalnej reakcji D-metylomaloniloCoA do L-metylomaloniloCoA, a w drugim etapie metylomalonyloCoA mutaza (EC 5.4.99.2.) przekształca L-metylomaloniloCoA do sukcynyloCoA. Koenzymem mutazy jest witamina B<sub>12</sub>. Wg Lindblada i wsp. (90) w metylomalonyloacidemii występuje nienormalnie wysokie zapotrzebowanie na koenzym. U chorych nie ma niedoboru witaminy B<sub>12</sub> ale podanie dużych da-



wiek tej witaminy (104) obniża wydalanie kwasu metylomalonowego w moczu. Zwiększone stężenie leucyny, izoleucyny i waliny we krwi chorych Lindblad i wsp. (90) tłumaczą niedoborem CoA w następstwie związania go w postaci nierozkładanego metylomalonyloCoA.

Obraz kliniczny metylomalonoacidemii przypomina hiperglicynemię, zwłaszcza jej ciężką postać ketotyczną. Hsia i wsp. (70) rozgraniczają wyraźnie te wady. Leukocyty chorych na hiperglicynemię ketotyczną nie utleniają propionianu do dwutlenku węgla, ale degradują prawidłowo metylomalonian. Natomiast leukocyty chorych na metylomalonyloacidurię nie utleniają ani jednego ani drugiego substratu. Różnice w lokalizacji bloku metabolicznego w metylomalonyloacidemii i hiperglicynemii ketotycznej przedstawia schemat 4.



A - Przypuszczalne miejsce bloku enzymatycznego w hiperglicynemii ketotycznej

B - " " " metylomalonoacidurii

1 - Karboksylaza propionilo CoA (Biotyna)

2 - Racemaza metylomalonylo CoA

3 - Mutaza metylomalonylo CoA (Wit. B<sub>12</sub> koenzym)

**Schemat 4.** Związki metaboliczne między propioniloCoA a izomerami metylomalonyloCoA

### III. Wady przemiany aminokwasów siarkowych

#### 1. Cystynuria (Cystyno-lizyno-arginino-ornitynuria)

Ta znana od dawna choroba jest wadą penetracji cystyny przez przegrody ustrojowe. Interesująca jest historia rozwoju poglądów na cystynurię. Cystynę wyodrębniono z kamieni pęcherzowych (stąd nazwa aminokwasu) w 1810 r., w 1876 r. Nieman (cyt. wg 41) stwierdził dziedziczny i rodzinny charakter cystynurii a w 1908 r. Garrrod zaliczył ją do wrodzonych wad metabolicznych typu ogólnoustrojowego. Dent i Rose w 1951 r. (32) zakwalifikowali cystynurię do chorób nerek z upośledzeniem wchłaniania zwrotnego w kanalikach nerkowych czterech aminokwasów: cystyny, lizyny, argininy i ornityny. W 1961 r. Milne i wsp. (96) na podstawie zwiększonej zawartości tioaminokwasów w kale stwierdzili upośledzenie wchłaniania ich nie tylko w nerkach lecz i w przewodzie pokarmowym. W 1964 r. Mc Carthy i wsp. (21)

wykrywają w kale cystynuryków cystynę i lizynę i stwierdzają upośledzenie koncentrowania tych aminokwasów przez komórki śluzówki jelit. C r a w h a l l i wsp. w 1963 r. (26) donoszą o leczniczym wpływie penicylaminy.

Są dwa rodzaje dziedziczenia anomalii: postać recesywna kompletna homozygotyczna (występująca częściej) i postać recesywna niekompletna, heterozygotyczna. W pierwszej postaci wady chorzy wydalają duże ilości aminokwasów zasadowych i cystyny. Formowanie się kamieni cystynowych jest wynikiem niskiej rozpuszczalności cystyny (ok. 3mg w 100ml) w wodnych roztworach, zwłaszcza kwaśnych. Postać niekompletna recesywna, w której praktycznie nie tworzą się kamienie moczowe, dzieli się na trzy typy (110): typ I — charakteryzuje niezdolność akumulowania w śluzówce jelit lizyny, cystyny i argininy przy prawidłowym wydalaniu cystyny i lizyny; typ II — niezdolność akumulowania lizyny, zachowane akumulowanie cystyny (arginina nie badana) przy wzmożonym wydalaniu cystyny i lizyny w moczu; typ III — akumulowanie wszystkich trzech wymienionych aminokwasów i nadmierne wydalanie ich w moczu. Przy doustnym obciążeniu cystyną w typie I i II nie ma wzrostu stężenia tego aminokwasu we krwi i krzywa obciążeniowa jest stale płaska (91), podczas gdy w typie III krzywa obciążeniowa jest prawie normalna.

Doustne podawanie cystyny nie zwiększa u cystynuryków jej wydalania w moczu. Natomiast doustne podanie cysteiny podnosi stężenie tego aminokwasu we krwi silniej niż u zdrowych i wzmacnia jej wydalanie w moczu (117). Doustnie podana arginina nie wchłania się w jelitach, ulega dekarboksylacji do putrescyny, która z kolei wchłonięta przekształca się w pyroolidynę wydalającą się w moczu (96). Po doustnym obciążeniu lizyną w moczu wydalana jest jej pochodna — piperydyna. Leukocyty cystynuryków wbudowują cystynę i lizynę tak jak leukocyty ludzi zdrowych (13).

## 2. Cystynoza (Choroba Lignac-Fanconi)

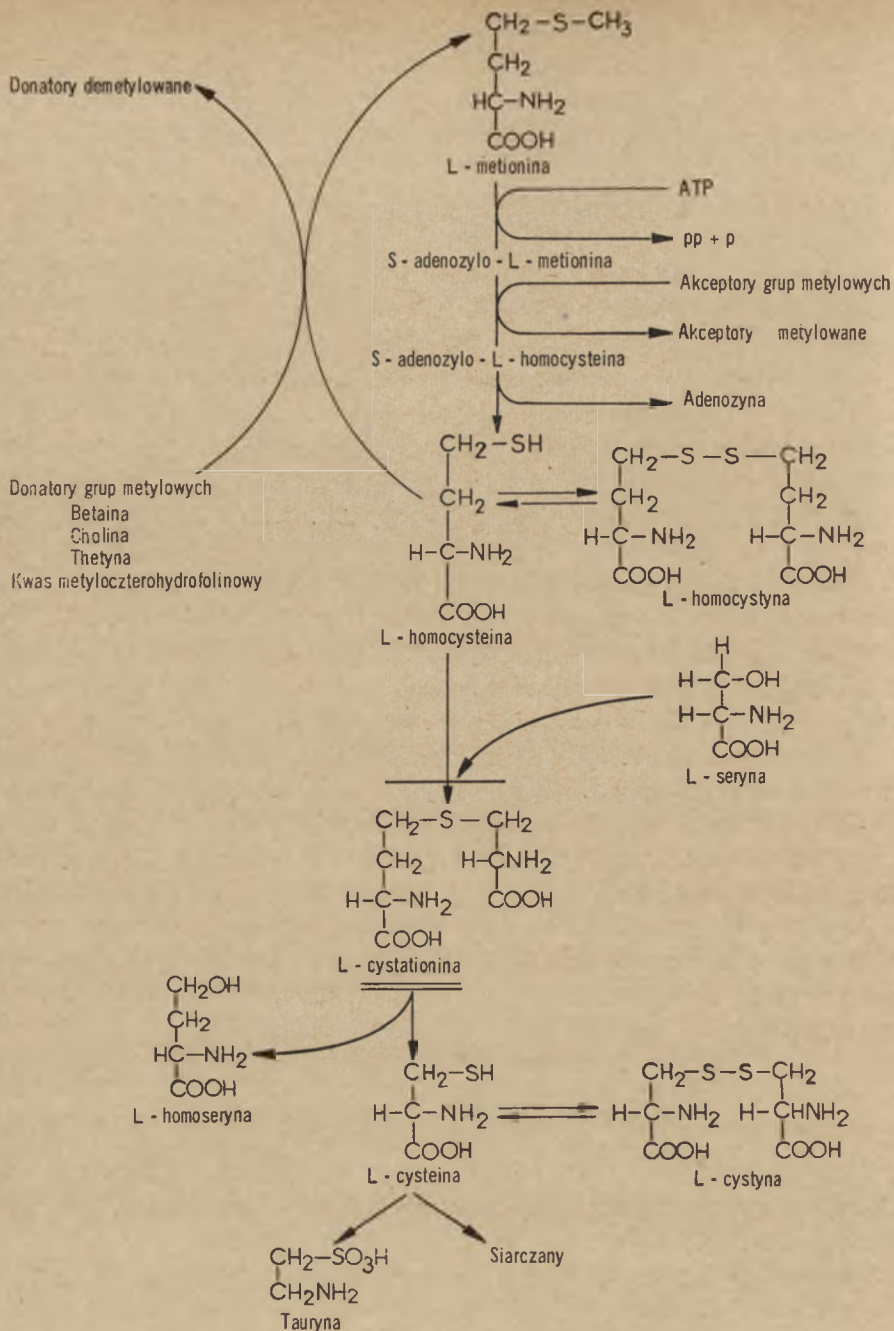
Choroba polega na odkładaniu cystyny w różnych narządach z odpowiednią manifestacją narządową, u dzieci z karzełkowatością i krzywicą oporną na witaminę D.

Patogeneza i przyczyna choroby jest jeszcze nieznana.

## 3. Homocystynuria

Chorobę wykryto w 1962 r. (20) i w ciągu następnych 6 lat opisano ponad 90 przypadków (50). Ogromny polimorfizm obrazu klinicznego tego schorzenia od ciężkich klinicznie obrazów do postaci bezobjawowych, wykazywanych jedynie biochemicznie, utrudnia prawidłową ocenę częstości występowania (27).





— Miejsce bloku w homocystynurii  
 === Miejsce bloku w cystationurii

**Schemat 5.** Przemiany tioaminokwasów z blokami metabolicznymi

W krwi chorych jest prawie stale zwiększone, nawet 50-krotnie, stężenie homocystyny i metioniny. Podobnie zachowują się te aminokwasy w płynie mózgowo-rdzeniowym. W moczu jest zwiększone wydalanie cystyny, cysteiny, metioniny, L-homocystyny oraz obecny jest złożony związek siarkowy 5-amido-4-imidazolokarboksamid-5-S-homocysteinyłorybozyd (106).

Przyczyną choroby jest zmniejszenie lub prawie całkowite (poniżej 5% normy) zahamowanie aktywności syntetazy cystationiny w wątrobie (97) i mózgu (44). Enzym ten syntetyzuje cystationinę z homocysteiny i seryny. Zablockowanie syntezy powoduje nagromadzenie się homocysteiny, która wydala się w moczu w postaci utlenionej, jako homocystyna. Przebieg reakcji ilustruje schemat 5.

W normalnej skórze ludzkiej nie ma wprawdzie aktywności syntetazy cystationiny, ale w hodowlach skóry *in vitro* wytwarzają się linie fibroblastów z tą aktywnością. W hodowlach skór homocystynuryków natomiast brak jest aktywności syntetazy cystationiny (129).

Cystationina wg jednych autorów powstaje w mózgu (44), zdaniem innych zaś jest syntetyzowana w wątrobie i stąd transportowana do mózgu (cyt. wg 108). Występuje ona w wysokich stężeniach w mózgu ludzkim (124) zwłaszcza w płacie potylicznym (69). W mózgu cystynuryków zaś albo nie ma cystationiny (53) albo występuje w bardzo niskich stężeniach (16).

Po doustnym obciążeniu L-homocystyną, która u zdrowych jest bardzo szybko metabolizowana i w moczu się nie wydala, u homocystynuryków występuje znaczne wydalanie tego aminokwasu (79). Po obciążeniu doustnym cystyną wydalanie siarki nieorganicznej w moczu rośnie u homocystynuryków tak samo jak u zdrowych (cyt. wg 82). Dożylnie podanie L-metioniny powoduje u homocystynuryków 3—10-krotnie dłuższe utrzymywanie się zwiększonego jej stężenia we krwi niż u zdrowych. Test doustnego obciążenia metioniną stosowano (131) do oceny heterozygot homocystynurii w rodzinach chorych. U heterozygot wzmacnia się bowiem wydalanie metioniny w moczu i pojawiają się ślady homocystyny.

#### 4. Cystationinuria

Wadę tę opisano po raz pierwszy w 1957 r. (48, 63), po czym w ciągu dziesięciu lat opublikowano 5 przypadków tej choroby (109).

Wodzącym objawem jest wzmożone wydalanie cystationiny w moczu z nieco tylko zwiększonym stężeniem tego metabolitu we krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Stężenie cystationiny we krwi nie może znacznie wzrosnąć, gdyż związek ten nie ulega zupełnie wchłanianiu zwrotnemu z moczu pierwotnego. Być może jest on nawet aktywnie wydzielany przez kanaliki nerkowe (48). Wydalanie cystationiny u chorych z tą wadą nasila się po doustnym podaniu DL-metioniny (63).



Cystationinę rozkłada cystationinaza, przy współudziale koenzymu fosforanu pirydoksalu (witaminy B<sub>6</sub>) na cysteinę i kwas  $\alpha$ -ketomasłowy. Homogenaty wątroby chorych na cystationinurię rozkładają cystationinę w minimalnym stopniu (43). Dodatek fosforanu pirydoksalu do tych homogenatów przywraca normalny lub subnormalny rozkład cystationiny (48). Chorzy na cystationinurię nie wykazują żadnych objawów niedoboru witaminy B<sub>6</sub>. Jednak podawanie zwiększonej ilości tej witaminy doustnie lub domięśniowo obniża u nich stężenie cystationiny we krwi, zmniejsza jej wydalanie oraz zwiększa wydalanie siarki nieorganicznej. Przypuszcza się, że przyczyną cystationinurii jest defekt w wiązaniu fosforanu pirydoksalu z białkiem cystationinazy.

### 5. Hipermetioninemia

Schorzenie to opisano (107) u trojga niemowląt (rodzeństwa) z wrodzonymi zmianami marskimi wątroby, zmianami w nerkach i objawami neurologicznymi.

Mocz tych chorych zawierał 10-krotnie wyższe niż normalnie ilości metioniny, zwiększone ilości tyrozyny, ornityny, lizyny i cytruliny a ponadto homocystynę, cystationinę, kwas  $\alpha$ -hydroksyfenylopirogroonowy oraz kwas  $\alpha$ -ketometiomasłowy, decydujący o charakterystycznym zapachu moczu.

Obciążenie doustne metioniną sprowadzało senność lub nudności i wymioty, przy czym niekiedy nasilał się charakterystyczny zapach moczu.

Obecność kwasu  $\alpha$ -ketometiomasłowego wskazuje na zaburzenia raczej na wstępnych etapach przemiany metioniny a prawidłowe ilości cystationiny w mózgu świadczą o zachowanej drodze degradacji metioniny.

### 6. Zespół złego wchłaniania metioniny

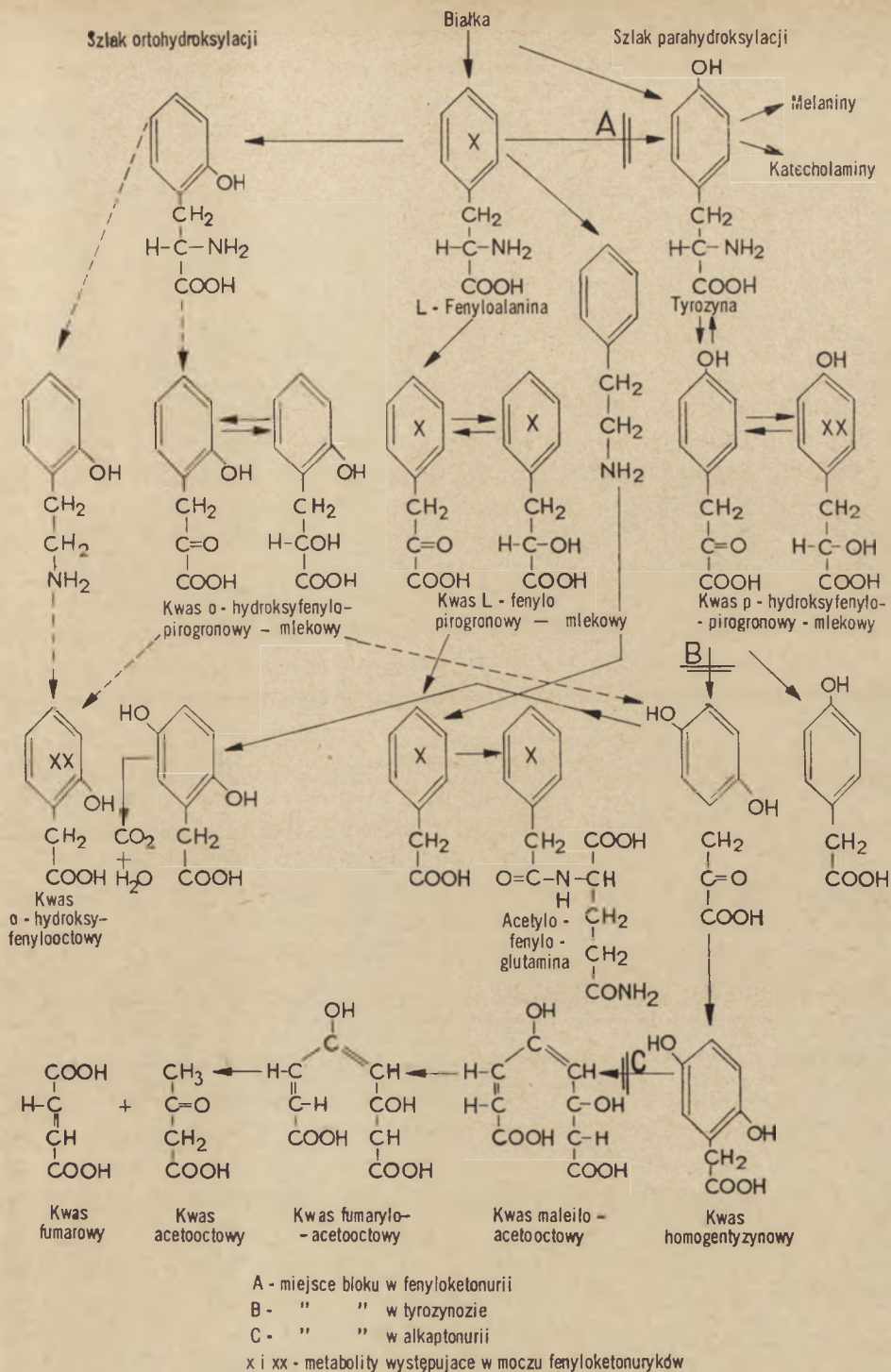
Chorobę opisano (68) u dwuletniej dziewczynki z głębokim upośledzeniem umysłowym. U chorej występowało upośledzenie wchłaniania nerkowego i jelitowego metioniny, aminokwasów o łańcuchu rozgałęzionym i innych np. seryny. W moczu jak i w kale znajdowano też kwas  $\alpha$ -hydroksymasłowy, pochodzący z metioniny.

Doustne obciążenie metioniną wzmagало wydalanie źle wchłanianych aminokwasów w kale, przy czym metionina była wydalana w postaci siarkotlenku.

Po 2-letniej diecie ubogometioninowej uzyskano cofnięcie szeregu objawów klinicznych.

## IV. Wady przemiany fenyloalaniny i tyrozyny

Bloki metaboliczne w przemianie fenyloalaniny i tyrozyny przedstawia schemat 6.



**Schemat 6.** Przemiany fenylalaniny na szlak orto- i para-hydroksylacji



### 1. Fenyloketonuria

Podstawowymi objawami biochemicznymi fenyloketonurii są: zwiększona zawartość fenyloalaniny w krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu i pocie oraz wydalanie nieprawidłowych metabolitów fenyloalaniny w moczu. Mocz chorych zawiera kwas fenylopirogronowy fenylolekowy (5), glukuronian kwasu fenylooctowego, kwas fenyloacetylooctowy, kwas ortohydroksyfenylooctowy, kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy (56), indykan oraz kwasy indoloctowy i indololekowy (54). Ponadto obserwuje się obniżone stężenie adrenaliny w krwi i obniżone wydalanie w moczu kwasu 3-metoksy-4-hydroksymigdałowego, a także obniżoną zawartość serotoniny w krwi i obniżone wydalanie w moczu jej końcowego metabolitu kwasu 3-hydroksyindoloctowego (66).

Pozycję defektu metabolicznego w fenyloketonurii ustalił Jervis (72, 73). Defekt polega na upośledzeniu lub zahamowaniu aktywności hydroksylazy fenyloalaninowej, zlokalizowanej w wątrobie (2).

Układ hydroksylazy fenyloalaninowej składa się z dwóch frakcji: termolabilnej, która znajduje się tylko w wątrobie, oraz stabilniejszej, występującej zarówno w wątrobie jak i w innych tkankach. Wyciąg z wątroby osoby zdrowej katalizuje przekształcanie fenyloalaniny w tyrozynę w obecności tlenu i NADP, natomiast wyciąg z wątroby fenyloketonuryka jest pozbawiony tej właściwości. Aktywność hydroksylazy fenyloalaniny u fenyloketonuryków może być zahamowana w różnym stopniu (do 90% zahamowania) (81), przy czym stopień zahamowania jest regulowany dziedzicznie. U heterozygot zahamowanie jest mniejsze. Zablockowanie normalnej drogi skierowuje fenyloalaninę na inne szlaki przemian. Ulega ona hydroksylacji w pozycji *orto* i *meta*. Powstała na tej drodze *orto*-hydroksyfenyloalanina (*ortotyrozyna*) po nie znanych bliżej przemianach wydalana jest w moczu w postaci kwasu *orto*hydroksyfenylooctowego. Wskutek transaminacji fenyloalaniny powstaje kwas fenylopirogronowy. Wydalanie tego i innych metabolitów fenyloalaniny jest proporcjonalne do jej stężenia w krwi (6). Sam objaw wydalania kwasu fenylopirogronowego w moczu nie jest jednak dla rozpoznania fenyloketonurii wodzący ani rozstrzygający.

### 2. Hiperfenyloalaninemia bez fenyloketonurii

Zwiększony poziom fenyloalaniny w krwi nie zawsze oznacza, że mamy do czynienia z fenyloketonurią jako jednostką chorobową. Z klinicznego punktu widzenia rozróżnienie to jest bardzo ważne, gdyż od tego zależy decyzja zastosowania długotrwałej, kosztownej i niecałkiem obojętnej dla ustroju diety, która zapobiega rozwojowi u fenyloketonurii upośledzenia umysłowego. Znane są przejściowe fizjologiczne hiperfenyloalaninemie.

Upośledzenie aktywności aminotransferazy fenyloalaniny wywołuje hiperfenyloalaninemię, której nie towarzyszy wydalanie w moczu kwasu fenylopirogronowego (3). Opisano też wadę podwójnego bloku na szlaku metabolicznym fenyloalaniny, w której upośledzeniu aktywności aminotransferazy fenyloalaniny towarzyszył blok w przemianie fenyloalaniny w tyrozynę (3). Doustne obciążenie fenyloalaniną nie podnosiło stężenia tyrozyny w krwi, a w moczu nie było kwasu fenylopirogronowego, fenylopirogronowego, fenyloketonów ani kwasów *orto*- i *parahydroksyfenylo*wych, nie było też nieprawidłowych metabolitów tryptofanu. Brak zaburzeń w przemianie tryptofanu wiązano z nieobecnością kwasów fenylopirogronowego i ortohydroksyfenylooctowego, które hamują pyrolazę tryptofanową (120a).

### 3. Tyrozynoza

**(Tyrozynemia. Dysfunkcja wątrobowo-nerkowa. Tyrozyluria. Zespół Barber-Denta).**

Choroba znana jest od 1932 r., a jeden przypadek opisano w Polsce (76).

Wodzącym objawem biochemicznym jest zwiększone stężenie tyrozyny we krwi (powyżej 10mg/100 ml surowicy) i uogólniona hiperaminoaciduria z tyrozylurią, tj. zwiększonym wydalaniem tyrozyny i jej metabolitów, dających dodatni odczyn Millona (kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy i *p*-hydroksyfenylomlekowy, dwuhydroksyfenyloalanina i inne). Ponadto jest stała glikuzoria a niekiedy proteinuria.

Za przyczynę choroby uważa się obniżenie względnie brak aktywności hydroksylazy *p*-hydroksyfenylopirogronianu (EC 1.14.2.2). Enzym ten w wątrobie i nerkach katalizuje w obecności tlenu przekształcanie kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego w kwas homogentyzynowy. W punktach wątroby chorych na tyrozynozę brak jest aktywności tej hydroksylazy (51). Doustne obciążenie fenyloalaniną lub tyrozyną lub kwasem *p*-hydroksyfenylopirogronowym daje długo utrzymujące się podwyższenie stężenia tyrozyny we krwi i zwiększa wydalanie w moczu związków dających dodatnią próbę Millona. L a D u (34) wysuwa jako przyczynę tyrozynemii upośledzenie aktywności aminotransferazy tyrozynowej opierając się na występowaniu po obciążeniu tyrozyną 3,4-dwuhydroksyfenyloalaniny i znacznych ilości kwasu *p*-hydroksyfenylomlekowego. Zahamowanie aktywności hydroksylazy *p*-hydroksyfenylopirogronianu jest jego zdaniem efektem wtórnym. Pogląd ten jest jednak odosobniony.

U noworodków istnieje fizjologiczna tyrozyluria i hipertyrozynemia (88), co utrudnia rozpoznawanie tyrozynozy w tym okresie. Utrzymywanie się hipertyrozynemii ponad 10 miesięcy oraz wyniki prób obciążeniowych rozstrzygają o rozpoznaniu (83).



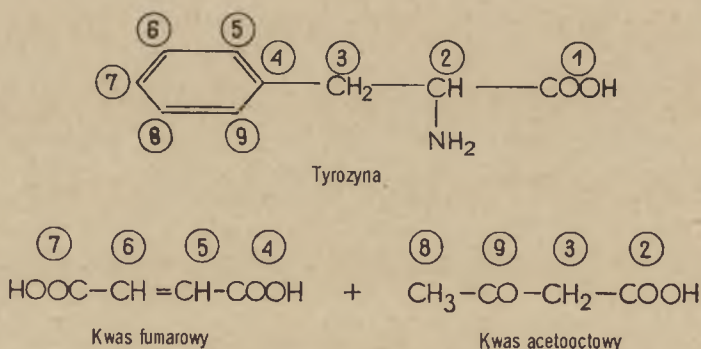
#### 4. Alkaptonuria (Homogentyzynuria)

Głównym objawem choroby jest wydalanie brunatnoczarnego moczu. Przypadki takie są znane od 400 lat. Nazwa alkaptonuria pochodzi od Boedekera, który w 1859 roku terminem „alkapton” nazwał hipotetyczną substancję czerniejącą przy zadaniu alkaliami. Substancję tę w 1891 r. Wolkoff i Bauman zidentyfikowali jako kwas 2,5-dwuhydroksyfenylooctowy i nazwali kwasem homogentyzynowym, przez analogię do znanego już kwasu gentyzynowego (kwasu 2,5-dwuhydroksybenzoesowego) (cyt. wg 46). Dotychczas opisano ponad 600 przypadków alkaptonurii z tego kilka w Polsce.

Alkaptonurycy wydalają w moczu do 20g kwasu homogentyzynowego na dobę. Stężenie tego związku w krwi jest bardzo niskie, gdyż *klirens* kwasu homogentyzynowego sięga 400—500ml/min., przekracza więc wielkość sączenia kłębkowego (46).

Kwas homogentyzynowy powstaje jak już wspomniano z kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego pod wpływem hydroksylazy *p*-hydroksyfenylopirogronianu. Prawdopodobnie przesunięciu ulega też cały łańcuch boczny, tak że grupy hydroksylowe znajdują się w pozycji *orto*- albo *meta*-w stosunku do niego (128).

Rozkład kwasu homogentyzynowego jest katalizowany przez oksygenazę homogentyzynianową — metaloproteid z żelazem dwuwartościowym. Przyłączeniu dwu atomów tlenu towarzyszy rozbitcie pierścienia benzenowego i powstanie kwasu maleiloacetoctowego, który przekształca się następnie w kwas fumarowy i acetoctowy (schemat 7).



**Schemat 7.** Pochodzenie węgli w końcowych metabolitach tyrozyny

Punktaty biopsyjne z wątroby (36) i nerek (139) alkaptonurików wykazują aktywność wszystkich enzymów biorących udział w przemianie tyrozyny do kwasu acetoctowego i fumarowego.

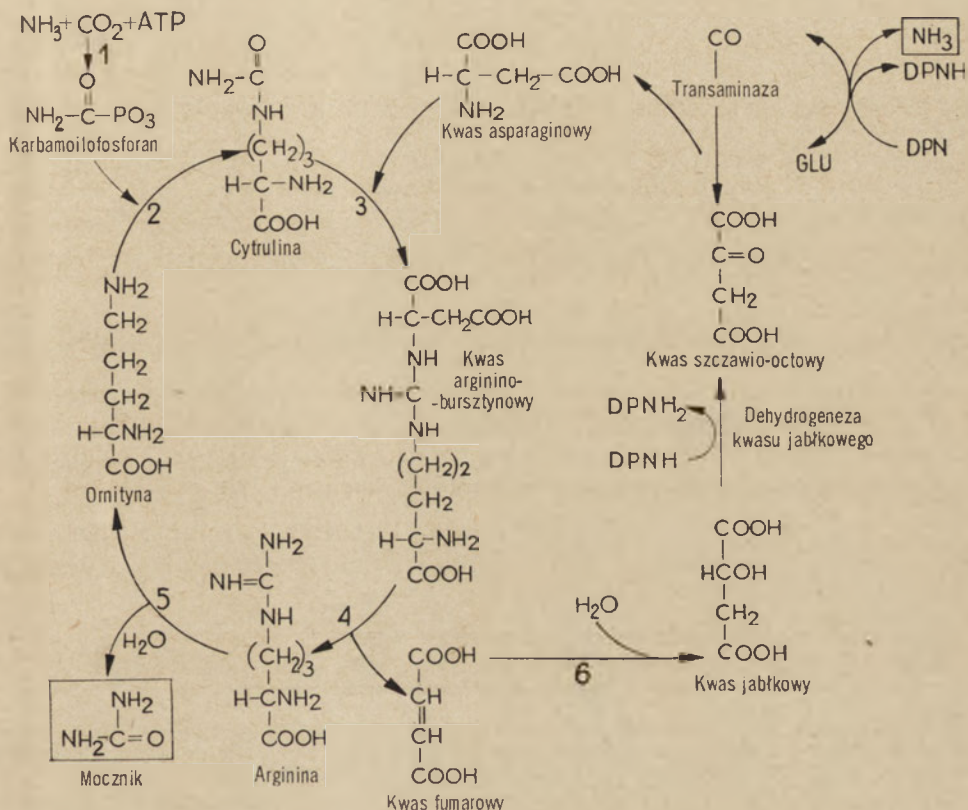
Próby obciążeniowe potwierdzają wyniki badań punktatów, a że roz-

poznanie cierpienia jest proste, nie mają one żadnego praktycznego znaczenia.

Homogentyzynurię można wywołać doświadczalnie u szczurów, myszek i świnek morskich przez ich karmienie fenyloalaniną. Taką homogentyzynurię usuwa witamina C.

## V. Wady metaboliczne cyklu mocznikowego

Bloki metaboliczne cyklu mocznikowego przedstawia schemat 8.



1. Syntetaza karbamioilofosforanowa
2. Karbamioilotransferaza ornitynowa
3. Syntetaza arginino-bursztynianowa
4. Liza arginino-bursztynianowa
5. Arginaza
6. Fumaraza

Schemat 8. Wady metaboliczne w cyklu mocznikowym

### 1. Hiperamonemia

Chorobę opisano w 1962 r. (111). Wodzącym objawem biochemicznym jest stała wysoka zawartość amoniaku w krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym.



niowym, oraz alkaliczny lub obojętny moczu z wysoką zawartością glutaminy.

Przyczyną hiperamonemii jest obniżenie aktywności karbamoilotransferazy ornitynowej, co stwierdza się w skrawkach i punktatach bioptycznych, wątroby oraz w leukocytach. Aktywność syntezy karbamoilofosforanowej jest obniżona do 20% wartości prawidłowej a aktywność syntetazy i liazy argininobursztynianowej jest prawidłowa.

Stężenie amoniaku we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym oraz stężenie kwasu glutaminowego w płynie mózgowo-rdzeniowym obniża się na diecie niskobiałkowej (85).

## 2. Cytrulinuria

Chorobę opisano w toku systematycznych badań moczu dzieci umysłowo upośledzonych (98). Głównym objawem jest wydalanie cytruliny w ilości 2—3g na dobę, będące wynikiem hipercytrulinemii. Drugim zasadniczym objawem biochemicznym jest hiperamonemia, występująca zwłaszcza po posiłkach.

Przyczyną cytrulinurii jest częściowy blok aktywności syntetazy argininobursztynianowej, który to enzym katalizuje spajanie cytruliny z kwasem asparaginowym na kwas argininobursztynowy. Szczegóły tej reakcji nie są jeszcze znane. W hodowlach tkanki skóry cytrulinuryka stwierdzono upośledzenie aktywności tej syntetazy (99), a w hodowli fibroblastów znacznie obniżony metabolizm cytruliny.

Po doustnym obciążeniu białkiem oraz ornityną, arginina i cytrulina zawartość amoniaku we krwi chorego rośnie znacznie, przewyższając kilkakrotnie wartości u kontroli.

## 3. Argininobursztynuria

Chorobę opisano w 1958 r., po czym w ciągu (1) 10 lat opublikowano kilkanaście przypadków tej wady (85, 86).

Zasadniczym objawem biochemicznym jest wydalanie w moczu kwasu argininobursztynowego, w ilościach od 20—40mg do 3g na dobę (86). Stężenie tego kwasu w surowicy jest niskie, a natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym sięga aż 10mg/100ml. Niskie stężenie kwasu argininobursztynowego we krwi wynika stąd, że praktycznie w nerkach nie jest on wchłaniany zwrotnie i jego *klirens* wynosi 105ml/min.

Kwas argininobursztynowy jest normalnym metabolitem szlaku syntezy mocznika. Przyczyną argininobursztynurii jest blok liazy argininobursztynianowej (EC 4.3.2.1) wskutek czego kwas argininobursztynowy nie ulega rozpadowi na arginina i kwas fumarowy.

W punktatach bioptycznych wątroby chorych nie stwierdza się aktyw-

ności liazy argininobursztynianowej (84, 86) przy zachowanej aktywności karbamoiltransferazy ornitynowej, i dwukrotnie wyższej niż u zdrowych aktywności syntetazy argininobursztynianowej.

Również w krwinkach czerwonych i leukocytach dzieci obciążonych tą wadą brak jest aktywności liazy argininobursztynianowej (12). Aktywność tego enzymu w mózgu 6-dniowego noworodka zmarłego na tę chorobę wynosiła tylko 2—3% kontroli (77). Wydaje się, że związane z tą wadą uszkodzenie narządów występuje bardzo wcześnie w życiu płodowym.

Doustne obciążenie prekursorami kwasu argininobursztynowego (cytruliną i ornityną) oraz podawanie argininy zwiększają natomiast dieta ubogo- względnie bezbiałkowa obniżają wydalanie kwasu argininobursztynowego w moczu (132).

Wydalanie kwasu argininobursztynowego w moczu po obciążeniu cytruliną służy jako wskaźnik do wykrywania heterozygot. Wydalanie w tych warunkach jest u heterozygot niższe niż u zdrowych.

#### 4. Argininuria

Dotychczas opisano jedyny przypadek (115) z wybitnie zwiększonym wydalaniem argininy w moczu, wzrastającym przy doustnym podaniu argininy w dawkach takich jak w normalnej diecie. Sugeruje się blok w aktywności arginazy, co wymaga jednak potwierdzenia.

## VI. Wady przemiany histydyny

### 1. Histrydynamia. Wrodzony brak amoniako-liazy histydynowej

Przemiany histydyny obrazuje schemat 9.

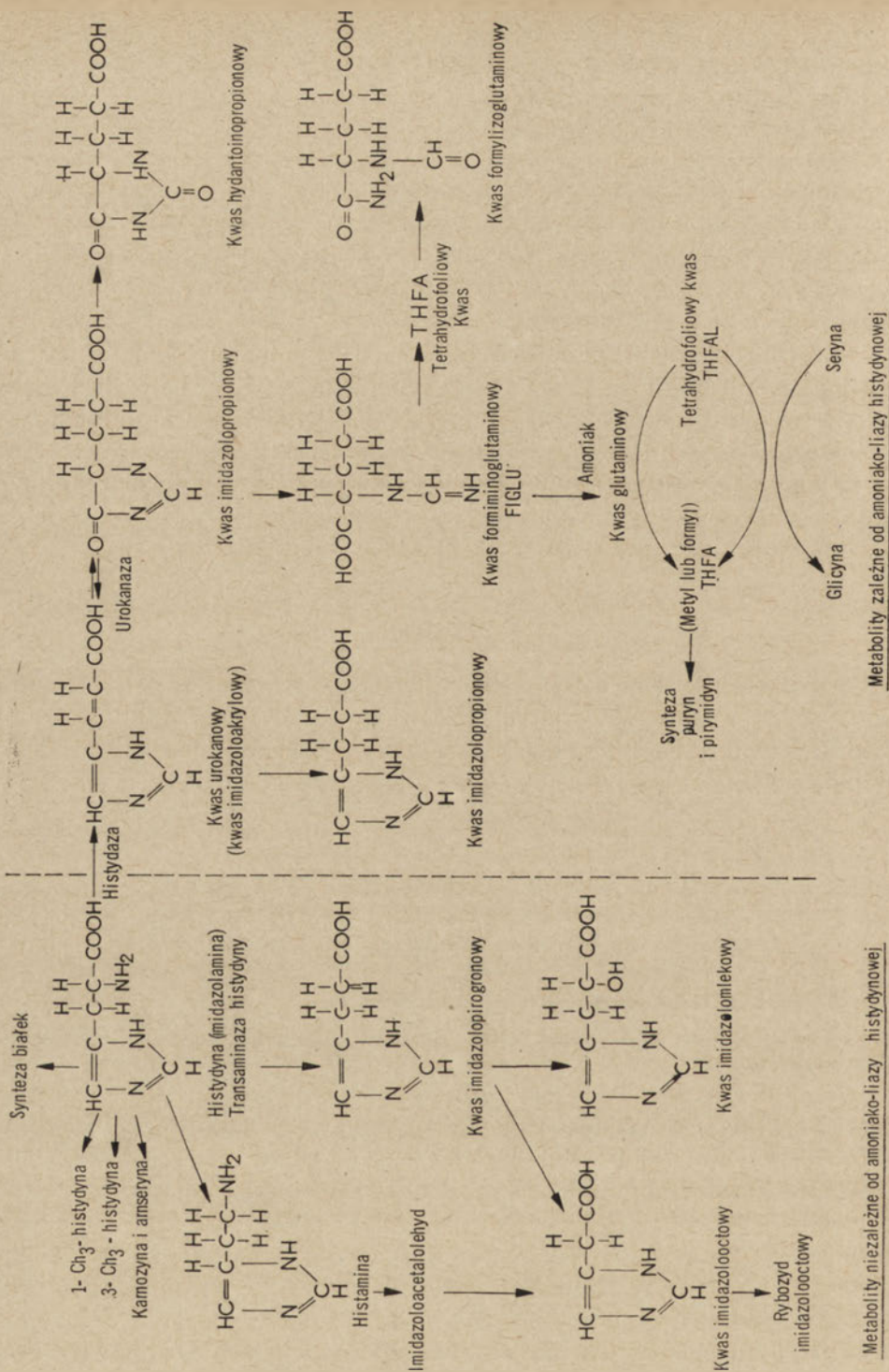
Histrydynię wykryto w 1961 r. (58, 59). Do roku 1968 opisano 25 przypadków (19).

Zasadniczym objawem jest wybiórcza hiperhistrydynuria, przekraczająca 5—10-krotnie wartości prawidłowe, oraz wydalanie innych metabolitów histydyny szlaku przed amoniako-liażą histydynową, tj. kwasu imidazolopirogronowego, imidazolomlekowego, 1-imidazolooctowego przy prawidłowej zawartości 1-metylohistydyny i 3-metylohistydyny oraz wybitne zwiększenie zawartości histydyny we krwi. Zwiększone jest również stężenie histydyny w płynie mózgowo-rdzeniowym przy niskim stężeniu glutaminy i kwasu glutaminowego (60).

Histrydynemia wywołana jest blokiem amoniako-liazy histydynowej dezaminującej nieodwracalnie histydyne do kwasu urokanowego. Enzym ten zlokalizowany jest w wątrobie i w skórze (9).

Histrydynemia stanowi klasyczny przykład możliwości zlokalizowania





Schemat 9. Drogi przemian histydyny

bloku metabolicznego w oparciu o próby obciążeniowe. Po doustnym obciążeniu histydyną wzrasta wybitnie jej stężenie w surowicy, wzrost ten utrzymuje się długo, wzrasta wydalanie w moczu kwasu imidazolo-mlekowego, imidazolo-pirogronowego, imidazolo-octowego a nie ma wydalania kwasu urokanowego i formiminoglutaminowego (4, 10, 118). Natomiast obciążenie kwasem urokanowym, pierwszym metabolitem pozablokowym, znacznie wzmacnia wydalanie kwasu formiminoglutaminowego w moczu (10, 35, 67). Wynik tej próby świadczy o integralności całej drogi metabolicznej od kwasu urokanowego do kwasu formiminoglutaminowego. Obniżenie lub brak aktywności amoniako-liazy histydynowej stwierdzano w naskórku chorych dzieci (67, 118), a u rodziców i rodzeństwa chorego — obniżoną aktywność tego enzymu. Obecność tego enzymu w skórze nie wyklucza histydnemii (137). Próby obciążeniowe i badania aktywności enzymu w skórze zastosowano do wykrywania heterozygot (35, 67).

## 2. Imidazoloaminoaciduria ze zwyrodnieniem mózgowo-płamkowym

Opisany przypadek (15) dotyczył dziecka z ciężkim upośledzeniem umysłowym, u którego stwierdzono wzmożone wydalanie w moczu histydyny, karnozyny, anseryny, 1-metylohistydyny i kilku bliżej nie zidentyfikowanych związków reagujących dodatnio z odczynnikiem Pauliego. Brak jest bliższych badań biochemicznych wyjaśniających podłoże schorzenia.

## VII. Wady przemiany tryptofanu

### 1. Choroba Hartnupów. Choroba H

Nazwa zespołu jest nazwiskiem rodziny, w której został on po raz pierwszy opisany (11). Chorobą dotkniętych było czworo z ośmiorga dzieci małżeństwa, kuzynostwa z pierwszego pokolenia. Do 1967 r. opisano ponad 20 przypadków tej wady (14).

Zasadniczym biochemicznym objawem choroby jest hiperaminoaciduria nerkowa, niekiedy ogromna, dotycząca w szczególności tryptofanu, kwasu glutaminowego, wydalanego w ilościach 2—3g na dobę, asparaginy, alaniny, seryny wydalanych do 1g dziennie, poza tym histydyny, cytruliny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, treoniny, tyrozyny i waliny, a także kwasu indolo-3-octowego, indykanu, indoloakryloglicyny, kwasu indolo-mlekowego. Natomiast wydalanie proliny, hydroksyproliny, metioniny i argininy jest znikome.

Indykanuria znika gdy poda się choremu antybiotyk o szerokim zasięgu (62) co świadczy o jelitowym pochodzeniu indykanu w moczu. W kale chorych znaleziono te same aminokwasy, które w sposób typowy dla choroby H wydalają się w moczu (7,113), co wskazuje na upośledzenie





ksanturenowego w okresie normalnego pokrycia zapotrzebowania białkowego (80). Związki te są metabolitami przemian tryptofanu na szlaku do kwasu nikotynowego, przed kinureninazą (schemat 10).

Choroba ta jest skutkiem zablokowania aktywności kinureninazy. Enzym ten wobec fosfopirydoksalu jako koenzymu katalizuje przemianę kinureniny do kwasu antranilowego i 3-hydroksykinureniny do kwasu 3-hydroksyantranilowego. Ten ostatni przekształca się do kwasu nikotynowego, zablokowanie tej drogi powinno zatem prowadzić do niedoboru witaminy B<sub>6</sub>. Chorzy nie wykazują jednak objawów niedoboru a podawanie witaminy B<sub>6</sub> nie zmienia wydalania metabolitów tryptofanu. Obciążenie tryptofanem nie zwiększa wydalania 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) ani nie wywołuje wydalania kwasu antranilowego i 3-hydroksyantranilowego.

Knap (78) opisał zespół podobny do hydroksykinureninurii różniący się jednak od niej tym, że zmiany w moczu ustępowały po podawaniu witaminy B<sub>6</sub>, mimo iż zachowana była droga syntezy tej witaminy z tryptofanu. Tło tego schorzenia nie jest znane. Rozważa się możliwość bloku w fosforylacji pirydoksalu, defektu (deficytu?) apoenzymu kinureninazy a także upośledzenia aktywności hydroksylazy kinureniny.

### 3. Wrodzona tryptofanuria z karzelkowatością

Schorzenie to obrazem klinicznym przypomina chorobę H ale w moczu obserwuje się zwiększenie wydalania tylko tryptofanu, bez wzrostu wydalania indykanu i z niewielką zwyżką wydalania kwasu indoloctowego przy czym we krwi stężenie tryptofanu także znacznie przekracza wartości normalne (123).

Przyczyną schorzenia jest zapewne blok w przemianie tryptofanu w kinureninę. Wskazują na to wyniki prób obciążeniowych. Po doustnym obciążeniu tryptofanem wzrasta bowiem i długo utrzymuje się na podwyższonym poziomie stężenie tryptofanu we krwi, wzrasta też jego wydalanie w moczu ale wydalanie kinureniny i N-metylowanego amidu kwasu nikotynowego jest obniżone.

Główna droga degradacji tryptofanu biegnie przez szlak kwasu nikotynowego. Pierwszym krokiem na tej drodze jest przejście tryptofanu pod wpływem oksygenazy tryptofanowej w formylokinureninę, która z kolei ulega enzymatycznej hydrolizie do kinureniny i kwasu mrówkowego. Przyczyną wady jest prawdopodobnie obniżenie lub brak aktywności oksygenazy tryptofanowej, co może kierować przemianę na inne szlaki (np. kwasu indoloctowego lub kwasu 5-hydroksyindoloctowego).

Stosując doustne obciążenie tryptofanem stwierdzono u rodziców chorego stan heterozygotyzmu.



#### 4. Zespół niebieskich pieluch

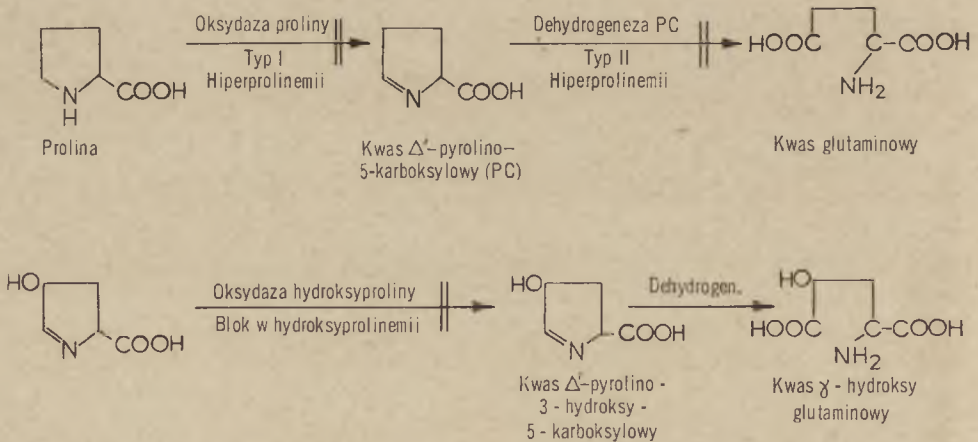
Zespół opisano pod nazwą rodzinnej hiperkalcemii u dzieci z nieprawidłową przemianą tryptofanu (95) a nazwa podana wyżej, pochodzi stąd, że mocz chorych zawierał duże ilości indykanu utleniającego się na powietrzu na niebieskie indygo.

Próby obciążeniowe wskazują na upośledzenie wchłaniania tryptofanu z przewodu pokarmowego. Doustne obciążenie tryptofanem dopiero po 16—24 godzinach wywołuje wzrost wydalania w moczu indykanu i kwasu indolo-3-ocowego bez wzrostu wydalania kwasu kinureninowego i pochodnych antranilowych. W stolcu nie stwierdza się tryptofanu. Po dożylnym obciążeniu tryptofanem występuje prawidłowy wzrost wydalania kwasu kinureninowego i antranilowego w moczu. Brak dowodowych badań biochemicznych tej wady.

### VIII. Wady przemiany iminokwasów

#### 1. Hiperprolinemia

Schorzenie to dające klinicznie obraz wrodzonego przewlekłego, odmiedniczkowego zapalenia nerek, względnie nerczycy wrodzonej cha-



**Schemat 11.** Bloki metaboliczne w przemianie proliny i hydroksyproliny

rakteryzuje się podwyższonym stężeniem proliny we krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz zwiększonym wydalaniem w moczu: proliny, peptydów zawierających prolinę, hydroksyprolinę i glicynę (112, 114).

W przemianie proliny (schemat 11) stwierdzono dotąd dwa bloki: jeden na poziomie oksydazy proliny i drugi na poziomie dehydrogenazy kwasu  $\Delta$ -pyrolino-5-karboksyłowego. Hiperprolinemia z niedoboru oksydazy proliny przebiega z dziedziczną chorobą nerek, podczas gdy hiperprolinemia z niedoboru aktywności dehydrogenazy kwasu  $\Delta$ -pyrolino-5-karboksyłowego nie wykazuje cech choroby nerkowej (37). W tej ostatniej stężenie proliny we krwi wraca do normy pod wpływem diety ubogoprolinowej (38).

## 2. Prolinuria

Chorobę tę wykryto u niemowląt w ramach badań screeningowych dzieci upośledzonych (122).

Cechuje ją stałe wydalanie znacznych ilości proliny i glicyny w moczu przy prawidłowym lub subnormalnym stężeniu tych aminokwasów we krwi i prawidłowym stężeniu innych aminokwasów. *Klirens* proliny i glicyny jest u tych chorych zwiększony. Przyczyną prolinurii jest wrodzone upośledzenie zwrotnego wchłaniania kanalikowego w nerkach proliny i glicyny. Świadczą o tym jednoznacznie próby obciążeniowe. Obciążenia doustne prolina i glicyna zwiększały u chorych wydalanie tych aminokwasów w moczu bez zmiany ich stężenia w krwi, a dożylne obciążenia wywoływały hiperprolinurię i hiperglicynurię.

Joseph i wsp. (74) opisali tzw. hiperprolinurię rodzinną polegającą na rozkojarzeniu wspólnoty wchłaniania zwrotnego proliny i glicyny. W schorzeniu tym upośledzenie dotyczyło tylko proliny.

## 3. Hydroksyprolinemia

Hydroksyprolina występuje w ustroju prawie wyłącznie w kolagenie stanowiąc 14% jego masy. Opisano dotąd tylko jeden przypadek hydroksyprolinemia (39, 40). Poziom hydroksyproliny w krwi nie zależał od zawartości tego aminokwasu w białkach diety. W moczu stężenie hydroksyproliny było znacznie wyższe niż normalnie i również nie zależało od zawartości aminokwasu w diecie.

Na podstawie dowodów pośrednich przypuszcza się, że przyczyną jest brak lub niedobór aktywności enzymu katalizującego przemianę hydroksyproliny do kwasu  $\Delta^1$ -pyrolino-3-hydroksy-5-karboksyłowego. Hydroksyprolina miałaby pochodzić z rozpadu kolagenu, aczkolwiek klinicznie nie stwierdza się u chorego zmian w ścięgnach.

Doustne obciążenie hydroksyprolina powoduje wzrost stężenia tego aminokwasu w krwi, a tylko nieznacznie rośnie wówczas stężenie kwasu  $\Delta^1$ -pyrolino-3-hydroksy-5-karboksyłowego.



## IX. Wady przemiany lizyny

### 1. Hiperlizynemia

U chorych z tą wadą stwierdzono (133) w moczu 10-krotnie zwiększone wydalanie lizyny oraz wzmożone wydalanie ornityny, niekiedy argininy, cystyny i kwasu  $\gamma$ -aminoizomasłowego. W krwi jest stale bardzo wysokie stężenie lizyny oraz podwyższone stężenie kwasu  $\alpha$ -aminoadypinowego i etanoloaminy a w płynie mózgowo-rdzeniowym tylko zwiększone stężenie lizyny.

Poglądy na patogenезę hiperlizynemii są rozbieżne. Wood y i wsp. uważają, że przyczyną jest częściowy blok włączania lizyny do białek (57, 133, 134, 135), podczas gdy Ghadimi i wsp. sądzą, że jest to blok w przemianie lizyny (61).

Po doustnym obciążeniu lizyną wyraźny wzrost stężenia lizyny w krwi utrzymuje się długo, równocześnie też rośnie wydalanie jej w moczu przy czym w moczu są prawidłowe metabolity degradacji lizyny. Obciążenie kwasem pipekolowym, metabolitem lizyny, podwyższa jego stężenie w krwi ale u chorych, w przeciwieństwie do zdrowych, nie pojawia się on w moczu.

### 2. Nietolerancja lizyny z okresowym zatruciem amoniakiem

W opisanym przypadku (22, 23) występowały napady śpiączki z hiperamonemią przy czym stężenie amoniaku we krwi było proporcjonalne do spożycia białka w diecie. Dieta wysokobiałkowa podnosiła też stężenie lizyny i argininy w krwi. W punktatach wątroby pobranych w okresie diety bezbiałkowej aktywność wszystkich enzymów cyklu mocznikowego była prawidłowa, natomiast obniżona była aktywność L-lizyno-NAD-oksydoreduktazy, enzymu zapoczątkowującego przemianę lizyny. Obciążenie lizyną powodowało wzrost stężenia amoniaku, azotu  $\alpha$ -aminowego i lizyny w krwi. Stwierdzano też bardzo wyraźny spadek aktywności arginazy krwinek czerwonych. Wiadomo zaś, że arginaza jest hamowana przez naturalne L-aminokwasy, najsilniej przez L-lizynę i L-ornitynę. Symptomatologię omówionej wady wywołuje więc zahamowanie jednego szlaku metabolicznego przez metabolit nagromadzający się w następstwie bloku enzymatycznego innego szlaku.

## LITERATURA

1. Allan I. D., Cusworth D. C., Dent C. E., Wilson V. K., *Lancet* **1**, 182 (1958).
2. Anderson J. A., Graven H., Ertel R., Fisch R., *J. Pediatrics* **61**, 605 (1962).

3. Anderson A., Fisch R., Miller E., Doeden D., *J. Pediatrics* **68**, 351 (1966).
4. Arakawa T., Chara K., Kudo Z., Tada K., Hayashi T., Mizuno T., Tohoku I., *J. Exp. Med.* **80**, 370 (1963).
5. Armstrong M. D., Robinson K. S., *Arch. Biochem.* **52**, 287 (1954).
6. Armstrong M. D., Show K. N. F., Robinson K. S., *J. Biol. Chem.* **213**, 797 (1955).
7. Asator A. M., Craske T., London D. R., Milne M. D., *Lancet* **1**, 126 (1963).
8. Atkins G. L., Dean B. H., Griffin W. J., Scowen E. F., Watts R. W. E., *Lancet* **2**, 1096 (1963).
9. Auerbach U. M., Di George A. M., Baldrige R. C., Tourtelotte C. D., Brigham M. P., *Clin. Res.* **9**, 334 (1961).
10. Auerbach U. M., Di George A. M., Baldrige R. C., Tourtelotte C. D., Brigham M. P., *J. Pediatrics* **60**, 487 (1962).
11. Baron D. N., Dent C. E., Harris H., Hart E. W., Jepson I. B., *Lancet* **421** (1956).
12. Baumgartner R., Scheidegger S., Stalder G., Hottinger A., *Helvet. Paed. Acta* **23**, 77 (1968).
13. Becher F. F., Green H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**, 694 (1958).
14. Berger R., Broyer M., *La Presse Medicale* **76**, 21 (1968).
15. Bessman S. P., Baldwin R., *Science* **135**, 789 (1962).
16. Brenton D. P., Cusworth D. C., Gaull G. E., *J. Pediatrics* **67**, 58 (1965).
17. Childs B., Nyhan W., *J. Pediatrics* **33**, 403 (1964).
18. Childs B., Nyhan W. L., Borden M., Bard L., Cooke R. E., *J. Pediatrics* **27**, 522 (1961).
19. Cain A. R., Holton I. B., *Arch. Dis. Childs* **43**, 227 (1968).
20. Carson N. A. J., Nail D. W., *Arch. Dis. Child* **37**, 505 (1962).
21. Carthy C. F., Mc., Borland I. L., Jr., Lynch H. J., Jr., Owen E. E., Tyor M. P., *J. Clin. Invest.* **43**, 1518 (1964).
22. Colombo I. P., Richterich R., Spahr A., Donath A., Rossi C., *Lancet* **1**, 1014 (1964).
23. Colombo I. P., Vaselle F., Humbel R., Buergi W., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 138 (1967).
24. Crawhall D. C., *Lancet* **2**, 806 (1959).
25. Crawhall I. C., Mowbray P. N., Scowen E. F., Watts R. W. E., *Lancet* **2**, 810 (1959).
26. Crawhall I. C., Scowen E. F., Watts R. W. E., *Brit. Med. J.* **1**, 588 (1963).
27. Cusworth D., inform. ustna, Halle 1969.
28. Cusworth D. C., Gattereau A., *Lancet* **2**, 916 (1968).
29. Dancis I., Hutzler R., Kokkoness T., *N. Engl. J. Med.* **267**, 84 (1967).
30. Dancis I., Hutzler I., Levitz M., *J. Pediatrics* **32**, 234 (1963).
31. Dean B. M., Griffin W. I., Watts R. W. E., *Lancet* **1**, 406 (1969).
32. Dent C. E., Rose G. A., *Quat. J. Med.* **20**, 205 (1951).
33. Dent C. E., Westall R. G., *Arch. Dis. Child.* **36**, 187 (1961).
34. Du B. N. La, *Am. J. Dis. Child.* **113**, 54 (1967).
35. Du B. N. La, Howell R. R., Jacoby G. A., Seegmuller E. J., Sober E. K., Zannoti V. G., Canby J. P., Ziegler R. K., *J. Pediatrics* **32**, 216 (1963).
36. Du B. N. La, Zannoti V. G., Seegmuller I. E., *J. Biol. Chem.* **230**, 251 (1958).



37. Efron M. L., *New Engl. J. Med.* **272**, 1243 (1965).
38. Efron M. L., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 166 (1967).
39. Efron M. L., Blixby E. M., Palatta L. G., Pryles C. V., *New Engl. J. Med.* **267**, 1193 (1962).
40. Efron M. L., Blixby M., Pryles C. V., *N. Engl. J. Med.* **272**, 1299 (1965).
41. Farriaux I. P., *Actualités Metaboliques en Pediatrie* Ed. Doin, Paris 1967, str. 33.
42. Fetter T. R., *Am. J. Clin. Pathol.* **24**, 1363 (1954).
43. Finkelstein I. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 865 (1965).
44. Finkelstein I. D., Mudd S. R., *Science* **146**, 785 (1964).
45. Fölling A., *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.* **227**, 169 (1934).
46. Fontaine G., *Actualités Metaboliques en Pediatrie*, Ed. Doin 1967.
47. Frederick E. W., Rabkim M. T., Richie R. H., Smith L. H., *New Engl. J. Med.* **269**, 821 (1963).
48. Frimpter G. W., Haymowitz A., Horwith M., *New Engl. J. Med.* **268**, 333 (1963).
49. Garrod M. E., *Repr. Oxf. Mon. Med. Gen.* London 1963.
50. Gaudier B., Francois P., Biserte G., Datrevaux M., Nuyts I. P., Hombart E., *Arch. Franc. Ped.* **25**, 541 (1968).
51. Gentz I., Lindblad B., Lindstadt S., Levy L., Schasteen W., Zetterstrom R., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 31 (1967).
52. Gerritsen T., Kaveggia E., Waisman H. A., *J. Pediatrics* **36** (1965).
53. Gerritsen T., Waisman H. A., *J. Pediatrics* **33**, 413 (1964).
54. Gerritsen T., Waisman H. A., *New Engl. J. Med.* **275**, 56 (1966).
55. Gerritsen T., Waisman H. A., *Am. J. Dis. Child.* **113** (1), 134 (1967).
56. Gjessing L. R., Borud O., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **17**, Suppl. 86 (1965).
57. Ghadimi H., Binnington V. T., Pecora P., *J. Pediatrics* **65**, (1964).
58. Partington M. W., Hunter M., *New Engl. J. Med.* **265**, 221 (1961).
59. Ghadimi H., Partington M. W., *J. Pediatrics* **29**, 714 (1962).
60. Ghadimi H., Partington M. W., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 83 (1967).
61. Ghadimi H., Zischka R., Binnington V. I., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 146 (1967).
62. Halvorsen K., Halvorsen S., *J. Pediatrics* **31**, 29 (1963).
63. Harris H., Penrose L. S., Thomas D. H. N., *Am. Hum. Genet.* **23**, 442 (1959).
64. Hockaday T. D. R., Clayton I. E., Smith L. H., *Arch. Dis. Child.* **40**, 485 (1965).
65. Hockaday T. D. R., Frederick E. W., Clayton J. E., Smith L. H., *J. Lab. Clin. Med.* **65**, 677 (1965).
66. Holt K. S., *Acta Ped.* **52**, 417 (1963).
67. Holton I. B., Lewis F. I. W., Moore G. R., *J. Clin. Pathol.* **17**, 671 (1964).
68. Hoofft C., Timmermans I., Snoeck I., Anterer I., Oyaert W., van den Hende Ch., *Lancet* **2**, 20 (1964).
69. Hope D. B., *Federation Proc.* **18**, 249 (1959).
70. Hsia D. Y., Scully K. J., Rosenberg L. E., *Lancet* **1**, 7598 (1969).
71. Jepson J. B., Smith A. I., Strang L. B., *Lancet* **2**, 1334 (1958).
72. Jervis G. A., *J. Biol. Chem.* **126**, 305 (1938).
73. Jervis G. A., *Clin. Chim. Acta* **5**, 453 (1960).
74. Joseph R., Ribierve H., Job I. C., Givault M., *Arch. Franc. Pediatr.* **15**, 377 (1958).
75. Kamray I., Mazurkiewicz-Szelożyńska K., *Ped. Pol.* **41**, 337 (1966).

76. Kanabus I., Wojnarowski M., Jezierska-Schier, Kanabus P., *Ped. Pol.* **43**, 533 (1968).
77. Kint I., Carton D., *Lancet* **2**, 635 (1968).
78. Knapp A., Zeit. Mensch. Vererb., Konstitutionslehre **36**, 258 (1962) cyt. Price I. M., Brown R. R., Yess N., w *Advan. in Metab. Disorders* **2**, 159 (1963).
79. Komrower G. M., Wilson V. K., *Proc. Royal Soc. Med.* **56**, 996 (1963).
80. Komrower G. M., Wilson V., Clamp I. R., Westall R. G., *Arch. Dis. Child.* **39**, 250 (1964).
81. Knox W. E., Hsia D., *Am. J. Med.* **22**, 687 (1957).
82. Kusick Mc V. A., *Heritable Disorders of Connective Tissue*, Mosby Comp. Saint Douis (1966).
83. Leading Article, *Brit. Med. J.* **3**, 511 (1968).
84. Levin B., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 162 (1967).
85. Levin B., Dobbs R. M., *Proc. R. Soc. Med.* **61**, 773 (1968).
86. Levin B., Mackey H. M. M., Oberholzer V. G., *Arch. Dis. Child.* **36**, 622 (1961).
87. Levin B., Oberholzer V. G., Burgess E. A., Young W. T., *Lancet* **14**, 15 (1966).
88. Levin S. Z., Marpless E., Gordon H. H., *Science* **90**, 620 (1939).
89. Lindblad B., Lindblad B. S., Olin P., Svanberg B., Zetterstrom R., *Acta Paed. Scand.* **57**, 417 (1968).
90. Lindblad B., Lindstrand K., Svanberg B., Zetterstrom R., *Acta Paed. Scand.* **58**, 178 (1969).
91. Linneweh F., *Acta Paed. (Budapest)* **10**, 1 (1969).
92. Łysiak W., *Badanie biochemiczne w zespole ketoaminoacidemii*, Gdańsk 1970, praca doktorska, Akademia Medyczna.
93. Menkes I. H., *Pediatrics* **69**, 413 (1966).
94. Menkes I. H., Hurst P. L., Craig I. M., *Pediatrics* **14**, 462 (1954).
95. Michael A. F., Drummand K. N., Ulstrom R. A., Good R. A., *Am. J. Dis. Child.* **104**, 510 (1962).
96. Milne M. D., Asator A. M., Edwards K. D. G., Lovridge L. N., *Gut.* **2**, 21 (1961).
97. Mudd S. N., Finkelstein I. D., Irreverre P., Laster L., *Science* **143**, 1443 (1964).
98. Murray W. C., Mc Mohyvdin F., Rossiter R. J., Rathbun J. C., Valentine G. H., Koegler S. J., Zarfes D. E., *Lancet* **1**, 138 (1962).
99. Murray W. C., Rathbun I. C., *Pediatrics* **32**, 347 (1963).
100. Norton P. M., Roitman E., Snyderman S., Holt L. E., *Lancet* **1**, 26 (1961).
101. Nyhan W. L., Borden M., Childs B., *Pediatrics* **27**, 539 (1961).
102. Nyhan W. L., Childs B., *J. Clin. Invest.* **43**, 2604 (1964).
103. Nyhan W. I., Chisol M., Edwards R. O., *J. Pediatrics* **62**, 540 (1963).
104. Oberholzer V. G., Levin B., Burgess E. A., Young W. F., *Arch. Dis. Child.* **42**, 492 (1967).
105. Patrick A. D., *Arch. Dis. Child.* **36**, 269 (1961).
106. Perry T. L., Hansen S., Bar H. P., Mc Dougall L., *Science* **152**, 776 (1966).
107. Perry T. L., Hardwick D. F., Dixon G. H., Dolman C. L., Hansen S., *Pediatrics* **36**, 236 (1965).
108. Petrykowski W., *Deutsch. Med. Woch.* **93**, 1877 (1968).
109. Raine D. N., *Clin. Chem.* **14**, 786 (1968).



110. Rosenberg L. E., Downing S., Durant I., *J. Clin. Invest.* **45**, 365 (1966).
111. Russel A., Levin B., Oberholzer V. G., Sinclair L., *Lancet* 699 (1962).
112. Schafer I. A., Scriver C. R., Efron M. L., *New Engl. J. Med.* **267** 51 (1962).
113. Scriver C. R., *New Engl. J. Med.* **275**, 530 (1965).
114. Scriver C., Schafer I. A., Efron M. E., *Nature* **192**, 672 (1961).
115. Serrano A. P., *Rev. Clin. Esp.* **97**, 176 (1965).
116. Smith A. J., Strang L. B., *Arch. Dis. Childhood* **33**, 109 (1958).
117. Smith D. H., Kolb F. O., Happer H. A., *J. Urol.* **81**, 61 (1959).
118. Snyder S. M., Myron P., Ktes M. W., Berlow S., *J. Clin. Endocr. Metabol.* **23**, 595 (1963).
119. Snyderman S. E., Norton P. M., Roitman E., Holt E. L., *Pediatrics* **34**, 454 (1964).
120. Stokke O., Eldjarn L., Norum K. R., Steen-Johnsen I., Halvorsen S., *Scand. J. Clin. Labor. Invest.* **20**, 313 (1967).
- 120a. Tada K., Besman S. P., *Ped. Japan.* **3**, 41 (1960).
121. Tada K., Ho H., Wada T., Arakawa T., *Tohoku J. Exptl. Med.* **80**, 118 (1963).
122. Tada K., Morikawa T., Ando T., Yoshida T., Minagawa A., *Tohoku J. Exptl. Med.* **87**, 133 (1965).
123. Tada K., Wada Y., Arakawa T., *Am. J. Dis. Child.* **113**, 64 (1967).
124. Tallan H. H., Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **230**, 707 (1958).
125. Tanaka K., Budd M. A., Efron M. L., Isselbacher K. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 236 (1966).
126. Tanaka K., Budd H. A., Holmes L. B., Isselbacher K. J., *Federation Proc.* **25**, 710 (1966).
127. Tanaka K., Isselbacher K. J., *J. Biol. Chem.* **242** (12), 2966 (1967).
128. Taniguchi K., Kappe T., Armstrong M. D., *J. Biol. Chem.* **239**, 3389 (1964).
129. Uhlendorf B. W., Mudd S. W., *Science* **1960**, 1007 (1968).
130. Wada Y., Tada K., Minagawa A., Yoshida T., Morikawa T., Okamura T., *Tohoku J. Exptl. Med.* **71**, 46 (1963).
131. Werder E. M., Curtius H. Ch., Tancredi F., Anders P. W., Prader A., *Helvet. Paed. Acta* **21**, 1 (1966).
132. Westall R. G., *Biochem. J.* **77**, 135 (1960).
133. Woody N. C., *Am. J. Dis. Child.* **108**, 543 (1964).
134. Woody N. C., Harris I. A., *Pediatrics* **66**, 1042 (1965).
135. Woody N. C., Hutzler I., Dancis J., *Am. J. Dis. Child.* **112**, 377 (1966).
136. Woody N. C., Ong E. B., Pupens M. B., *Pediatrics* **40**, 986 (1967).
137. Woody N. C., Snyder C. H., Harris I. A., *Am. J. Dis. Child.* **110**, 606 (1965).
138. Vries S., de Kochwa S., Lazebnik I., Frank M., Djaldelti M., *Am. J. Med.* **23**, 408 (1957).
139. Zannoni V. G., Seegmuller I. E., La Du B. N., *Nature* **193**, 952 (1962).

## Aktualne poglądy na polimorfizm białek i enzymów krwi u trzody chlewnej

### Present Views on the Polimorphism of Proteins and Enzymes in Pig Blood

Present views are summarized on the polymorphism of proteins and enzymes in blood serum and in erythrocytes of swine.

Niniejszy artykuł jest próbą zebrania i podsumowania poglądów na temat polimorfizmu białek i enzymów u trzody chlewnej, opublikowanych w okresie ostatniego dziesięciolecia w czasopismach zagranicznych.

Szybki rozwój tej dziedziny wiedzy utrudnia bieżącą ocenę stanu badań, gdyż ich wyniki są stale wdrażane do hodowli, a uzyskane sprawdzenia oddziałują zwrotnie na tok dociekań teoretycznych. Z tego względu artykuł ten, jak wiele mu podobnych, może zawierać niepełne dane o aktualnych wynikach badań w tym zakresie. Artykuł obejmuje, poza pewnymi pojęciami ogólnymi, omówienie zagadnień polimorfizmu w odniesieniu do następujących białek i enzymów krwi u trzody chlewnej:

- 1) białek surowicy krwi:  $S\alpha_2$ -globulin, transferyn, postalbumin, albumin, prealbumin, hemopeksyn;
- 2) enzymów erytrocytów krwi: fosfoheksizoizomerazy, anhidrazy węglanowej, dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu;
- 3) enzymów surowicy krwi: ceruloplazminy, amylazy, esterazy, fosfatazy alkalicznej.

Pod pojęciem polimorfizmu (heteromorfizmu) rozumiemy wielopostaciowość uwarunkowaną genetycznie, skutek występowania np. serii alleli wielokrotnych, dających efekt nieciągłej zmienności w stosunku do kontrolowanej przez nie cechy. Od pojęcia polimorfizmu należy odróżniać pojęcie polifenizmu tj. wielopostaciowości fenotypowej uwarunkowanej niegenetycznie, a powstającej pod wpływem zmian warunków środowiskowych.

Polimorfizm u zwierząt można wykazać za pomocą różnorodnych metod badania fenotypu takich jak: fizjologiczne, morfologiczne, enzymatyczne, elektroforetyczne, immunologiczne, immuno elektroforetyczne. Najbardziej rozpowszechnioną jest elektroforeza, w szczególności zaś przyczynia się do ich szybkiego rozwoju elektroforeza przeprowadzana na żelu skrobiowym. Żel skrobiowy jest znacznie lepszym podłożem dla rozdziału

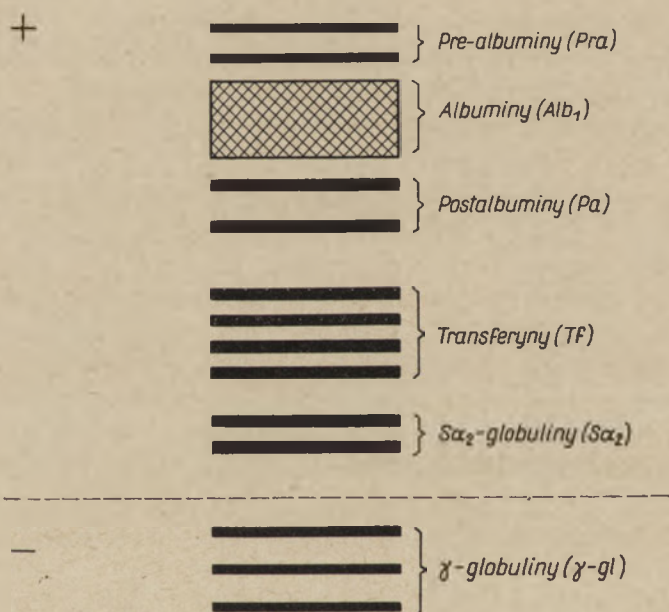
\* Lek. wet., Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec



białek niż bibuła, gdyż pozwala na jakościowy rozdział nie tylko podstawowych frakcji surowicy (albuminy,  $\beta$ -globuliny,  $\gamma$ -globuliny), ale także na wykrywanie podfrakcji poszczególnych białek (np. typy transferyn w obrębie frakcji  $\beta$ -globulin). Jest to tym bardziej ważne, że podfrakcje te okazały się uwarunkowane genetycznie, o czym będzie mowa przy omawianiu poszczególnych białek i enzymów. Wszystkie omawiane w niniejszym artykule badania wykonywane były właśnie na żelu skrobiowym.

Powiązanie polimorfizmu białek lub enzymów z grupami krwi u zwierząt daje niemal 100% pewność pochodzenia danego osobnika, np. powiązanie grup krwi z polimorfizmem amylazy u trzody chlewnej daje 98% wykluczeń (16). Poza tym polimorfizm u trzody chlewnej jest bardzo wysoki i w związku z tym może dać wiele cennych odpowiedzi na zagadnienia dotychczas niewyjaśnione.

Wykrywanie coraz to nowych grup białek i enzymów o uwarunkowaniu genetycznym oraz poszerzanie wiadomości o znanych już białkach i enzymach stwarza dalsze możliwości różnicowania poszczególnych osobników oraz populacji zwierząt z punktu widzenia genetycznego.



Rys. 1. Schematyczny obraz polimorfizmu białek w elektroforezie na żelu skrobiowym

Obecnie bardzo duże zainteresowanie budzą wyniki badań, w części już sprawdzone w praktyce, dotyczące powiązań między polimorfizmem genetycznym, a produktywnością oraz zdrowotnością zwierząt. Daje to podstawy do stosowania nowych kryteriów w selekcji zwierząt hodowlanych. Możliwości takie istnieją dzięki temu, że określony typ białek lub

enzymów polimorfizmu genetycznego połączony jest ze zmianami ilościowymi i jakościowymi przemiany materii u poszczególnych zwierząt tego samego gatunku. Zmiany, o których mowa, są klinicznie nieuchwytnie.

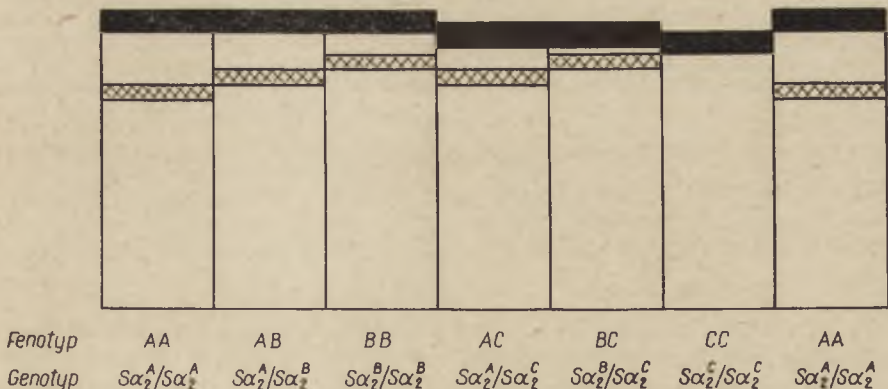
Ogólne rozmieszczenie białek po elektroforetycznym ich rozdziale w żelu skrobiowym w środowisku obojętnym wg S c o p e s' a (60) przedstawia rysunek 1.

Wszystkie przedstawione na rysunku 1 białka, poza  $\gamma$ -globulinami, wędrują w polu elektrycznym do anody. Najwolniejszą grupą białek, która znajduje się zaraz za linią startu, są  $S\alpha_2$ -globuliny, najszybszą natomiast grupę stanowią prealbuminy. Pozostałe białka oraz enzymy znajdują się w przedziale między  $S\alpha_2$ -globulinami a prealbuminami. Białka z grupy  $\gamma$ -globulin wędrują w polu elektrycznym do katody, a więc w kierunku przeciwnym niż wszystkie inne uprzednio wymienione białka.

### I. $S\alpha_2$ -globuliny

$S\alpha_2$ -globulina ( $\alpha_2$ -makroglobulina) jest białkiem — jak to już nadmieniono — znajdującym się po rozdziale elektroforetycznym w żelu skrobiowym zaraz za linią startu. Nazwę tej frakcji nadał S m i t h i e s w 1959 roku (62). Rola fizjologiczna tego białka w organizmie nie jest dotychczas w pełni poznana. Na polimorfizm  $S\alpha_2$ -globuliny zwrócili uwagę po raz pierwszy S c h r o f f e l i H o j n y w 1962 r. (58). Szczegółowe badania wykazały później (57), że białko to występuje w sześciu fenotypach AA, AB, BB, AC, BC, CC, które są pod kontrolą trzech alleli: allelu  $S\alpha_2^A$ ,  $S\alpha_2^B$ ,  $S\alpha_2^C$ . W związku z tym osobniki o fenotypie AA mają genotyp  $S\alpha_2^A/S\alpha_2^A$ , BB —  $S\alpha_2^B/S\alpha_2^B$ , AB —  $S\alpha_2^A/S\alpha_2^B$ , AC —  $S\alpha_2^A/S\alpha_2^C$ , BC —  $S\alpha_2^B/S\alpha_2^C$ , CC —  $S\alpha_2^C/S\alpha_2^C$  (rysunek 2).

U osobników o fenotypach AA, AB, BB  $S\alpha_2$ -globuliny — po rozdziale



Rys. 2.  $S\alpha_2$ -globuliny



elektroforetycznym surowicy na żelu — składają się z dwóch prążków: silnego, wędrującego szybciej i słabego — wolniejszego. Fenotypy te rozróżnia się na podstawie różnej ruchliwości prążka słabszego, który ma najmniejszą ruchliwość w fenotypie AA, a największą w fenotypie BB. Prążek silny u tych fenotypów ma taką samą ruchliwość.

U osobników o fenotypach AC i BC  $S\alpha_2$ -globuliny występują również w postaci dwóch prążków, silnego — wędrującego szybciej i słabego — wolniejszego. Prążki silne w fenotypach AC i BC mają taką samą ruchliwość, z tym tylko, że są one wolniejsze od prążków silnych w fenotypach AA, AB i BB. Prążek słaby w fenotypie AC ma natomiast ruchliwość prążka słabego z fenotypu AB, a w fenotypie BC — ruchliwość taką jak w fenotypie BB. Osobniki, u których  $S\alpha_2$ -globuliny występują w postaci jednego silnego prążka o ruchliwości mniejszej niż prążki silne w fenotypach AC i BC — mają fenotyp CC.

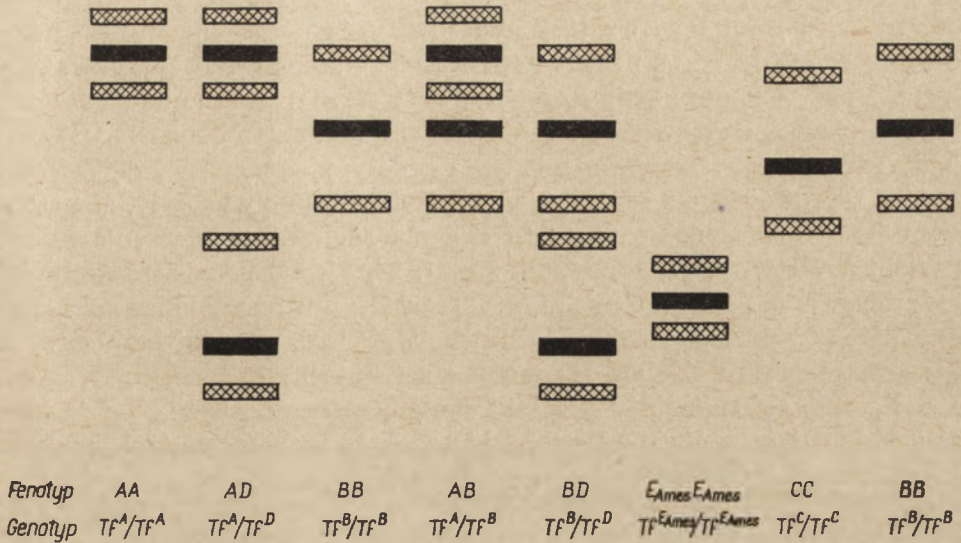
Schroffel (57) po przebadaniu 278 sztuk świń stwierdził u 81 osobników fenotypu AA (29%), u 82 — fenotyp AB (30%), u 48 — fenotyp AC (17,2%), u 27 — fenotyp BB (9,5%), u 34 — fenotyp BC (12,2%) i u 6 — fenotyp CC (2,1%). U osobników dorosłych, jak również i u prosiąt młodych, występują takie same fenotypy z tą tylko różnicą, że u osobników dorosłych poszczególne fenotypy mają szybszą ruchliwość niż u prosiąt.

## II. Transferyny

Transferyna (siderofilina) jest białkiem należącym do  $\beta_1$ -globulin o ruchliwości elektroforetycznej szybszej niż omawiana poprzednio grupa białek (rysunek 1). Są to białka o ciężarze cząsteczkowym 73 000 — 76 000. Cząsteczka tego białka (apotransferyna) ma dwa miejsca do wiązania żelaza. Każde z tych miejsc może przyłączyć jeden atom  $Fe^{+3}$ . Cząsteczka transferyny może także przyłączyć jony:  $Cu^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ , ale trwałość tych kompleksów jest niewielka. Polimorfizm transferyn przedstawia w ogólnym przekroju rysunek 3.

Po raz pierwszy na polimorfizm transferyn u trzody chlewnej zwrócili uwagę Ashton i Kristjansson w 1960 roku (9, 38, 39). Stwierdzili oni występowanie u trzody chlewnej trzech rodzajów fenotypów: AA, AB, BB, oraz udowodnili, po przebadaniu rodzin, że fenotypy te są determinowane przez zdwa kodominujące allele — allel  $Tf^A$  i allel  $Tf^B$ . Osobniki, u których po rozdiale elektroforetycznym surowicy, transferyny występują na żelu skrobiowym w postaci trzech prążków, silnego środkowego i dwóch słabych po obydwu stronach, są homozygotami pod względem tej cechy o fenotypie AA, o genotypie  $Tf^A/Tf^A$ . Osobniki, u których transferyny występują również w postaci trzech prążków, środkowego — silnego i dwóch słabych, ale o ruchliwości elektroforetycznej

mniejszej niż w fenotypie AA, są homozygotami o fenotypie BB, o genotypie  $Tf^B/Tf^B$ . Natomiast osobniki, u których transferyny występują w postaci pięciu prążków, dwóch silnych i trzech słabych o ruchliwości transferyn fenotypu AA i BB, są heterozygotami pod względem tej cechy o fenotypie AB i genotypie  $Tf^A/Tf^B$ .



Rys. 3. Transferyny

W roku 1962 King (36) stwierdził występowanie nowego typu transferyny, składającej się z trzech prążków o ruchliwości elektroforetycznej nieco mniejszej niż ruchliwość transferyny homozygot BB. Nazwał ją transferyną C i udowodnił na rodzinach świń rasy landrace, że typ ten jest determinowany przez allel  $Tf^C$ . W przeprowadzonych dotąd badaniach na całym świecie, częstotliwość typu transferyny C jest bardzo niska (1, 61, 65) a u większości ras nie występuje ona zupełnie. Transferyna ta, w postaci homozygoty CC, została ujawniona w roku 1966 przez Schroffela (59) u kilku świń rasy chińskiej. W Polsce allel  $Tf^C$  został stwierdzony jedynie u świń rasy złotnickiej pstrej (49, 50). Na 269 przebadanych osobników rasy złotnickiej pstrej tylko jeden osobnik był homozygotą CC, co stanowi 0,37%, jeden heterozygotą AC (0,37%) oraz 8 osobników heterozygotą BC (2,97%). Według Madeyskiej (49) tę bardzo małą częstotliwość allelu  $Tf^C$  u świń, tłumaczy Imlach sprzężeniem allelu  $Tf^C$  z genem semiletalnym, natomiast Dinklage — wyjaśnia to zjawisko wyeliminowaniem allelu  $Tf^C$  z powodu prowadzonej stale selekcji.

W 1963 roku Kristjansson stwierdził występowanie u świń nowego allelu, a mianowicie allelu  $Tf^D$ , którego fenotyp przejawia się



występowaniem trzech prążków: silnego prążka — środkowego i dwóch słabszych po obu jego stronach o ruchliwości elektroforetycznej najwolniejszej ze wszystkich typów transferyn.

Schroffel w 1966 roku (59) stwierdził istnienie wszystkich typów transferyn na rasach trzody chlewnej występujących w Czechosłowacji i jednocześnie podał, że transferyna D występuje w postaci heterozygot AD lub BD.

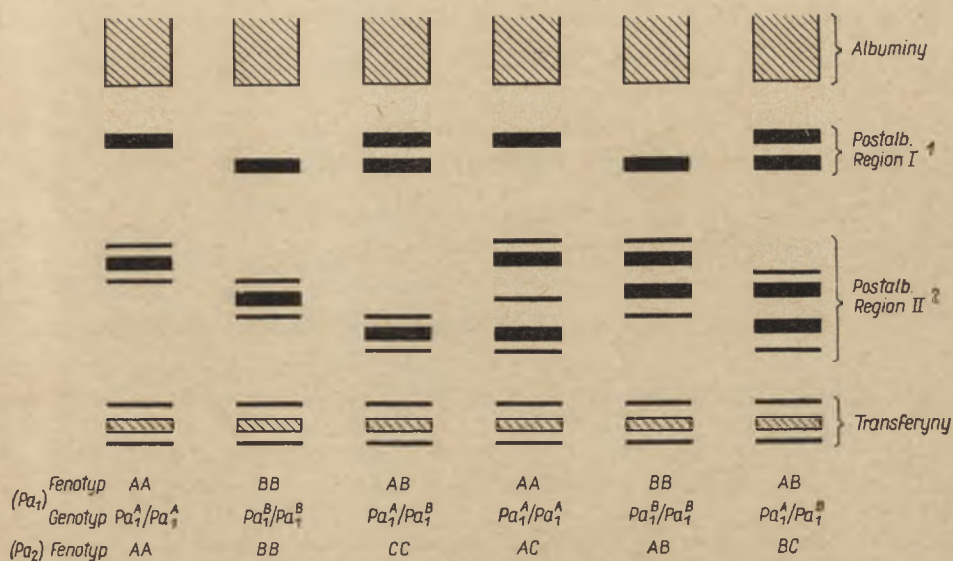
W 1968 roku Baker (10) stwierdził u świń rasy hampshire nowy typ transferyny, którą nazwał  $TfE_{Ames}$ . Jest ona kontrolowana przez allel  $Tf^E_{Ames}$ , którego powstanie Baker tłumaczy spontaniczną mutacją w oparciu o zjawisko pojawienia się tego allelu tylko u potomstwa, podczas gdy u rodziców występowały jedynie genotypy  $Tf^A/Tf^B$ ,  $Tf^A/Tf^B$ . Badania przeprowadzone z radioaktywnym izotopem  $^{59}Fe$  wykazały, że prążek ten jest transferyną, gdyż tylko ona ma zdolność przyłączania żelaza. Wielu autorów (9, 11, 12, 14, 19, 20, 21, 24, 51, 65) podaje częstotliwość występowania poszczególnych typów transferyn u trzody chlewnej u różnych ras świń na różnych terenach. W Polsce częstotliwość różnych typów transferyn zbadała Małowska (49, 50).

Na podkreślenie zasługuje fakt opisany przez Hristica i in. (31) i potwierdzony przez Hesselholta (26), że u świń duńskich landrace występuje tylko typ transferyny B determinowany przez allel  $Tf^B$ . Zjawisko to można tłumaczyć tym, że allel  $Tf^B$  jest najbardziej korzystnym genem w tej rasie i że inne zostały wyeliminowane na skutek prowadzonej selekcji (15). Obecnie wielu autorów (29, 35, 37, 42) znajduje powiązania między typami transferyn a produktywnością u różnych ras. Jest to nowym doniosłym zagadnieniem w selekcji.

### III. Postalbuminy

Postalbuminy są białkami wędrującymi w polu elektroforetycznym w żelu skrobiowym między transferynami a albuminami (rysunek 4). Jest to grupa białek o nieznanym dotychczas właściwościach fizjologicznych w organizmie. Na polimorfizm postalbumin u trzody chlewnej po raz pierwszy zwrócili uwagę Schroffel w 1965 roku (56), następnie Buschmann i Schmid w 1968 roku (13) oraz Hesselholt w 1969 roku (26). Jednakże autorzy ci nie stwierdzili w swoich badaniach genetycznej kontroli postalbumin. Dowodów tych dostarczyły dopiero prace Kubka (45, 46, 48). W pracach swych wykazał on istnienie polimorfizmu postalbumin oraz udowodnił na rodzinach świń istnienie genetycznego uwarunkowania, ale tylko w stosunku do dwóch frakcji wędrujących najszybciej z całej grupy. W związku z tym Kubek podzielił postalbuminy na dwa regiony, co przedstawia rysunek 4.

Region I — uwarunkowany genetycznie — znajdujący się bezpośrednio przed albuminami zawiera dwie frakcje o różnej szybkości elektroforetycznej. Frakcja szybsza, znajdująca się bliżej albumin, oznaczona jest jako frakcja A i składa się z jednego prążka. Następna frakcja, nieco wolniejsza od frakcji A i oznaczona jako frakcja B, również składa się z jednego prążka. Osobniki, mające tylko frakcję A są homozygotami pod względem tej cechy o fenotypie AA. Osobniki, które mają tylko



Rys. 4. Postalbuminy

frakcję B są również homozygotami pod względem tej cechy o fenotypie BB. Natomiast osobniki posiadające obydwie frakcje są heterozygotami o fenotypie AB. Po przebadaniu rodzin K u b e k ustalił, że fenotypy powyżej podane determinowane są przez dwa allele: allel Pa<sub>1</sub><sup>A</sup> i allel Pa<sub>1</sub><sup>B</sup>. Frakcja A jest kontrolowana przez allel Pa<sub>1</sub><sup>A</sup>, a frakcja B przez allel Pa<sub>1</sub><sup>B</sup>. W związku z tym osobniki o fenotypie AA mają genotyp Pa<sub>1</sub><sup>A</sup>/Pa<sub>1</sub><sup>A</sup>, BB — Pa<sub>1</sub><sup>B</sup>/Pa<sub>1</sub><sup>B</sup>, AB — Pa<sub>1</sub><sup>A</sup>/Pa<sub>1</sub><sup>B</sup>. Ponadto K u b e k stwierdził u 61 osobników przebadanych 18 sztuk — z fenotypem AA (29,6%), 12 — z fenotypem BB (19,6%) i 31 — z fenotypem AB (50,8%). Płeć ani wiek nie wpływa na różnice elektroforetyczne. Podobny polimorfizm postalbumin stwierdzono w płynie pęcherzykowym jajników.

Jeśli chodzi o region II postalbumin, znajdujący się bliżej transferyn, to poglądy zarówno w odniesieniu do poszczególnych frakcji, jak i w odniesieniu do genetycznego ich uwarunkowania są jeszcze bardziej rozbieżne. K u b e k (45, 48) przytacza za K r i s t j a n s s o n e m (41) polimorfizm postalbumin regionu II, w którym wyróżnia trzy typy: A, B i C (rysunek 4).

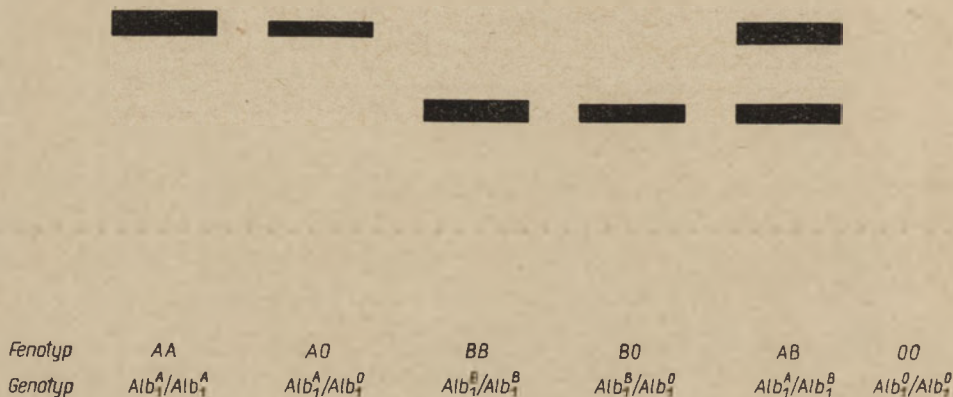


#### IV. Albuminy

Albumina jest głównym białkiem surowicy krwi. Jej rola biologiczna polega przede wszystkim na utrzymywaniu stałego ciśnienia onkotycznego w organizmie. Jedynym miejscem syntezy albuminy osocza jest wątroba.

Na polimorfizm albumin u trzody chlewnej zwrócił uwagę w 1966 r. Kristjansson (43). Opisał on występowanie trzech typów albumin: A, B i C. Typy te powstają dzięki trzem allelom:  $Alb_1^A$ ,  $Alb_1^B$ ,  $Alb_1^0$  których istnienie zostało udowodnione na rodzinach ras landrace oraz yorkshire.

Albumina A, która może występować w dwóch fenotypach AA i AO jest kontrolowana przez allel  $Alb_1^A$  (rysunek 5).



Rys. 5. Albuminy

Osobniki, u których albuminy występują w postaci jednego silnego prążka o ruchliwości najszybszej ze wszystkich typów albumin, są homozygotami o fenotypie AA i genotypie  $Alb_1^A/Alb_1^A$ . Te osobniki zaś, u których występuje silny prążek o takiej samej ruchliwości, ale u których albumin jest ilościowo o połowę mniej, są heterozygotami o fenotypie AO, a o genotypie  $Alb_1^A/Alb_1^0$ . Osobniki, u których albuminy występują w postaci jednego silnego prążka o ruchliwości elektroforetycznej mniejszej niż u osobników o fenotypie AA lub AO są — w przypadku, gdy substancji jest ilościowo około dwa razy więcej — homozygotami o fenotypie BB, a gdy jest jej dwukrotnie mniej — heterozygotami o fenotypie BO. W pierwszym przypadku osobniki mają genotyp  $Alb_1^B/Alb_1^B$  w drugim zaś —  $Alb_1^0/Alb_1^B$ . Osobniki, u których występują dwa prążki silne o ruchliwości równej ruchliwości albumin A i B w ilości takiej jak w fenotypach AO i BO, są heterozygotami o fenotypie AB. Osobniki te mają fenotyp  $Alb_1^A/Alb_1^B$ .

Osobniki, u których nie stwierdza się po rozdiale elektroforetycznym w warunkach takich jak poprzednio żadnych prążków, Kristjansson (43) oznaczył jako homozygoty o fenotypie OO, posiadające genotyp  $Alb_1^O/Alb_1^O$ . Fenotyp OO był stwierdzony u świń rasy landrace. W pracy tej Kristjansson (43) rozpatruje rozmieszczenie poszczególnych alleli u rodziców i ich potomstwa, nie zajmuje się jednak częstotliwością poszczególnych alleli w populacjach.

### V. Prealbuminy

W 1963 roku Kristjansson stwierdził polimorfizm prealbumin u trzody chlewnej (41). Prealbuminy są białkami, które w żelu skrobiowym wędrują szybciej od albumin (rysunek 1). Składają się one z dwóch typów. Osobniki mające prążek szybszy, są pod względem tej cechy homozygotą o fenotypie AA. Genotyp ich jest  $Pra^A/Pra^A$ . Osobniki, o prążku wolniejszym niż to ma miejsce u osobników o fenotypie AA, są homozygotą o fenotypie BB, a o genotypie  $Pra^B/Pra^B$ . Osobniki, u których występują obydwa prążki o ruchliwości prealbumin A i B, są heterozygotą o fenotypie AB i o genotypie  $Pra^A/Pra^B$ . Po przebadaniu 358 sztuk świń Kristjansson stwierdził w swej pracy u 96 osobników fenotyp AA (26,8%), u 202 — fenotyp AB (56,5%) i u 60 — fenotyp BB (16,7%). Badania te zostały potwierdzone przez Schroffela (56), który również stwierdził występowanie u świń dwóch prealbumin A i B, kontrolowanych przez dwa allele  $Pra^A$  i  $Pra^B$ .

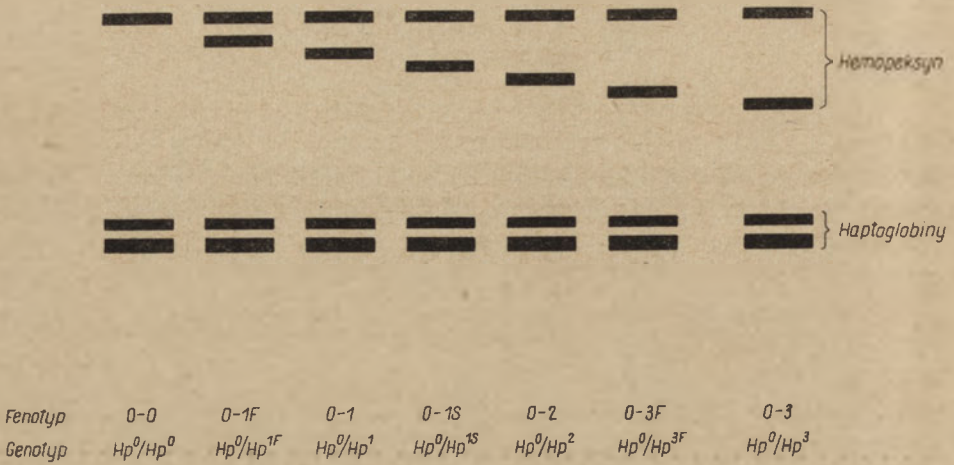
### VI. Hemopeksyna

Przez wiele lat hemopeksyna była uważana za haptoglobinę i rozpatrywana łącznie z nią jako jedna grupa białek. Dopiero badania *in vitro* wykazały, że hemoglobina dodawana do surowicy w nadmiarze ujawnia się w rozkładzie elektroforetycznym surowicy nie tylko w strefie  $\alpha$  jako kompleks z haptoglobiną, ale również w strefie  $\beta_1$ -globulin (w strefie transferyn — rysunek 1). Dalsze badania wykazały odrębność dwóch białek: białka haptoglobiny — wiążącego całą hemoglobinę oraz białka zwanego hemopeksyną, wiążącego z hemoglobiny tylko hem. Hemopeksyna jest  $\beta$ -glikoproteidem surowicy krwi, która ma zdolność wiązania hemu. Białko to w literaturze występuje również pod nazwami: *hemoglobin — binding  $\beta$ -globulin*, *heme-binding  $\beta$ -globulin*, *seromucoid* —  $\beta_{1A}$ -*seromucoid* —  $\beta_{1B}$ ,  $\beta_{1B}$ -*globulin*, *cytochromofilin*,  $\beta_1$ -*haptoglobin* ( $\beta_{1H}$ ). Hemopeksyna ma ciężar cząsteczkowy około 70 000. Wytwarzana jest przez wątrobę. Zasadniczą jej funkcją w organizmie jest wiązanie i usuwanie z krążenia wolnego hemu. Poziom hemopeksyn jest odwrotnie



proporcjonalny do zawartości hemu w surowicy. Ilościowe oznaczenie hemopeksyny jest bardzo trudne, w odróżnieniu od haptoglobiny (64).

Po raz pierwszy polimorfizm tych frakcji białek opisali u trzody chlewnej Blumberg i Kristjansson w 1960 roku (11, 40), później frakcje te opisywane były także przez innych autorów (23, 59). Aktualny pogląd na polimorfizm hemopeksyny przedstawia rysunek 6.



Rys. 6. Haptoglobiny i hemopeksyny

U trzody chlewnej występują następujące typy hemopeksyny: O, 1F, 1S, 2, 3F, 3, które kontrolowane są przez allele:  $Hp^0$ ,  $Hp^{1F}$ ,  $Hp^1$ ,  $Hp^{1S}$ ,  $Hp^2$ ,  $Hp^{3F}$ ,  $Hp^3$ . Najszybszym typem hemopeksyny jest typ O, który składa się podobnie jak wszystkie pozostałe z jednego prążka. Typem zaś o najmniejszej ruchliwości jest typ 3. Pozostałe typy mają ruchliwość pośrednią między typem O i 3. Polimorfizm hemopeksyny u trzody chlewnej jest bardzo duży. Stwarza to szerokie możliwości wykorzystania tych badań w praktyce hodowlanej.

Wielu autorów (2, 4, 28, 33), stara się znaleźć powiązanie między grupami krwi i hemopeksyną. Zależność tę udało się stwierdzić Im la h o w i w 1965 r. (33) oraz H e s s e l h o l t o w i (28). Wyżej wymienieni znaleźli mianowicie związki między grupą Ka i  $Hp^3$ , Kb i  $Hp^0$  oraz Kb i Hpl.

## VII. Fosfoheksoizomeraza

Fosfosheksoizomeraza (ketolo-izomeraza D-glukozy-6-fosforanu, E.C 5.3.1.9.) zwana jest także w literaturze izomerazą glukozofosforanową. Jest to enzym, który katalizuje odwracalną przemianę glukozo-6-fosfo-

ranu na fruktozo-6-fosforan. Jest on również enzymem szeroko rozpowszechnionym we wszystkich tkankach i jednym z najbardziej aktywnych enzymów ustroju. Po raz pierwszy polimorfizm fosfoheksoizomerazy w hemolizacie erytrocytów u trzody chlewnej opisała *Saison* w 1968 roku (53). Obserwowała ona trzy różne fenotypy, ale nie przedstawiła genetycznej ich kontroli. W 1971 r. *Kubek* i *Dinklage* (479) oraz *Saison* i wsp. (55) potwierdzili występowanie tych trzech fenotypów oraz podali, że są one determinowane przez dwa allele: allel  $\text{PHI}^A$  i allel  $\text{PHI}^B$ .

Osobniki, u których fosfoheksoizomeraza występuje w postaci trzech prążków: środkowego — silnego i dwóch słabych po obydwu stronach, są homozygotą o fenotypie AA. Osobniki, u których enzym ten występuje również w postaci trzech prążków, środkowego silnego i dwóch słabych po obydwu stronach, ale o ruchliwości wolniejszej niż w fenotypie poprzednim, są homozygotami o fenotypie BB. Natomiast osobniki, u których występują obydwie typy, to jest A i B o widocznych na żelu pięciu prążkach są heterozygotami o fenotypie AB. Częstotliwość występowania poszczególnych genów A i B *Kubek* i *Dinklage* (47) badali na świniach rasy niemieckiej i stwierdzili u niemieckiej landrace gen A o częstotliwości 0,485, a B — 0,515. U rasy miniaturowej gottyńskiej gen A miał częstotliwość 0,660, a gen B — 0,340. Ostatnio *Andresen* (6, 7) sugeruje powiązanie pomiędzy tym enzymem a antygenem krwinkowym H i drugim enzymem dehydrogenazą glukozo-6-fosforanu.

### VIII. Anhydraza węglanowa

Anhydraza węglanowa erytrocytów (hydro-liaza węglanu, E.C 4.2.1.1) jest enzymem, katalizującym odwracalną reakcję między dwutlenkiem węgla a wodą, z wytworzeniem kwasu węglowego, który następnie samistnie dysocjuje na jon dwuwęglanowy i jon wodorowy. Anhydraza węglanowa występuje w erytrocytach w dużym nadmiarze w stosunku do ilości koniecznej dla procesów katalizy. Zmniejszenie ilości enzymu nawet do 20% normy nie daje poważniejszych zaburzeń w wymianie gazowej dwutlenku węgla. Ilość anhydrazy węglanowej zmniejsza się w przebiegu niedokrwistości.

*Tanis* w roku 1970 (63) opisał występowanie w erytrocytach trzody chlewnej dwóch izoenzymów anhydrazy węglanowej, które uwidaczniają się po elektroforetycznym rozdziale surowicy na żelu skrobiowym w postaci prążków: jednego o większej ruchliwości elektroforetycznej, a drugiego o mniejszej. Prążek o szybszej ruchliwości *Tanis* nazwał izoenzymem B. Ciężar cząsteczkowy tego izoenzymu wynosi około  $3 \times 10^4$ . Jest on związkiem niskocząsteczkowym. Izoenzym ten zawiera w swym składzie mało metioniny i zbliżony jest do izoenzymu B u koni. Prążek



o wolniejszej ruchliwości Tanis nazwał izoenzymem C. Ciężar cząsteczkowy izoenzymu C jest prawie równy ciężarowi izoenzymu B. Izoenzym C jest związkiem wysokocząsteczkowym, podobnie jak izoenzym C u bydła, a w składzie swym zawiera znacznie więcej metioniny niż izoenzym B.

### IX. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu (oksydoreduktaza D-glukozy-6-fosforan:NADP, E.C 1.1.1.49) jest enzymem, który katalizuje utlenianie glukozy-6-fosforanu do 6-fosfoglukonianu. Jest to pierwszy z enzymów na drodze tak zwanego cyklu pentozowego przemiany materii. S a i s o n w 1968 roku (53, 54) opisała polimorfizm dehydrogenazy-6-fosforanowej u trzody chlewnej i stwierdziła występowanie dwóch izoenzymów A i B, które kontrolowane są przez dwa allele: PGD<sup>A</sup> i PGD<sup>B</sup>.

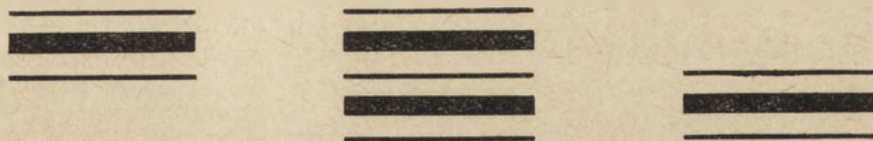
Osobniki, u których występuje na żelu skrobiowym jeden prążek szybszy są homozygotami o fenotypie AA. Osobniki te mają genotyp PGD<sup>A</sup>/PGD<sup>A</sup>. Osobniki także z jednym prążkiem, ale wolniejszym niż opisany wyżej, są homozygotami o fenotypie BB, a genotypie PGD<sup>B</sup>/PGD<sup>B</sup>. Osobniki zaś, u których występują obydwie prążki jednocześnie są heterozygotami o fenotypie AB, a genotypie PGD<sup>A</sup>/PGD<sup>B</sup>. Po przebadaniu kilku populacji S a i s o n stwierdziła (53, 54), że w tych populacjach występuje najmniej osobników o fenotypie BB (0,04 — 0,07). Ostatnio A n d r e s e n (5) sugeruje sprzężenie dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu z grupą krwi H oraz fosfoheksokinazą.

### X. Ceruloplazmina

Ceruloplazmina ( $\alpha_2$ -miedzioglobulina) jest enzymem oksydoredukcyjnym i w związku z tym zwana jest także oksydazą miedziową. Po raz pierwszy stwierdzili ją w 1948 roku H o l m b e r g i L a u r e l l (30) w surowicy ludzi i świń. W roku 1964 I m l a c h (32) opisał polimorfizm ceruloplazminy u trzody chlewnej. Polimorfizm u trzody wg I m l a c h a przedstawia rysunek 7.

U trzody chlewnej — jak widać na schemacie — występują dwa izoenzymy ceruloplazminy A i B, które kontrolowane są przez dwa allele: Cp<sup>A</sup> i Cp<sup>B</sup>. Osobniki, u których ceruloplazmina występuje na żelu skrobiowym pod postacią trzech prążków: środkowego — mocnego i dwóch słabych są homozygotami pod względem tej cechy o fenotypie AA i o genotypie Cp<sup>A</sup>/Cp<sup>A</sup>. Osobniki zaś, u których ceruloplazmina występuje również w postaci trzech prążków: środkowego — silnego i dwóch słabych,

ale o ruchliwości elektroforetycznej mniejszej niż to ma miejsce w fenotypie AA, są homozygotami o fenotypie BB, a o genotypie  $Cp^B/Cp^B$ . Osobniki natomiast, u których występuje pięć prążków: dwa silne i trzy słabe o ruchliwości równej ruchliwości prążków fenotypów AA i BB, są heterozygotami o fenotypie AB. Osobniki te mają genotyp  $Cp^A/Cp^B$ .



Fenotyp	AA	AB	BB
Genotyp	$Cp^A/Cp^A$	$Cp^A/Cp^B$	$Cp^B/Cp^B$

Rys. 7. Ceruloplazmina

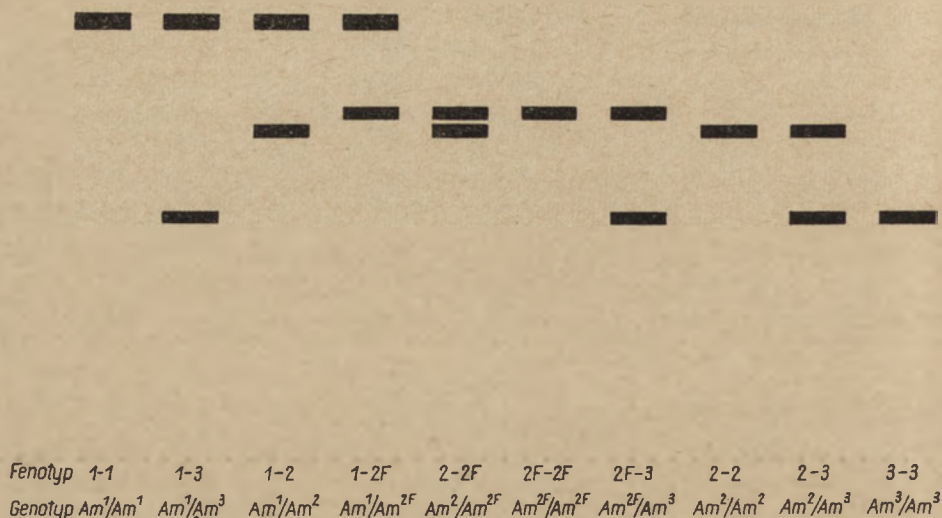
Im la h stwierdził ponadto w swych badaniach, że izoenzym A nie występuje u świń rasy wielkiej białej i wessex, natomiast u świń landrace występuje w częstotliwości 0,5. Izoenzym B w częstotliwości 1,0 występuje u świń rasy wielkiej białej i wessex, a u świń landrace w częstotliwości 0,95.

## XI. Amylaza

Amylaza jest enzymem występującym w prawie wszystkich narządach w organizmie pod postacią  $\alpha$ -amylazy (4-glukano-hydrolaza  $\alpha$ -1,4-glukanu, E.C.3.2.1.1) lub  $\beta$ -amylazy (maltohydrolaza  $\alpha$ -1,4-glukanu, E.C. 3.2.1.2.). Hydrolizuje ona wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe w polisacharydach takich, jak glikogen i skrobia. Hesselholt w 1968 roku podał, że amylaza może mieć różną ruchliwość elektroforetyczną (25). W związku z tym wyróżnił on trzy regiony jej występowania: region I — występuje na wysokości albumin (rysunek 1); amylaza o tej ruchliwości występuje w płynie pęcherzykowym oraz w cewce moczowej, region II — który znajduje się na wysokości  $\beta$ -globulin (rysunek 1) występuje amylaza surowicy krwi. Polimorfizm tego regionu przedstawia rysunek 8.



Po raz pierwszy polimorfizm amylazy u trzody chlewnej opisali Ashton i Schroffel (9, 57) i nadali mu nazwę *thread proteins*. Stwierdzili oni również genetyczną kontrolę amylazy oraz występowanie polimorfizmu u osobników w wieku powyżej 4—5 tygodni. W latach następnych Graetzer, Hesselholt (22, 25, 27) na podstawie badań



Rys. 8. Amylaza

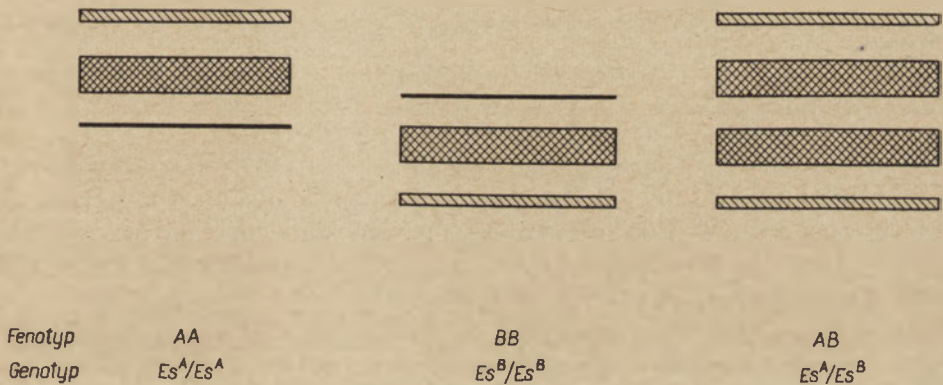
rodziny rasy landrace podali, że u trzody chlewnej mogą występować następujące izoenzymy amylazy: 1, 2, 2F, 3. Izoenzymy te są kontrolowane przez allele:  $Am^1$ ,  $Am^2$ ,  $Am^{2F}$  i  $Am^3$ . Niektórzy autorzy — Dinklage (18) oznaczają w swych pracach poszczególne izoenzymy amylazy literami alfabetu A, B, BF, C, co odpowiada kolejno liczbom 1, 2, 2F, 3.

Hesselholt (25) stwierdził w swych badaniach, że izoenzym 2 (B) jest izoenzy mem najczęściej występującym u trzody chlewnej (0,845). Pozostałe izoenzymy występują w następujących częstotliwościach: 1 (A) — 0,113, 2F (BF) — 0,024, 3 (C) — 0,018. Polimorfizm tego regionu amylazy u trzody chlewnej jest bardzo duży, co pozwala na praktyczne zastosowanie wyników badań w tym zakresie w hodowli. Połączenie danych o polimorfizmie amylazy z badaniem grup krwi daje 98% pewności co do pochodzenia danego osobnika (16). Andresen i Nielsen (3, 52) stwierdzają w swych pracach powiązanie między amylazą  $Am^1$  i grupą krwi Ib oraz między amylazą  $Am^3$  i grupą krwi Ia.

Region III — znajduje się na wysokości  $\alpha$ -globulin (rysunek 1). W regionie tym występuje amylaza znajdująca się między innymi w trzustce, wątrobie i jelitach.

## XII. Esteraza

Esteraza surowicy (hydrolaza estrów karboksylowych, E.C.3.1.1.1) jest enzymem katalizującym hydrolizę wiązania estrowego między kwasami karboksylowymi i jedno- lub wielohydroksylowymi alkoholami. Niektórzy autorzy nazywają ten enzym aliesterazą, gdy katalizuje on hydrolizę krótkiego łańcucha, podobnie jak to ma miejsce w przypadku maślanu metylu. Po raz pierwszy na polimorfizm esterazy u trzody chlewnej zwrócili uwagę Augustinsson i Olsson w 1961 roku (8). Szczegółowy polimorfizm esterazy u trzody chlewnej opisał w 1968 roku Kubek (44). Stwierdził on, że esterazy surowicy mogą występować w trzech regionach: region I — usytuowany jest po rozdiale elektroforetycznym surowicy na wysokości albumin (rysunek 1) i składa się z dwóch frakcji o stosunkowo niskiej aktywności. Jak dotąd nie ma danych w literaturze co do genetycznego uwarunkowania tych dwóch frakcji. Region II — zlokalizowany jest na żelu skrobiowym między transferynami (rysunek 1). Polimorfizm tego regionu przedstawia rysunek 9.



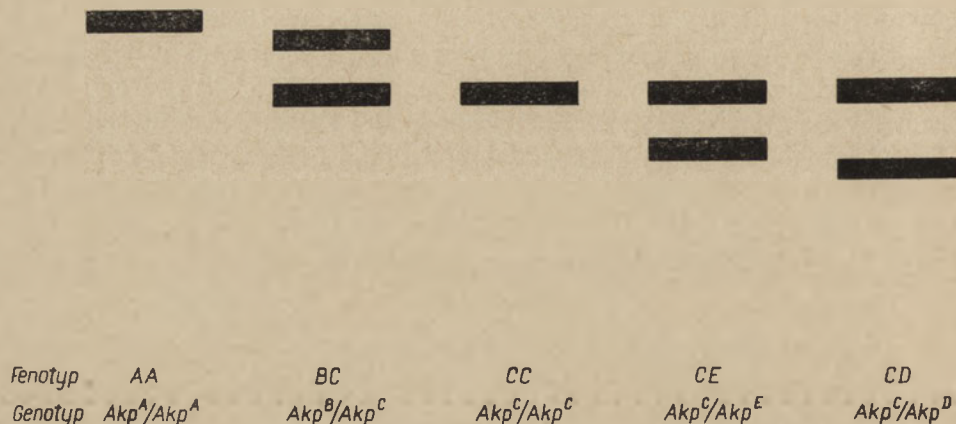
Rys. 9. Esteraza II regionu

W regionie drugim występują dwa izoenzymy A i B, które kontrolowane są przez 2 allele: Es<sup>A</sup> i Es<sup>B</sup>, co zostało udowodnione na rodzinach trzody chlewnej. W skład izoenzymu A wchodzi trzy prążki: środkowy — silny oraz dwa słabsze, z czego jeden — szybciej migrujący — jest mocniejszy od drugiego. W skład izoenzymu B wchodzi także trzy prążki, ale o ruchliwości mniejszej niż w izoenzymie A. Tutaj mocniejszym prążkiem, spośród dwóch słabszych, jest prążek migrujący wolniej. Poza tym Kubek stwierdził, że allel Es<sup>A</sup> występuje w częstotliwości 0,4817, natomiast allel Es<sup>B</sup> — w częstotliwości 0,5183. Region III — znajduje się na żelu skrobiowym na wysokości Sa<sub>2</sub>-globulin i składa się także z dwóch frakcji, podobnie jak region I.



### XIII. Fosfataza alkaliczna

Fosfataza alkaliczna (fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych, E.C. 3.1.3.1.) jest enzymem bardzo rozpowszechnionym w organizmie. Szczególnie dużą rolę odgrywa ten enzym w młodych organizmach w wieku 4—48 dni. Polimorfizm fosfatazy alkalicznej u trzody chlewnej opisali po raz pierwszy Dinklage i Imlah w 1968 roku (17, 34). Przedstawiony on jest na rysunku 10.



Rys. 10. Fosfataza alkaliczna

Dinklage i Imlah stwierdzają występowanie u trzody chlewnej pięciu izoenzymów, których synteza ma być kontrolowana przez allele: Akp<sup>A</sup>, Akp<sup>B</sup>, Akp<sup>C</sup>, Akp<sup>D</sup> i Akp<sup>E</sup>. Wymienione wyniki badań budzą jednak u szeregu innych autorów znaczne wątpliwości.

Przedstawione w niniejszym artykule badania z zakresu polimorfizmu białek i enzymów krwi świadczą o stałym rozwoju tej dziedziny wiedzy, która w naukach biologicznych ze względu m.in. na zastosowania praktyczne zajmuje jedno z czołowych miejsc.

#### LITERATURA

1. Aleksandrov O. A., *Doklady TSCChA*, Moskowskaja Ordena Lenina Sel'sko-chozjajstvennaja Akademia Imeni K. A. Timirjazeva, **135**, 95 (1968).
2. Andresen E., *A Study of Blood Groups of the Pig*, Munksgaard, Copenhagen, 1963.
3. Andresen E., *Science* **153**, 1660 (1966).
4. Andresen E., *Genetics* **54**, 805 (1966).
5. Andresen E., *Acta Vet. Scand.* **11**, 136 (1970).
6. Andersen E., *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* **1**, 171 (1970).
7. Andresen E., *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* **2**, 119 (1971).

8. Augustinsson K. B., Olsson B., *Hereditas* **47**, 1 (1961).
9. Ashton G. C., *Nature* **186**, 991 (1960).
10. Baker L. N., *Vox Sang.* **14**, 446 (1968).
11. Blumberg B. S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Biol. Med.* **104**, 25 (1960).
12. Brucks R., *Schweinezucht und Schweinemast* **6**, 148 (1968).
13. Buschman H., Schmid D. O., Serumgruppen bei Tieren. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1968.
14. Buser J. C., Nicod B., *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **112**, 652 (1970).
15. Christinsen K., *Anim. Blood Groups iBochem. Genet.* **1**, 123 (1970).
16. Dinklage H., *Züchtungskunde* **40**, 3:228 (1968).
17. Dinklage H., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
18. Dinklage H., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
19. Fésüs L., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
20. Gavalier M., Hojny J., X-th Eur. Conf. Anim. Blood Biochem. Polymorphism, Paris, 1966.
21. Gorin W., *Diss. Rab. Aspir. Viza* **16**, 79 (1969).
22. Graetzer M. A., Heselholt M., Moustgaard J., Thyman M., Proc. IX Eur. Anim. Blood Groups Conf. Prague, 1965, str. 279.
23. Heselholt M., *Acta Vet. Scand.* **4**, 238 (1963).
24. Heselholt M., Aarsberetning. Inst. Sterilitetsforskin, Copenhagen, 1966, str. 75.
25. Heselholt M., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
26. Heselholt M., Thesis Munksgaard, Copenhagen, 1969, str. 46.
27. Heselholt M., Larsen B., Nielsen P. B., Aarsskr. K. Vet. Landbohojsk, 1966, str. 78.
28. Heselholt M., Nielsen P. B., X-th Eur. Conf. Anim. Blood. Groups Biochem. Polymorphism, Paris 1966, str. 445.
29. Hetzer H. O., Harvey W. R., *J. Anim. Sci.* **26**, 1244 (1967).
30. Holmberg C. G., Laurell C. B., *Acta Chem. Scand.* **5**, 476 (1951).
31. Hristic V., Heselholt M., Stosic D., *Acta Vet. Scand.* **8**, 43 (1967).
32. Imlah P., *Nature* **203**, 658 (1964).
33. Imlah P., Proc. IX-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Conf. Prague, 1965, str. 423.
34. Imlah P., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
35. Jensen E. L., Smith B., Baker L. N., Cox D. F., *J. Anim. Sci.* **32**, 174 (1971).
36. King J. W. B., cyt. za 10.
37. Kraeling R. R., Gerrist R. J., Young E. P., *J. Anim. Sci.* **32**, 174 (1971).
38. Kristjansson F. K., *Science* **131**, 1681 (1960).
39. Kristjansson F. K., *Canad. J. Genet. Cytol.* **2**, 295 (1960).
40. Kristjansson F. K., *Genetics* **46**, 907 (1961).
41. Kristjansson F. K., *Genetics* **48**, 1059 (1963).
42. Kristjansson F. K., *J. Reprod. Fertil.* **8**, 311 (1964).
43. Kristjansson F. K., *Genetics* **53**, 675 (1966).
44. Kubek A., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.



45. Kubek A., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
46. Kubek A., Thesis Csechoslovak Academy of Sciences, Laboratory of Animals Genetics. Libechov str. 55.
47. Kubek A., Dinklage H., *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* **2**, 35 (1971).
48. Kubek A., Matousek J., *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* **1**, 163 (1970).
49. Madeyska-Lewandowska H., *Biul. IGHZ PAN* **24**, 19 (1971).
50. Madeyska A., Składanowska E., Zurkowski M., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
51. Moustgaard J., Hesselholt M., w Swine in Biomedical Research, A Symposium. Batelle—North—West. Washington (1966).
52. Nielson P. B., X-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Paris, 1966.
53. Saison R., Proc. XI-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism, Warsaw, 1968.
54. Saison R., Giblett E. R., *Vox Sang.* **16**, 514 (1969).
55. Saison R., O'Reilly M., *Vox Sang.* **20**, 274 (1971).
56. Schröffel J., Thesis Laboratory of Physiology and Genetics of Animals, Libechov, 1965.
57. Schröffel J., Proc. IX-th Eur. Conf. Anim. Blood Groups, Prague, 1965, str. 321.
58. Schröffel J., Hojny J., *Cesk. Fysiol.* **11**, 277 (1962).
59. Schröffel J., *Nature* **210**, 1274 (1966).
60. Scopes R. K., *Nature* **197**, 1201 (1963).
61. Smith C., Jensen E. L., Baker L. N., Cox D. F., *J. Anim. Sci.* **27**, 848 (1968).
62. Smithies O., w Advances in Protein, Chemistry, red. C. B. Anfinsen, jr., M. L. Anson, K. Bailey, J. T. Edsall, Academic Press, New York, London 1959, str. 65.
63. Tanis R. J., Tashian R. E., Y. - S. L., Yu, *J. Biol. Chem.* **245**, 6003 (1970).
64. Wagner D., Veterinarmed. Diss. Leipzig 1969, str. 108.
65. Willer S., Neuffer K., *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin* **24**, 1071 (1970).

ALINA GRZELIŃSKA \*

## Teorie mechanizmu odporności roślin na choroby infekcyjne

### Theories of the Mechanism of the Plant Resistance to Infections Diseases

Various theories are presented of the mechanisms underlying the resistance of plant to infection diseases.

Rozwojowi każdego gatunku organizmów na Ziemi towarzyszy nieustanny proces selekcji, oparty o możliwości adaptacyjne ustroju do warunków środowiska. O tym czy dany organizm przetrzyma tę selekcję, czy zostanie wyeliminowany, decyduje zespół zjawisk odpornościowych — mechanizmy obronne organizmu. Mechanizmy te w toku ewolucji ulegały rozwojowi i doskonaleniu w zmieniających się warunkach otoczenia.

Nauka o chorobach infekcyjnych roślin rozwinęła się już w pierwszej połowie 19 wieku na podstawie poglądów panujących w medycynie. Jednakże do dzisiaj wiedza o immunologii roślin znacznie ustępuje wiedzy o immunologii zwierząt głównie ze względu na ogromne zróżnicowanie tej grupy organizmów, a także wskutek niemożności ściślejszej lokalizacji procesów odpornościowych w określonej tkance lub tkankach. Obiektem badań jest wobec tego cała roślina, stanowiąca środowisko o dużej heterogenności i zmienności. Ma to decydujący wpływ na trudności metodyczne i powtarzalność wyników.

Każda roślina w toku ontogenezy styka się nieustannie z czynnikami chorobotwórczymi. Mimo jednak tego ciągłego zagrożenia znaczna część roślin nie ulega chorobom. O przydatności bowiem rośliny do spełniania roli żywiciela dla określonego patogenu decyduje możliwość zapewnienia mu niezbędnych warunków rozwoju oraz wzajemna tolerancja wszystkich składników chemicznych. Odporność natomiast zależy od zdolności organizmu do przeciwstawiania się wnikaniu lub rozprzestrzenianiu patogenu, od potencjalnej możliwości do funkcjonalnej obrony przed sprawcą (105) i jest cechą wspólną dla wszystkich organizmów żywych.

Zależnie od czynników determinujących reakcję rośliny na inwazję patogenu wyróżniamy reakcje odpornościowe bierne i czynne (62a), jakkolwiek istnieje wiele danych pozwalających traktować ten podział jako umowny. Odporność bierna uwarunkowana jest właściwościami rośliny

---

\* Dr, Instytut Genetyki i Hodowli Roślin SGGW



istniejącymi przed bezpośrednim kontaktem z drobnoustrojami patogennymi, a ujawniającymi się w tworzeniu anatomicznych, fizjologicznych i chemicznych barier przeciwinwazyjnych utrudniających rozprzestrzenianie patogenu. Reakcje tego typu są niespecyficzne.

Czynny mechanizm obronny wykazuje zawsze pewien stopień specyficzności. Odporność czynna jest uzależniona od takich właściwości, które ujawniają się w roślinie w wyniku kontaktu z patogenem i są wykorzystywane do skutecznej obrony. Reakcje odpornościowe nie zapobiegają więc samej infekcji, ale hamują proces generalizacji choroby.

Zależnie od stopnia intensywności reakcje odpornościowe przyjęto określać jako normoergiczne, których natężenie jest proporcjonalne do wielkości działającego bodźca, i hiperergiczne, w których nasilenie reakcji rośliny jest nieporównanie większe od wielkości bodźca (reakcje przebiegające z nadwrażliwością). Reakcja nadwrażliwości mimo, że prowadzi do szybkiego zlokalizowania, a następnie zniszczenia ogniska choroby, nie jest jednak reakcją odporności *sensu stricto*.

Przebieg infekcji u odmian odpornych i wrażliwych na daną chorobę jest identyczny, różnica w intensywności reakcji odpornościowej ujawnia się dopiero w następnych stadiach choroby (107). Natężenie reakcji obronnej zależne jest od stopnia uczulenia żywiciela na sprawcę, kierunek zaś i specyficzność wynika z charakteru patogenu i typu indukowanych zmian chorobowych.

Z aktualnego stanu wiedzy w dziedzinie morfologii i fizjologii roślin wynika, że organizmy roślinne w odróżnieniu od zwierząt nie zawierają wyspecjalizowanych komórek i układów obronnych. Struktura ścian celulozowych utrudnia obieg komórek bojowych, każda komórka musi więc bronić się samodzielnie. Tym samym roślinie pozostaje tylko obrona biochemiczna. Na przestrzeni ostatniego stulecia rozpatrywano wiele typów związków w powiązaniu z ich udziałem w reakcjach odpornościowych roślin.

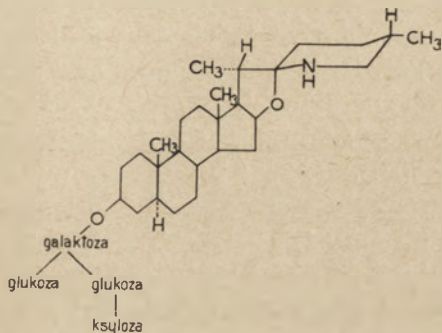
## I. Alkaloidy

Najwcześniejsze prace z dziedziny odporności roślin na choroby infekcyjne przypisywały hamujący wpływ na mikroorganizmy patogennicenne alkaloidom. W badaniach tego typu niejednokrotnie udało się nawet wykazać korelację między odpornością rośliny a poziomem określonych alkaloidów. G a ü m a n n (35) stwierdził, że tomatyna (I) i solanina (II), alkaloidy pomidora, hamują wzrost *Fusarium lycopersici* w rozcieńczeniu 1 : 10<sup>-5</sup>, czyli w stężeniu naturalnie występującym w roślinach. Podobne wyniki uzyskano badając wpływ na mikroorganizmy solaniny i chalkoniny w powiązaniu z kwasem chlorogenowym (5). Wysoką toksyczność loidów

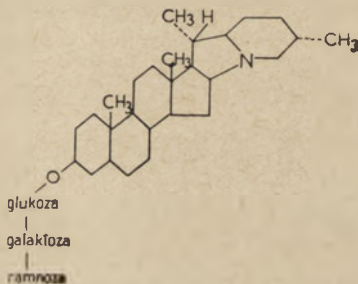
wobec *Helminthosporium carbonicum* potwierdził ostatnio Allen (4) oraz Allen i Kuć (6).

Przypuszczalny mechanizm działania tomatyny zaproponowali Arneson i Durbin (8). Ponieważ alkaloid ten jest bardziej aktywny w wysokim pH autorzy sugerują, że aktywna jest tylko jego forma bezprotonowa. W formie takiej tomatyna może tworzyć kompleksy ze związkami sterydowymi grzybów.

I



II



Hipoteza dotycząca udziału alkaloidów w reakcjach odpornościowych rośliny nie zyskała wielu zwolenników, jakkolwiek prace na ten temat sporadycznie pojawiają się do dzisiaj. Znane są bowiem ogromne zdolności adaptacyjne mikroorganizmów do wysokich nawet stężeń substancji trujących (31, 59), a także fakt, że rośliny zawierające podobne stężenie alkaloidów wykazują zróżnicowaną odporność odmianową.

## II. Glikozydy

Prace dotyczące udziału różnego rodzaju glikozydów w zjawisku odporności stanowiły następny etap w rozwoju badań nad mechanizmem tego procesu.

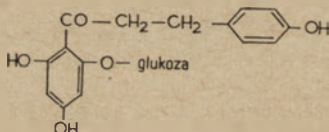
Działanie hamujące rozwój mikroorganizmów przypisywano olejkom gorczycznym powstającym po hydrolizie glikozydów izorodanowych (34),



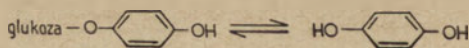
związkom cyjanowym uwalnianym przy rozpadzie glikozydów cyjanogen-nych (100), a także związkom fenolowym uwalnianym w wyniku hydroli-zy glikozydów fenolowych (32, 83, 114). Związki te nie występują w stanie wolnym w roślinie zdrowej, ale zostają uruchomione w wyniku kontaktu z patogenem; można je więc traktować jako przejaw aktywnej reakcji odpornościowej. Hipotetycznie należałoby jednak przyjąć, że mechanizm obronny roślin polega na poinfekcyjnym uruchomieniu systemu enzy-mów hydrolizujących glikozydy (129) w wyniku bądź ich syntezy lub aktywacji, bądź zniszczenia barier biologicznych komórki.

Niektóre doświadczenia wydają się potwierdzać ten fakt. H u b e r i i A n d e r s o n (52) stwierdzili, że odporne na *Fusarium* odmiany fasoli gromadziły po infekcji znacznie więcej  $\beta$ -glikozydazy niż odmiany wrażli-we. Związek fenolowy — floretyna jest gromadzona przez rośliny jako  $\beta$ -glikozydflorydzyzna (III). Po infekcji rośliny produkują  $\beta$ -glikozydazę, która uwalnia floretynę; ulega ona następnie utlenieniu do postaci chino-nowej, toksycznej dla *Venturia inaequalis* (94). Aktywność antybiotyczną wykazuje także arbutyna przy zwiększonej aktywności  $\beta$ -glikozydazy (49). Hydroliza arbutyny prowadzi do uwolnienia hydrochinonu, który wskutek działania oksydazy *o*-dwufenylowej lub autooksydacji ulega przekształce-niu do chinonu poprzez przejściową formę semichinonu. Zdaniem autorów czynnikiem regulującym odporność może być system arbutyna — hydro-chinon (IV).

III



IV



Przytacza się również, zwłaszcza w stosunku do glikozydów fenolo-wych, możliwość hydrolitycznego działania glikozydaz uwalnianych przez patogen (21, 24, 116). D a v i s i w s p. (21) wykazali na przykład obec-ności  $\beta$ -glikozydazy w ziemiaku porażonym przez *Fusarium* podczas gdy zdrowe ziemiaki aktywności tej nie wykazały.

Wnikliwe badania przeprowadzone jeszcze w latach 40-tych, głównie przez pracowników szkoły Walkera, każą jednak wątpić w znaczenie pro-duktów hydrolizy glikozydów dla ogólnej odporności roślin na choroby infekcyjne. Udało się bowiem drogą selekcji uzyskać odmiany roślin nie-mal całkowicie pozbawione glikozydów izorodanowych, co jednak pozos-tawało bez żadnego wpływu na ich odporność (93, 132). Otrzymano także czyste linie gorczyicy znacznie różniące się odpornością na *Plasmodiop-*

*hora brassicae*, ale o identycznym poziomie olejków gorczyczych i myrozyny (123).

Brak pełnego udokumentowania doświadczalnego dla mechanizmu odporności o przedstawionym typie, a także pewne rozbieżności wyników skłoniły wielu badaczy do poszukiwań czynników odporności wśród innych metabolitów rośliny.

### III. Fenole

Już w latach 50—tych pojawił się pogląd, że znamioną rolę w odpowiedzi rośliny-żywiciela na infekcję mogą odgrywać związki fenolowe (55, 109, 132). Teoria fenolowa odporności roślin zyskała wielokierunkową interpretację teoretyczną i doświadczalną. Podstawą do jej sformułowania była znaczna toksyczność związków fenolowych w powiązaniu z powszechną ich akumulacją w tkankach porażonych (10, 13, 16, 21, 50, 53, 55, 61, 85). Do związków fenolowych gromadzonych najczęściej należą: jedno- i dwuhydroksyfenole, glikozydy fenolowe, flawonoidy, antocyjaniny, aminokwasy aromatyczne i pochodne kumaryn. Każda infekcja prowadziłyby do gromadzenia innych związków aromatycznych. Nie udało się jednak znaleźć zależności między typem choroby i charakterem gromadzonych związków. Działanie związków fenolowych w procesie patogenezy przejawia się w inhibicji produkowanych przez patogen pozakomórkowo enzymów celulolitycznych i pektynolitycznych. Stanowiłoby to nieswoistą zaporę przeciw penetracji mikroorganizmów (24, 55, 64).

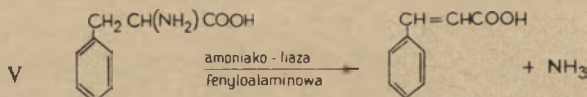
Teoretycznie możliwe są dwie drogi regulacji poziomu związków fenolowych u roślin: a) inhibicja lub aktywacja na zasadzie sprzężenia zwrotnego aktywności enzymów katalizujących różne etapy syntezy fenoli i b) indukcja lub represja syntezy enzymów tej drogi metabolicznej (63).

Synteza związków fenolowych przebiega najczęściej drogą kwasu szykimowego (33, 66). Początkowa reakcja obejmuje kondensację fosfoenolopirogronianu z erytrozo-4-fosforanem. Czynniki, które wpływają na efektywność produkcji tych związków, będą zatem miały bezpośredni wpływ na syntezę fenoli. Jednym z takich czynników jest infekcja. Porażone bowiem tkanki wykazują w procesie utleniania glukozy zwiększony udział cyklu pentozofosforanów (20, 124), który stanowi źródło erytrozo-4-fosforanu. Enzymy uczestniczące w syntezie kwasu szykimowego mają charakter regulatorowy (66), a utrata tych właściwości przez enzymy allosteryczne biosyntezy związków aromatycznych w chorych tkankach może spowodować wzrost akumulacji związków fenolowych.

Inną drogą biosyntezy związków fenolowych u roślin jest dezaminacja aminokwasów aromatycznych. Przemianę fenyloalaniny do kwasu cynamonowego katalizuje amoniako-liaza fenyloalaninowa (V). Dalsze prze-



kształcenia kwasu cynamonowego prowadzą do takich pochodnych jak dwuhydroksyfenole, flawonoidy i ligniny. Wzrost aktywności amoniako-liazy fenyloalaninowej indukuje infekcja mikroorganizmów (12), zranienia mechaniczne (76), pewne antybiotyki (39, 41), a także ekspozycja na światło widzialnym (76) i pozafioletowym (42). Dezaminację tyrozyny do kwasu *p*-kumarowego (VI) katalizuje amoniako-liaza tyrozynowa, której aktywność znacznie wzrasta w tkankach batata po infekcji *Ceratocystis fimbriata* lub wskutek uszkodzeń mechanicznych (76).



Do gromadzenia fenoli może wreszcie przyczynić się sam patogen przez wydzielanie enzymów uwalniających fenole z glikozydów lub przez produkcję tych składników (27, 116).

Istnieją jednak dane, że frakcja fenolowa z jabłoni wręcz stymuluje zarodnikowanie *Venturia pirina* (32), a kwas chlorogenowy wykazuje niewielki wpływ na rozwój *Phytophthora palmivora*, *Ph. cactorum* i *Ph. parasitica* (3). W wielu wypadkach nie udało się także znaleźć dodatniej korelacji między poinfekcyjną zawartością fenoli a odpornością roślin (30, 51, 99, 112).

Zarówno zatem wobec tych danych, jak i na podstawie wyników badań nad alkaloidami i glikozydami, jako prawdopodobnymi czynnikami odporności, należy wnioskować, że skład chemiczny rośliny stanowi niewielką przeszkodę dla rozwoju mikroorganizmów patogenicznych. Reakcja obronna natomiast może polegać na odpowiednim ukierunkowaniu metabolizmu rośliny, w tym także metabolizmu związków aromatycznych. Pogląd ten reprezentowali zwłaszcza Rubin i wsp. (104). Zbliżone sugestie, szczególnie mocno popierane przez Farkasa (24), skierowano w stronę poinfekcyjnych przekształceń związków fenolowych do odpowiednich chinonów przy udziale enzymów utleniających.

Udowodniono, że chinony działają znacznie efektywniej jako inhibitory enzymów celulolitycznych, pektynolitycznych i proteolitycznych od fenoli (69). Mogą one reagować z grupami SH enzymów przez addycję 1 : 4 tworząc nieaktywne kompleksy (69), wiązać jony metali uczestniczące w katalizie, utleniać grupy tiolowe enzymów lub współzawodniczyć z substratem (133). Inaktywacja enzymów przez chinony może także polegać na zablokowaniu niezbędnej dla katalitycznej aktywności białka grupy aminowej. Produkty utleniania *o*-dwuhydroksyfenoli na przykład inaktywują pozakomórkowe enzymy wydzielane przez patogeny (87), między innymi poligalakturonazę. Inhibicja tego enzymu jest spowodowana najprawdopodobniej przez addycję 1 : 4 chinonów do grup aminowych lub

iminowych. Utlenione fenole prowadzą do charakterystycznego brunatnienia tkanek wokół ogniska chorobowego, które w takiej postaci tworzą rodzaj bariery dla penetracji patogenu (68).

W tym aspekcie istotną rolę w reakcjach odpornościowych roślin należałoby przypisywać enzymom utleniającym fenole — oksydazom fenolowym. Jakkolwiek mechanizm aktywacji tych enzymów po infekcji nie jest dokładnie znany, Farkas i Kiraly (24) przypuszczają, że wzrost aktywności oksydaz fenolowych jest podobną odpowiedzią cytoplazmy rośliny, jak tworzenie przeciwciał u zwierząt. Wskutek bowiem aktywacji tych enzymów rośliny zdolne są do intensywniejszego gromadzenia związków fenolowych po infekcji. A dopiero taki ostry poinfekcyjny wzrost stężenia fenoli byłby dowodem odporności roślin.

Wielu autorów przytacza dane wskazujące na znaczny wzrost aktywności oksydazy o-dwufenolowej (43, 46, 68, 72, 73, 75, 101, 102) i peroksydazy (29, 43, 44, 46, 52, 75, 79, 95) po infekcji. Jednakże analiza aktywności tych enzymów w powiązaniu ze stopniem odporności roślin nie dała jednoznacznych wyników (52, 79, 88, 126, 134); niejednokrotnie korelacja taka okazała się ujemna — rośliny odporne nie wykazywały w ogóle poinfekcyjnych zmian aktywności peroksydazy (37, 79, 88). Wydaje się zatem, że zmiany poinfekcyjne w kierunku gromadzenia utlenionych fenoli zależne są od typu reakcji obronnej.

Jednym ze związków, który uczestniczy w regulacji syntezy peroksydazy u roślin jest prawdopodobnie etylen, występujący powszechnie w zranionych tkankach (22, 115). W roślinach inokulowanych octan etylu hamował wzrost *Helminthosporium carbonum* w ok. 90% (12). Ponadto sugeruje się związek przyczynowy między aktywacją peroksydazy a poziomem nie występującego w białkach iminokwasu — kwasu pipekolinoowego, gromadzącego się u roślin porażonych i rosnących w niekorzystnych warunkach (22).

Wyrazem reakcji przebiegającej z nadwrażliwością (typu hiperergicznego) jest szybki rozpad struktury zainfekowanych komórek. Aktywność tych reakcji jest więc związana z metabolizmem destrukcyjnym (63).

Badania histochemiczne wskazują na znaczną akumulację związków fenolowych przez rośliny wykazujące odporność wynikającą z nadwrażliwości, a także na udział w tych procesach enzymów utleniających (12, 28, 78, 117). Według badaczy radzieckich z grupy Rubina i węgierskich z grupy Farkasa w każdym wypadku chorobowym, w którym tkanki reagują z nadwrażliwością następuje silna i szybka aktywacja enzymów utleniających fenole (26, 60, 81, 102). Aktywność oksydaz fenolowych jest odzwierciedleniem tempa brązowienia porażonych tkanek (130).

Reakcje typu hiperergicznego wydają się być związane z przesunięciem równowagi procesów oksydacyjno—redukcyjnych w kierunku wzmożonego utleniania tkankowego. Nadmierne utlenianie polifenoli prowadziłoby właśnie do szybkiego rozpadu struktury komórkowej. Obniżając za



pomocą promieni jonizujących aktywność peroksydazy i oksydazy o-dwufenolowej obniża się jednocześnie odporność rośliny (103). Odmienne wpływy wywołują systemy redukujące, które hamują lub osłabiają reakcję nadwrażliwości. Jako źródło wysokiej siły redukującej w komórce przytacza się  $\text{NADH}_2$  (24) i kwas askorbinowy, który — redukując chinony — obniża ich toksyczność (26, 86). Podobne działanie przypisuje się dehydrogenazom (45, 102).

Występowanie poinfekcyjnych zmian w poziomie związków fenolowych i aktywności oksydaz fenolowych, zdaniem niektórych badaczy (36, 62, 135), jest w stosunku do wytwarzania nekroz procesem wtórnym. Pierwotny bodziec natomiast może modyfikować strukturę błon cytoplazmatycznych w ten sposób, że w wyniku zmiany ich przepuszczalności następuje zanik kompartmentacji komórki. Regulacja metabolizmu komórek ulega rozkojarzeniu, oksydazy fenolowe i inne enzymy utleniające i hydrolityczne uzyskują kontakt z substratami uprzednio izolowanymi wskutek przedziałowości. Następstwem tych zjawisk jest wytwarzanie nekroz.

Reakcja typu hiperergicznego wynika ze spotęgowanej wrażliwości rośliny na metabolity patogenu, nie stanowi więc typowej plazmatycznej reakcji obronnej i nie zapewnia komórce powrotu do równowagi fizjologicznej.

Przyjmując słuszność teorii fenolowej także w odniesieniu do reakcji normoergicznych należałoby spodziewać się, że mechanizm aktywacji oksydaz fenolowych zostanie uruchomiony wkrótce po infekcji, co zapewniłoby skuteczność reakcji obronnej. Analiza zmian aktywności peroksydazy w toku patogenezы roślin pomidora o różnej wrażliwości na *Fusarium lycopersici* dowiodła jednakże, że reakcja odpornościowa nie była związana ze wzrostem aktywności tego enzymu (38). Stanowi to potwierdzenie wcześniejszych sugestii Maxwella i Batemana (75), że wzrost aktywności oksydaz w porażonych tkankach wynika z degeneracji prowadzącej do zmian destrukcyjnych i nie ma związku z hamowaniem rozwoju patogenu. Dokładne badanie dynamiki zmian aktywności peroksydazy i oksydazy o-dwufenolowej, poczynając od momentu infekcji, wykazało znacznie intensywniejszy przyrost aktywności tych enzymów u odmian odpornych bezpośrednio po infekcji, natomiast u odmian wrażliwych w zaawansowanym stadium choroby (38). Seevers i Daly (112) stosując zmiany termiczne prowadzące do całkowitego zaniku odporności pszenicy na rdzę nie wykryli żadnych różnic w aktywności peroksydazy. Dowodzi to, zdaniem autorów, że ilość peroksydazy indukowanej pod wpływem infekcji nie jest skorelowana z odpornością.

Słuszność teorii fenolowej w odniesieniu do czynnego mechanizmu obronnego rośliny winna być potwierdzona specyficznością reakcji odpornościowej. Tymczasem doświadczalnie ustalono, że uszkodzenia mecha-

niczne stymulują gromadzenie tych samych związków fenolowych, które pojawiają się w porażonych tkankach (2).

Jakkolwiek coraz więcej danych wskazuje że zarówno, wzrost poziomu związków fenolowych, jak i aktywności oksydaz fenolowych jest zjawiskiem o pewnym znaczeniu wyłącznie w reakcjach nadwrażliwości, zwolennikami „fenolowej teorii” odporności roślin było do niedawna bardzo wielu badaczy. Mimo pewnych braków i rozbieżności jest to dotychczas najpełniej opracowana teoria mechanizmu reakcji obronnych dysponująca ogromnym materiałem doświadczalnym.

#### IV. Białka

Liczne prace z zakresu odporności roślin dotyczą poinfekcyjnych zmian w metabolizmie białek i produktów ich rozkładu. Wzrost poziomu wolnych aminokwasów po infekcji przyjmowano jako dowód wskazujący na spadek zawartości białek w roślinie (67, 79, 97). Badania Ramakrishnana (96) dowiodły jednak, że są to procesy niezależne po infekcji bowiem roślin wrażliwych obok wzrostu puli wolnych aminokwasów zwiększa się także ilość białka rozpuszczalnego. Analogiczne zmiany manifestujące się wzrostem zawartości białka rozpuszczalnego towarzyszyły infekcji wielu roślin wrażliwych (37, 84, 125), a ich interpretacja jest na ogół zgodna. Jako czynniki równorzędne sugerowano nakładanie się na poziom białek żywiciela — białek patogenu oraz syntezę pod wpływem infekcji nowych białek enzymatycznych.

Znane są także wypadki chorobowe, w których nie obserwowano ilościowych zmian poinfekcyjnych we frakcji białek rozpuszczalnych ani u roślin wrażliwych ani u odpornych (56, 58, 126). Chromatograficzna i elektroforetyczna analiza dowiodła jednak, że mimo braku różnic ilościowych jako efekt inwazji patogenu pojawiają się w składzie białek różnice jakościowe (56, 58, 106, 131) przejawiające się znikaniem pewnych białek a pojawianiem innych (56, 125). Ponieważ zastosowanie w tego typu badaniach inhibitorów biosyntezy białka wykluczyło pasożytnicze pochodzenie nowo syntetyzowanych białek, Farkas i Stahmann (29) sugerują, że infekcja przyspiesza procesy syntetyczne normalnie występujące w późniejszym stadium rozwoju ontogenetycznego rośliny.

Ciekawa praca badaczy japońskich (58) rzuciła nowe światło na problem specyficzności zmian w składzie białek. Wykazali oni mianowicie, że białka syntetyzowane w odpowiedzi na infekcję były również produkowane pod wpływem urazów mechanicznych, chociaż w mniejszych ilościach. Specyficzność reakcji byłaby więc tylko cechą ilościową.

Poinfekcyjne zmiany w białkach nie występują wyłącznie w ognisku chorobowych, jak to sugerowali Maxwell i Bateman (75); odpowiedź na bodziec objęte są wszystkie tkanki rośliny (37). Jeżeli miej-



scowa infekcja zdolna jest do indukowania zmian obejmujących wszystkie komórki ustroju, torem umożliwiającym ten proces mógłby być wpływ na materiał genetyczny. Przypuszczenie takie skłania do przeanalizowania pewnych wątpliwości. Nie wyjaśniony pozostaje problem czy białka pojawiające się po infekcji stanowią specyficzne czynniki antygenowe patogenu, czy są to odpowiedniki przeciwciał zwierzęcych, syntetyzowane w komórkach rośliny pod wpływem bodźca antygenowego. Przyjmując za Uritanim i Stahmannem (131) antygenowy charakter tych białek powstaje trudność interpretacji wyników, wykazujących immunologicznie pojawianie się nowych białek po mechanicznym zranieniu rośliny (58).

Dokładne badania białek enzymatycznych u roślin doprowadziły do ujawnienia wielu form izoenzymatycznych pewnych enzymów, wśród których była także peroksydaza; ilość izoenzymów po infekcji wzrastała (9, 125). Ponieważ zaobserwowane zmiany w rodzaju i ilości izoenzymów w tkankach porażonych grzybami, bakteriami i wirusami (57, 58, 106, 120, 126, 134) w niektórych wypadkach zdołano również wykazać w starych tkankach roślin zdrowych — wysunięto przypuszczenie, że zmiany poinfekcyjne zbliżone są do zmian związanych z rozwojem i starzeniem się rośliny, ale znacznie je wyprzedzają (7, 25, 29). Jest to hipoteza „przyspieszania starości” przez infekcję.

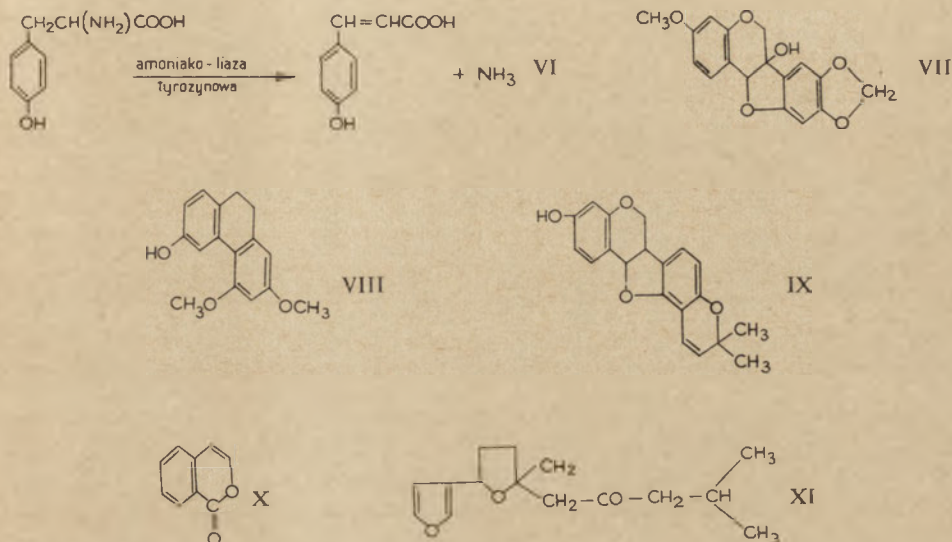
Poinfekcyjne zmiany w ilości i poziomie izoperoksydaz charakteryzują się małą specyficznością, zastosowane bowiem jako antygeny różne związki chemiczne (nikiel, sole rtęci) wykazały ten sam skutek co infekcja (29). Natomiast zmiany stymulowane naturalnym procesem starzenia były identyczne ze zmianami wywołanymi przez mechaniczne uszkodzenie roślin (82).

Sugestii o „przyspieszaniu starości” przez infekcję oraz poinfekcyjnej biosyntezie nowych peroksydaz nie podtrzymują dane uzyskane przez innych autorów (37, 82). Infekcja, podobnie jak starzenie się, indukuje głównie zmiany ilościowe poszczególnych izoperoksydaz; nowe pasma izoperoksydaz znaleziono także w minimalnych ilościach w młodych tkankach roślin zdrowych. Zmiany poinfekcyjne, jakkolwiek specyficzne dla tkanek żywiciela, a nie patogenu nie były jednak identyczne ze zmianami towarzyszącymi starzeniu się roślin. Ponadto pojawienie się maksymalnego natężenia tych zmian towarzyszyło pełnemu rozwojowi choroby u roślin wrażliwych, nie wynikało więc z procesu obronnego (37).

## V. Fitoaleksyny

Na występowanie u roślin określonych inhibitorów i na ich udział w odporności na choroby wskazywano już od dawna. Związki te początkowo określano jako pseudoprzeciwciała (23), prohibityny (108), później jako

fitoncydy (128) i antybiotyki roślinne (119). Zdaniem Mahadevana (71) rośliny zawierają dwa rodzaje czynników obronnych: prohibityny i fitoaleksyny. Prohibityny, nazwane przez Stoessla (127) inhibitorami przedinfekcyjnymi, stanowiłyby bierne bariery chemiczne, fitoaleksyny natomiast tworzyłyby aktywny system obronny. Teoria fitoaleksyn, wysunięta przez Müllera (77) jeszcze w latach czterdziestych, stanowi pewną kontynuację teorii fenolowej ale jednocześnie zyskała ostatnio interpretację opartą o współczesne poglądy genetyczne.



Już sama nazwa nawiązuje do występujących u zwierząt aleksyn — substancji niespecyficznych o dość silnych właściwościach toksycznych wobec mikroorganizmów. Aleksyny roślinne, czyli fitoaleksyny, są to związki niskocząsteczkowe produkowane w roślinach zdrowych w ilościach śladowych, znacznie wzrastających po infekcji. Wzmoczona produkcja fitoaleksyn zachodzi w tkankach porażonych i w najbliższym ich sąsiedztwie (17). Jest to więc proces typowo lokalny. Jako związki niespecyficzne fitoaleksyny wykazują szeroki zakres działania; mikroorganizmy różnią się jednakże stopniem wrażliwości na określone związki, a te z nich, dla których rodzaj fitoaleksyny i jej stężenie nie jest hamujące stają się patogenami roślin. Mechanizm obronny polegający na działaniu fitoaleksyn jest zasadniczo wspólny dla roślin wrażliwych i odpornych, różnica przejawia się w szybkości poinfekcyjnej syntezy fitoaleksyn. U roślin odpornych szybkość ta jest zdecydowanie większa i to warunkuje skuteczną obronę. Zdaniem Cruickshanka (17) szybkość reakcji jest cechą specyficzną roślin zdeterminowaną genetycznie.

Wyizolowane dotychczas i zdefiniowane chemicznie fitoaleksyny to



pizatyna (VII) (90), fazyzna (VIII) (89), orchińol (IX) (14), izokumaryna (X) (121), ipomeamaron (XI) (1) i inne. Już na podstawie tych kilku przykładów widać, że większość z nich stanowią produkty przemian fenoli.

Najpełniej obecnie zbadaną fitoaleksyną jest izoflawonoid — pizatyna (39—41, 91, 111), na tym więc przykładzie starano się wyjaśnić mechanizm poinfekcyjnej syntezy fitoaleksyn w oparciu o nowoczesne poglądy na temat regulacji genetycznej. Syntezę pizatyny stymuluje infekcja grzybami fakultatywnymi i obligatoryjnymi, nie pojawia się ona natomiast po zranieniach mechanicznych i infekcji bakteryjnej (127). Synteza tej fitoaleksyny jest również indukowana przez pewne związki chemiczne o charakterze antybiotyków, jak aktynomycyny D i mitomycyna C, przy czym efektywne są jedynie niskie stężenia tych związków (110, 111).

Poinfekcyjnej syntezie pizatyny (a także innych fitoaleksyn) towarzyszy zwykle wzrost aktywności amoniako-liazy fenyloalaninowej, katalizującej pierwszy etap syntezy związków fenolowych na drodze dezaminacji aminokwasów aromatycznych (13, 39, 41, 42).

Podobieństwo w działaniu antybiotyków i skutków infekcji wskazuje, że pierwotne procesy odpornościowe obejmują zmiany w mechanizmie przekazywania informacji genetycznej na poziomie transkrypcji (9, 41). Przypuszczenie to wynika ze sposobu działania aktynomycyny D, która zmieniając konformację pewnych odcinków DNA ułatwia syntezę komplementarnego mRNA. A zarówno synteza pizatyny, jak i amoniako-liazy fenyloalaninowej jest uzależniona od syntezy specyficznego mRNA. Regulacja zatem produkcji tych związków zależy od stadium konformacyjnego podwójnej spirali DNA (39, 42).

Aktynomycyna D i mitomycyna C tworzą kompleks z łańcuchami DNA wiążąc się z resztami guaninowymi. Związki te mogą więc współdziałać z negatywnym mechanizmem kontroli genetycznej przez połączenie z jednostką regulowaną genu właściwego dla syntezy pizatyny i w ten sposób warunkują jej nieograniczoną produkcję. Połączenie to może być skutkiem wysokiej zawartości dG w genach regulatorach lub wynikać z braku czy uszkodzenia komponenty białkowej.

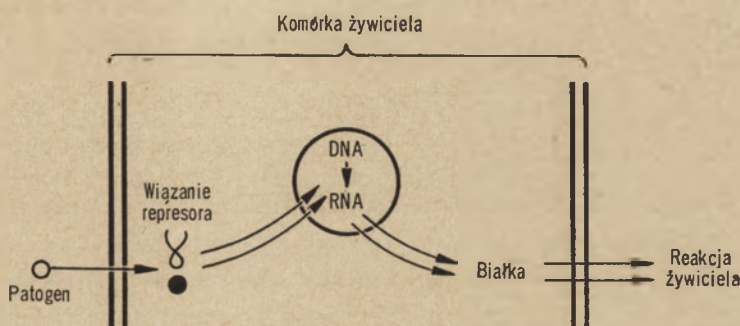
Także zmiany konformacyjne wywołane dimeryzacją tyminy pod wpływem działania promieni UV na DNA mogą zapoczątkować proces derepresji genu determinującego syntezę pizatyny, prawdopodobnie wskutek wzmożonej dysocjacji cząsteczek represora (42).

Można zatem przyjąć, że infekcja, podobnie jak pewne związki o charakterze antybiotyków, indukuje syntezę pizatyny, a indukcja ta, zgodnie z modelem Jacoba i Monoda (54), polega na selektywnej inhibicji represora i aktywacji odpowiedniego genu struktury determinującego ciągłą produkcję tej fitoaleksyny.

Jako induktory reakcji odpornościowej działają produkty uwalniane przez mikroorganizmy. Dla określenia tego typu związków Cruickshank (18) zaproponował termin „mykoantygeny”. Udało się nawet wyi-

zolać z *Monillia fructicola* związek, nazwany moniliakaliną A, który wywoływał derepresję genu warunkującego syntezę fazy u fasoli (19).

Wyjaśnienie mechanizmu reakcji odpornościowych u roślin w oparciu o teorię operonu zaproponował także K u ć (65) i M a h a d e v a n (70). Wskutek pojawiania się w tkankach rośliny pewnych związków specyficznych albo dla patogenu, albo dla współdziałania żywiciela—paszyt następuje wiązanie represora i synteza mRNA przez odpowiednie geny strukturalne, kierujące syntezą specyficznych enzymów (rysunek 1). Nie udało się jednakże dotąd wyizolować żadnego specyficznego mRNA, syntetyzowanego w następstwie infekcji.



Rys. 1. Mechanizm poinfekcyjnej derepresji genów odporności (wg 70)

Nieco odmienna interpretacja tego zjawiska sugeruje, że u roślin zdrowych aktywność operonu właściwego dla produkcji piazatyny jest regulowana przez nieustanną produkcję określonego represora, uniemożliwiającego ekspresję genu. Inhibicja syntezy represora prowadzi do odblokowania miejsca operatorowego i transkrypcji genów determinujących syntezę piazatyny (40).

Rozpatrując ten problem na płaszczyźnie genetycznej S c h w o c h a u i H a d w i g e r (11) stwierdzili, że współdziałanie żywiciela odporny—patogen obejmuje dominujący gen odporności żywiciela i dominujący gen braku wirulencji patogenu, ujawniający się produkcją metabolitów aktywujących gen odporności żywiciela. Natomiast gen zjadliwości patogenu powodowałyby rozkład lub przekształcanie tego typu metabolitów. Indukcja odporności u żywiciela przebiega drogą derepresji pewnych genów przez selektywne współdziałania z negatywnym mechanizmem regulacji genetycznej.

Regulacja działania genu lub genów odporności stwarza więc możliwość takiego przesunięcia kierunku przemian metabolicznych rośliny, które nie dopuszcza do wzajemnej tolerancji patogenu i żywiciela; tolerancja taka jest natomiast typowa dla roślin wrażliwych.

Ten hipotetyczny mechanizm reakcji odpornościowych nie ogranicza



się tylko do produkcji fitoaleksyn, ale dotyczy wszystkich typów reakcji odpornościowych i jest ogólny dla organizmów wyższych (111).

Produkcja fitoaleksyn, jakkolwiek ogromnie prawdopodobna i poparta dość logiczną hipotezą jest, jak sugerują badacze, procesem lokalnym obejmującym ognisko choroby i najbliższe jego sąsiedztwo. Wobec sprawców o niewielkiej zjadliwości, czyli wysokiej wrażliwości na tego typu związki, działanie fitoaleksyn prowadzące do zogniskowania choroby może być skuteczne. Istnieją jednak dane wskazujące, że reakcją na infekcję objęte są wszystkie tkanki i organy rośliny-żywiciela (37); porażenie korzeni jest związane z występowaniem zmian w metabolizmie odległych tkanek liści. Ponadto już z teorii fitoaleksyn wynika, że istnieją mikroorganizmy o wysokiej zjadliwości. Ich geny, determinujące produkcję swoistych „mykoantygenów” są trwale reprimowane (111) wobec czego nie mają zdolności współdziałania z genami odporności żywiciela i indukowania syntezy fitoaleksyn, chociaż z drugiej strony wiadomo, że nawet wobec tych wysoce zjadliwych patogenów istnieją odmiany odporne roślin. Wreszcie trudno wyjaśnić małą specyficzność fitoaleksyn w powiązaniu z genetycznym mechanizmem ich indukcji, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że wytwarzanie w analogicznym procesie przeciwciała u zwierząt charakteryzuje się wprost doskonałą specyficznością.

A zatem także fitoaleksyny nie spełniają wymagań uniwersalnych czynników odporności roślin. Mogą one, podobnie jak aleksyny i  $\beta$ -lizyny u zwierząt, stanowić kolejny etap reakcji obronnej, na jaką napotyka patogen po pokonaniu przeciwinwazyjnych barier fizjologicznych i barier chemicznych utworzonych z prohibityn, które z kolei można traktować jako odpowiedniki zwierzęcych leukin i plakin. Natomiast charakter podstawowego, decydującego etapu reakcji odpornościowej roślin pozostaje ciągle jeszcze nie wyjaśniony.

## VI. Odporność nabyta

Do niedawna utrzymywał się pogląd, że u roślin istnieją tylko nieliczne wypadki, kiedy pewne infekcje wywołują odporność na następne infekcje tym samym czynnikiem chorobotwórczym. Jako warunek takiej odporności przytaczano konieczność występowania w pozornie zdrowej tkance czynnika chorobotwórczego w stanie utajonym.

Wyniki badań podjętych w ostatnich kilku latach dostarczają coraz więcej dowodów, iż odporność nabyta roślin nie jest zjawiskiem wyjątkowym. Do częstych bowiem wypadków należy proces tak zwanej indukowanej odporności roślin polegający na indukowaniu przez infekcję niezjadliwymi lub słabo zjadliwymi rasami patogenów odporności przeciwko patogenom zjadliwym (11, 15, 39, 47, 48, 74, 92, 118). Na przykład niezjadliwa rasa *Phytophthora nicotianae* indukowała uszkodzenia typu nad-

wrażliwości na liściach *Peperonia*, które nie były już atakowane przez rasy zjadliwe tego grzyba (118). Także odporność różnych roślin wobec odpowiadających im form *Fusarium* wzrasta po inokulacji rasami niepatogenicznymi. Forma *F. callistephi* i *F. dianthi* była bardzo skuteczna w ochronie przed zjadliwą formą — *F. lycopersici* (74). Indukowanej odporności roślin towarzyszy pojawienie się nowych związków, przeważnie chemicznych niezidentyfikowanych (15, 48, 118), jakkolwiek istnieją przypuszczenia, że mogą to być fitoaleksyny (15, 92).

Wątpliwości dotyczące możliwości zastosowania teorii fitoaleksyn dla generalnego wyjaśnienia zjawisk odporności u roślin oraz przytoczone dane doświadczalne upoważniają do wniosku, że teoria fitoaleksyn w obecnej interpretacji zawiera elementy dwóch różnych procesów obronnych: etapu obrony niespecyficznego opartej na produkcji związków chemicznych o szerokim spektrum działania i dość znacznej toksyczności oraz etapu specyficznego reakcji na bodźce zewnętrzne uwarunkowanej wpływem swoistych „mykoantygenów” na aktywację określonych genów w komórkach żywiciela. Zainicjowana w ten sposób reakcja byłaby dość specyficzna, a wobec identycznych antygenów wykazywałaby określony okres trwania. Jest to więc równoznaczne z przypuszczeniem, że występowanie przeciwciał u roślin nie jest zjawiskiem zdecydowanie niemożliwym.

#### LITERATURA

1. Akazawa T., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 82 (1960).
2. Akazawa T., Wada K., *Plant Physiol.* **36**, 139 (1961).
3. Akinrefon O. A., *Phytopath. Z.* **63**, 153 (1968).
4. Allen E. H., *Phytopath. Z.* **69**, 151 (1970).
5. Allen E. H., Kuć J., *Phytopathology* **54**, 886 (1964).
6. Allen E. H., Kuć J., *Phytopathology* **58**, 776 (1968).
7. Andreew L. N., Shaw M., *Canad. J. Bot.* **43**, 1479 (1965).
8. Arneson P. A., Durbin R. D., *Plant Physiol.* **43**, 683 (1968).
9. Atsushi Hirai, Wildman S. G., *Virology* **31**, 721 (1967).
10. Barnes E. H., Williams E. B., *Phytopathology* **50**, 844 (1960).
11. Bell A. A., *Phytopathology* **59**, 1119 (1969).
12. Biehn W. L., Kuć J., Williams E. S., *Phytopathology* **57**, 804 (1967).
13. Biehn W. L., Kuć J., Williams E. B., *Phytopathology* **58**, 1255 (1968).
14. Boller A., Corrodi H., Gaumann E., Hardegger E., Kern H., Winterhalten-Wild N., *Helv. Chim. Acta* **40**, 1062 (1957).
15. Chamberlain D. W., Paxton J. D., *Phytopathology* **58**, 1349 (1968).
16. Condon P., Kuć J., *Phytopathology* **49**, 1596 (1959).
17. Cruickshank I. A. M., *Ann. Rev. Phytopathol.* **1**, 351 (1963).
18. Cruickshank L. A. M., *World Rev. Pest. Cont.* **5**, 161 (1966).
19. Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., *Life Sci.* **7**, 449 (1968).
20. Daly J. M., Sayre R. M., *Phytopathology* **47**, 163 (1957).



21. Davis D., Waggoner P. E., Dimond A. E., *Nature* **172**, 959 (1953).
22. Dezsi L., Palfi G., Farkas G. L., *Phytopath. Z.* **69**, 285 (1970).
23. Ezekiel W. N., Taubenhaus J. J., Fudge J. F., *Phytopathology* **22**, 459 (1932).
24. Farkas G. L., Kiraly Z., *Phytopath. Z.* **44**, 105 (1962).
25. Farkas G. L., Dezsi L. M., Horvath M., Kisban K., Udvardy J., *Phytopath. Z.* **49**, 343 (1964).
26. Farkas G. L., Kiraly Z., Solymosy P., *Virology* **12**, 408 (1960).
27. Farkas G. L., Ledingham G. A., *Can. J. Microbiol.* **5**, 37 (1959).
28. Farkas G. L., Matolscy G., Proc. V Intern. Bioch. Congr. Moscow, III, 393 (1961).
29. Farkas G. L., Stahmann M. A., *Phytopathology* **56**, 669 (1966).
30. Fehrman H., Dimond A. H., *Phytopathology* **57**, 69 (1967).
31. Fischer E., Gaumann E., *Die Biologie der Pflanzenbewohnenden parasitische Pilze*, Jena, 1928.
32. Flood A. E., Kirkham D. S., w *Phenolic in Plants in Health and Disease*, red. J. Pridham, Pergamon Press, Oxford 1960, str. 81.
33. Gamburg O. L., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 483 (1966).
34. Gäumann E., *Pflanzliche Infektionslehre*, Basel, 1951.
35. Gäumann E., *Nauka o chorobach infekcyjnych roślin*, PWRiL, Warszawa, 1959.
36. Goodman R. N., *Phytopathology* **58**, 872 (1968).
37. Grzelińska A., *Phytopath. Z.* **66**, 374 (1969).
38. Grzelińska A., *Phytopath. Z.* **69**, 212 (1970).
39. Hagwiger L. A., Mess S. L., Broembsen S., *Phytopathology* **60**, 332 (1970).
40. Hadwiger L. A., Schwochau M. E., *Phytopathology* **59**, 223 (1969).
41. Hadwiger L. A., Schwochau M. E., *Plant Physiol.* **47**, 346 (1971).
42. Hadwiger L. A., Schwochau M. E., *Plant Physiol.* **47**, 588 (1971).
43. Hampton R. E., *Phytopathology* **53**, 497 (1953).
44. Heitefus R., Stahmann M. A., Walker J. C., *Phytopathology* **50**, 370 (1960).
45. Held A., Kedar N., Kirk Y., *Phytopathology* **55**, 970 (1965).
46. Hermann H., *Phytopath. Z.* **33**, 349 (1958).
47. Higgins V. J., Millar R. L., *Phytopathology* **58**, 1377 (1968).
48. Higgins V. J., Millar R. L., *Phytopathology* **60**, 269 (1970).
49. Hildebrand D. C., Schroth M. N., *Phytopathology* **54**, 59 (1964).
50. Hold M. J., *Sci Food Agric.* **8**, 553 (1957).
51. Holme A. C., Bodney K. L., w *Phenolic in Plants in Health and Disease*. red. J. B. Pridham, Pergamon Press, Oxford, 1960, str. 87.
52. Huber D. M., Andersen A. L., *Phytopathology* **54**, 896 (1964).
53. Hughes J. C., Swain T., *Phytopathology* **50**, 398 (1960).
54. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
55. Johnson G., Schall L. A., *Science* **115**, 627 (1952).
56. Johnson L. Johnson L. B., Braunman B. L., Zscheile F. P., *Phytopathology*, **56**, 1405 (1966).
57. Kawashima N., Uritani I., *Agric. Biol. Chem.* **27**, 409 (1963).
58. Kawashima N., Hyodo H., Uritani I., *Phytopathology* **54**, 1086 (1964).
59. Kern H., *Phytopath. Z.* **19**, 351 (1952).
60. Kiraly Z., *Phytopath. Z.* **35**, 23 (1959).
61. Kiraly Z., Farkas G. L., *Phytopathology* **52**, 657 (1962).
62. Klement Z., Goodman R. N., *Ann. Rev. Phytopathol.* **5**, 17 (1967).

- 62a. Kochman J., *Biuletyn IHAR* 4—5 (1959).
63. Kosuge Tsune, *Ann. Rev. Phytopathol.* 7, 195 (1969).
64. Kuć J., *Phytopathology* 97, 676 (1957).
65. Kuć J., *Ann. Rev. Microbiol.* 20, 337 (1966).
66. Lingens F., *Angew. Chem.* 7, 350 (1968).
67. Lipsite D. V., Proc. V Intern. Congr. Bioch. Moscow IX, 383 (1963).
68. Lovrekovich L., Lovrekovich H., Stahmann M. A., *Phytopathology* 57, 737 (1967).
69. Lyr H., *Phytopath. Z.* 52, 229 (1965).
70. Mahadevan A., *J. Sci. Ind. Res.* 29, 36 (1970).
71. Mahadevan A., *Phytopath. Z.* 68, 73 (1970).
72. Maine E. C., Kelman A., *Phytopathology* 50, 645 (1960).
73. Matta A., Dimand A. B., *Phytopathology* 53, 574 (1963).
74. Matta A., Gentile I., Gisi I., *Phytopathology* 59, 512 (1969).
75. Maxwell D. P., Bateman D. F., *Phytopathology* 57, 123 (1967).
76. Minamikawa T., Uritani I., *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 573 (1964).
77. Müller K. O., Börger H., *Arb. Biol. Reichsanst. Land und Forstwirt.* 23, 189 (1940).
78. Müller K. O., Behr L., *Nature* 173, 498 (1949).
79. Nazirow N. N., Zapruder F. G., Dżanikułow F., *Uzbek. Biol. Zn.* 5, 45 (1961).
80. Neish A. C., *Ann. Rev. Phytopathol.* 7, 195 (1969).
81. Nemeth J., Klement Z., Farkas G. L., *Phytopath. Z.* 65, 267 (1969).
82. Novacky A., Hampton R., *Phytopathology* 58, 301 (1968).
83. Noveroska R. L., Williams E. B., Kuć J., *Phytopathology* 54, 98 (1964).
84. Okanencko A. S., Bershtein B. J., Reingard T. A., Proc. V Intern. Congr. Bioch. Moscow, IX, 386 (1963).
85. Okasha M. A., Kyugo K., Bringham R. S., *Phytopathology* 58, 1118 (1968).
86. Parish C. L., Zaitlin M., Siegel A., *Virology* 26, 413 (1963).
87. Patil S. S., Dimond A. F., *Phytopathology* 57, 492 (1967).
88. Patil S. S., Pawelson R. L., Young A. N., *Phytopathology* 54, 531 (1964).
89. Perrin O. R., *Tetrahedron Lett.* 1, 29 (1964).
90. Perrin D. R., Bottomley W. J., *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1919 (1962).
91. Perrin D. R., Cruickshank I. A. M., *Aust. J. Biol. Sci.* 18, 803 (1965).
92. Pierre R. E., *Phytopathology* 61, 322 (1971).
93. Pryor D. E., Walker J. C., Stahmann M. A., *Am. J. Bot.* 27, 30 (1940).
94. Raa J., *Neth. J. Plant. Pathol.* 74, 37 (1968).
95. Rai J. N., Sinka A. K., Tevari A. K., *Phytopath. Z.* 61, 49 (1968).
96. Ramakrishna L., *Phytopath. Z.* 55, 297 (1966).
97. Rama Krishna Rao N., Shaumugasundaran E. R. B., *Phytopath. Z.* 57, 183 (1966).
98. Rautela G. S., Payne M. G., *Phytopathology* 60, 238 (1970).
99. Reyes L. O., Schomburgh E. S., Munoz A., *Chem. Abs.* 68, 10294 (1968).
100. Rubin B. A., Arcichowska E. W., *Biochimizeskaja Charakteristika Ustoiczivosti Rastienij k Mikroorganizmom, Izdatielstwo Wysszaja Szkoła, Moskwa* 1948.
101. Rubin B. A., Wolobiewa N. P., *Dok. Akad. Nauk. SSSR* 79, 637 (1951).
102. Rubin B. A., Aksenowa W. A., *Biochimija* 22, 202 (1957).
103. Rubin B. A., Mietlitski L. W., Salkowa E. G., Muchin B. N.,



- Korablewa H. P., Morozowa N. P., *Bioch. Plodow i Owoszczy* 5, 5 (1959).
104. Rubin B. A., Arcichowska E. W., *Phytopath. Z.* 58, 101 (1967).
  105. Rubin B., Arcichowska J., *Biochemia i Fizjologia Odporności Roślin*, PWRiL, Warszawa, 1971.
  106. Rudolph K., Stahmann M. A., *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 71, 107 (1964).
  107. Scheffer R. P., Walker J. C., *Phytopathology* 43, 116 (1953).
  108. Schmidt M., *Planta* 20, 407 (1933).
  109. Schneider A., *Naturwissenschaften* 39, 452 (1952).
  110. Schwochau M. E., Hadwiger L. A., *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 731 (1968).
  111. Schwochau E. M., Hadwiger L. A., *Recent Advances Phytochem.* 3, 181 (1970).
  112. Seevers P. M., Daly J. M., *Phytopathology* 60, 1322 (1970).
  113. Seevers P. M., Daly J. M., *Phytopathology* 80, 1642 (1970).
  114. Sequeira L., *Phytopathology* 59, 473 (1969).
  115. Shannon L. M., Uritani I., Laiaseki H., *Plant Physiol.* 47, 493 (1971).
  116. Shaw M., Samborski D. J., *Can. J. Bot.* 35, 389 (1957).
  117. Simons J. T., Ross A. F., *Phytopathology* 61, 293 (1971).
  118. Siradhana B. S., Schmitthenner A. F., Ellet C., *Phytopathology* 59, 405 (1969).
  119. Skinner F. A., w *Modern Methods of Plant Analysis*, red. K. Paech, M. V. Tracey, Springer, Berlin 1955, t. 3, str. 626.
  120. Solymosy F., Szirma J., Beczner L., Parkas G. L., *Virology* 32, 117 (1967).
  121. Sondheimer E., *Phytopathology* 51, 71 (1961).
  122. Stahmann M. A., Clare B. G., *Plant Physiol.* 41, 1505 (1966).
  123. Stahmann M. A., Link K. P., Walker J. C., *J. Agric. Res.* 67, 49 (1943).
  124. Stahmann M. A., Uritani I., Tomiyama K., *Phytopathology* 50, 655 (1960).
  125. Staples R. C., Stahmann M. A., *Phytopathology* 54, 760 (1964).
  126. Stavety J. R., Hansen E. W., *Phytopathology* 57, 482 (1967).
  127. Stoessl A., *Recent Advances Phytochem.* 3, 143 (1970).
  128. Tonkin B. P., (1942), *Biochemia i Fizjologia Odporności Roślin*, PWRiL, Warszawa, 1971.
  129. Trzebiński J., *Biuletyn IHAR* 4—5 (1959).
  130. Umaerus V., *Am. Potato J.*, 36, 124 (1959).
  131. Uritani I., Stahmann M. A., *Plant Physiol.* 36, 770 (1961).
  132. Walker J. C., Stahmann M. A., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6, 351 (1955).
  133. Webb J. L., *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, Academic Press, New York, 1966, t. 3, str. 421.
  134. Weber C. J., Bruce Clare, Stahmann M. A., *Phytopathology* 57, 421 (1967).
  135. Wheeler H., Henckey P., *Ann. Rev. Phytopathol.* 6, 331 (1968).
  136. Zucker M., *Plant Physiol.* 40, 779 (1965).

## SPRAWOZDANIE

### Niektóre aktualne problemy neurochemii na marginesie

#### III Międzynarodowego Kongresu Neurochemii

W dniach 5—9 lipca 1971 roku odbył się w Budapeszcie III Kongres Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemicznego. Wzięło w nim udział ponad 600 pracowników naukowych z całego świata.

Tematyka Kongresu obejmowała zagadnienia z neurochemii, neurofarmakologii, neuroanatomii, neurocytologii i biochemii klinicznej układu nerwowego. Obrady toczyły się w ramach 6 sympozjów, 21 posiedzeń sekcyjnych (na których zostało wygłoszonych około 400 komunikatów zgrupowanych tematycznie) i 8 konferencji „Okrągłego Stołu”. Sympozja, prowadzone przez najwybitniejszych specjalistów danego zagadnienia, dotyczyły następujących działów neurobiologii:

- I. Białka ośrodkowego układu nerwowego (organizatorzy: P. Mandel — Francja; E. M. Shooter — USA; F. O. Schmitt — USA).
- II. Biochemiczne mechanizmy działania leków w ośrodkowym układzie nerwowym (organizatorzy: R. Paoletti — Włochy; Z. S. Herman — Polska).
- III. Kompartmentacja w układzie nerwowym (organizator: A. Lajtha — USA).
- IV. Białka mielin (organizator: A. N. Davison — Anglia).
- V. Patologia chemiczna, ze szczególnym uwzględnieniem zjawisk immunochemicznych w schorzeniach neurologicznych (organizator: H. J. Bauer — NRF).
- VI. Biochemia synapsy (organizator: V. P. Whittaker — Anglia).

Podobnie jak w innych dziedzinach również i w neurochemii, białka zajmują szczególną pozycję i im też poświęcono wiele uwagi na Kongresie. Białka enzymatyczne zaangażowane w metabolizmie neurotransmiterów są ze względów zrozumiałych przedmiotem zainteresowania neurochemików. Niemniej jednak i inne enzymy, w tym głównie ATPaza, wiążą się ściśle ze specyficzną funkcją układu nerwowego. W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się białkom specyficznym dla układu nerwowego.

Jeden z pierwszych referatów Sympozjum Białkowego poświęcony był omówieniu aktualnych wyników, dotyczących ustalenia struktury czyn-



nika 7S NGF, stymulującego wzrost neurytów (*Nerve Growth Factor* — NGF). Istnienie białka, które stymuluje wzrost neurytów w hodowlach tkankowych, jest faktem znanym od wielu lat. Obecność białka NGF została wykazana w tkance mięsaka myszy, w jądzie węzowym oraz w gruczołach podszczękowych samców myszy, gdzie ilość tego białka jest szczególnie duża. W ekstraktach tych ostatnich aktywność NGF związana jest ściśle z określonym kompleksem białkowym 7S.

Obecnie wiadomo, że 7S NGF składa się z trzech typów podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Tylko podjednostka  $\beta$  ujawnia prawdziwą aktywność stymulującą wzrost neurytów. Podjednostka  $\gamma$ , najmniej poznana, wykazuje zdolność stymulowania wzrostu embrionalnych fibroblastów w hodowlach *in vitro*, a także posiada pewne właściwości esteropeptydazowe. Podjednostka  $\alpha$  spełnia rolę czynnika zabezpieczającego komórki nerwowe podczas ich dysocjacji z embrionalnych zwojów rdzenia kręgowego.

Udało się (Veron S., Nomura J., Shooter E. M.) uzyskać rekonstrukcję białka 7S NGF z poszczególnych podjednostek, nawet w obecności dużego nadmiaru innych białek. Ustalono skład aminokwasowy izolowanych podjednostek  $\alpha$ ; po redukcji i karboksymetylacji otrzymano dwa łańcuchy peptydowe o ciężarze cząsteczkowym 10 500 i 17 500 daltonów. Skład aminokwasowy tych dwóch łańcuchów był różny, lecz suma aminokwasów w obydwóch łańcuchach była równa sumie aminokwasów całej podjednostki. W białku tym nie wykryto wolnych grup sulfhydrylowych, natomiast stwierdzono obecność 7 mostków dwusiarczkowych.

Podjednostka  $\beta$  zawiera dwa prawdopodobnie identyczne łańcuchy peptydowe, każdy z trzema wewnątrzcząsteczkowymi mostkami dwusiarczkowymi. Podjednostki  $\beta$  wykazują zdolność do polimeryzacji i być może ta właściwość jest przyczyną różnic w wynikach badań przeprowadzonych na różnych preparatach NGF przez poszczególnych autorów.

W preparatach otrzymanych metodą Angeletti i wsp. białko NGF 2,5S posiadało ciężar cząsteczkowy 28 000 daltonów i można je było podzielić na dwa identyczne fragmenty o ciężarze cząsteczkowym 14 000 daltonów.

W każdej podjednostce występują trzy wewnątrzłańcuchowe mostki dwusiarczkowe, a N-końcowym aminokwasem jest seryna. Aktualnie prowadzone są prace nad ustaleniem sekwencji aminokwasowej w poszczególnych łańcuchach peptydowych. Czynnione są również sugestie na temat udziału reszt histydynowych i tryptofanowych w funkcjonalnej aktywności tego białka.

Oprócz znanych efektów NGF na hodowlę tkanki nerwowej *in vitro*, przeprowadzono również badania *in vivo* nad działaniem tego czynnika na komórki nerwów sympatycznych. Wynika z nich, że NGF stymuluje u myszy syntezę adrenergicznych neurotransmiterów przez częściową indukcję takich enzymów jak  $\beta$ -hydroksylazy tyrozyny i dopaminy. Przy zastosowaniu czułych metod immunologicznych wykazano, że w tkankach

myszy NGF kumuluje się głównie we frakcji mikrosomalnej (Angeletti P.U.).

Efekt biologiczny działania NGF został dobrze poznany, a zmiany morfologiczne wywołane tym czynnikiem były opisane w szczegółach. Natomiast mechanizm działania NGF na poziomie molekularnym jest mało znany. Z ogólnych danych wynika, że NGF stymuluje zarówno procesy oksydacyjne jak i syntetyczne w embrionalnych zwojach czuciowych. Ponieważ NGF stymuluje wzrost komórek w hodowlach *in vitro* w obecności aktynomycyny D, można sądzić, że jego działanie nie jest związane z syntezą RNA *de novo*. Przedstawione w sympozjalnych referatach wyniki badań wielu autorów wskazują na znaczne osiągnięcia w dziedzinie poznania budowy chemicznej i struktury tego ze wszech miar interesującego białka.

Niektóre referaty poświęcone były fibrylarnym białkom neurofilamentów i mikrotubuli, charakterystycznych mikrostruktur neuronów. Różnice morfologiczne tych struktur znajdują swój wyraz w różnicach izolowanych z nich białek. W przeciwieństwie do białek neurofilamentów białka z neurotubuli, tzw. neurotubulina (podobnie jak białka mikrotubuli np. z aparatu mitotycznego różnych komórek) posiada zdolność wiązania kolchicyny i GTP. Neurotubulinę można selektywnie wytrącić z roztworu białek rozpuszczalnych przy pomocy alkaloidu — vinblastyny. Neurotubulina, jak wykazano w pracowni Shelanskiego (USA), jest dimerem o masie cząsteczkowej 110 000 składającym się z dwóch nieidentycznych monomerów. Pomimo, że mechanizm działania kolchicyny i vinblastyny na neurotubulinę nie jest jeszcze wystarczająco poznany, można jednak wiązać go ze zmianami konformacyjnymi białka, co z kolei być może pociąga za sobą zmiany funkcjonalne neurotubuli. Jak dotychczas nie udało się uzyskać repolimeryzacji podjednostek neurotubuliny.

Skład aminokwasowy obydwu podjednostek jest bardzo podobny, a porównanie map peptydowych wykazało znaczne podobieństwo między neurotubulinami pochodzącymi z różnych gatunków zwierząt. Białko neurotubularne zawiera około 6% heksozaminy i 1% cukrów obojętnych. Nie wykazano natomiast kwasu sialowego.

Podjednostki neurotubularnych białek podlegają fosforylacji na resztach serynowych. Reakcję tę przeprowadzono *in vitro* i przebiegała ona w obecności ATP i mózgowej kinazy proteinowej stymulowanej przez cykliczny AMP. Preparaty białek neurotubularnych wykazują pewną aktywność kinazy proteinowej, jednakże nie wiadomo czy fakt ten jest następstwem kontaminacji, czy też właściwością samego białka. W całym mózgu jak również i we frakcji synaptosomów neurotubulina stanowi około 15% białek rozpuszczalnych, przy czym zawartość tego białka zmniejsza się w czasie wzrostu zwierzęcia (Shelanski i wsp.).

Oprócz neurotubuliny zdolność wiązania kolchicyny wykazują w móz-



gu również pewne białka strukturalne, nierozpuszczalne frakcje lizowanych synaptosomów i niektóre frakcje błon.

Z neurofilamentów włókien olbrzymich wyizolowano (Davison i wsp.) białko o ciężarze cząsteczkowym 96 000 daltonów. Jedna z podjednostek posiada ciężar cząsteczkowy 45 000 daltonów i jest białkiem kwaśnym. Druga podjednostka charakteryzuje się wyższą zawartością seryny częściowo ufosforylowanej. Chociaż skład aminokwasowy białek neurofilamentowych jest podobny do składu aminokwasowego neurotubuliny, to jednak brak aktywności w wiązaniu kolchicyny i GTP różni je zasadniczo od białek neurotubularnych. Ostatnio w pracowni Shelańskiego opracowano metodę izolacji neurofilamentów z aksonów mózgow ssaków. Badania nad bliższym poznaniem struktury tych białek są aktualnie prowadzone w licznych laboratoriach.

Szczególne zainteresowanie neurochemików skupia się na białkach specyficznych dla tkanki mózgowej. Do chwili obecnej bliżej poznano dwa białka specyficzne dla systemu nerwowego, a nazwane umownie białkiem *S-100* i białkiem *14-3-2* (B. W. Moore). Są to białka o charakterze kwaśnym i występują w mózgu w stężeniu tysiąckrotnie wyższym niż w innych tkankach, przy czym białko *14-3-2* jest około 3—4 razy więcej niż białko *S-100*. Na podstawie immunologicznych reakcji krzyżowych obecność białka *S-100* stwierdzono w mózgu kręgowców i bezkręgowców, natomiast białko *14-3-2* u ssaków i ptaków, nie zaobserwowano go natomiast u ryb i gadów. W trakcie ontogenezy białko to pojawia się wraz z rozpoczęciem aktywności fizjologicznej mózgu (Warecka, NRF). W przeciwieństwie do białka *S-100*, białko *14-3-2* występuje głównie w substancji szarej mózgu a tylko w ilościach śladowych można je wykryć w istocie białej. Szereg danych doświadczalnych potwierdza neuronalne pochodzenie białka *14-3-2* (B. W. Moore i T. J. Cicero).

Białko *S-100* posiada ciężar cząsteczkowy 21 000 daltonów i składa się z trzech podjednostek o ciężarze cząsteczkowym około 7 000. Białko to ma charakter kwaśny i zawiera duże ilości kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego. Jest to typowe białko globularne, które zachowuje pewną termostabilność w obecności EDTA, jonów wapnia lub 2-merkaptotetanolu. Białko to wiąże specyficznie dwa jony wapniowe jako wynik odsłoniętych strukturalnych grup sulfhydrylowych i jednej reszty tryptofanowej. Konformacyjne zmiany cząsteczki białka pociągają za sobą pojawianie się kilku pasm elektroforetycznych, których obecność sugeruje istnienie pewnych różnic w pierwotnej strukturze tej rodziny białek. Tak więc preparaty białek *S-100* wykazują elektroforetyczną heterogenność, której stopień jest różny w preparatach pochodzących z różnych gatunków. Białko *14-3-2* w przeciwieństwie do białka *S-100* nie wiąże jonów wapnia i posiada wyższy ciężar cząsteczkowy, co być może spowodowane jest większą zdolnością do tworzenia form polimerycznych. Obecnie czynione są próby ustalenia relacji między zawartością białka mózgo-

wo-specyficznego a patogenezą niektórych schorzeń centralnego układu nerwowego (Warecka K.).

Inne białko mózgowo-specyficzne (10B) o charakterze glikoproteidu zostało wydzielone z mózgu ludzkiego. Z mózgu gołębia, udało się wydzielić (S. Bogoch, USA) dwa białka, 10B<sub>I</sub> i 10B<sub>II</sub>, różniące się nieznacznie swym składem aminokwasowym, lecz wykazujące różnice w składzie komponenty węglowodanowej. Białko to jest pochodzenia glejowego i występuje głównie w astrocytach. Sugeruje się, że być może uczestniczy ono w procesach kodowania informacji oraz w funkcjach kontaktowych komórek, o czym mogłyby świadczyć zmiany w składzie cukrowcowym preparatów otrzymanych z guzów mózgowych, a więc tkanki, która podlega regresji funkcjonalnej.

Struktury mielinowe centralnego układu nerwowego zawierają proteolipidy i białka zasadowe (Folch-Pi). Charakterystycznym dla komponenty białkowej proteolipidów jest niska zawartość aminokwasów zasadowych i kwaśnych, a duże stężenie aminokwasów obojętnych i aromatycznych. Białko to posiada strukturę helikoidalną, a badania elektroforetyczne wskazują na to, że pewna heterogenność proteolipidów dotyczy raczej wielkości cząsteczki, a nie różnic w ładunkach. Ciężar cząsteczkowy tego białka określa się na około 35 000 daltonów.

Wśród białek związanych ze strukturami mielinowymi szczególnie dużo uwagi poświęca się białkom zasadowym. Zainteresowanie to wynika ze znanego efektu biologicznego jakie te białka wywołują. W określonych warunkach eksperymentalnych zasadowe białko mielinowe wstrzyknięte innemu zwierzęciu doświadczalnemu wywołuje objawy alergicznego zapalenia mózgu (EAE — *experimental allergic encephalomyelitis*). Zmiany wywołane tym sposobem w mózgu mają typowy obraz neuroalergii i są raczej objawem nadwrażliwości, aniżeli efektem działania krążących przeciwciał. Opisany eksperymentalny efekt zasadowego białka mielinowego jest szczególnie dogodnym modelem w badaniach nad patologicznymi zmianami mielinizacyjnymi w organizmie człowieka (*sclerosis multiplex* itp.). Nic więc dziwnego, że białko to zostało wydzielone, oczyszczone i pod wieloma względami ściśle zdefiniowane. Zasadowe białka mielinowe izolowane z mózgu człowieka, wołu, świnki morskiej i królika posiadają jednakowy ciężar cząsteczkowy, identyczną migrację elektroforetyczną, skład aminokwasowy i aktywność biologiczną. Pewne różnice w wielkości masy cząsteczkowej uzyskiwane przez różnych autorów spowodowane są najczęściej destrukcyjnym działaniem kwaśnych proteaz na białko zasadowe w trakcie jego izolacji. Białko to składa się z 170 reszt aminokwasowych o przewodze aminokwasów zasadowych. Ciężar cząsteczkowy wynosi 18 000 daltonów, a punkt izoelektryczny 10,6. Pełna sekwencja aminokwasowa mielinowego białka zasadowego została określona przez Eylara. Doświadczenia z trawieniem kwaśną proteazą białka zasadowego wykazały, że tylko niewielki fragment łańcucha polipeptydowego, składa-



jący się z 45 reszt aminokwasowych, odpowiedzialny jest za efekt biologiczny. Chemiczna modyfikacja niektórych reszt aminokwasowych w łańcuchu peptydowym wykazała, że w cząsteczce istnieją dwie determinanty odpowiedzialne za efekt biologiczny, przy czym jedna z nich zawiera jedyną w składzie aminokwasowym resztę tryptofanową. Przedstawiono również dane, z których wynika, że łańcuchy peptydowe nawet o mniejszej ilości aminokwasów posiadają aktywność biologiczną u niektórych zwierząt pod warunkiem, że zawsze jest w tym łańcuchu reszta tryptofanowa.

Inne białka zasadowe nie związane ze strukturami mielinowymi, to białka rybosomalne i jądrowe. Wykazano (Borkowski T., Stryjecka M. i Sanecka-Obacz M.), że mimo pewnego podobieństwa białek zasadowych obydwu struktur istnieją wyraźne różnice w ilości poszczególnych frakcji jak i w szybkości inkorporacji radioaktywnej lizyny. Stwierdzono również, że zarówno histony mózgowe jak i białka rybosomalne wbudowują <sup>32</sup>P przy czym proces ten przebiega w niejednakowym rytmie.

Konferencje „Okrągłego Stołu” miały charakter interdyscyplinarny i cieszyły się ogromnym zainteresowaniem. Jedna z nich, pt. *Neurochemiczne podłoże pamięci i procesów uczenia się* została zorganizowana przez Agranoffa (USA) wybitnego specjalistę z tej dziedziny wiedzy. Dyskusja na Konferencji jak i na sekcji poświęconej tym zagadnieniom dotyczyła wielu aktualnych problemów. Do najważniejszych pytań, na które próbowano odpowiedzieć można zaliczyć następujące: czy zmiany biochemiczne w mózgu zaobserwowane w badanej sytuacji doświadczalnej są specyficzne dla procesów uczenia się, czy też są związane z jakimiś innymi czynnikami towarzyszącymi eksperymentom, np. stresem i związanymi z nim zmianami hormonalnymi, lub zwiększoną aktywnością ruchową (Jakoubek, Czechosłowacja). Z tego punktu widzenia były m. in. rozpatrywane dane V. E. Shashoua (USA), który w doświadczeniach wykonanych na złotej rybce wykazał, że w dwóch różnych sytuacjach behawioralnych tworzy się nowe RNA o stałej sedymentacji 13-14S. Zjawisko to zaobserwował on nie tylko podczas uczenia nowego sposobu pływania, lecz również po próbach wykonywania zadania, które było niemożliwe do wypełnienia. Chociaż zaobserwowane zmiany w RNA okazały się niespecyficzne, to jednak wydaje się, że mają one jakiś związek z utwaleniem zdobytych informacji. Podobne znaczenie mają wyniki pracy S. P. R. Rosago i wsp., którzy wykazali, że u kurcząt pod wpływem tzw. *imprinting* zwiększa się aktywność polimerazy RNA w określonych jądrach przodomózgowia. Jednakże autorzy nie mogli wykluczyć, że zaobserwowane przez nich zmiany biochemiczne związane są z bezpośrednim działaniem bodźca świetlnego stosowanego w doświadczeniach. Niewątpliwym jednak osiągnięciem było wykazanie, że badanej przez nich sytuacji behawioralnej towarzyszyła następująca sekwencja zmian biochemicznych w badanych przez nich jądrach mózgu:

1. wzrost aktywności polimerazy RNA,
2. wzmożona inkorporacja prekursorów do RNA,
3. zwiększona inkorporacja aminokwasów do białek.

Inni autorzy (Glassman i wsp., USA) stwierdzili, że pod wpływem krótkotrwałego treningu powstaje w mózgu ufosforylowane białko o bardzo krótkim okresie półtrwania. Jednakże podobnie jak i w innych pracach, ewentualnego wpływu czynników emocjonalnych nie można wykluczyć.

Prócz danych wskazujących, że procesom uczenia się towarzyszą w mózgu zmiany w metabolizmie RNA i białek, na Kongresie omawiane były dalsze wyniki prac Ungara (USA). Jak wiadomo autor ten od szeregu lat pracuje nad zagadnieniem chemicznego transferu informacji zdobytych w procesie uczenia się. Stosując u gryzoni test unikania ciemności, Ungar wyizolował z mózgu zwierząt trenowanych peptyd, który uważa za związany z procesem uczenia się zwierząt. Peptyd ten, który w mózgu występuje w kompleksie z RNA, zastrzyknięty zwierzętom „naiwnym” powodował u nich przyspieszenie opanowywania testu. Ungar nie tylko określił sekwencję aminokwasów omawianego peptydu, lecz także zsyntetyzował go. Nieznaczne nawet zmiany w cząsteczce peptydu (np. amidowanie niektórych grup aminokwasów) zmieniało stopień aktywności biologicznej preparatu, nazwanego przez Ungara scotofobiną (od greckiego: *scotos* — ciemność, *fobia* — lęk). Ungar sądzi, że informacje zakodowane są w sekwencji aminokwasów peptydu, podobnie jak sens wyrazu określony jest kolejnością liter. Peptydy czynne w transferze informacji nazwał autor cząsteczkami kodującymi, przy czym wyraża pogląd, że prawdopodobnie istnieje cała rodzina peptydów, dotychczas jeszcze nie poznanych, które mają podobne biologiczne właściwości do scotofobiny. Wyniki badań Ungara mają zarówno wielu zwolenników jak i przeciwników.

Z tego krótkiego przeglądu ważniejszych danych z Kongresu na temat zmian biochemicznych w mózgu związanych z procesem uczenia się wynika, że dotychczas brak jest odpowiedniego modelu doświadczalnego, który mógłby być jednoznacznie interpretowany. Wydaje się, że w wielu przypadkach badane są struktury mózgu, które nie są bezpośrednio związane ze stosowanym testem i to również może być przyczyną obserwowania tylko nieznacznych zmian biochemicznych wykrywanych w wielu przypadkach jedynie przy stosowaniu analizy statystycznej. Udział białek w tworzeniu się śladów pamięciowych wydaje się dość pewny, co nie przesądza, że w przyszłości uda się być może natrafić na bardziej specyficzne wskaźniki biochemiczne.

Większość neurobiologów uważa, że na synapsach mogą powstawać trwałe zmiany wywołane funkcjonalną aktywnością i że zmiany te mogą odgrywać ważną rolę w procesach uczenia się i w zjawiskach związanych z pamięcią. Stąd też dodatkowe zainteresowanie ultrastrukturą i biochemią synaps. Temu zagadnieniu poświęcone było specjalne sympozjum



i szereg komunikatów referowanych na kilku sekcjach. Poruszane problemy wiązały się z właściwościami pęcherzyków synaptycznych, z techniką otrzymywania czystych frakcji subkomórkowych, jak i oddzielania gleju od neuronów. Szereg ośrodków zarówno europejskich jak i amerykańskich opracowuje obecnie coraz lepsze, bardziej precyzyjne metody. Do przodujących ośrodków w tym zakresie należą laboratoria w Cambridge (Whittaker), w Göteborgu (Hamberger), w Strasburgu (Mandel) i inne. Czynione są również próby wykrywania różnic biochemicznych pomiędzy glejem a neuronami (między innymi Rose, Lodin). Pracownie skandynawskie, znane od dawna z świetnie opracowanych ultramikrometod, nadal dostosowują je do układu nerwowego; podobne techniki opracowywane są w Getyndze (Neuhoff). Techniki te budzą wprawdzie podziw swą precyzją, nie wydaje się jednak, by w przyszłości neurochemia mogła korzystać z nich na większą skalę ze względu na ogromne, trudne narazie do wytłumaczenia różnice w poszczególnych komórkach, należących do tej samej populacji.

Jedna z sekcji poświęcona była zagadnieniom związanym z mechanizmem transportu składników w aksonach. Jak wiadomo, większość białek syntetyzowana jest w perikaryonach, a następnie przenoszona wzdłuż aksonów do zakończeń nerwowych. Szybkość transportu badana różnymi metodami (przeważnie za pomocą substancji znakowanych) została określona w wielu pracowniach i obecnie na ogół się przyjmuje, że różne składniki poruszają się różną szybkością, która waha się od kilku do kilkuset milimetrów na dobę.

Przez niektórych autorów postulowany jest dwukierunkowy ruch w aksonach. Ostatnio określono szybkość transportu esterazy acetylocholinowej w nerwach psa w kierunku proksymalnym i odwrotnym na 260 i 134 mm na 24 godz. (L. Lubińska i S. Niemierko, 1971). Sjöstrand z pracowni w Göteborgu przedstawił na Zjeździe wyniki swoich doświadczeń przeprowadzonych za pomocą zupełnie innych metod, które potwierdziły powyżej przytoczone szybkości transportu w aksonach. Kilku autorów (między innymi Kreutzberg, Cuenod, Marchio) przedstawiło dane wskazujące, że podanie *in vivo* kolchicyny lub vinblastyny, które jak omówiono to wyżej wiążą się z neurotubuliną, hamują lub zwalniają transport, zwłaszcza szybki. Na zasadzie tych danych wysuwany jest pogląd, że szybki ruch składników aksoplazmy związany jest z obecnością neurotubuli.

Podobnie jak i na innych zjazdach biochemicznych zagadnienie błon biologicznych było przedmiotem licznych komunikatów wiążących się ściśle z biochemią lipidów. Dużo uwagi poświęcono również neurotransmitterom i enzymom związanym zarówno z ich syntezą jak i rozpadem.

Konieczność przeprowadzania obrad jednocześnie w kilku sekcjach i sympozjach zmuszała niestety uczestników do brania udziału tylko w części posiedzeń, a o bardzo dużym dorobku Zjazdu, w wielu przypadkach można się było zorientować tylko ogólnie.

## KOMUNIKATY

Komitet Organizacyjny  
III Konferencji Naukowej  
Sekcji Płodności i Niepłodności  
Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego  
Białystok  
ul. M. C. Skłodowskiej 24a, tel. 209-82

### Komunikat

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego powiadamia, że sekcja Płodności i Niepłodności PTG organizuje w maju lub czerwcu 1973 r. w Białowieży III Konferencję Naukową na temat „Mechanizmy warunkujące zapłodnienie komórki jajowej”.

Przedmiot obrad będą stanowiły: fizjologia dojrzewania komórki jajowej, transport, zapłodnienie, rola prostaglandyn, kapacytacji plemników oraz inne zagadnienia związane z zapłodnieniem komórki jajowej, jak wpływ hormonów białkowych i sterydowych, aspekty biochemiczne i genetyczne etc.

Komitet Organizacyjny przewiduje wydrukowanie nadesłanych prac przed Konferencją, przy czym winny one spełniać następujące warunki:

1. Maszynopis pracy o objętości nieprzekraczającej 5 stron (łącznie z materiałem ilustracyjnym i piśmiennictwem), pisany na papierze formatu A-4 w odstępach jednowierszowych, z lewym marginesem 3 cm.
2. Ryciny winny być wykonane na białym kartonie technicznym lub na kalce technicznej w skali 1:1. Liternictwo na rysunkach i szkicach tylko pismem technicznym. Podpisy do fotografii i wykresów muszą być napisane na oddzielnej kartce.
3. Zdjęcia kontrastowe, biało-czarne, najlepiej w skali 1:1.
4. Maszynopisy prac winny być nadesłane do Komitetu Organizacyjnego do dn. 30.I.73 r. (2 egzemplarze).
5. Załączyć streszczenie w języku angielskim.

Komitet Organizacyjny prosi o zgłoszenie tematów na III Konferencję Sekcji Płodności i Niepłodności PTG do dnia 15.XII.1972 r.

Przewodniczący

Sekcji Płodności i Niepłodności  
Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego  
Prof. dr habil. Aleksander Krawczuk



## POSTĘPY BIOCHEMII

January 1973

### ARTICLES IN POLISH

Volume 19	Number 1
In Commemoration of Professor Bolesław Skarżyński . . . . .	
C. Cierniewski — The Prostaglandins (Dep. Biochem. Inst. Biochem. and Physiol., The University, Łódź) . . . . .	5
J. Gryszkiewicz — Enzymatic Electrodes (Inst. Med. Biochem. School of Medicine, Kraków) . . . . .	19
A. Kubicz — Acid Phosphatases, their Heterogeneity, Structure and Properties (Dep. Mol. Biochem., Inst. Biochem. and Bot., The University, Wrocław) . . . . .	37
K. Obojska — Oligo- and Polypeptide Antibiotics (Polish Pharmacopea Lab., Institute of Drugs, Warsaw) . . . . .	51
L. Tomaszewski — The Inborn Errors of Metabolism of Amino Acids (Dep. Clin. Analytics, Inst. Biopharmacy, School of Medicine, Warsaw) . . . . .	91
W. Kluciński — Present Views on the Polymorphism of Proteins and Enzymes in Pig Blood (Inst. Genetics and Animal Breeding, Pol. Acad. Sci., Jastrzębiec n/Warsaw) . . . . .	123
A. Grzelińska — Theories of the Mechanism of Plant Resistance to Infectious Diseases (Inst. Genetics and Plant Breeding, School of Agriculture, Warsaw) . . . . .	131
Chronicle . . . . .	159

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.: Baranowski 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

Ku pamięci prof. dr B. Skarżyńskiego . . . . .	
C. Cierniewski — Prostaglandyny . . . . .	5
J. Gryszkiewicz — Elektrody enzymatyczne . . . . .	19
A. Kubicz — Kwaśne fosfatazy - heterogeność, budowa chemiczna oraz właściwości fizyko-chemiczne . . . . .	37
K. Obojska — Antybiotyki oligo- i polipeptydowe . . . . .	55
L. Tomaszewski — Wrodzone wady metaboliczne w przemianie amino- kwasów . . . . .	91
W. Kluciński — Aktualne poglądy na polimorfizm białek i enzymów krwi u trzody chlewnej . . . . .	123
A. Grzelińska — Teorie mechanizmu odporności roślin na choroby in- fekcyjne . . . . .	141
Niektóre aktualne problemy neurochemii — na marginesie III-go Międzyna- rodowego Kongresu Neurochemii ( <i>T. Borkowski, S. Niemierko</i> ) . . . . .	159
Komunikat Sekcji Płodności i Niepłodności Polskiego Towarzystwa Gineko- logicznego . . . . .	167