

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1974
tom 20
nr 1

KWARTALNIK

PSTBAH 20(1)
1-96 (1974)

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiedzialni są za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły są honorowane według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Autorzy proszeni są o przestrzeganie następujących wskazówek:

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.

Układ maszynopisu: strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, tytuł pracy oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu korzystny jest często podział na rozdziały i podrozdziały. Wydzielone z tekstu tytuły rozdziałów należy oznaczyć numeracją arabską (np. I-2, II-4 itp.). Tytuły podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie powinny być numerowane. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

Autorzy proszeni są o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o nie wprowadzanie do tekstu stworzonych do-rażnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ AKADEMII NAUK

1 9 7 4
tom XX
zeszyt 1

KWARTALNIK
PSTBAH 20 (1) 1-96 (1974)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)
Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Choraży (Gliwice), J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), T. Szczepkowski (Kraków)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

KOMITET REDAKCYJNY

B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa),
B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), S. Lewak (Warszawa),
P. Masłowski (Toruń), I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE -- WARSZAWA 1973

Nakład 2.220 (2.092+128)	Oddano do składania 6.XI.1973 r.
Ark. wyd. 7,25, druk. 6,0	Podpisano do druku w lutym 1974 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono w lutym 1974 r.
Cena zł. 20.--	Zam. nr 1558/73. W-122

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT*

Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej

Changes in Cell Surface after Viral Transformation

Nienormalnie szybki wzrost komórek nowotworowych, łatwość infiltracji do różnych organów przy pasażowaniu *in vivo*, jak również wielowarstwowy wzrost, często obserwowany w hodowlach *in vitro*, związane są — jak powszechnie się dziś sądzi — z modyfikacją błon powierzchniowych komórek. Za pewnymi powiązaniem składu i struktury błon powierzchniowych komórek z ich nowotworowością przemawia szereg obserwacji, a mianowicie: zmiany kształtu komórek stransformowanych w porównaniu z komórkami prawidłowymi (1, 2) zmniejszenie przyczepności do podłoża umożliwiające wzrost komórek nowotworowych w zawiesinie (3), kontynuacja podziałów mimo zetknięcia się z sąsiadującymi komórkami (4—7), oraz szereg różnic w antygenowości komórek (8, 9), łatwości ulegania aglutynacji (8, 10, 11), jak również szybkości transportu do komórek licznych cukrów i aminokwasów (12—15).

Powierzchniowa błona komórkowa stanowi kompleks lipidowo-białkowy, od którego nazewnątrz usytuowana jest warstwa zawierająca glikoproteidy i glikolipidy. Występowanie tej warstwy wokoło komórek wydaje się być wspólną cechą wszystkich komórek (16—19), co wykazano przy zastosowaniu szeregu metod histochemicznych i obserwacji w mikroskopie świetlnym oraz szczególnie precyzyjnie, dzięki obserwacjom w mikroskopie elektronowym (20—24). Grubość tej warstwy jest różna w komórkach różnych typów, przy czym niekiedy udaje się skorelować grubość ze stanem prawidłowości lub nowotworowości komórek. I tak w niektórych komórkach stransformowanych przez wirusy znaleziono grubszą otoczkę niż w ich macierzystych komórkach prawidłowych (25—27), w innych wykazano zmniejszenie, pod wpływem wirusa, grubości otoczki, prawdopodobnie na skutek wzmożonego uwalniania do środowiska części mate-

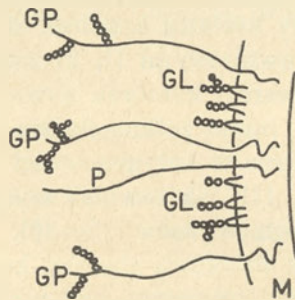
* Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

Stosowane skróty: cAMP — adenozyno 3',5'-monofosforan, dbc-AMP — N⁶,O²-dwubutyrylo-adenozyno 3',5'-monofosforan

riału otoczki (22, 28, 29). Szybkości inkorporacji piętnowanych prekursorów węglowodanów (26) jak również pomiary elipsometryczne (30) wskazują jednakże na wielokrotnie szybszą syntezę otoczki w komórkach stransformowanych niż prawidłowych.

I. Labilność chemicznej struktury zewnętrznych warstw błon powierzchniowych komórek

W skład zewnętrznej warstwy błony powierzchniowej, wchodzi glikoproteidy, glikolipidy, a w niektórych typach komórek także i wolne wielocukry (31—35). Wydaje się, że glikolipidy są usytuowane w bezpośrednim sąsiedztwie błony komórkowej i połączone z nią przez łańcuchy kwasów tłuszczowych ceramidu, podczas gdy glikoproteidy tkwiące peptydową komponentą w błonie komórkowej sięgają swą węglowodanową komponentą dalej na zewnątrz niż glikolipidy (Ryc. 1) — tworząc w konsekwencji najbardziej zewnętrzną otoczkę błony komórkowej (36, 37).



Ryc. 1. Schemat błony komórkowej i otaczającej ją zewnętrznej warstwy powierzchniowej (wg 36)

GP — glikoproteidy, GL — glikolipidy, M — błona komórkowa

Czy transformacja komórek znajduje odbicie w zmianach składu komponent cukrowych zewnętrznych błon komórkowych? Zastosowanie analitycznych technik wskazało rzeczywiście na różnice we względnych zawartościach poszczególnych składników błon powierzchniowych komórek prawidłowych i stransformowanych. I tak zawartości cukrów i aminocukrów, w szczególności zaś kwasu sialowego i N-acetylogalaktozaminy w błonach komórek stransformowanych okazały się niższe niż w błonach komórek prawidłowych (8, 38—46), wbrew wcześniejszym obserwacjom sugerującym zagęszczenie komponent cukrowych wokół komórek nowotworowych (8, 47).

Zmiany w składzie węglowodanowych komponent błon komórek stransformowanych mogą wynikać — zarówno z odmiennego zużytkowania cukrów począwszy od pobierania prostych cukrów ze środowiska a skończyw-

szy na inkorporacji ich do złożonych kompleksów błony, jak również z różnic w katabolizmie glikoproteidów i glikolipidów.

Synteza złożonych glikoproteidów zachodzi przy udziale kompleksu enzymów biosyntetyzujących, których określona kolejność działania determinuje typ wiązania oraz sekwencję poszczególnych cukrów (48). Badania aktywności poszczególnych enzymów tego kompleksu z komórek prawidłowych i stransformowanych działaniem wirusów są dotychczas fragmentaryczne, niemożliwe przeto jest dokonanie uogólnień. Dla przykładu — są doniesienia o różnokierunkowych zmianach aktywności określonych transferaz cukrowych: podwyższona w komórkach stransformowanych aktywność transferaz galaktozy i N-acetylogalaktozaminy (49, 50), obniżona aktywność transferazy fukozy (42) i transferazy glukoza: kolagen (51). W stransformowanych liniach komórkowych stwierdzono jednakże zbieżność niskiej zawartości kwasu sjałowego i niskiej aktywności transferaz sjałowych, przenoszących kwas sjałowy na egzogenne substraty typu mucyny i fetuiny, pozbawione uprzednio kwasu sjałowego (42, 52, 53). Wyższa aktywność kilku glikozydaz w fibroblastach mysich stransformowanych wirusami SV-40 i polioma niż w wyjściowych, prawidłowych fibroblastach 3T3 (54, 55) wskazuje ponadto na różnice w katabolizmie wielocukrów błonowych.

Zastosowanie bardziej precyzyjnych i specyficznych metod izolowania z błon i analizy glikoproteidów i glikolipidów pozwoliło na dokładniejsze zbadanie zawartości poszczególnych składników tych związków występujących w komórkach prawidłowych i stransformowanych. Tak np. analizując frakcję glikopeptydów zawierających fukozę stwierdzono, że jedna z frakcji polisacharydowych elująca się najszybciej z kolumny Sephadex G-50, występuje w znacznie większych ilościach w błonach powierzchniowych wielu komórek stransformowanych wirusami DNA i RNA niż w błonach komórek prawidłowych (41, 56—58). Polisacharyd o podobnych własnościach znaleziono także w błonach komórek prawidłowych z hodowli będącej w logarytmicznej fazie wzrostu (59) oraz w błonach komórek znajdujących się w mitozie z hodowli zsynchronizowanej działaniem winblastyny (60). Ostatnio wykazano, że łatwa wymywalność tego polisacharydu z kolumny wynika z obecności w jego cząsteczce dodatkowych cząsteczek kwasu sjałowego (58, 61). Występowanie tego związku wydaje się być uwarunkowane wzmożoną aktywnością transferazy sjałowej wykorzystującej jako endogenne substrat glikopeptydy obecne w obu typach komórek. Nieznana jest dotychczas biologiczna rola tego glikopeptydu, niemniej jednak występowanie znacznych jego ilości w komórkach dzielących się i stransformowanych może wskazywać, zdaniem *Warrena* i wsp. (58, 61) na jego przyspeczalny udział w regulacji przebiegu cyklu komórkowego.

Analiza glikolipidów błon powierzchniowych komórek prawidłowych i stransformowanych działaniem wirusów wykazała mniejszą różnorodność

pochodnych ceramidu w błonach komórek stransformowanych. Nie znajdowano w nich na ogół gangliozydów o strukturze bardziej złożonej niż hematozyd (62—70); w pewnych układach stransformowanych komórek ilość hematozydu nawet ulegała obniżeniu (62). W niektórych układach komórkowych spadkowi zawartości wyższych gangliozydów towarzyszyło nagromadzenie się ich prekursorów (62, 63).

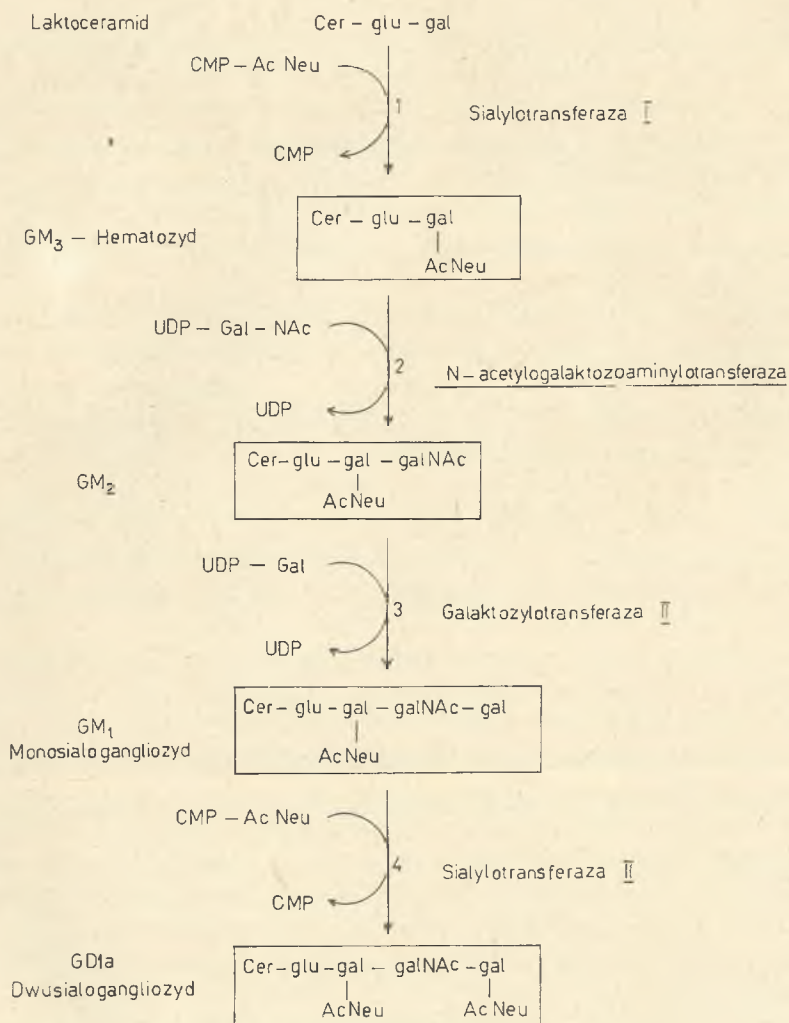
Spadek ilości bardziej złożonych niż hematozyd gangliozydów oraz nagromadzenie się hematozydu, w porównaniu z prawidłowymi komórkami wątrobowymi, znaleziono także w komórkach hepatomy Morrisa, indukowanej chemicznie *in vivo* (71, 72). Wyjaśnienie zagadnienia analogii względnie odmienności charakteru zmian w składzie gangliozydów komórek, stransformowanych działaniem wirusów lub pod wpływem chemicznych kancerogenów, wymaga jednakże dalszych badań.

Różnice w składzie powierzchniowych glikolipidów wykazano także w komórkach prawidłowych badanych w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. A mianowicie w przeciwieństwie do komórek z okresu eksponencyjnego wzrostu hodowli w błonach komórek z hodowli stacjonarnych, (w których nie występowały już podziały mitotyczne) przeważały pochodne glikolipidów o stosunkowo długim łańcuchu cukrowym i zawierające do kilku cząsteczek kwasu sjałowego (36, 69, 73—80). Takich glikolipidów nie znajdowano w błonach komórek stransformowanych. Występowanie złożonych glikopeptydów właściwie wyłącznie w błonach komórek, w których nie zachodzi synteza DNA, może, zdaniem Hammas-tröma (80), wskazywać na potencjalny udział tego typu związków w regulacji replikacji DNA w komórce.

Badania aktywności enzymów syntetyzujących złożone glikolipidy wykazały zmienny poziom aktywności transferaz cukrowych w zależności od warunków hodowli jak i transformacji wirusowej. Kilkakrotnie wyższy poziom aktywności enzymów uczestniczących w syntezie hematozydu (81), a w szczególności zaś glikolipidu różniącego się od hematozydu dodatkową resztą cukrowcową (GM₂) (72, 82, 83), znajdowano w komórkach z hodowli stacjonarnych, niż w komórkach z logarytmicznej fazy wzrostu (Ryc. 2). W komórkach mysich stransformowanych wirusami SV-40 lub polioma poziom aktywności N-acetylogalaktozaminylotransferazy, katalizującej przeniesienie na hematozyd reszty cukrowcowej (Ryc. 2) był nawet jeszcze niższy od aktywności charakteryzującej prawidłowe komórki z logarytmicznej fazy wzrostu (72, 84). Fakt ten wydaje się wskazywać na pojawienie się w komórkach, w wyniku transformacji wirusowej, określonego bloku metabolicznego, odpowiedzialnego w znacznym stopniu za zmiany składu glikolipidów komórkowych (72).

Transformacji wirusowej komórek towarzyszy także pojawienie się sjałidazy w niektórych układach komórkowych (np. w fibroblastach z nerki chomika stransformowanych adenowirusem Ad 12), enzymu specyficznie aktywnego jedynie w stosunku do egzogennych dwusjało- i trójsjałogan-

gliozydów (85). Wydaje się zatem prawdopodobne, że enzym ten degradując gangliozydy nie własnych lecz sąsiadujących komórek mógłby odgrywać rolę we wzajemnym oddziaływaniu komórek (*cell — cell interactions*).



Ryc. 2. Schemat biosyntezy gangliozydów (wg 83)

glu — glukoza, gal — galaktoza, cer — ceramid (N-acylosfingozyna); Ac-Neu — kwas N-acetyloneuraminowy

Odmienność składu powierzchniowych glikoproteidów i glikolipidów komórek prawidłowych i transformowanych, wynikająca najprawdopodobniej ze zmienionych, w wyniku transformacji wirusowej, mechanizmów biosyntezy tych związków, znajduje niewątpliwie swoje odbicie w charakterze antygenowym komórek. Omówienie pojawiania się (czy też ujawniania) w wyniku transformacji nowotworowej antygenów powierzchni-

wych, ich precyzyjna lokalizacja w błonach powierzchniowych komórek oraz wzajemne przestrzenne powiązania wykracza jednakże poza zakres omawianego tematu.

II. Badanie struktury zewnętrznych warstw błon powierzchniowych komórek przy zastosowaniu lektyn

Lektyny, związki izolowane z nasion różnych roślin strączkowych oraz z tkanek niektórych bezkręgowców, stanowią grupę glikoproteidów, które na skutek wybiórczego wiązania się z określonymi cukrami, charakteryzują się zdolnością rozpoznawania tych związków w określonych strukturach biologicznych (10, 86).

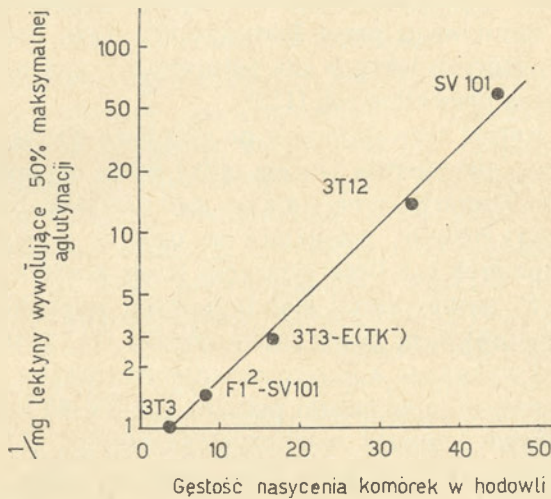
Dotychczas jedynie kilka lektyn oczyszczono w stopniu zezwalającym na zastosowanie ich (jako markerów) w badaniach biologicznych. Należy do nich przede wszystkim konkanawalina A otrzymana z nasion fasoli (*jack bean*) i wiążąca α -metyloglikopyranozydy, α -D-mannopiranozydy oraz α -N-acetyloglikozaminy (87—89).

Lektyna ta, w odróżnieniu od innych lektyn (90, 91) jest czystym białkiem i nie zawiera kowalencyjnie związanego cukru (10). Analiza krystalograficzna pozwoliła na ustalenie, że cząsteczka konkanawaliny A stanowi tetramer złożony z podjednostek o ciężarze cząsteczkowym około 27 000 daltonów (92) przy czym na każdym monomerze usytuowane są miejsca wiążące cukier oraz metal (Mn, Ca) (92—95). Inne lektyny często stosowane w badaniach biologicznych to lektyna z kielków pszenicy wykazująca specyficzność w stosunku do N-acetylo-D-glukozaminy (96—98) oraz lektyna izolowana z nasion soi, dla której specyficznym haptenem okazała się N-acetylo-D-galaktozamina (99, 100). Powyżej wymienione hapteny lektyn zidentyfikowano w badaniach, w których porównywano efektywność określonych prostych cukrów w przeciwdziałaniu efektom wywoływanym przez lektyny. Wyizolowanie, z powierzchniowych błon komórek, frakcji glikoproteidowych wiążących poszczególne lektyny oraz wstępna analiza ich składu chemicznego wydają się potwierdzać wcześniejsze obserwacje dotyczące specyficzności poszczególnych haptentów i lektyn (101—105). Wyniki te nie wykluczają jednak możliwości wiązania określonej lektyny przez kilka cukrowych haptentów obecnych w błonie, jednakże z różną efektywnością (11).

Lektyny są obecnie często stosowane w badaniu struktury błon biologicznych. Przy zastosowaniu ich udało się np. wykazać odmienność struktury zewnętrznych warstw powierzchniowych błon komórek prawidłowych i stansformowanych. Okazało się bowiem, że przeważająca większość komórek stansformowanych, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych z łatwością ulega aglutynacji pod wpływem lektyn (Ryc. 3) (106—118).

Różna reakcja komórek prawidłowych i stansformowanych na obec-

ność lektyn w środowisku wskazuje zatem pośrednio na różnice bądź to w ilości cukrów, bądź też ich dostępności dla lektyn pomiędzy błonami komórek prawidłowych i transformowanych. Nie wszystkie jednak układy komórek transformowanych wirusami cechuje zwiększona, w porównaniu z komórkami prawidłowymi, łatwość aglutynacji przez lektyny. Wątpliwości dotyczą przede wszystkim komórek transformowanych wirusami RNA, gdyż obok komórek, po transformacji wirusami RNA, łatwiej aglutynowanych przez lektyny (119—122), znaleziono i takie pary układów komórkowych, w których komórki transformowane niektórymi wirusami RNA (Schmidt-Ruppin, B77, P-RSV, Fe SV(R), STL) były aglutynowane w tym samym stopniu co ich macierzyste komórki prawidłowe (123, 124).



Ryc. 3. Aglutynacja prawidłowych i transformowanych mysich fibroblastów pod wpływem lektyny z kielków pszenicy (wg 112)

3T3 — prawidłowe mysie fibroblasty; 3T3-E(TK⁻) — enzymatyczny mutant fibroblastów 3T3; 3T3-12 — spontanicznie transformowane fibroblasty 3T3; SV 101 — fibroblasty 3T3 transformowane wirusem SV40; F1²-SV 101 — komórki, o typie wzrostu charakterystycznym dla prawidłowych fibroblastów, wyselekcjonowane z populacji komórek SV 101

W niektórych zaś układach (np. limfocyty i komórki leukemiczne L₁₂₁₀; (11, 100)) wyjściowe prawidłowe komórki (limfocyty) łatwiej ulegały aglutynacji przez konkanawalinę A niż komórki leukemiczne. W niektórych przypadkach intensywność aglutynacji komórek transformowanych może być uwarunkowana dodatkowymi czynnikami np. syntezą przez embryonalne fibroblasty kurczenia, transformowane wirusem RSV, znacznych ilości kwaśnych mukopolisacharydów (125). W efekcie stwierdzano słabą aglutynację tych komórek przez lektyny, a dopiero usunięcie niskopolisacharydowej warstwy działaniem hialuronidazy powodowało, że zarówno konkanawalina A jak i lektyna z kielków pszenicy wywoływały aglutynację tych transformowanych komórek.

Ogólnie jednak wydaje się, że różnice w strukturze zewnętrznych warstw błony powierzchniowej komórek prawidłowych i transformowanych wirusami, wykrywalne testem aglutynacji, wydają się rzeczywiście w większości przebadanych układów towarzyszyć transformacji nowotworowej. Tak np. zmiany powierzchniowe, wykrywalne testem aglutynacji ujawniają się w komórkach kilkadziesiąt godzin po infekcji wirusowej (126—130). Jest wielce prawdopodobne, że zjawisko to jest związane z podjęciem, indukowanej przez wirus, syntezy DNA w komórkach. Zahamowanie bowiem syntezy DNA fluorodezoksyurydyną lub hydroksymocznikiem zapobiega wzrostowi podatności komórek na aglutynację pod działaniem lektyn (8, 128—130).

Co więcej, komórki transformowane, które w wyniku określonych bodźców odzyskały typ wzrostu charakteryzujący komórki prawidłowe przestają ulegać aglutynacji przez lektyny (131, 132). Podobnie komórki transformowane, których lektyny nie aglutynują rosłą na ogół w sposób zbliżony do komórek prawidłowych (133).

Opracowanie testów zezwalających na ilościowe ujęcie zjawiska aglutynacji jest sprawą niezmiernie trudną, gdyż wiele czynników, np. sama procedura zebrania komórek, wpływają na jego przebieg. Nie mniej jednak znane są już dzisiaj metody, polegające na ogół na pomiarach ilości aglutynowanych komórek lub ilości wiązanej przez komórki radioaktywnej lektyny, które przy zastosowaniu standardowych warunków doświadczenia (czas, temperatura) dają powtarzalne wyniki (11, 134). Przy zastosowaniu tych metod wykazano kilkakrotnie intensywniejsze wiązanie lektyny przez transformowane wirusami polioma lub SV-40 mysie fibroblasty niż przez prawidłowe komórki macierzystego szczepu (11, 106, 135). Są jednak i dane donoszące o jednakowym wiązaniu lektyn przez niektóre inne komórki prawidłowe i transformowane (136—141). Wydaje się jednakże, że — nawet jeśli rzeczywiście występują różnice w stopniu wiązania lektyn przez błony komórek prawidłowych i transformowanych — to są one niewspółmiernie niskie z intensywnością aglutynacji komórek transformowanych powyższego układu.

Stopnia aglutynowalności komórek nie udaje się jednak traktować jako wskaźnika potencjalnej złośliwości nowotworu komórki, bowiem mysie białaczkowe szczepy o różnym stopniu złośliwości *in vivo* wiążą jednakowe ilości konkanawaliny A, i wykazują zbliżony stopień intensywności aglutynacji (142).

Zastosowanie mikroskopii elektronowej, jak również lektyn powiązanych z ferrytyną lub fluoresceiną, pozwoliło na prześledzenie obrazów rozmieszczenia lektyny na powierzchni komórek (106, 111, 143—151). Wykazano np., że na powierzchni prawidłowych fibroblastów (143, 147) oraz limfocytów (147) konkanawalina A rozmieszcza się w sposób rozproszony, podczas gdy na powierzchni fibroblastów transformowanych wirusem SV-40 lub komórek lymphoma konkanawalina A może występować w sku-

piskach, również chaotycznie rozmieszczonych. Tak więc wydaje się, że jedną z konsekwencji transformacji komórek wirusami mogłyby być zmiany labilności strukturalnej („fluidity”) zewnętrznej glikoproteidowej warstwy błony powierzchniowej umożliwiającą przemieszczenia miejsc wiążących konkanawalinę A (11, 146).

W świetle ostatnich badań wydaje się, że nie różnice w ilości receptorów lektyn a jedynie ich odmienna lokalizacja na powierzchni błon komórkowych stanowi jedną z głównych przyczyn różnic w aglutynowalności komórek prawidłowych i nowotworowych. Można sądzić, że zmiany w rozmieszczeniu receptorów lektyn na powierzchni błon mogą nastąpić poprzez ujawnianie preegzystujących ukrytych receptorów, przez zagęszczenie receptorów na powierzchni błony na skutek zmniejszenia rozmiarów komórek oraz przegrupowania receptorów doprowadzające do ich zagęszczenia w określonych rejonach komórki (109, 143, 152).

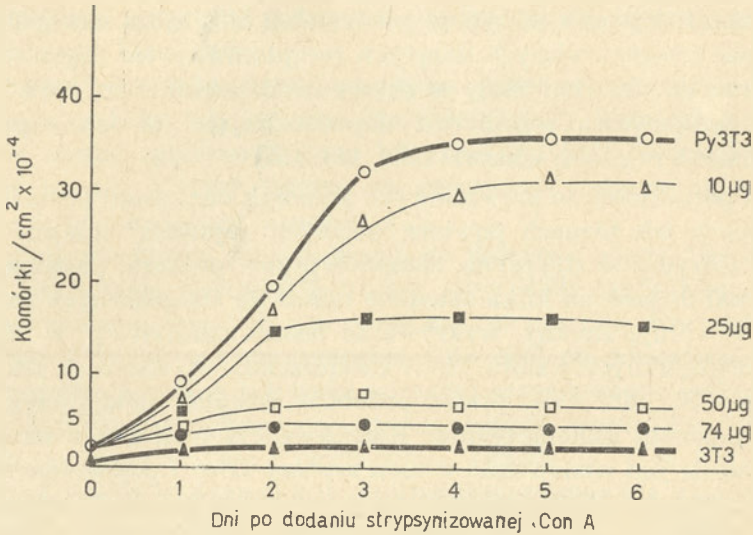
Przez potraktowanie prawidłowych komórek enzymami proteolitycznymi można w ich błonach powierzchniowych „ujawnić” miejsca wiążące lektyny. Enzymy te (trypsyna, chymotrypsyna, pronaza, papaina, ficyna, subtilizyna) dodane na kilka zaledwie minut do stacjonarnych kultur komórek, wywołują zmiany, wykrywalne testem aglutynacji, w „architektonice” zewnętrznych warstw błony powierzchniowej komórek (96, 98, 100, 108, 116—118, 153, 154), prawdopodobnie wskutek modyfikacji białkowych komponent glikoproteidów. Konsekwencją tych zmian na powierzchni komórek jest wznowienie w nich syntezy DNA i pojawienie się mitoz (98, 155). Ponadto elektronomikroskopowe obrazy komórek pobierających konkanawalinę A, uprzednio poddanych działaniu enzymów proteolitycznych, sugerują podobne rozmieszczenie receptorów lektyn w tych komórkach do rozmieszczenia w komórkach stransformowanych (145).

Ujawnienie miejsc wiążących lektyny w komórkach prawidłowych można również wywołać przez zaburzenia w nich toku biosyntezy białek (118, 156, 157). Efekt ten osiągnięto jedynie przez potraktowanie cykloheksimidem komórek z hodowli stacjonarnych, co nie udało się z komórkami z hodowli znajdujących się w ekspanencyjnej fazie wzrostu. Wytlumaczenie tego wyniku jest możliwe w oparciu o wyniki badań metabolizmu powierzchniowych glikoproteidów w komórkach. Wskazują one na znaczną labilność (na skutek intensywniejszego rozpadu) glikoproteidów w błonach komórek z hodowli stacjonarnych, w przeciwieństwie do stosunkowo dużej ich stabilności w błonach komórek z logarytmicznej fazy wzrostu hodowli (158, 159). Zakłócenie syntezy złożonych glikoproteidów może zatem uwiadaczać się wyraźniej w komórkach o szybciej odnawianych składnikach błony.

Nasuwa się pytanie czy odmienność w architektonice zewnętrznych warstw błon komórek prawidłowych i stransformowanych, wykrywana testem aglutynacji może mieć jakiś związek z regulacją wzrostu komórek.

Szereg danych wydaje się przemawiać za tym przypuszczeniem, a przede wszystkim:

— Modyfikacja błon komórek prawidłowych, działaniem enzymów proteolitycznych do konfiguracji porównywalnej z konfiguracją komórek transformowanych (podobne wyniki testu aglutynacji) wyzwała w tych komórkach czasowe wznowienie syntezy DNA a w następstwie podziały, a więc występuje tu analogia do zachowania się komórek nowotworowych (11, 155).



Ryc. 4. Odpowiedź wzrostowa mysich fibroblastów na strypsynizowaną konkanawalinę A (wg 160)

Con A — konkanawalina A; 3T3 — prawidłowe mysie fibroblasty; Py 3T3 — fibroblasty 3T3 transformowane wirusem polioma

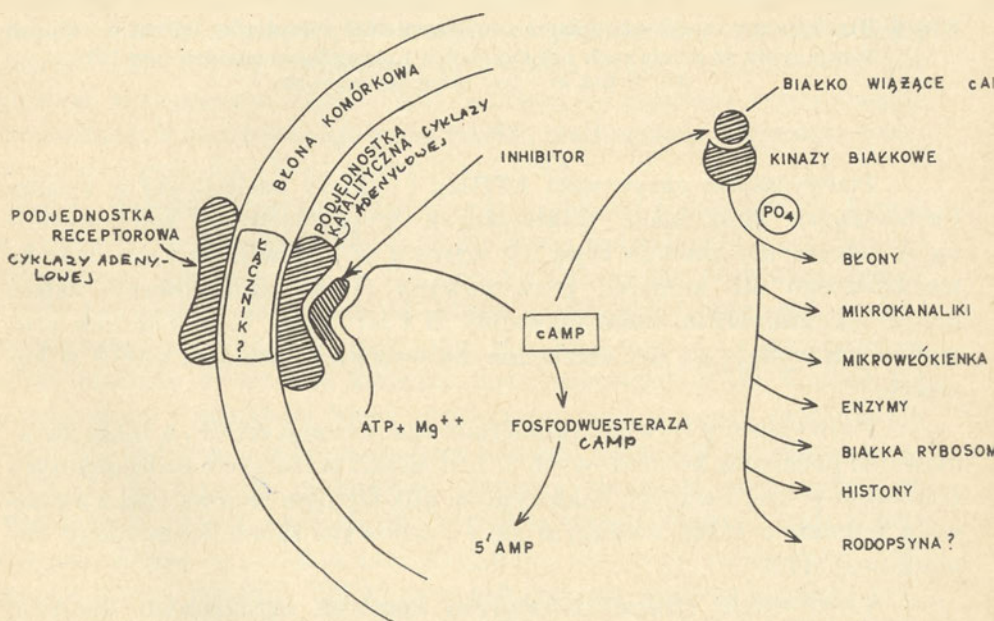
— Modyfikacja błon licznych komórek transformowanych (mysie fibroblasty transformowane wirusami polioma (160) lub SV-40 (161, 162) poprzez traktowanie ich preparatami trypsynowanej konkanawaliny A, zachowującej zdolność do wiązania się z receptorami przy utracie zdolności do aglutynowania komórek, powoduje początkowo zwolnienie tempa wzrostu komórek (coraz niższa gęstość populacji w zależności od ilości dodanego preparatu trypsynowanej konkanawaliny A (Ryc. 4), a w konsekwencji, jak gdyby przywrócenie komórkom typu wzrostu charakteryzującego komórki prawidłowe. Co więcej, pomiary czasu trwania faz cyklu komórek traktowanych trypsynowaną konkanawaliną A wykazały, że przeważająca większość komórek znajduje się w fazie G-1 cyklu (162), podobnie jak stwierdzono to uprzednio dla komórek prawidłowych z hodowli stacjonarnych.

— Niektóre komórki leukemiczne (Ogun, HR-1, Janosky) rosnące w zawieszynie w hodowli *in vitro*, w wyniku krótkotrwałego traktowania konka-

nawaliną A zmieniają swój typ wzrostu i rosną na powierzchni naczynia hodowlanego, podobnie jak komórki prawidłowe (163).

— Zaobserwowane w badaniach *in vivo* hamowanie przez konkanawalinę A proliferacji niektórych nowotworów (np. lymphoma indukowana wirusem Moloney), jak również wybiórcza toksyczność tej lektyny *in vitro* i *in vivo* w przypadku komórek transformowanych wskazują, że trwałe zablokowanie miejsc receptorowych konkanawaliny A prowadzi do śmierci komórek (115, 164, 165).

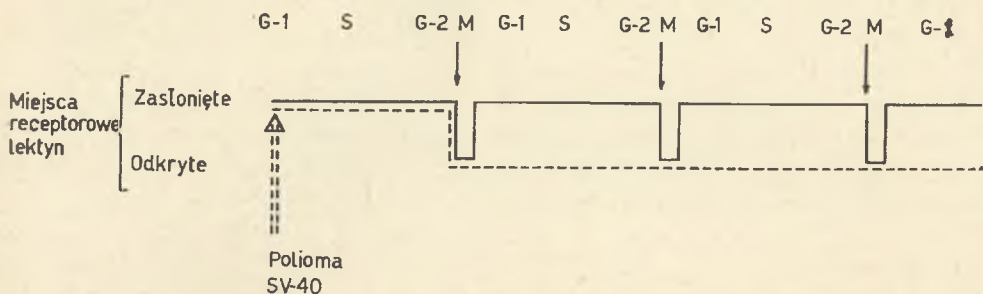
W jaki zatem sposób dochodzi do skoordynowania zmian zachodzących na powierzchni błony komórkowej ze zmianami w funkcjonowaniu jądra komórkowego. Szereg obserwacji sugeruje, że zmiany w stężeniu cAMP mogą stanowić sygnał przekazujący do jądra komórkowego informacje o charakterze struktury błony, a zlokalizowanie receptora cykazy adenylowej w powierzchniowych warstwach błony komórkowej (166; Ryc. 5) czyni to przypuszczenie jeszcze bardziej prawdopodobnym. Poza tym wia-



Ryc. 5. Model lokalizacji cykazy adenylowej w błonie komórkowej (uproszczony schemat wg 166)

domo, że niski poziom cAMP charakteryzuje komórki transformowane wirusami (161, 167—171), w przeciwieństwie do prawidłowych, w których tylko w okresie mitozy stwierdza się obniżenie poziomu cAMP (169, 172, 173). W tym też tylko stadium komórki prawidłowe ulegają aglutynacji pod działaniem lektyn, czyli wykazują strukturę błony powierzchniowej

zbliżoną do struktury komórek transformowanych (174—176). Zdaniem Burgera można nawet założyć, że komórki transformowane charakteryzują się zawsze architektoniką błon cechującą błony komórek prawidłowych jedynie w stadium mitozy (Ryc. 6) (8, 175, 177). Obserwacje, że zmiany na powierzchni błony ujawniają się nie bezpośrednio po infekcji wirusowej, lecz dopiero w następnym cyklu komórkowym przemawiają za powyższym przypuszczeniem. Są to:



Ryc. 6. Hipotetyczny model odsłaniania (uwidocznienia) receptorów lektyn w różnych fazach cyklu w komórkach prawidłowych i transformowanych (wg 112)
G-1, S, G-2, M — fazy cyklu komórkowego

— Podwyższenie aktywności ATPazy i cyklazy adenylowej w transformowanych komórkach, traktowanych trypsynizowaną konkanawaliną A, towarzyszy zmianie typu ich wzrostu w hodowli, do typu charakterystycznego dla komórek prawidłowych (161); zamaskowanie zatem miejsc receptorowych konkanawaliny A i struktura błon komórek prawidłowych wydają się być niezbędne dla wysokiego poziomu cAMP w komórce.

— Podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP, a także zahamowanie podziałów komórkowych w hodowlach szczurzych embrionalnych fibroblastów traktowanych bakteryjnym glikolipidem izolowanym z *Samonella minnesota* (178), wiążącym się z lipidowym składnikiem błony komórkowej (179).

— Traktowanie transformowanych komórek egzogennym dbcAMP w większości przypadków przywraca im, przynajmniej fenotypowo, charakter wzrostu komórek prawidłowych, a także powoduje ich coraz trudniejszą aglutynację przez lektyny (180).

— Pewne różnice w rodzaju i we względnych zawartościach glikopetydów izolowanych z błon komórek transformowanych, nietraktowanych dbcAMP lub poddanych jego działaniu, wskazują na zależność składu glikoproteidów od typu wzrostu komórek oraz od poziomu cAMP (181, 182).

Tak więc zbieżność występowania określonej struktury zewnętrznych

warstw błon powierzchniowych komórek z określonym poziomem cAMP w komórce wydaje się być dla bardzo licznych układów komórkowych pewną prawidłowością. Spadek wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP w wyniku transformacji wirusowej komórek jak również zmienność poziomu cAMP w różnych stanach fizjologicznych komórki posłużyła Burgerowi i wsp. (130, 173, 183) do sformułowania hipotezy sugerującej uzależnienie przebiegu cyklu komórkowego od wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP, pośrednio więc od określonej struktury błony. Spadek poziomu cAMP byłby, wg tej hipotezy, sygnałem przekazującym do jądra komórkowego informacje o zaistniałej zmianie (zarówno trwałej na skutek transformacji jak i przejściowej w wyniku działania surowicy i proteaz) w architektonice błony do formy ulegającej interakcji z lektynami. Obserwacje, że egzogenne cAMP, dodane do hodowli komórek w określonej fazie cyklu komórkowego hamuje w nich syntezę DNA (184) popiera sugestię, że niski poziom cAMP w komórce jest niezbędnym sygnałem do rozpoczęcia w nich syntezy DNA.

W hipotezie Burgera nie sprecyzowano jednak jakie „konsekwencje biochemiczne” może za sobą pociągać spadek poziomu cAMP w komórce. Ostatnie badania Hauschki i wsp. nad pobieraniem tymidyny przez komórki, wskazują na hamowanie aktywności kinazy tymidynowej pod wpływem egzogenego cAMP (185). Autorzy ci sugerują występowanie w komórkach, kontrolowanego przez cAMP, mechanizmu pobierania tymidyny, a więc pośrednio kontroli replikacji DNA.

Szereg danych dotyczących uzależnienia szybkości transportu do komórek związków drobnocząsteczkowych od stanu prawidłowości czy też nowotworowości komórek (12, 14, 15), jak również wyniki obserwacji tempa wzrostu komórek w zależności od składu środowiska i obecności czynników wzrostowych (188, 187) posłużyły Holley'owi do sformułowania ogólnej hipotezy o wzroście komórek nowotworowych (188). Według tej hipotezy skład i struktura błony powierzchniowej komórek determinuje szybsze lub wolniejsze pobieranie przez komórki związków drobnocząsteczkowych z otaczającego środowiska. Szybszy transport tych związków w komórkach stransformowanych powoduje wzrost stężenia tych składników w komórce do poziomu, przy którym nie są one już czynnikami limitującymi wzrost komórki. Selektywne zatrzymanie wzrostu komórek prawidłowych w określonej fazie cyklu komórkowego na skutek braku w pożywce określonych aminokwasów (np. izoleucyny (189) czy leucyny (190) również przemawia za hipotezą Holley'a.

Powyżej omówione hipotezy nie wyczerpują oczywiście możliwości i innych interpretacji powiązań pomiędzy zmianami składu i architektury zewnętrznych warstw błony powierzchniowej komórek a regulacją wzrostu komórek. Nie mniej jednak istnienie tych zależności wydaje się już dzisiaj sprawą bezsporną.

Główne problemy powyższego artykułu stanowiły treść referatu wygłoszonego na sympozjum o błonach biologicznych podczas XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku we wrześniu 1973 roku.

(Artykuł nadszedł 16.9.1973)

PISMIENICTWO

1. McNutt N. S., Culp L. A., Black P. H., (1973), *J. Cell. Biol.*, **56**, 412—428.
2. Stoker M. G. P., (1972), *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.*, **181**, 1—17.
3. Stoker M. G. P., (1971), *Biomembranes* **2**, 271—282.
4. Stoker M. G. P., Rubin H., (1967), *Nature (Lond.)*, **215**, 171—172.
5. Humphreys T., (1971), w *Cell interactions, III Lepetit Colloquium*, 264—276.
6. Martz E., Steinberg M. S., (1972), *J. Cell Physiol.*, **79**, 189—210.
7. Martz E., Steinberg M. S., (1973), *J. Cell Physiol.*, **81**, 25—38.
8. Burger M. M., (1971) w *Current Topics in Cellular Regulation* **3**, 135—193, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., Academic Press, New York, London.
9. Mehrishi J. N., (1972), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **25**, 1—70.
10. Sharon N., Lis H., (1972), *Science* **177**, 949—959.
11. Burger M. M., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 91—101.
12. Foster D. O., Pardee A. B., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2675—2681.
13. Grimes W. J., Schroeder J. L., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 487—491.
14. Hatanaka M., Hanafusa H., (1970), *Virology*, **41**, 647—652.
15. Isselbacher K. J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **69**, 585—589.
16. Cook G. M. W., (1968), *Biol. Rev.*, **43**, 363—391.
17. Martinez-Palomo A., (1970), *Int. Rev. Cytol.*, **29**, 29—75.
18. Sawicka T., Piasek A., (1971), *Post. Biochemi*, **17**, 275—289.
19. Kraemer P. M., (1972) w *Growth, Nutrition and Metabolism in Cells in Culture* t. 1, 371—426.
20. Mareel M., de Ridder L., Deman J., (1972), *Histochemie* **32**, 335—341.
21. Rowlatt C., Wicker R., Bernhard W., (1973), *Int. J. Cancer* **11**, 314—326.
22. Parsons D. F., Subjeck J. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 85—113.
23. Huet Ch., Garrido J., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 523—527.
24. Bernhard W., Avrameas S., (1971), *Exp. Cell Res.*, **64**, 232—236.
25. Mallucci L., Poste G., Wells V., (1972), *Nature, New Biology* **237**, 9—12.
26. Mallucci L., Poste G., Wells V., (1972), *Nature, New Biology* **235**, 222—223.
27. Martinez-Palomo A., Brailowsky C., (1968), *Virology* **34**, 379—382.
28. Kapeller M., Galoz R., Grover N. B., Doljanski F., (1973), *Exp. Cell Res.*, **79**, 152—158.
29. Chiarugi V. P., Urbano P., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 195—205.
30. Poste G., (1973), *Exp. Cell Res.*, **77**, 264—270.
31. Winzler R. J., (1973), *Intern. Rev. Cytology*, **29**, 77—125.
32. Heath E. C., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 29—56.
33. Ginsburg V., Kobata A., (1971), w *Structure and Function of Biological Membranes*, 439—459.
34. Hughes R. C., (1973), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **26**, 189—268.

35. Bergelson L. D., (1972), *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* 13, 1—59.
36. Hakomori S. I., Kijimoto S., Siddigui B., (1972), w *Membrane Res.*, wyd. C. F. Fox, 253—277.
37. Bara J., Lallier R., Trudel M., Brailovsky C., Nigam V. N., (1973), *Eur. J. Biochem.*, 35, 495—498.
38. Ohta N., Pardee A. B., McAuslan B. R., Burger M. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* 158, 98—102.
39. Wu H. C., Meezan E., Black P. H., Robbins P. W., (1969), *Biochemistry*, 8, 2509—2517.
40. Meezan E., Wu H. C., Black P. H., (1969), *Biochemistry*, 8, 2518—2524.
41. Buck C. A., Glick M. C., Warren L., (1970), *Biochemistry*, 9, 4567—4576.
42. Grimes W. J., (1970), *Biochemistry*, 9, 5083—5092.
43. Onodera K., Sheinin R., (1970), *J. Cell Sci.*, 7, 337—355.
44. Hartman J. F., Buck C. A., Defendi M., Glick M. C., Warren L., (1972), *J. Cell. Physiol.*, 80, 159—166.
45. Sakijama H., Burge B. W., (1972), *Biochemistry*, 11, 1366—1377.
46. Perdue J. F., Kletzien R., Wry V. L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 266, 505—510.
47. Defendi V., Gasic G., (1963), *J. Cell. Physiol.*, 62, 23—31.
48. Roseman S., (1970), *Chem. Phys. Lipids*, 5, 270—297.
49. Bosmann H. B., Hagopian A., Eylar E. H., (1968), *J. Cell Physiol.*, 72, 81—88.
50. Bosmann H. B., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 48, 523—529.
51. Bosman H. B., Eylar E. H., (1968), *Nature* (Lond.), 582—583.
52. Grimes W. J., (1973), *Biochemistry*, 12, 990—996.
53. Den H., Schultz A. M., Basu M., Roseman S., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 2721—2723.
54. Bosmann H. B., (1969), *Exp. Cell Res.*, 54, 217—221.
55. Bosmann H. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 264, 339—343.
56. Buck C. A., Glick M. C., Warren L., (1971), *Science* 172, 169—171.
57. Warren L., Critchley D., Macpherson I., (1972), *Nature* (Lond.), 235, 275—278.
58. Warren L., Fuhrer J. P., Buck C. A., (1973), *Fed. Proc.*, 32, 80—85.
59. Buck C. A., Glick M. C., Warren L., (1971), *Biochemistry*, 10, 2176—2180.
60. Glick M. C., Buck C. A., (1973), *Biochemistry*, 12, 85—90.
61. Warren L., Fuhrer J. P., Buck C. A., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 1838—1842.
62. Hakomori S., Murakami W. T., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 59, 254—261.
63. Hakomori S., Teather C., Andrews H., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 33, 563—568.
64. Brady R. O., Mora P. T., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 218, 308—319.
65. Mora P. T., Brady R. O., Bradley R. M., McFarland V. W., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 63, 1290—1296.
66. Mora P. T., Cumar F. A., Brady R. O., (1971), *Virology* 46, 60—72.
67. Yogeewaran G., Sheinin R., Wherrett J. R., Murray R. K., (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 5146—5158.
68. Yogeewaran G., Murray R. K., Pearson M. L., Sanwal B. D., McMorris F. A., Ruddle F. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 1231—1239.
69. Sakijama H., Robbins P. W., (1973), *Fed. Proc.*, 32, 86—90.

70. Robbins P. W., Macpherson I. A., (1971), *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **177**, 49—58.
71. Brady R. O., Borek C., Bradley R. M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6552—6554.
72. Brady R. O., Fishman P. H., Mora P. T., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 102—108.
73. Robbins P. W., Macpherson I., (1971), *Nature (London)*, **229**, 569—570.
74. Hakomori S., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **67**, 1741—1747.
75. Hakomori S., Siddigui B., Li Y. T., Li S. C., Hellerguist C. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2271—2277.
76. Hakomori S., (1971), w *The Dynamic Structure of Cell Membranes*, red. F. F. H. Wallach and H. Fischer, Springer Verlag, 65—96.
77. Diringer H., Ströbel G., Koch M. A., (1972), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1769—1774.
78. Critchley D. R., Macpherson I., (1973), *Biochim., Biophys. Acta* **296**, 145—159.
79. Critchley D. R., Graham I. M., Macpherson I., (1973), *FEBS Letters* **32**, 37—40.
80. Hammarström S., Bjursell G., (1973), *FEBS Letters* **32**, 69—72.
81. Kijimoto S., Hakomori S., (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 557—563.
82. Cumar F. A., Brady R. O., Kolodny E. H., McFarland V. W., Mora P. T., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **67**, 757—764.
83. Fishman P. H., McFarland V. W., Mora P. T., Brady R. O., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 48—57.
84. Nigam V. N., Lallier R., Brailovsky C., (1973), *J. Cell Biol.*, **58**, 307—316.
85. Schengrund C. L., Lausch R. N., Rosenberg A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4424—4428.
86. Henning R., Uhlenbruck G., (1973), *Nature, New Biology* **242**, 120—122.
87. Yariv J., Kalb A. J., Lewitzki A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **165**, 303—305.
88. Kalb A. J., Lewitzki A., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 669—672.
89. Goldstein I. J., Hollerman C. F., Smith E. E., (1965), *Biochemistry*, **4**, 876—883.
90. Lis H., Sharon N., Katchalski E., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 684—689.
91. Nagata Y., Burger M. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2248—2250.
92. Hardman K. D., Wood M. K., Schiffer M., Edmundson A. B., Ainsworth C. F., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **68**, 1395—1397.
93. Quiocho F. A., Reeke G. N., jr, Becker J. W., Lipscomb W. N., Edelman J. M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **68**, 1853—1857.
94. Edelman G. M., Cunningham B. A., Reeke G. N., jr, Becker J. W., Waxdal M. J., Wang J. L., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **69**, 2580—2584.
95. Gachelin G., Goldstein L., (1972), *FEBS Letters* **26**, 264—266.
96. Pollack R. E., Burger M. M., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **62**, 1074—1076.
97. Burger M. M., Goldberg A. R., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **57**, 359—366.
98. Burger M. M., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **62**, 994—1001.
99. Lis H., Sela B., Sachs L., Sharon N., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 582—585.
100. Sela B., Lis H., Sharon N., Sachs L., (1970), *J. Membrane Biol.*, **3**, 267—279.

101. Wray V. P., Walborg E. F., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 2072—2079.
102. Allan D., Auger J., Crumpton M. J., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 23—25.
103. Janson V. K., Burger M. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 127—135.
104. Janson V. K., Sakamoto Ch. K., Burger M. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 136—143.
105. Smith D. F., Neri G., Walborg E. F., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2111—2118.
106. Inbar M., Sachs L., (1969), *Nature* (London), **223**, 710—712.
107. Inbar M., Sachs L., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **63**, 1418—1425.
108. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2748—2751.
109. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 3—4.
110. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., (1973), *Exp. Cell Res.*, **76**, 143—151.
111. Rosenblith J. Z., Ukena T. E., Yin H. H., Berlin R. D., Karnofsky M. J., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **70**, 1625—1629.
112. Burger M. M., (1971), *Biomembranes*, **2**, 247—270.
113. Zarlring J. M., Tevethia S. S., (1971), *Virology*, **45**, 313—316.
114. Tevethia S. S., Lowry S., Rawls W. E., Melnick J. L., McMillan V., (1972), *J. Gen. Virol.*, **15**, 93—97.
115. Nicolson G. L., Blaustein J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **266**, 543—547.
116. Weber J., (1973), *J. Cell. Physiol.*, **81**, 49—54.
117. Sela B. A., Lis H., Sharon N., Sachs L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 273—277.
118. Borek C., Grob M., Burger M. M., (1973), *Exp. Cell Res.*, **77**, 207—215.
119. Becht H., Rott R., Klenk H. D., (1972), *J. Gen. Virol.*, **14**, 1—8.
120. Kapeller M., Doljanski F., (1972), *Nature, New Biology*, **235**, 184—185.
121. Lehman J. M., Sheppard J. R., (1972), *Virology* **49**, 339—341.
122. Bicquard J. M., Vigver P., (1972), *C. R. Acad. Sci.*, **274**, 144—147.
123. Moore E. G., Temin H., (1971), *Nature*, (London), **231**, 117—118.
124. Salzberg S., Green M., (1972), *Nature, New Biology*, **240**, 116—118.
125. Burger M. M., Martin G. S., (1972), *Nature, New Biology*, **237**, 9—12.
126. Ben-Bassat H., Inbar M., Sachs L., (1970), *Virology* **40**, 854—859.
127. Eckhart W., Dulbecco R., Burger M. M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **68**, 283—286.
128. Benjamin T. L., Burger M. M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **67**, 929—934.
129. Sheppard J. R., Levine A. J., Burger M. M., (1971), *Science* **172**, 1345—1346.
130. Levine A. J., Burger M. M., (1972), *J. Theor. Biol.*, **37**, 435—446.
131. Inbar M., Rabinowitz Z., Sachs L., (1969), *Intern. J. Cancer* **4**, 690—696.
132. Roth S., McGuire E. J., Roseman S., (1971), *J. Cell Biol.*, **51**, 536—548.
133. Culp L. A., Black P. H., (1972), *J. Virol.*, **9**, 611—620.
134. Oppenheimer S. B., Odencrantz J., (1972), *Exp. Cell Res.*, **73**, 475—480.
135. Shoham J., Sachs L., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **69**, 2479—2482.
136. Arndt-Jovin D. J., Berg P., (1971), *J. Virol.* **8**, 716—721.
137. Sela B. A., Lis H., Sharon N., Sachs L., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 564—568.
138. Cline M. J., Livingston D. C., (1971), *Nature, New Biology*, **232**, 155—156.
139. Friberg S., jr., Golub S. H., Lilliehöök B., Cochran A. J., (1972), *Exp. Cell Res.*, **73**, 101—106.

140. Ozanne B., Sambrook J., (1971), *Nature, New Biology* **232**, 156—160.
141. Malucci L., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 241—244.
142. Dent P. B., Hilcoat B. L., (1972), *J. Nat. Can. Inst.*, **49**, 373—377.
143. Nicolson G. L., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 244—246.
144. Nicolson G. L., Singer S. J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **68**, 942—945.
145. Nicolson G. L., (1972), *Nature, New Biology*, **239**, 193—197.
146. Nicolson G. L., (1973), *Nature, New Biology*, **243**, 218—220.
147. Inbar M., Sachs L., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 124—128.
148. Inbar M., Huet Ch., Oseroff A. R., Ben-Bassat H., Sachs L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 594—599.
149. Martinez-Palomo A., Wicker R., Bernhardt W., (1972), *Int. J. Cancer*, **9**, 676—684.
150. Bretton R., Wicker R., Bernhardt W., (1972), *Int. J. Cancer* **10**, 397—410.
151. Smith S. B., Revel J. P., (1972), *Develop. Biol.*, **27**, 434—441.
152. Ben-Bassat H., Inbar M., Sachs L., (1971), *J. Mem. Biol.*, **6**, 183—194.
153. Burger M. M., (1970), *Nature (Lond.)*, **227**, 170—171.
154. Smith D. F., Neri G., Walborg E. F., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2111—2118.
155. Sefton B. M., Rubin H., (1970), *Nature (London)*, **227**, 843—845.
156. Borek C., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, str. 23a, Abstr. 46.
157. Baker J. B., Humphreys T., (1972), *Science* **175**, 905—906.
158. Warren L., Glick M. C., (1968), *J. Cell Biol.*, **37**, 723—746.
159. Warren L., (1969), *Curr. Topics Develop. Biol.*, **4**, 197—222.
160. Burger M. M., Noonan K. D., (1970), *Nature (London)*, **228**, 512—515.
161. Yoshikawa-Fukada M., Nojima T., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **80**, 421—430.
162. Hall R. G., jr., Teel R. W., Allen E., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, p. 102a, Abstr. 203.
163. Mori Y., Akedo H., Tanigaki Y., (1973), *Exp. Cell Res.*, **78**, 360—366.
164. M. Inbar, H. Ben-Bassat, L. Sachs, (1972), *Int. J. Cancer*, **9**, 143—149.
165. Shoham J., Inbar M., Sachs L., (1970), *Nature* **227**, 1244—1246.
166. Bitensky M. W., Gorman R. E., (1973), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **26**, 409—461.
167. Otten J., Johnson G. S., Pastan I., (1971), *Biochim Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1192—1198.
168. Heidrick M. L., Ryan W. L., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1313—1315.
169. Sheppard J. R., Prescott D. M., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 293—296.
170. Kram R., Mamat P., Tomkins G. M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **70**, 1432—1436.
171. Rein A., Carchman R. A., Johnson G. S., Pastan I., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 899—904.
172. Millis A. J. T., Forrest G., Pious D. A., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1645—1649.
173. Burger M. M., Bombik B. M., Breckenridge B. M., Sheppard J. R., (1972), *Nature, New Biology*, **239**, 161—163.
174. Fox T. O., Sheppard J. R., Burger M. M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **68**, 244—247.
175. Burger M. M., (1972) w *Membrane Research*, wyd. C. F. Fox, 241—247.
176. Noonan K. D., Levine A. J., Burger M. M., (1973), *J. Cell Biol.*, **58**, 491—497.
177. Burger M. M., Doonan K. D., (1972) w *Cell Differentiation*, wyd. R. Harris, P. Allin, D. Viza, 182—185.

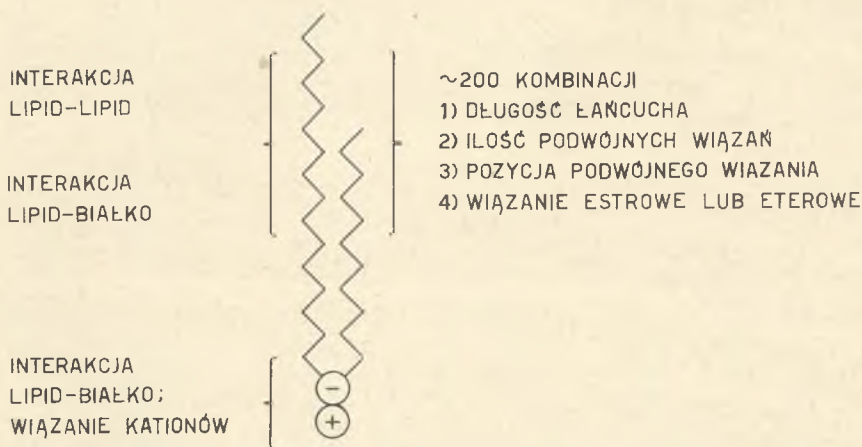
178. Brailovsky C., Trudel M., Lallier R., Nigam V. N., (1973), *J. Cell Biol.*, **57**, 124—132.
179. Bara J., Lallier R., Brailovsky C., Nigam V. N., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 489—494.
180. Sheppard J. R., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **68**, 1316—1320.
181. Roberts R. M., Baig M., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 217a, Abs. 433
182. Roberts R. M., Walker A., Cetorelli J. J., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 86—89.
183. Bombik B. M., Burger M. M., (1973), *Exp. Cell Res.* **80**, 88—94.
184. Willingham M. C., Johnson G. S., Pastan I., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 743—748.
185. Hauschka P. V., Everhart L. P., Rubin R. W., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **69**, 3542—3546.
186. Holley R. W., Kiernan I. A., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **60**, 300—304.
187. Temin H. M., Pierson R. W. jr., Dulak N. C., (1972), w *Growth, Nutrition and Metabolism in Cells in Culture 1*, 49—81, Academic Press, Inc. New York, London.
188. Holley R. W., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **69**, 2840—2841.
189. Tobey R. A., Crissman H. A., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 460—464.
190. Everhart L. P., Prescott D. M., (1973), *Exp. Cell Res.*, **75**, 170—174.

Józef Zborowski*, M. Gabriela Sarzała**

Drogi biosyntezy różnomolekularnych fosfolipidów

Biosynthesis Pathways of the Molecular Species of Phospholipids

Zastosowanie w ostatnich latach techniki rozdziału fosfolipidów na płytkach z kwasu krzemowego z domieszką azotanu srebra pozwoliło na wyodrębnienie wśród fosfolipidów zawierających tę samą zasadę azotową (np. cholinę), różnomolekularnych ich form, określanych jako odrębne rodzaje molekularne (angielski termin — *molecular species*) różniące się między sobą składem kwasów tłuszczowych. Różnice te dotyczą zarówno dłu-

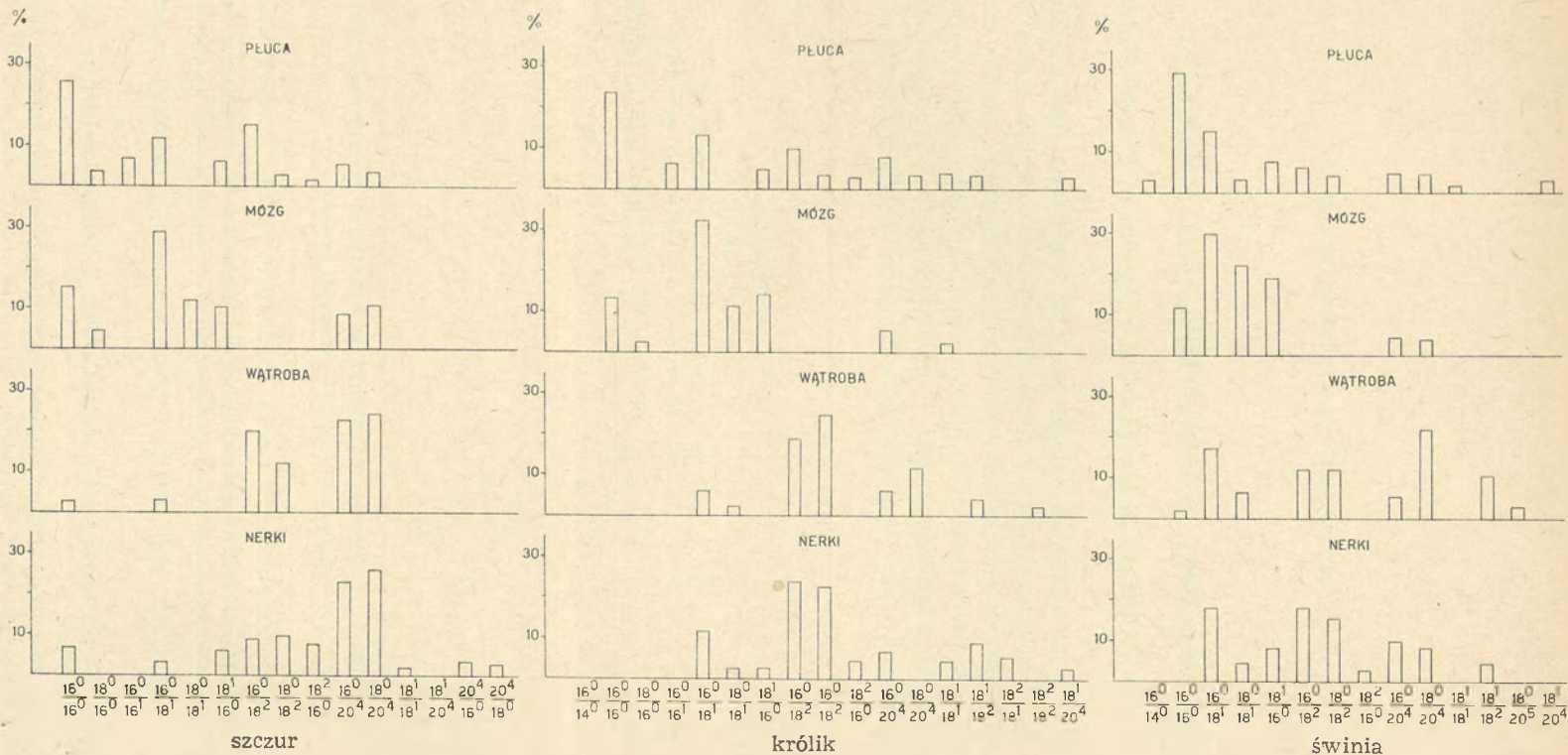


Ryc. 1. Wpływ struktury cząsteczki fosfolipidu na możliwość szeregu interakcji przy tworzeniu błony (wg (1), zmodyfikowany)

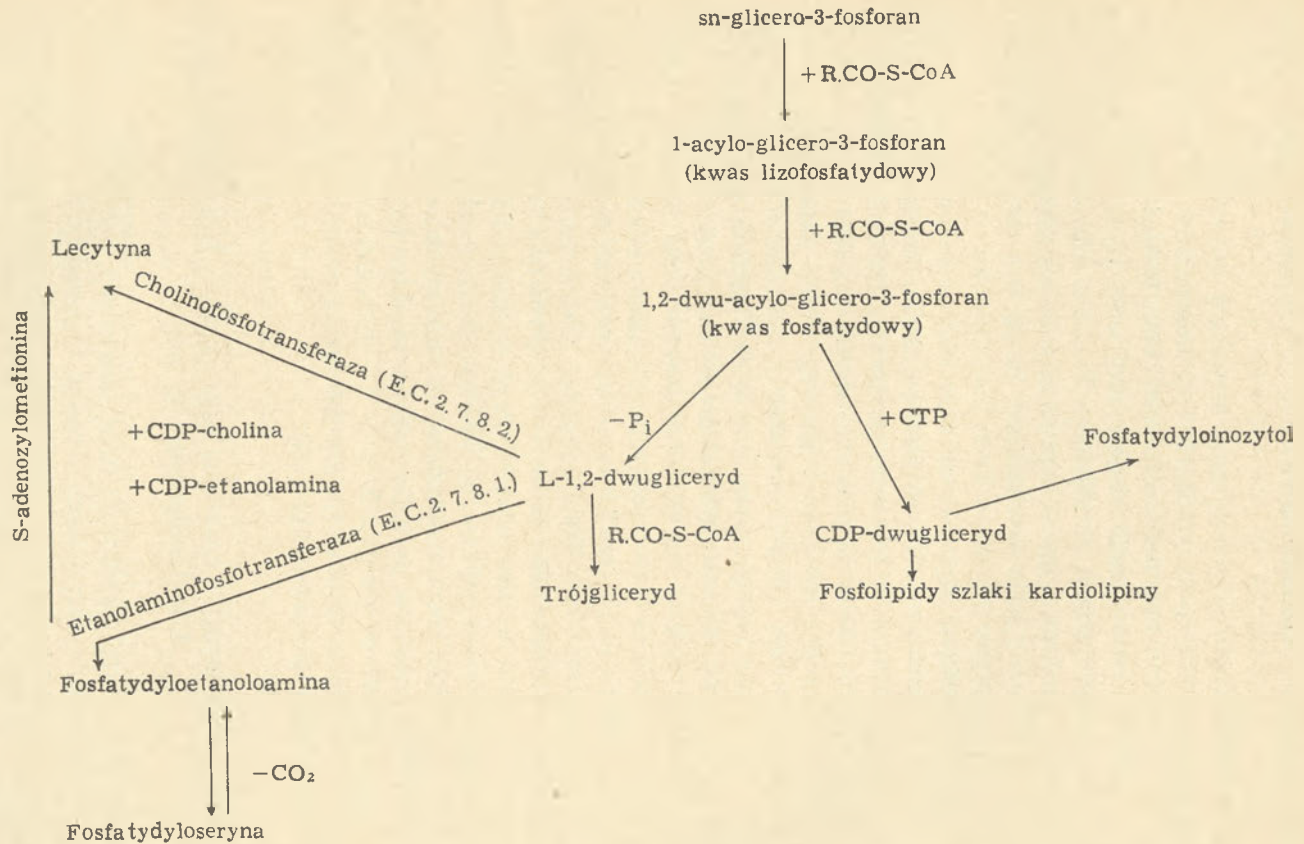
gości łańcucha występujących kwasów tłuszczowych jak i stopnia nienasyenia, a także rozmieszczenia poszczególnych kwasów w cząsteczce fosfolipidu. Jednocześnie badania nad naturalnymi i sztucznymi błonami wykazały, że wewnętrzna organizacja i właściwości błon zależą w znacznym

* Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

** Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.



Ryc. 2. Rodzaje molekularne lecytyny z tkanek różnych zwierząt.(wg danych Montfoort'a i wsp. (2))
Liczby określają długość łańcuchów kwasów tłuszczowych a podane wykładniki liczbę nienasyconych wiązań.



Schemat 1. Główne drogi biosyntezy fosfolipidów w tkankach zwierzęcych

stopniu od rodzajów różnomolekularnych fosfolipidów tworzących te błony.

Rycina 1 przedstawia schematycznie strukturę cząsteczki fosfolipidu oraz wskazuje na udział poszczególnych jej fragmentów w różnego rodzaju interakcjach przy tworzeniu struktury błon biologicznych. Jak zaznaczono na rysunku teoretycznie istnieje możliwość około 200 kombinacji związanych z występowaniem określonych kwasów tłuszczowych w cząsteczce fosfolipidu determinujących jego rodzaje molekularne. Istotne więc wydaje się zagadnienie, jakie mechanizmy mogą być odpowiedzialne za syntezę różnych rodzajów molekularnych fosfolipidów.

Głównymi składnikami lipidowymi błon biologicznych są fosfolipidy cholinowe i etanoloaminowe. Ich różnomolekularne rodzaje występujące w tkankach należą również do najlepiej zbadanych. Na ogół cząsteczki fosfolipidów naturalnych zawierają nasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 1, a nienasycone w pozycji 2 szkieletu węglowego. Inne układy tzn. fosfolipidy 1,2-dwunienasycone, 1,2-dwunasycone i 1-nienasycone, 2-nasycone występują w materiale biologicznym w małych ilościach, a w znaczniejszych tylko wyjątkowo. Procentowa zawartość określonych różnomolekularnych fosfolipidów wydaje się być charakterystyczna raczej dla danej tkanki, aniżeli związana ze specyficznością gatunkową (Ryc. 2).

Jak widać z danych na rycinie 2 stosunkowo znaczną zawartość lecytyn dwunasyconych stwierdzono w tkance płucnej. Uważa się (3), że monomolekularna warstwa dwunasyconych lecytyn pokrywająca nabłonek pęcherzyków płucnych pełni tu specjalną funkcję, a mianowicie chroni przed nadmiernym przenikaniem płynów do wnętrza pęcherzyków.

Występowanie wielu różnomolekularnych cząsteczek lecytyny i fosfatydyloetanoloaminy nasuwa pytanie, czy za selektywne rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w pozycjach 1 i 2 odpowiedzialne są enzymy biorące udział w syntezie *de novo* (I), czy też enzymy cyklu deacylacji fosfolipidów i reacylacji lizofosfolipidów (II).

I. Zagadnienie specyficzności enzymów przy syntezie lecytyny i fosfatydyloetanoloaminy *de novo*

Zgodnie z przyjętym schematem dróg biosyntezy fosfolipidów (schemat 1) za wprowadzanie określonych kwasów tłuszczowych do cząsteczek lecytyny i fosfatydyloetanoloaminy odpowiadają bądź acylotransferazy katalizujące syntezę kwasu fosfatydowego bądź działające selektywnie transferazy fosfocholinyl lub etanoloaminy.

I-1. Specyficzność enzymów syntetyzujących kwas fosfatydowy

Kwas fosfatydowy jest kluczowym intermediatem w syntezie wszystkich fosfolipidów. Powstawanie więc określonych rodzajów molekularnych

kwasy fosfatydowe może warunkować syntezę innych fosfolipidów o tym samym składzie kwasów tłuszczowych. W tkankach zwierzęcych synteza kwasu fosfatydowego może zachodzić różnymi drogami. Najwcześniej poznaną drogą (4, 5) jest synteza z *sn*-glicero-3-fosforanu, który ulega stopniowej acylacji przez przyłączenie dwóch reszt kwasów tłuszczowych z acyloCoA. Sugestię, że reakcja ta zachodzi dwustopniowo wysunęli już Kornberg i Pricer (5). Autorzy ci stwierdzili również, że maksymalna wydajność estryfikacji glicerofosforanu zachodzi w obecności kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha (C_{14} , C_{17} , C_{18}), przy czym w ich badaniach jednakowo działał kwas oleinowy ($C_{18:1}$) i stearynowy ($C_{18:0}$). W badaniach tych nie interesowano się pozycją w jaką kwasy nasycone i nienasycone ulegały włączeniu. Za sugestią Kornberga i Pricera o występowaniu dwóch różnych enzymów katalizujących kolejne reakcje acylacji *sn*-glicero-3-fosforanu do kwasu lizofosfatydowego i fosfatydowego przemawiały również wyniki Landsa i Harta (6), którzy stwierdzili hamowanie pierwszej z tych reakcji przez niektóre związki blokujące grupy sulfhydrylowe. Według tych autorów (7) obydwie acylotransferazy nie wykazują specyficzności względem nasyconych lub nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wyniki te otrzymane były przy użyciu mikrosomów wątroby świnki morskiej, podobne dane uzyskali też inni autorzy badając mikrosomy wątroby szczura (8) i gołębia (9). Hill i wsp. (9) przy użyciu tych ostatnich jako źródła enzymu, ^{14}C -glicero-3-fosforanu jako akceptora oraz ekwimolarnych ilości stearyloCoA i linoleiloCoA stwierdzili powstawanie następujących cząsteczek kwasu fosfatydowego: $C_{18:0}/C_{18:0} - 15\%$, $C_{18:2}/C_{18:2} - 42\%$, $C_{18:2}/C_{18:0} - 22\%$, $C_{18:0}/C_{18:2} - 21\%$. Wynik ten mógł wskazywać na przypadkowe rozmieszczenie badanych kwasów tłuszczowych w pozycjach 1 i 2. Stwierdzono jednak przy użyciu skrawków wątroby pewną preferencję nienasyconych kwasów tłuszczowych do estryfikacji pozycji 2 (9) zgodną z wynikami innych badań, w których jako źródła enzymu używano mikrosomów różnych tkanek (10, 11). Frakcje lecytyny, fosfatydyloetanoloaminy i kwasu fosfatydowego analizowane po inkubacji mikrosomów wątroby szczura w obecności *sn*-glicero-3-fosforanu i różnych nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych zawierały około 80% nasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji 1 i podobnie około 80% nienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji 2 (tabela 1). Wyniki te przemawiają wyraźnie za wybiórczą syntezą określonych rodzajów molekularnych na poziomie syntezy kwasu fosfatydowego.

Dodatkowe przekonujące dane za powstawaniem asymetrycznych cząsteczek kwasu fosfatydowego uzyskano używając par różnie znakowanych kwasów tłuszczowych nasyconego i nienasyconego (11). Stwierdzono wówczas syntezę różnomolekularnych cząsteczek kwasu fosfatydowego, głównie takich w których liczba wiązań podwójnych odpowiadała liczbie wiązań występujących w podawanej parze kwasów tłuszczowych. W doświadczeniach tych stosowano w różnych kombinacjach znakowane trytem

nasycone kwasy tłuszczowe ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$) oraz znakowane węglem nienasycone kwasy tłuszczowe ($C_{18:2}$, $C_{18:3}$).

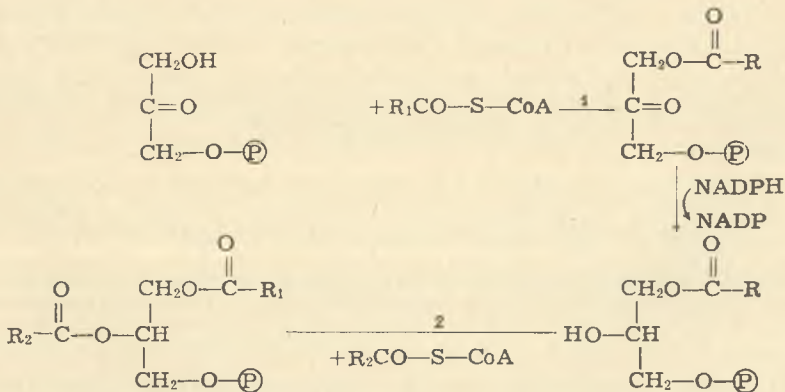
Bezpośrednich dowodów wybiórczej specyficzności acylotransferaz katalizujących syntezę kwasu fosfatydowego dostarczyły badania Yama-

Tabela 1.

Rozmieszczenie nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcjach fosfolipidów mikrosomów wątroby szczura inkubowanych w obecności glicero-3-fosforanu i różnych kwasów tłuszczowych (wg Possmayera i wsp. (11))

Kwas tłuszczowy	Lecytyna		Fosfatydyloacetno- loamina		Kwas fosfatydowy	
	1-pozycja %	2-pozycja %	1-pozycja %	2-pozycja %	1-pozycja %	2-pozycja %
$C_{16:0}$	83	17	87	13	72	28
$C_{18:0}$	90	10	86	14	86	14
$C_{18:2}$	6	94	22	78	16	84
$C_{18:3}$	12	88	32	68	20	80

shity i wsp. (12, 13) z użyciem częściowo oczyszczonych enzymów. Wykazano, że w reakcji estryfikacji glicero-3-fosforanu do 1-acyloglicero-3-fosforanu (kwasu lizofosfatydowego) bierze udział zaktywowany kwas nasycony, w reakcji katalizowanej przez drugą acylotransferazę tj. estryfikacji 1-acyloglicero-3-fosforanu do kwasu fosfatydowego wykorzystywany jest zaktywowany nienasycony kwas tłuszczowy, (nienasycony acyloCoA).



Schemat 2. Synteza kwasu fosfatydowego z fosforanu dwuhydroksyacetonu (wg (16, 17))

R_1 — reszta kwasu tłuszczowego nasyconego;
 R_2 — reszta kwasu tłuszczowego nienasyconego;
 1 i 2 kolejne reakcje acylacji.

Inne drogi syntezy kwasu fosfatydowego, a przynajmniej niektóre z nich, mogą być również odpowiedzialne za tworzenie różnomolekularnych fosfolipidów. Stosunkowo najdawniej opisana została (14) reakcja fosforylacji L-1,2-dwuglicerydu przy udziale ATP katalizowana, przez kinazę dwuglicerydu. Również droga syntezy kwasu fosfatydowego z aldehydu fosfoglicerynowego (15) lub fosforanu dwuhydroksyacetonu (16, 17) mogłaby prowadzić do powstawania określonych rodzajów cząsteczek kwasu fosfatydowego. Maksymalna wydajność estryfikacji fosforanu dwuhydroksyacetonu zachodzi w obecności nasyconego kwasu tłuszczowego, głównie palmitynowego (17). Powstający po redukcji przy udziale NADPH kwas lizofosfatydowy może ulegać dalszej acylacji, wykorzystując zaktwowany nienasycony kwas tłuszczowy (schemat 2).

Oprócz endoplazmatycznego retikulum mitochondria również wykazują zdolność do estryfikacji *sn*-glicero-3-fosforanu do kwasu lizofosfatydowego i fosfatydowego (18—24), a enzymy katalizujące obydwie reakcje znajdują się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (18—23). Natomiast enzymy katalizujące syntezę lecytyny i fosfatydyloetanoloaminy (omawiane dalej) występują wyłącznie w endoplazmatycznym retikulum (25—27).

I-2. Synteza różnomolekularnych cząsteczek lecytyny i fosfatydyoetanoloaminy na poziomie transferaz wykorzystujących pochodne CDP

Stymulację syntezy lecytyny przy udziale cholinofosfotransferazy (E.C. 2.7.8.2) w obecności dodanego dwuglicerydu zawierającego w cząsteczce nienasycony kwas tłuszczowy wykazano badając mikrosomy mózgu (29) jeszcze w roku 1966. Późniejsze badania z pracowni van Deenena (29, 30) przy użyciu mikrosomów wątroby szczura jako źródła enzymu i dwuglicerydów o różnym składzie kwasów tłuszczowych zawierających od 1 do 4 nienasyconych wiązań, nie wykazały specyficzności transferaz wykorzystujących CDP-cholinę i CDP-etanolaminę.

Porównanie jednak zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji lecytyny i fosfatydyloetanoloaminy wskazuje na znacznie większą ich zawartość w tej ostatniej (31, 32). Możliwość wykorzystania dwuglicerydów z dostępnej puli przez cholinofosfotransferazę (E. C. 2.7.8.2) i etanoloaminofosfotransferazę (E. C. 2.7.8.1) jest zagadnieniem odrębnym.

I-3. Inne możliwe drogi prowadzące do syntezy różnych rodzajów molekularnych lecytyny i fosfatydyloetanoloaminy

W wielu tkankach zwierzęcych wykazano reakcje bezpośredniej wymiany zasady pomiędzy fosfatydyloetanoloaminą a wolną seryną (33), a także innymi fosfolipidami i zasadami (34—37). Reakcje te katalizowane

przez frakcję mikrosomalną wymagają obecności jonów Ca^{2+} i zachodzą bez nakładów energii.

Również znana jest reakcja powstawania fosfatydyloetanolaminy przez dekarboksylację fosfatydyloseryny (33) (schemat 1). Inną reakcją na drodze wewnętrznych przemian fosfolipidów jest reakcja metylacji fosfatydyloetanolaminy przy udziale S-adenozylometioniny (38, 39). Produktami pośrednimi reakcji są monometylofosfatydyloetanolamina i dwumetylofosfatydyloetanolamina. Synteza tą drogą zachodzi głównie w śluzówce jelita i wątrobie. W tej ostatniej tkance według danych *Trewhelli* i *Collinsa* (40) reakcja metylacji fosfatydyloetanolaminy obok reakcji acylacji lizolecytyny odgrywa istotną rolę *in vivo* przy syntezie niektórych rodzajów molekularnych lecytyny zawierających kwas arachidonowy ($\text{C}_{20:4}$).

II. Degradacja fosfolipidów i acylacja lizofosfolipidów

W początkach lat sześćdziesiątych *Lands* (41) wysunął sugestię, że sprzężone reakcje deacylacji fosfolipidów i reacylacji lizofosfolipidów odpowiadają za asymetryczne rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w cząsteczkach fosfolipidów.

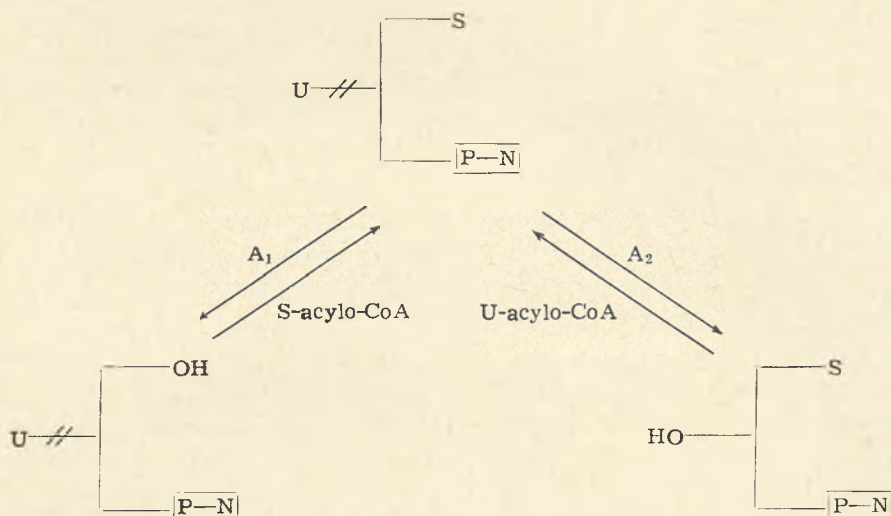
W tkankach zwierzęcych swoiste fosfolipazy (acylohydrolazy fosfolipidów) katalizują pierwsze z tych reakcji działając na wiązania estrowe w pozycjach 1 i 2 cząsteczki fosfolipidu. Wg zaproponowanej przez *van Deenena* i *de Haasa* (42) nomenklatury enzym powodujący hydrolizę wiązania estrowego w pozycji 1 nosi nazwę fosfolipazy A_1 , a odszczepiający resztę acylową w pozycji 2 — fosfolipazy A_2 . Wprowadzenie tych oznaczeń pozwoliło na zastąpienie mniej ścisłych dawniej stosowanych nazw fosfolipazy A hydrolizującej wiązanie estrowe w pozycji 2 oraz fosfolipazy B, która działała zarówno na wiązanie w pozycji 1 jak i 2 cząsteczki fosfolipidu.

Obecność fosfolipaz A_1 i A_2 stwierdzono w wielu tkankach ssaków jak śluzówce jelit, mózgu, wątrobie, trzustce i innych. Bogatym źródłem fosfolipazy A_2 są jady żmij.

Wg danych *Scherphofa*, *Waite'a* i *van Deenena* (43, 44) fosfolipazy A_1 i A_2 występują w różnych strukturach subkomórkowych. I tak autorzy ci badając frakcje wątroby szczura stwierdzają, że fosfolipaza A_2 znajduje się głównie w mitochondriach, podczas gdy fosfolipaza A_1 występuje we fragmentach endoplazmatycznego retikulum (mikrosomy). Enzymy te posiadają różne aktywatory i inhibitory. Fosfolipaza A_2 wymaga jonów Ca^{2+} a hamują ją związki chelatujące, podczas gdy aktywność fosfolipazy A_1 hamują jony metali dwuwartościowych. Całkowitą degradację fosfolipidów katalizuje lizofosfolipaza, enzym znajdujący się głównie we frakcji rozpuszczalnej (cytoplazmatycznej) (44, 45). W przeciwieństwie

do swoistości fosfolipaz lizofosfolipaza nie wykazuje specyficzności, katalizując odszczepienie kwasu tłuszczowego zarówno w pozycji 1, jak i 2 cząsteczki lizofosfolipidu.

Powstające w wyniku działania fosfolipazy A_1 i A_2 monoacylowe pochodne fosfolipidów mogą być selektywnie acylowane przez odpowiednie acylotransferazy (Schemat 3).



Schemat 3. Schemat degradacji fosfolipidów przez fosfolipazy A_1 i A_2 oraz reacylacji powstałych lizofosfolipidów przy udziale specyficznych acylotransferaz lizofosfolipidów (wg (46))

S – kwasy nasycone;
U – kwasy nienasycone.

Izomeryczne formy lizofosfolipidów są specyficznymi akceptorami określonych kwasów tłuszczowych. I tak gdy jako substratu używano 1-acylofosfatydylocholiney inkorporacji uległy nienasycone kwasy tłuszczowe, gdy stosowano 2-acylofosfatydylocholinę to wbudowaniu ulegały kwasy nasycone. Podobna selektywność inkorporacji ma miejsce w przypadku lizofosfolipidów etanolaminowych (47, 48). Van den Bosch i wsp. (49) przy użyciu mikrosomów wątrobowych jako źródła enzymu i 1-acylolizolecytyny jako akceptora stwierdzili następującą zależność inkorporacji kwasów tłuszczowych: oleinowy \rangle linolowy \rangle laurynowy \rangle palmitynowy \rangle stearynowy. Gdy jako akceptora użyto 2-acylolizolecytyny stwierdzono następującą kolejność inkorporacji kwasów tłuszczowych: stearynowy \rangle palmitynowy \rangle laurynowy, a w znacznie mniejszym stopniu niż ten ostatni oleinowy i linolowy. Na ogół 1-acylolizofosfolipidy wydają się być lepszymi akceptorami kwasów tłuszczowych niż ich izomeryczne formy.

Szereg danych (50) wskazuje, że za inkorporację nasyconych kwasów tłuszczowych do 2-lizofosfolipidów, a kwasów nienasyconych do 1-lizofosfolipidów odpowiedzialne są specyficzne acylotransferazy. Specyficzność

tych enzymów jest różna w różnych tkankach, jest bardzo wysoka w mikrosomach wątroby szczura, (49) natomiast dużo niższa w mikrosomach wątroby świnki morskiej (9). Z kolei w tkance płucnej występuje specyficzna acylotransferaza odpowiedzialna za wprowadzenie kwasu palmitynowego w pozycję 2 lizolecytyny (32).

Sądono początkowo, że acylotransferazy występują wyłącznie we frakcji mikrosomalnej (51). Uzyskano jednak dane, że również i mitochondria są zdolne do acylacji lizofosfolipidów (18, 21). Enzymy katalizujące ten proces, podobnie jak acylotransferazy *sn*-glicero-3-fosforanu, występują w zewnętrznej błonie mitochondriów.

Badania Scherphof'a i van Deenen'a (52) w których zastosowano różnie znakowane prekursorzy i śledzono stosunek izotopów w syntetyzowanych fosfolipidach wskazują na znaczny udział drogi acylacji lizofosfolipidów w syntezie lecytyny i fosfatydyloetanolaminy. I tak w wyniku inkubacji L - 3 H-glicero-3-fosforanu i znakowanych 14 C kwasów tłuszczowych w obecności mitochondriów, mikrosomów, stwierdzono, że stosunek izotopowy 3 H/ 14 C jest inny we frakcji kwasu fosfatydowego, a inny we frakcji lecytyny i fosfatydyloetanolaminy. Gdyby inkorporacja kwasów tłuszczowych do cząsteczek lecytyny i fosfatydyloetanolaminy odbywała się wg schematu Kennedy'ego, (schemat 1), stosunek izotopowy powinien być we wszystkich frakcjach identyczny. Gdyby natomiast kwasy tłuszczowe ulegały wbudowywaniu wyłącznie drogą acylacji lizofosfolipidów stosunek ten byłby równy zeru. Stwierdzono jednak, że stosunek izotopowy w kwasie fosfatydowym był znacznie wyższy niż w lecytynie i fosfatydyloetanolaminie. W przypadku zaś tych ostatnich fosfolipidów był on także wyższy od zera, co świadczyło, że synteza fosfolipidów cholinowych i etanolaminowych zachodziła obydwoma drogami.

Na obecnym etapie badań trudno jest ustalić jaki jest udział drogi acylacji lizofosfolipidów w biosyntezie fosfolipidów *in vivo*. Wydaje się jednak, że tą drogą może zachodzić synteza nowych, niewystępujących w warunkach fizjologicznych rodzajów molekularnych fosfolipidów. Przemawia za tym między innymi zmiana składu kwasów tłuszczowych w lecytynie wątroby zwierząt karmionych pokarmem pozbawionym niezbędnych wielonasyconych kwasów tłuszczowych (53). Szereg danych wskazuje również, że reakcje acylacji lizofosfolipidów mogą mieć duże znaczenie przy wprowadzaniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do cząsteczek fosfolipidów, szczególnie fosfatydyloetanolaminy.

(Artykuł nadszedł 6.9.1973)

PIŚMIENNICTWO

1. van Deenen L. L. M., (1971), *Pure Appl. Chem.*, **25**, 25—56.
2. Montfoort A., van Golde L. M. G., van Deenen L. L. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 335—342.

3. Klaus M. H., Clements J. A., Havel R. J., (1961), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 1858—1859.
4. Kennedy E. P., (1953), *J. Biol. Chem.*, **201**, 399—412.
5. Kornberg A., Pricer W. E. jr., (1953), *J. Biol. Chem.*, **204**, 345—357.
6. Lands W. E. M., Hart P., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1905—1911.
7. Lands W. E. M., Hart P., (1964), *J. Lipid Res.*, **5**, 81—87.
8. Stoffel W., De Tomás M. E., Schiefer H-G., (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.*, **348**, 882—890.
9. Hill E. E., Husbands D. R., Lands W. E. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4440—4451.
10. Husbands D. R., Reiser R., (1966), *Fed. Proc.*, **25**, 405.
11. Possmayer F., Scherphof G. L., Dubbelman T. M. A. R., van Golde L. M. G., van Deenen L. L. M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 95—110.
12. Yamashita S., Numa S., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 565—573.
13. Yamashita S., Hosaka K., Numa S., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3490—3492.
14. Hokin M. R., Hokin L. E., (1959), *J. Biol. Chem.* **234**, 1381—1386.
15. Rao G. A., Sorrels M. F., Reiser R., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 252—256.
16. Hajra A. K., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3458—3465.
17. Hajra A. K., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 929—935.
18. Stoffel W., Schiefer H-G., (1968), *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.*, **349**, 1017—1026.
19. Zborowski J., Wojtczak L., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 73—84.
20. Shephard E. H., Hübscher G., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 429—440.
21. Sarzała M. G., van Golde L. M. G., De Kruyff B., van Deenen L. L. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 106—119.
22. Daae L. N. W., Bremer J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 92—104.
23. Monroy G., Rola F. H., Pullman M. E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6884—6894.
24. Bremer J., Daae L. N. W., Christophersen B. O., (1973), IX Int. Congr. Biochem., abstracts, str. 386.
25. Wilgram G. F., Kennedy E. P., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 2615—2619.
26. Mc Murray W. C., Dawson R. M. C., (1960), *Biochem. J.*, **112**, 91—108.
27. Jungalwala F. B., Dawson R. M. C., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 399—402.
28. Mc Caman R. E., Cook K., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3390—3394.
29. Mudd J. B., van Golde L. M. G., van Deenen L. L. M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 547—556.
30. De Kruyff B., van Golde L. M. G., van Deenen L. L. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 425—435.
31. Arvidson G. A. E., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 478—486.
32. Vereyken J. M., Montfoort A., van Golde L. M. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 70—81.
33. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., Fielding L., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, PC 28.
34. Dills R. R., Hübscher G., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 505—513.
35. Porcellati G., Arienti G., Pirotta M., Giorgini A., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1395—1417.
36. Kanfer J. N., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 468—476.
37. Bjerve K. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 549—562.
38. Bremer J., Greenberg D. M., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 205—216.

39. Gibson K. D., Wilson J. D., Udenfriend S., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 673—679.
40. Trehwella M. A., Collins F. D., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 51—61.
41. Lands W. E. M., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2233—2237.
42. van Deenen L. L. M., De Haas G. H., (1966), *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 157—194.
43. Scherphof G. L., Waite M., van Deenen L. L. M., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 406—409.
44. Waite M., van Deenen L. L. M., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 498—517.
45. Erbland J. F., Marinetti G. V., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 128—138.
46. van Deenen L. L. M., (1972), *Naturwissenschaften* **59**, 485—491.
47. Lands W. E. M., Merkl I., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 898—904.
48. Merkl I., Lands W. E. M., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 905—906.
49. van den Bosch H., van Golde L. M. G., Slotboom A. J., van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 694—703.
50. Hill E. E., Lands W. E. M., (1970), w *Lipid Metabolism*, red. J. S. Wakil str. 185—278, Academic Press, New York.
51. Eibl H., Hill E. E., Lands W. E. M., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **9**, 250—258.
52. Scherphof G. L., van Deenen L. L. M., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 417—420.
53. van Golde L. M. G., Pieterse W. A., van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 84—95.

WALDEMAR LUTZ* LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ**

Chemiczna synteza i właściwości analogów hormonów peptydowych

Chemical Synthesis and Properties of Peptidic Hormone Analogues

Termin peptydy stosuje się na ogół na określenie związku o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 10 000 daltonów (80—90 aminokwasów), pozostawiając termin białka na określenie cząsteczek o większej masie (1). Peptydy pod względem budowy chemicznej należą do grupy amidów kwasowych. Przyroda nie uznaje oczywiście konwencji terminologicznych i zakresy ciężarów cząsteczkowych naturalnych peptydów oraz białek nie są odgraniczone. Jest rzeczą sporną czy insulinę, której cząsteczki są zbudowane z 51 aminokwasów, należy uznać za „duży” peptyd czy też za „małe” białko. Również niesprecyzowane są nazwy „oligopeptyd” i „polipeptyd” (2).

Rozmiary występujących w przyrodzie peptydów są zróżnicowane, od małych dwupeptydów (anseryna, karnoizyna) do peptydów o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym ponad 8000 daltonów (parathormon). Ich aktywność różni się również w bardzo szerokim zakresie. Jedne z naturalnych peptydów są wysoce aktywne biologicznie (hormony, antybiotyki), podczas gdy inne takiej właściwości nie wykazują.

Stosowane dotychczas metody badania składu i sekwencji aminokwasowej peptydów nie zawsze pozwalają na ostateczne rozszyfrowanie struktury badanego peptydu. Często poznanie budowy nowoodkrytych peptydów naturalnych dokonuje się poprzez syntezę chemiczną analogów tych peptydów i porównanie ich właściwości biologicznych i fizykochemicznych (3—8).

Chemiczna synteza peptydów dostarcza informacji nie tylko o budowie peptydu ale pozwala również wykazać zależności, jakie istnieją między strukturą danego peptydu a jego właściwościami biologicznymi. Przeprowadzone na drodze chemicznej modyfikacje hormonów peptydowych wy-

* Dr, III Klinika Chorób Wewnętrznych, Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź.

** Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź.

kazały, że można wymieniać lub usuwać niektóre aminokwasy z cząsteczek peptydów bez zmiany ich aktywności biologicznej. W wielu przypadkach udało się nawet uzyskać syntetyczne analogi o aktywności przewyższającej aktywność naturalnych hormonów peptydowych (9—12). Doświadczalnie sprawdzono przede wszystkim, które aminokwasy są niezbędne dla wystąpienia odpowiednich właściwości hormonalnych, a które są odpowiedzialne za łączenie się hormonu peptydowego z właściwymi receptorami na powierzchni komórki. Stwierdzono ponadto, które z aminokwasów w cząsteczce są „zbędne”, tj. nie mają zasadniczego wpływu na aktywność hormonalną danego peptydu. Wykazano także, że oprócz aminokwasów „zbędnych” w cząsteczkach hormonów peptydowych mogą występować także aminokwasy „niejednoznaczne”, które wprawdzie można zastąpić przez inne podobne aminokwasy nie zmieniając aktywności biologicznej peptydu, ale skrócenie łańcucha o ten aminokwas może całkowicie znieść aktywność biologiczną (13—17). Aminokwasy te są zaangażowane w utrzymanie takiego kształtu cząsteczki hormonu peptydowego, aby aminokwasy odpowiedzialne za jego łączenie się z właściwym receptorem pozostawały w odpowiednich wzajemnych stosunkach przestrzennych.

Chemiczna synteza peptydów, szczególnie synteza większych peptydów, jest procesem bardzo czasochłonnym w porównaniu z możliwościami, jakimi dysponuje żywy organizm. W żywym organizmie peptydy są tworzone z szybkością minutową a nawet sekundową, podczas gdy zespół doświadczonych chemików potrzebuje wielu godzin lub dni dla przeprowadzenia syntezy bardziej złożonych peptydów (5). Z drugiej strony przyroda aby przeprowadzić mutację genu, której konsekwencją byłaby wymiana jednego aminokwasu w cząsteczce peptydu, potrzebuje czasu rzędu setek tysięcy a nawet milionów lat (18), a chemiczna synteza, mimo swojej niedoskonałości, daje możliwość wprowadzenia szybkich i wielokierunkowych zmian w składzie aminokwasowym cząsteczki peptydu.

Peptydy biologicznie czynne występują w organizmie w bardzo małych ilościach, stąd ich wyodrębnienie i otrzymanie w czystej postaci jest związane z ogromnymi trudnościami (19). Dopiero synteza chemiczna umożliwiła szerokie zastosowanie tych peptydów w badaniach naukowych i lecznictwie. Dalszy postęp w powszechnym stosowaniu hormonów peptydowych wiąże się z uproszczeniem ich syntezy poprzez pominięcie aminokwasów, których obecność w cząsteczce hormonu nie okazała się konieczna dla aktywności biologicznej.

I. Chemiczna synteza peptydów

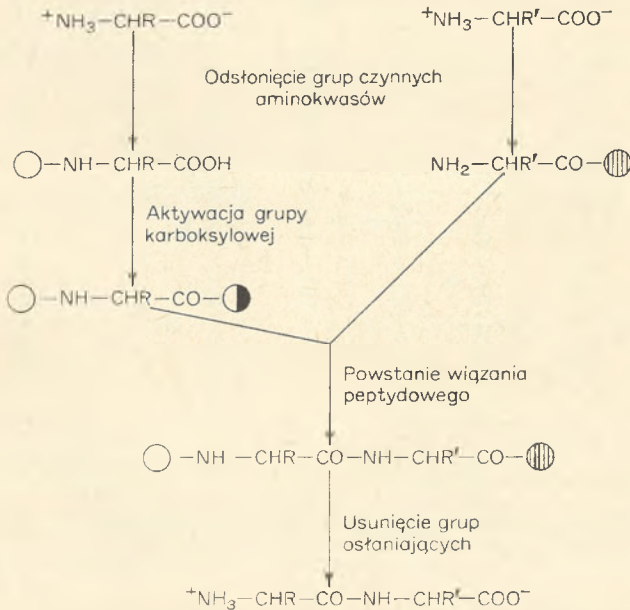
Początki rozwoju chemii peptydów sięgają końca XIX i początku XX wieku i wiążą się z pionierskimi pracami Curtiusa i Fischera. Jednak dopiero po 1954 r., kiedy du Vigneaud (20) dokonał pierwszej syn-

tezy hormonu peptydowego — oksytocyny, zaczął się burzliwy rozwój tej gałęzi chemii. Od tego czasu obok licznych prac dotyczących samej techniki prowadzenia procesu syntezy peptydów, główne kierunki badań zmierzają do syntezy peptydów o identycznej budowie jak peptydy naturalne, a także peptydów będących analogami tych peptydów o zmienionej budowie chemicznej. Narastająca w ogromnym tempie ilość syntetycznych analogów peptydów naturalnych wymagała ustalenia zasad ich nazewnictwa. W związku z tym Komisja Nazewnictwa Biochemicznego (CBN), działająca przy Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) oraz Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB) przedstawiła zalecenia poprawnego tworzenia nowych nazw dla syntetycznych pochodnych peptydów naturalnych (21). Niektóre z podstawowych zasad przedstawiono w tabeli 1 na przykładzie angiotensyny II.

I-1. Podstawowe zasady i sposób postępowania

Synteza dwupeptydu z odpowiednich aminokwasów wymaga utworzenia wiązania peptydowego w taki sposób, aby zachowana została prawidłowa kolejność aminokwasów oraz wyeliminowana możliwość racemizacji przy asymetrycznych atomach węgla w pozycji α (22, 23).

Reakcja ta przebiega zwykle przez następujące etapy:



Ryc. 1. Kolejne etapy reakcji prowadzących do syntezy dwupeptydu

○ i ⊖ — ugrupowania osłaniające grupy czynne aminokwasów,
◐ — ugrupowanie aktywujące grupę karboksylową

Tabela 1.

Angiotensyna II i nazewnictwo jej syntetycznych pochodnych

Skład aminokwasowy peptydu	Rodzaj zmiany dokonanej w peptydzie naturalnym	Nazwa skrótowa peptydu
H—Asp—Arg—Wal—Tyr—Ile—His—Pro—Fen—OH 1 2 3 4 5 6 7 8	—	Angiotensyna II (nazwa wyjściowa)
H—Asp—Arg—Wal—Tyr—Wal—His—Pro—Fen—OH 5	Wymiana aminokwasu	Wal ⁵ -angiotensyna II
H—Asp—Arg—Wal—Tyr—Ile—His—Pro—Fen—Leu—OH 8	Wydłużenie łańcucha peptydowego	Angiotensylo II-Leu
H—Asp—Arg—Wal—Tyr—Tyr—Ile—His—Pro—Fen—OH 4 4a 5	Wystawienie aminokwasu	Endo-Tyr ^{4a} -angiotensyna II
H—Arg—Wal—Tyr—Ile—His—Pro—Fen—OH 2	Eliminacja aminokwasu	Des-Asp ¹ -angiotensyna II
Wal H—Asp—Arg—Wal—Tyr—Ile—His—Pro—Fen—OH 1	Rozgałęzienie peptydu	C ^{β1} -angiotensylo II-Wal
H—Arg—Wal—Tyr—Ile—OH 2 5	Fragmentacja peptydu	Angiotensyno II-(2—5) czteropeptyd

- a) osłonięcie grupy aminowej aminokwasu, który ma stanowić N-końcową resztę dwupeptydu;
- b) osłonięcie grupy karboksylowej aminokwasu mającego być C-końcową resztą dwupeptydu;
- c) ewentualne osłonięcie grup czynnych w łańcuchach bocznych aminokwasów;

Tabela 2.

Ugrupowania osłaniające grupy czynne aminokwasów podczas syntezy łańcucha peptydowego (5)

Ugrupowanie osłaniające aminokwas	Nazwa rodnika ugrupowania osłaniającego	Nazwa skrótnowa	Czynnik usuwający ugrupowanie osłaniające
$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	Benzyloksi-	OBzl	Katalityczna wodoroliza, HBr lub HF w CF_3COOH ,
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Benzyloksikarbonyl-	Z-	
$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{O}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_3$	III-rzędowy butyloksi-	OBu	Zimny CF_3COOH
$\text{CH}_3-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	III-rzędowy butyloksi karbonyl-	Boc-	
$\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2)-\text{S}-\text{NH}-\overset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	2-nitrofenylosulfenyl-	Nps	Lekkie zakwaszenie + indol

d) przeprowadzenie grupy karboksylowej aminokwasu z osłoniętą grupą aminową w odpowiednią aktywną pochodną, która ulega nukleofilowemu atakowi grupy aminowej aminokwasu z osłoniętą grupą karboksylową, w wyniku czego powstaje dwupeptyd z osłoniętymi grupami czynnymi;

e) usunięcie grup osłaniających i wyodrębnienie czystego dwupeptydu (Ryc. 1).

Tak więc w tworzeniu wiązania peptydowego powinny brać udział tylko jedna grupa aminowa i jedna grupa karboksylowa. Grupy funkcyjne,

które nie powinny reagować, muszą być zablokowane przez ugrupowania osłaniające.

Wyróżnia się dwa zasadnicze rodzaje ugrupowań osłaniających, a mianowicie takie, które uczestniczą pośrednio w syntezie peptydu chroniąc grupy α -aminowe oraz α -karboksylowe i mogą być selektywnie odszczepiane, a także takie, które osłaniają grupy czynne łańcuchów bocznych aminokwasów podczas całej syntezy peptydu. Wszystkie te ugrupowania muszą zostać usunięte po zakończeniu syntezy na takiej drodze, aby nie uległ zmianie produkt reakcji — nowosyntezowany peptyd (24—28).

Z uwagi na to, że większość peptydów jest stabilna w pH kwasowym, spośród grup ochronnych korzystniejsze są te, które są łatwo odszczepiane w środowisku kwasowym (29—33). Liczba znalezionych ugrupowań osłaniających jest duża ale tylko nieliczne mają szerokie zastosowanie (5). W tabeli 2 przedstawiono najczęściej używane typy podstawników do osłony grup aminowych i karboksylowych.

Jednym z istotnych problemów w chemii peptydów jest proces racemizacji, jaki może towarzyszyć syntezie wiązania peptydowego (22, 23, 34). Utworzenie wiązania peptydowego między grupami $-\text{NH}_2$ i $-\text{COOH}$ z wydzieleniem cząsteczki wody jest procesem endoergicznym, dlatego też konieczną staje się aktywacja grupy karboksylowej. Utworzenie „aktywnej” cząsteczki aminokwasu stwarza z kolei możliwość racemizacji, co powoduje obniżenie aktywności biologicznej zsyntezowanego peptydu, ponieważ obok właściwego stereoisomeru powstaje inny izomer przestrzenny, który na ogół nie jest aktywny (5, 16). Ogromna liczba metod oraz ugrupowań aktywujących (27) stosowanych w procesie syntezy wiązań peptydowych są miarą wkładu pracy dla wyeliminowania ryzyka racemizacji. O wyborze odpowiedniego ugrupowania aktywującego, w przeprowadzeniu syntezy wiązania peptydowego decyduje jego reaktywność w stosunku do nukleofilowej grupy aminowej, a także łatwość wywoływania racemizacji (16).

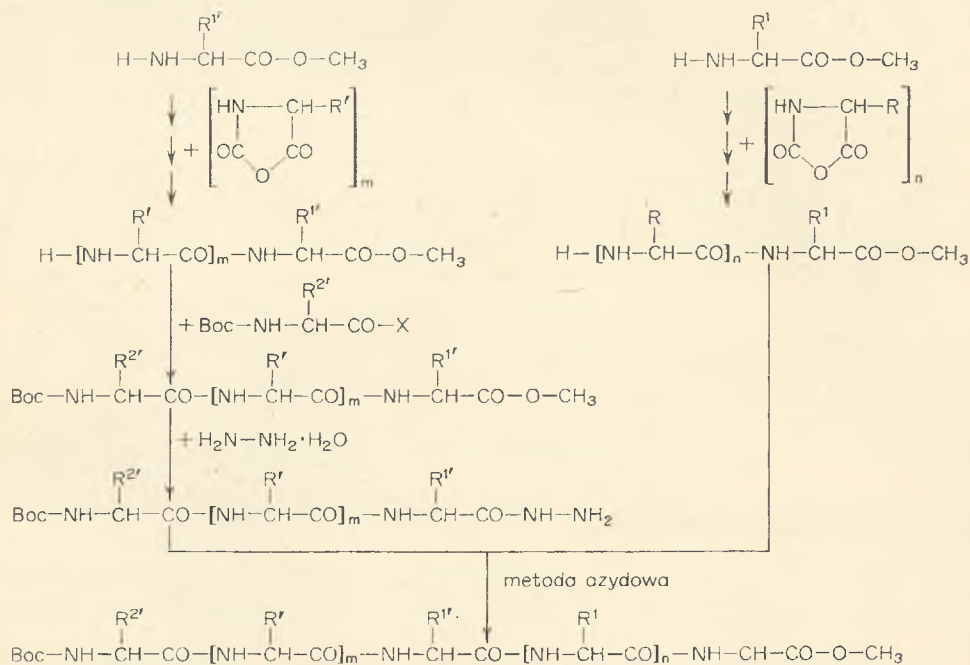
Szerokie zastosowanie w syntezie wiązań peptydowych znajdują tzw. „estry aktywne”, otrzymywane w wyniku kondensacji aminokwasu i odpowiedniego fenolu w obecności NN'-dwucykloheksylokarbodwumidu (35, 36) albo też w wyniku reakcji transestryfikacji N-acyloaminokwasu przy zastosowaniu fosforynów i siarczynów arylowych (27). Ostatnio wprowadzono inne typy estrów aktywnych między innymi estry N-hydroksymidu kwasu bursztynowego (37).

I-2. Metody syntezy

Stosowane obecnie metody syntezy peptydów dają się wyprowadzić z dwóch zasadniczych technik, tj. z technik konwencjonalnych oraz technik syntezy na nierozpuszczalnym podłożu nośnym (38).

W grupie technik konwencjonalnych wyróżniają się dwa sposoby postępowania. Pierwsza z nich polega na stopniowej syntezie peptydu przy

maksymalnym osłonięciu wszystkich grup czynnych aminokwasów (39); był on użyty w syntezie glukagonu (40) i kalcytoniny (41). W drugim sposobie postępowania synteza peptydu przebiega przy możliwie najmniejszym osłanianiu grup czynnych. Metoda ta bazuje na kierowanym, systematycznym przyłączaniu pojedynczych aminokwasów poprzez odpowiednie bezwodniki N-karboksyłowe aminokwasów (42) (Ryc. 2).



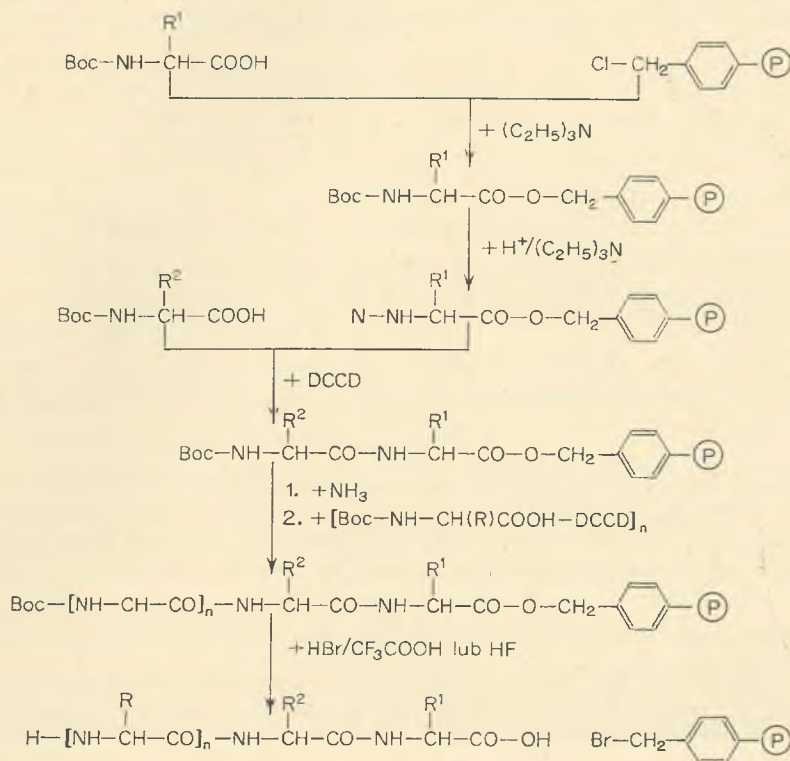
Ryc. 2. Konwencjonalna synteza peptydów z możliwie najmniejszym osłanianiem grup czynnych przy użyciu bezwodników N-karboksyłowych aminokwasów
Boc — trzeciorzędowy butyloksykarbonyl, X — bursztynyloimidyl (wg 38)

Technika konwencjonalna z użyciem aminokwasów z całkowicie osłoniętymi grupami czynnymi umożliwia syntezę peptydów, jak też ich łączenie w odpowiednie większe peptydy, przy praktycznie całkowitym wykluczeniu powstawania produktów ubocznych (12, 22). Sposób ten jednak nadaje się do syntezy peptydów zbudowanych najwyżej z około 30 aminokwasów, z uwagi na trudną rozpuszczalność dużych łańcuchów peptydowych obciążonych grupami osłaniającymi (38).

Technika konwencjonalna z możliwie najmniejszym osłanianiem grup czynnych aminokwasów nie daje już pewności, że zsyntezowany peptyd będzie wolny od produktów ubocznych. W związku z tym peptyd jest budowany poprzez syntezę małych fragmentów peptydowych, które następnie łączą się w większe cząsteczki (38, 43—46).

Techniki z użyciem nierozpuszczalnego podłoża nośnego dla syntezy

peptydów posługują się stopniowym dobudowywaniem kolejnych aminokwasów, według właściwej kolejności, na podłożu z nierozpuszczalnej żywicy syntetycznej. Nowosyntezowany peptyd jest kowalencyjnie związany z żywicą i zostaje odłączony dopiero po zakończeniu syntezy (47—51).



Ryc. 3. Synteza peptydów na nierozpuszczalnym podłożu nośnym wg Merrifielda (47)

P — polimer, DCCD — dwucykloheksylokarbodiimid, Boc — trzeciorzędowy butyloksykarbonyl

Najpopularniejszą jest technika opracowana w 1963 roku przez Merrifielda (47) (Ryc. 3), a pierwszym naturalnym peptydem otrzymanym w ten sposób była bradykinina (52). Żywica stosowana w tej metodzie jako podłoże nośne jest kopolimerem styrenu i dwuwinylobenzenu. Miejsca wiążące dla grupy karboksylowej C-końcowego aminokwasu syntetyzowanego peptydu uzyskano przez wprowadzenie w żywicę grup chlorometylenowych (ClCH_2 -). Usieciowanie żywicy jest tak dobrane, aby cechowały ją całkowita nierozpuszczalność oraz wysoki stopień pęcznienia w rozpuszczalnikach organicznych. Umożliwia to prowadzenie syntezy nie tylko na powierzchni ziaren żywicy (średnica 50μ), ale również w ich wnętrzu. W ten sposób każde ziarno służy jako podłoże nośne dla jednoczesnej syntezy 10^{12} łańcuchów peptydowych (53).

W pierwszym etapie syntezy odpowiednia pochodna N-acylowa C-końcowej reszty aminokwasowej peptydu, ogrzewana z żywicą i aminą trzeciorzędową w chlorku metylenu, przekształca się w nierozpuszczalny ester typu estru benzylowego. Po usunięciu ugrupowania N-acylowego, osłaniającego grupę α -aminową aminokwasu związanego z żywicą, przeprowadza się reakcję syntezy wiązania peptydowego z następnym N-acyloaminokwasem zaktywowanym przez NN'-dwucykloheksylokarbodwuimid lub ugrupowanie nitrofenylowe. Powtarzanie opisanego cyklu reakcji prowadzi do stopniowego przedłużania łańcucha peptydowego. Użyte w syntezie aminokwasy muszą mieć osłonięte wszystkie grupy czynne z wyjątkiem grupy α -karboksylowej. Po zakończonym dobudowywaniu aminokwasów usuwa się osłaniające ugrupowanie N-acylowe na ostatnim aminokwasie oraz rozszczepia się wiązanie estrowe łączące peptyd z żywicą, działając bromowodorem w kwasie trójfluorooctowym lub ciekłym fluorowodorem. Podczas tej ostatniej operacji zostają również usunięte ugrupowania osłaniające grupy czynne łańcuchów bocznych.

Zastosowanie nierozpuszczalnego podłoża nośnego dla peptydu i pośrednich produktów jego syntezy wyeliminowało konieczność oczyszczania ich przez krystalizację; nadmiar substratów i produkty uboczne można usunąć przez wymywanie po zakończeniu każdego etapu syntezy. Istnieją próby automatyzacji procesu w ten sposób, aby w określonym czasie były dodawane odpowiednie odczynniki (53).

Metoda z zastosowaniem stałego podłoża do syntezy peptydów okazała się również przydatną do syntezy białek. Przy jej użyciu dokonano syntezy obu łańcuchów insuliny (54, 55), analogu cytochromu c serca końskiego (56), rybonukleazy A z trzustki wołu (57) oraz ludzkiego hormonu wzrostowego (58).

Technika ta ma jednak wiele niedociągnięć, które w znacznym stopniu ograniczają jej zastosowanie do syntezy peptydów i białek o działaniu farmakologicznym (38). Główne z nich są następujące:

a) praktycznie żaden z etapów tworzenia wiązania peptydowego nie przebiega ze 100% wydajnością, co prowadzi do powstawania peptydów o wadliwej sekwencji;

b) związki, które muszą być użyte do oddzielenia końcowego produktu syntezy od stałego podłoża nośnego powodują często jego degradację;

c) szereg trudności wynika z efektu przestrzennej zawady rosnących łańcuchów peptydowych oraz utrudnionego dostępu odczynników reakcyjnych do wnętrza podłoża nośnego;

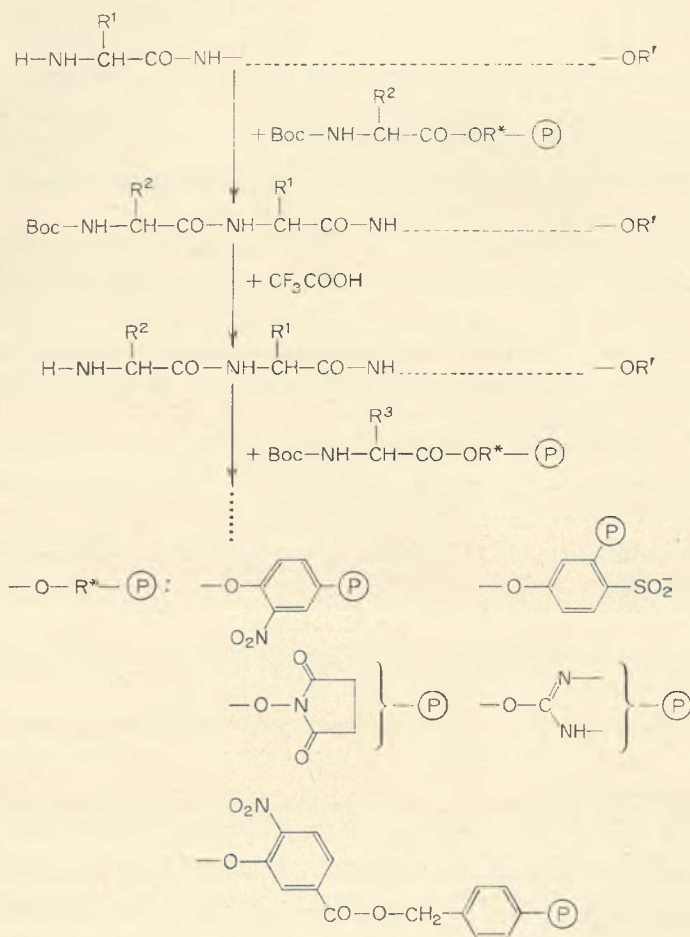
d) metody analityczne stosowane do kontroli nie są wystarczająco czułe, by uchwycić niedokładności w przebiegu procesu syntezy.

Technika Merrifielda (47) doczekała się licznych modyfikacji, w których stosuje się różne „grupy zaczepiające” w celu polepszenia wydajności procesu syntezy oraz skrócenia czasu reakcji (48, 50, 59—62).

Pomysł Merrifielda użycia polimeru jako nośnika w syntezie peptydów

został także zaadaptowany do analizy sekwencji aminokwasowej peptydów z wykorzystaniem ich degradacji według Edm ana (63, 64).

W innej technice syntezy z użyciem nierozpuszczalnego podłoża nośnego N-acyloaminokwasy są przeprowadzone z użyciem odpowiedniej żywicy jako nośnika w aktywne pochodne karboksylowe i jako takie są wiązane z odpowiednim aminokwasem lub peptydem (65, 66). Zasadnicze etapy tej techniki oraz stosowane rodzaje ugrupowań aktywujących związanych z żywicą przedstawia rycina 4.



Ryc. 4. Synteza peptydów z użyciem aktywnych pochodnych aminokwasów związanych z nierozpuszczalnym podłożem nośnym (38)

-OR*—P — ugrupowania aktywujące związane z żywicą, P — polimer, Boc — trzeciorzędowy butyloksykarbonyl

Ostatnio (67) wprowadzono do syntezy peptydów tzw. podłoże ciekłe, aby wyeliminować tym samym główne niedogodności stosowania podłoża stałego, tj. efekt zawady przestrzennej rosnących łańcuchów peptydowych

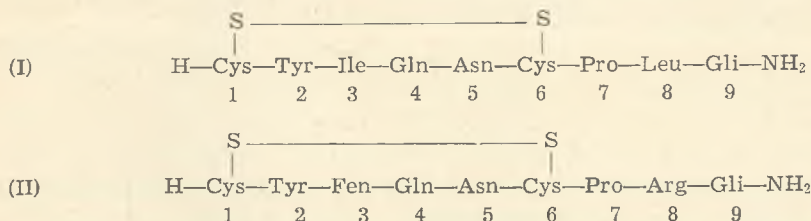
i utrudniony dostęp odczynników i substratów do wnętrza podłoża nośnego. W metodzie tej rosnący łańcuch peptydowy jest związany z podłożem nośnym, tj. glikolem polietylenowym o masie 10 000 daltonów, poprzez wiązanie estrowe między grupą karboksylową pierwszego aminokwasu (nowo powstającego peptydu) a grupą hydroksylową glikolu polietylenowego. Wszystkie etapy reakcji przebiegają w roztworze, a niskocząsteczkowe produkty uboczne oraz nadmiary odczynników są usuwane przez ultrafiltrację.

II. Zależność między budową a aktywnością biologiczną hormonów peptydowych

Peptydy o właściwościach hormonów nie posiadają autonomii odczykowej podobnej do tej, jaką wykazują enzymy. Są one swego rodzaju wysłannikami, które dopiero po związaniu się ze specyficznymi receptorami wyzwalają w miejscu swego działania reakcję lub łańcuch reakcji. Powodując odpowiednie zmiany w sekwencji aminokwasowej hormonu peptydowego można badać zależności występujące między jego budową chemiczną a aktywnością biologiczną.

II-1. Oksytocyna i wazopresyna

Produkowane przez jądra podwzgórza, a magazynowane w części tylnej przysadki (68), oksytocyna (I) i wazopresyna (II) są dziewięciopeptydami należącymi do grupy heterodetycznych peptydów monocyklicznych*



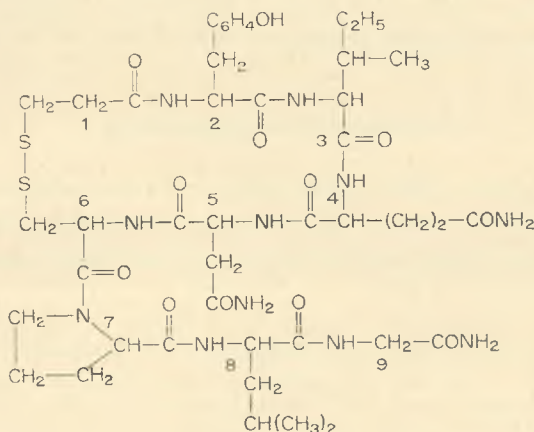
(1). W cząsteczkach tych hormonów dwudziestoczłonowy pierścień (por. ryc. 5) z trójpeptydowym łańcuchem bocznym utworzony jest z udziałem wiązania dwusiarczkowego. Wyrazem aktywności biologicznej oksytocyny jest skurcz mięśni gładkich macicy oraz gruczołów mlecznych (2), a wazopresyny — resorpcja zwrotna wody w dystalnej części kanalika nerkowego (działanie antydiuretyczne) oraz skurcz naczyń krwionośnych (działanie

* Peptydy homodetyczne — aminokwasy połączone tylko wiązaniami peptydowymi. Peptydy heterodetyczne — obok wiązań peptydowych występują także wiązania inne, np. dwusiarczkowe.

hipertensyjne) (2). Hormony te wydają się posiadać różne receptory tkanekowe dla wywołania odpowiedniego efektu fizjologicznego.

Oksytocyna jest pierwszym hormonem otrzymanym na drodze syntetycznej. W 1954 roku du Vigneaud i wsp. dokonali najpierw syntezy oksytocyny (20), a następnie wazopresyny (69). Od tego czasu liczba otrzymanych syntetycznych analogów obu tych hormonów przekroczyła liczbę 200 (70). Tak duża ilość syntetycznych analogów w znacznym stopniu umożliwiła wykazanie, jaki jest udział poszczególnych aminokwasów składowych w występowaniu odpowiednich aktywności biologicznych.

Wielu autorów (71—78) wykazało, że dla wystąpienia aktywności biologicznej oksytocyny i wazopresyny niezbędna jest obecność łańcucha peptydowego złożonego z 9 aminokwasów oraz dwudziestoczłonowa struktura pierścieniowa z mostkiem dwusiarczkowym. Wszelkie zmiany prowadzące do zwiększenia lub zmniejszenia liczby członów przez wprowadzenie (lub usunięcie) dodatkowych aminokwasów czy też grup metylenowych do pierścienia prowadzą do obniżenia aktywności biologicznej, a niektóre z otrzymanych analogów są inhibitorami hormonów naturalnych.



Ryc. 5. Struktura kowalencyjna 1-dezaminooksytocyny tj. [1-β-merkaptopropiono]oksytocyny (82)

Zależność właściwości biologicznych analogów oksytocyny i wazopresyny od ich budowy przestrzennej jest szczególnie widoczna w cząsteczkach z fragmentem peptydowym dołączonym do grupy aminowej cysteiny w położeniu 1. Takie analogi wywołują blokadę działania oksytocyny (79, 80), utrzymującą się jednak tylko przez pewien okres czasu zależny od sposobu wprowadzenia analogu do ustroju — domięśniowo lub dożylnie. Sądzi się, że analogi te zwane „hormonogenami” (81), nieaktywne w pierwotnej postaci, uzyskują aktywność w wyniku odtrawienia podstawnika przy grupie aminowej (70, 81).

Nieoczekiwanie wysoką aktywnością (skurcz mięśniówki macicy) odznacza się 1-dezaminooksytocyna, analog oksytocyny pozbawiony N-końcowej grupy aminowej (Ryc. 5) (82). Natomiast analog oksytocyny z acetylowaną N-końcową grupą aminową wykazywał tylko nieznaczną aktywność hormonu naturalnego (83), a bromoacetylooksytyocyna (84) okazała się silnym inhibitorem działania obu przysadkowych neurohormonów na cyklazę adenylową. Można więc sądzić, że usunięcie N-końcowej grupy aminowej ułatwia przestrzenne dopasowanie oksytocyny do receptora na powierzchni komórek, na które oddziałuje.

Otrzymana syntetycznie (85) [1- β -merkaptopropiono]-wazopresyna wykazywała prawie niezmienną aktywność presoryczną, natomiast odznaczała się zwiększoną aktywnością antydiuretyczną.

Interesujący jest udział grupy hydroksylowej reszty tyrozylowej (pozycja 2) w aktywności obu hormonów. Metylowanie grupy hydroksylowej tyrozyny w oksytocynie prowadzi do znacznego obniżenia jej aktywności skurczowej w stosunku do macicy i gruczołów mlecznych. Natomiast odpowiednia metylowana pochodna wazopresyny odznacza się słabym działaniem presorycznym, podczas gdy działanie antydiuretyczne pozostaje prawie niezmienione (1). Synteza [2-fenylalanino]-wazopresyny (86), a więc hormonu pozbawionego grupy hydroksylowej w pozycji 2 wykazała, że zmiana ta powoduje zanik działania antydiuretycznego przy nieznacznie zmniejszonej aktywności presorycznej. Całkowite usunięcie grupy fenylowej, np. przez syntezę [2-histydyno]-wazopresyny (87) prowadzi do pełnej utraty aktywności biologicznej. Wprowadzenie glicyny w położenie 2 pierścienia oksytocyny dostarcza również analogu nie wykazującego żadnej aktywności biologicznej (88). Te obserwacje dowodzą, że grupa hydroksyfenylowa w cząsteczce oksytocyny i grupa fenylowa w cząsteczce wazopresyny w pozycji 2 są niezbędne dla wystąpienia odpowiednich właściwości hormonalnych.

Godne uwagi rezultaty otrzymano przez zmianę reszty izoleucylowej w pozycji 3 oksytocyny (89, 90). Aktywność otrzymanych analogów zmniejszała się w kolejności: izoleucyna > walina > fenylalanina > tyrozyna > tryptofan. Można sądzić, że zmniejszenie aktywności analogów związane ze zmianą w pozycji 3 wynika z obniżenia efektywności wiązania się z receptorem.

Niezbędną dla aktywności hormonalnej obu peptydów jest obecność grup amidowych w pozycjach 4 i 5 (91, 92). Jednak reszta glutaminy w pozycji 4 może być podstawiona resztą asparaginy bez zmiany aktywności hormonalnej oksytocyny. Po podstawieniu glutaminy w cząsteczce wazopresyny obserwuje się nawet zwiększenie aktywności antydiuretycznej, jak to ma miejsce w przypadku [4-asparagino]-wazopresyny oraz [4-treonino]-oksytyocyny (93, 94). Szczególna aktywność tej ostatniej wynika zapewne z silnego oddziaływania reszty treonylowej z odpowiednim ugrupowaniem receptora wiążącego hormon (5).

Na ważną rolę proliny w pozycji 7 wskazują syntezy analogów oksytocyny i wazopresyny, w których resztę proliłową zastąpiono innymi aminokwasami (1). Wszystkie analogi nie zawierające proliny w pozycji 7 nie wykazywały aktywności hormonalnej.

Synteza analogów wazopresyny z aminokwasami zasadowymi, tj. cytruliną, ornityną i histydyną w pozycji 8 (95—98) wykazała, że większą rolę niż zasadowość grupy funkcyjnej odgrywa tu czynnik przestrzenny. Obecność argininy lub lizyny w pozycji 8 warunkuje pojawienie się aktywności presorycznej wazopresyny (1).

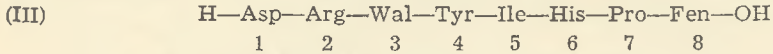
Za koniecznością występowania w cząsteczkach obu dyskutowanych hormonów reszty glicyloamidowej w pozycji 9 przemawia brak aktywności analogów [9-sarkozyno]-oksytocyny i [9-sarkozyno]-wazopresyny (99, 100).

R a s m u s s e n i wsp. (101) przebadali zależność aktywności hormonalnej od czynników strukturalnych na przykładzie 30 analogów oksytocyny i wazopresyny. W wyniku swoich doświadczeń postulują oni dwustopniowy mechanizm oddziaływania hormonu z receptorem. W pierwszym etapie hormon wiąże się z receptorem za pomocą wiązań jonowych, wodorowych i hydrofobowych (te ostatnie wydają się być najważniejsze), a w następnym — dochodzi do otwarcia wiązań dwusiarczkowych oraz do wytworzenia wiązań kowalencyjnych między hormonem a receptorem. W świetle nowszych badań nad aktywnymi analogami oksytocyny, w których siarkę zastąpiono grupami metylenowymi (102) lub selenem (103), ta koncepcja nie jest słuszną, gdyż aktywność ich nie odbiega od aktywności naturalnego hormonu.

Badania nad syntetycznymi analogami dostarczają nie tylko danych o zależności między aktywnością biologiczną a strukturą pierwszorzędową neurohormonów ale mogą również wyjaśnić ich budowę przestrzenną, warunkującą dopasowanie się cząsteczki hormonu do receptora. Metody wykorzystywane w oznaczaniu konformacji przestrzennej białek nie mogły znaleźć zastosowania w przypadku oksytocyny i wazopresyny, ponieważ mimo wielu wysiłków (104—107) nie udało się dotychczas otrzymać aktywnych analogów tych hormonów w odpowiedniej formie krystalicznej. C h i u i wsp. (108) uzyskali, co prawda, kryształy aktywnej biologicznie selenooksytocyny ale rozwiązanie problemu konformacji oksytocyny na drodze badań rentgeno-strukturalnych stanie się możliwe dopiero po zastąpieniu siarki w jej cząsteczce atomem o większej gęstości elektronowej. Porównanie zaś przestrzennej konformacji analogów aktywnych z nieaktywnymi pozwoli, być może, wyjaśnić mechanizm rozpoznawania przez hormon właściwego receptora komórkowego. Warto tu wspomnieć, że stosując inne metody m.in. badanie jądrowego rezonansu magnetycznego udało się już określić konformację cząsteczek oksytocyny (109) i wazopresyny w roztworach (110).

II-2. Angiotensyna II

W wyniku działania reniny (EC. 3.4.4.15) na α_2 -globuliny osocza krwi uwalnia się dziesięciopeptyd angiotensyna I. Proteolityczne odszczepienie dwupeptydu histydyloleucyny od końca z wolną grupą karboksylową angiotensyny I prowadzi do powstania angiotensyny II (III) powodującej skurcz naczyń krwionośnych. Hormon ten przeto podwyższa ciśnienie krwi; współuczestniczy on również w kontroli równowagi mineralnej poprzez uwalnianie aldosteronu (111).



Pierwszej syntezy angiotensyny II dokonali w 1957 r. Rittel i wsp. (112). Dalsze prace nad syntezą pochodnych tego hormonu były prowadzone w kierunku otrzymania analogów o zmienionych grupach funkcyjnych lub zmienionej kolejności aminokwasów oraz analogów ze zmniejszoną lub zwiększoną liczbą aminokwasów.

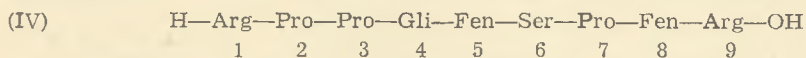
Z doświadczeń nad syntetycznymi analogami angiotensyny II (1, 113—120) oraz z prac Rinickera i Schwyzera (121), Aoyagi i wsp. (122) i Hollemansa (123) wynika, że dla wystąpienia jej aktywności biologicznej niezbędna jest obecność tyrozyny w pozycji 4, histydyny w pozycji 6, proliny w pozycji 7 i fenyloalaniny w pozycji 8. Andreatta i Hofmann (15) wypowiadają się jednak przeciwko niezbędności histydyny z jej kwasowozasadowym pierścieniem imidazolowym. Zsyntezowany przez nich analog angiotensyny II — [6- β -(pirazolilo-3)-alanino]-angiotensyna II nie różnił się aktywnością od hormonu naturalnego.

Wydaje się, że aktywność biologiczna angiotensyny II związana jest nie tylko z jej strukturą pierwszorzędową, ale również z drugorzędową (124). Prawdopodobnie peptyd ten ma konformację spirali α , w której C-końcowy trójpeptydowy fragment (His-Pro-Fen-OH), najbardziej istotny dla aktywności biologicznej, a także reszta tyrozyny, zajmują ustalone miejsce, co warunkuje związanie hormonu z właściwym receptorem. Inne badania (114) potwierdziły taką budowę cząsteczki angiotensyny II. Zsyntezowany analog angiotensyny bez N-końcowego dwupeptydu wykazywał bardzo niską aktywność biologiczną, co wynikało z niemożliwości utworzenia stabilnej struktury spiralnej. Połączenie takiego sześciopieptydu z dowolnym polipeptydem powodowało stabilizację spirali α aktywnego fragmentu angiotensyny i prowadziło do uzyskania pochodnych o znacznie zwiększonej aktywności biologicznej.

II-3. Bradykinina i kallidyna

Działanie specyficznych proteaz serynowych typu trypsynowego, tj. kalikrein (EC 3.4.4.21) na białka osocza krwi zawarte we frakcji α_2 -globu-

lin, tzw. kininogeny prowadzi do uwolnienia peptydów: bradykininy i kallidyny. Bradykinina jest homodetycznym dźwięciopeptydem liniowym (IV). Kallidyna różni się od bradykininy obecnością dodatkowego aminokwasu na końcu z wolną grupą aminową (lizylobradykinina).



Hormony te powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększenie przepuszczalności ścian naczyńniowych, obniżenie ciśnienia tętniczego (125).

Po raz pierwszy syntezę w pełni aktywnej bradykininy przeprowadzili w 1960 r. Boissonnas i wsp. (126), natomiast syntezę kallidyny Pless i wsp. (127) w 1962 r. Warto również wspomnieć o syntezie bradykininy przez Siemiona (128).

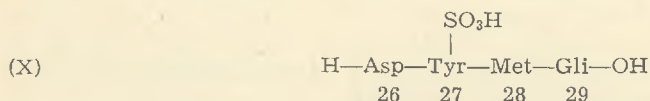
Analiza właściwości około 100 analogów bradykininy i kallidyny (1) umożliwiła wykazanie pewnych zależności między składem aminokwasowym tych peptydów a ich aktywnością biologiczną. N- i C-końcowe reszty argininy mogą być wymieniane na reszty innych aminokwasów zasadowych przy nieznacznym obniżeniu aktywności (129). Dla wystąpienia odpowiedniej aktywności bradykininy reszta arginilowa 1 jest bardziej niezbędną niż reszta argininy w pozycji 9 (1). Znaczne obniżenie aktywności wykazywały analogi bradykininy i kallidyny, w których reszty fenylolanilowe w pozycjach 5 i 8 (bradykinina) oraz 6 i 9 (kallidyna) zastąpiono aminokwasami niearomatycznymi (130). Analogi otrzymane po podstawieniu alaniną reszt proliowych w pozycjach 2 i 7, tj. [2-alanino]-bradykinina i [7alanino]-bradykinina wykazują znaczne obniżenie aktywności w porównaniu z naturalnym peptydem (16). Natomiast [3-alanino]-bradykinina, a więc analog z zamienioną resztą proliową w pozycji 3, tylko niewiele różni się swoją aktywnością od bradykininy (130). Zastąpienie reszty glicylowej w pozycji 4 przez alaninę przejawia się znacznym spadkiem aktywności (17), podczas gdy podstawienie seryny w pozycji 6 przez inne aminokwasy pozostaje bez wpływu na aktywność bradykininy jak i kallidyny (podobny wpływ mają analogiczne zmiany w pozycjach 5 i 7 kallidyny (131)).

II-4. Hormon adrenokortykotropowy (ACTH)

Hormon ten produkowany jest w zasadochłonnych komórkach przedniej części przysadki, a jego aktywność biologiczna wyraża się w pobudzaniu wytwarzania kortykosterydów przez korę nadnerczy, ponadto pobudza on lipolizę (1, 132).

Pierwszą całkowitą syntezę ACTH, homodetycznego trzydziestodźwięciopeptydu liniowego przeprowadzili w 1963 roku Schwyzer i Sieber (133). W 1972 r. Rinicker i wsp. (7) wykazali, że otrzymane dotychczas syntetyczne preparaty ACTH świni i człowieka różnią się

ty tyrozylowej prowadzi do znacznego obniżenia aktywności tego peptydu (144), co wskazywałoby, że silnie anionowa grupa siarczanowa jest niezbędna do związania się hormonu z receptorem. Najmniejszym peptydem, który jeszcze wykazuje aktywność biologiczną, jest cholecystokinino-pankreozymino-(26—————29)-czteropeptyd (144) (X).

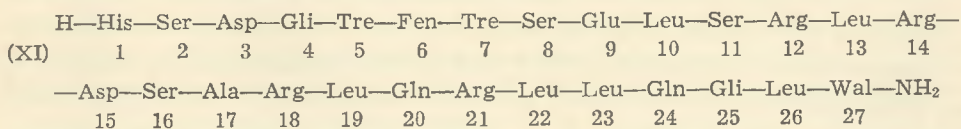


C-końcowy fragment gastryny, gastryno-(14—————17)-czteropeptyd, otrzymany syntetycznie, wykazuje niemal wszystkie właściwości gastryny (145). Wskazywałoby to na zbyteczność pozostałego fragmentu cząsteczki. Wyniki badań biologicznych przy użyciu analogów tego C-końcowego czteropeptydu sugerują, że pierścień indolowy tryptofanu jest prawdopodobnie ważny dla związania się z receptorem, metionina może być zastąpiona przez inne aminokwasy o łańcuchach hydrofobowych, a zastąpienie fenyloalaniny przez tyrozinę powoduje prawie całkowitą utratę aktywności (16).

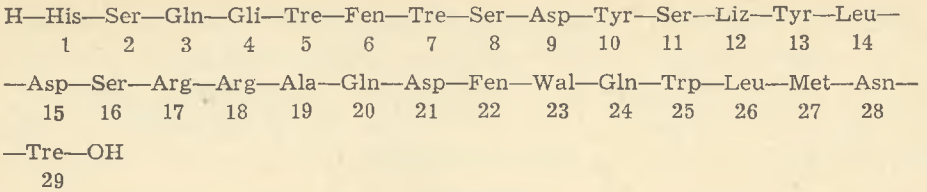
Na przykładzie aktywności biologicznej fragmentów i analogów gastryny, angiotensyny, ACTH oraz innych peptydów omówiono znaczenie sekwencji przy C- lub N-końcowej reszcie aminokwasowej w licznych peptydach biologicznie czynnych (146). Różnice strukturalne mogą być uzależnione od warunków biologicznych, w których peptyd istnieje, np. jeśli narażony jest na działanie hydrolazy α -aminoacylopeptydowej, staje się możliwe rozwinięcie w drodze ewolucji zabezpieczenia w postaci aminokwasów zbędnych dobudowanych do reszty N-końcowej. Przeciwnie, jeśli bardziej prawdopodobne jest działanie na peptyd hydrolaz peptydyloaminokwasowych, należy się spodziewać, że aminokwasy zbędne pojawią się przy C-końcowej reszcie aminokwasowej.

II-6. Sekretyna i glukagon

Sekretyna jest homodetycznym dwudziestosześciopeptydem liniowym, uważanym za peptyd homologiczny w stosunku do glukagonu. Z dwudziestusiedmiu aminokwasów czternaście zajmuje takie same pozycje w cząsteczce sekretyny (XI) jak w glukagonie (XII) (40, 142).

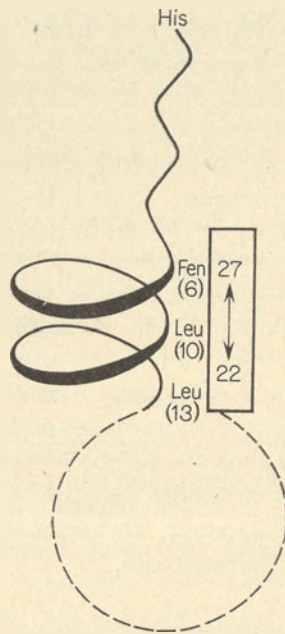


Obydwa te hormony hamują wydzielanie kwasu solnego przez komórki okładzinowe błony śluzowej żołądka oraz wywołują skurcze jego mięśniówki, poza tym wpływają na uwalnianie insuliny z trzustki, a także stymulują lipolizę (147).



(XII)

W 1966 r. dokonano syntezy sekretyny (11) i potwierdzono ustaloną poprzednio (142) jej sekwencję aminokwasową. Na podstawie analizy strukturalnej syntetycznych fragmentów cząsteczki sekretyny zaproponowano (148) konformację tego peptydu (Ryc. 6).



Ryc. 6. Konformacja przestrzenna łańcucha peptydowego sekretyny zaproponowana przez Bodanszky'ego i wsp. (148)

Z przedstawionej konformacji wynika, że między resztami aminokwasowymi w pozycjach 6 i 13 występuje fragment spiralny łańcucha peptydowego. Jego stabilizacja odbywa się z udziałem C-końcowego odcinka łańcucha, tj. z udziałem aminokwasów zajmujących pozycję 22—27. Przyczyn takiej konformacji łańcucha peptydowego sekretyny Bodanszky (148) dopatruje się w rozmieszczeniu aminokwasów niepolarnych, obecnych w pozycjach 6 (fenyloalanina), 10 i 13 (leucyna), 17 (alanina), 19, 22, 23 i 26 (leucyna) oraz 27 (walina). Niemal identyczne rozmieszczenie aminokwasów niepolarnych występuje w cząsteczce glukagonu (40, 143, 149).

Rozmieszczenie niepolarnych reszt aminokwasów w N-końcowej części łańcucha peptydowego sekretyny (pozycje 6, 10 i 13) przypomina rozmieszczenie tych reszt we fragmentach spiralnych cząsteczki hemoglobiny (150). Według *Perutza* i wsp. (150) w hemoglobinie niepolarne reszty aminokwasów rozmieszczone są po jednej stronie spirali i z kolei są one stabilizowane przez kontakt z drugim regionem niepolarnym innego fragmentu spiralnego. Tego typu wzajemne oddziaływania niepolarnych odcinków łańcucha peptydowego hemoglobiny mogą być przeniesione na cząsteczkę sekretyny, gdzie spiralny (przy jej N-końcu) fragment z resztami niepolarnymi umieszczonymi po jednej stronie jest stabilizowany przez niepolarne aminokwasy C-końcowego odcinka peptydu. Z badań modelowych *Bodanszky'ego* i wsp. (148) wynika, że łańcuch boczny leucyny (pozycja 16) jest umieszczony między łańcuchami bocznymi fenyloalaniny (poz. 6) i leucyny (poz. 10), podobnie jak łańcuch boczny leucyny (poz. 23) leży między łańcuchami bocznymi leucyny w pozycjach 10 i 13.

Fragment hydrofobowy skierowany jest do wnętrza cząsteczki (148) i warunkuje utrzymanie jej w odpowiedniej konformacji, natomiast fragmenty hydrofilowe (w spirali oraz w N-końcowym czteropeptydzie) wysunięte są na zewnątrz cząsteczki i warunkują kontakt peptydu z właściwym receptorem. Za tym, że właśnie hydrofilowy N-końcowy odcinek jest odpowiedzialny za wiązanie się cząsteczki sekretyny z receptorem, przemawia synteza sekretyno-(2-----27)-dwudziestosześciopeptydu, który praktycznie jest nieaktywny. Również zamiana kwasu asparaginowego w pozycji 3 na kwas izoasparaginowy prowadzi do utraty funkcji biologicznej (148). W przeciwieństwie do ACTH czy też gastryny, cały łańcuch peptydowy sekretyny wydaje się być niezbędnym dla wystąpienia jej aktywności biologicznej.

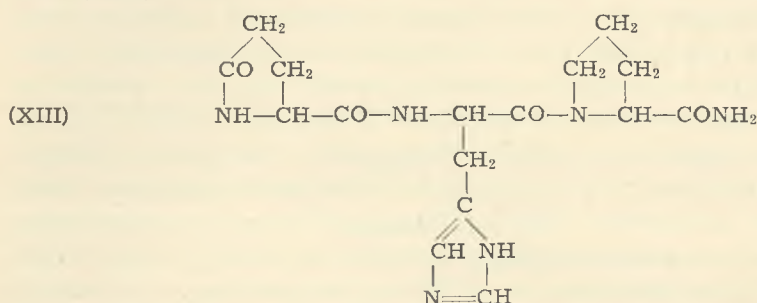
II-7. Hormony uwalniające z podwzgórza

Peptydy powstające w podwzgórzu, a oddziaływujące na poziomie komórek przedniej części przysadki mózgowej, noszą nazwę hormonów uwalniających (2) lub czynników uwalniających (19). Regulują one wydzielanie hormonów przysadkowych albo przez stymulację, albo przez hamowanie uwalniania hormonów nagromadzonych w komórkach przysadki (151). Dotychczasowe badania wskazują, że istnieje przynajmniej jeden hormon uwalniający, produkowany przez podwzgórze dla każdego hormonu przysadkowego. Pełny wykaz nazw i skrótów hormonów podwzgórza podają *Szukalski* i *Kobylński* (152).

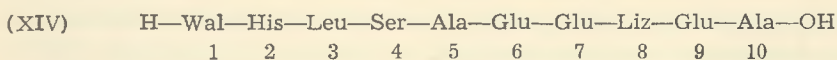
Badanie hormonów uwalniających podwzgórza napotyka na ogromne trudności z powodu ich bardzo niskiej zawartości w tkance podwzgórzowej (19). Przy poznawaniu budowy chemicznej wszystkich dotychczas zbadanych hormonów uwalniających posługiwano się metodą syntezy che-

micznej oraz prób biologicznych jako rozstrzygających o poprawnym ustaleniu sekwencji aminokwasowej (153—155).

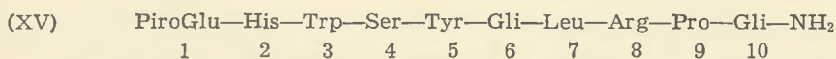
Pierwszym hormonem uwalniającym, który został zbadany zarówno pod względem biologicznym jak i chemicznym, był hormon uwalniający tyreotropinę (156). Okazał się on trójpeptydem zbudowanym według początkowych ustaleń z kwasu glutaminowego, histydyliny i proliny. Jednak synteza sześciu możliwych trójpeptydów nie dała w efekcie związku, który by posiadał aktywność biologiczną odpowiadającą hormonowi naturalnemu. Dopiero przypadkowe stwierdzenie, że podczas jednej z prób syntezy otrzymano niewielką ilość związku biologicznie czynnego, pozwoliło ustalić, że w skład cząsteczki hormonu wchodzi nie kwas glutaminowy ale kwas piroglutaminowy (pirolidono-5-karboksylowy). Ponadto wykazano, że dla pełnej aktywności biologicznej konieczna jest obecność grupy amidowej w C-końcowej prolina. Ostatecznie ustalono, że hormon uwalniający tyreotropinę jest trójpeptydem o nazwie piroglutamylhistydyloprolinoamid (XIII)



Vale i wsp. (157) dokonali syntezy kilku analogów hormonu uwalniającego tyreotropinę, z których jeden, a mianowicie piroglutamyl-[N-3-metylo]-histydyloprolinoamid miał aktywność kilkakrotnie większą niż hormon naturalny. Pozostałe analogi, tj. dwupeptyd piroglutamyl-[N-3-metylo]-histydylina oraz trójpeptyd piroglutamyl-[N-1-metylohistydylo]-prolinoamid wykazywały tylko śladową aktywność, a trójpeptyd piroglutamyl-[pirazolilo-3-]-alanyloprolinoamid posiadał tylko 5% aktywności naturalnego hormonu uwalniającego tyreotropinę (158).



Kolejnymi hormonami uwalniającymi, których sekwencję aminokwasową udało się ustalić, były zsyntezowane w laboratorium Schall'ego (8, 159): dziesięciopeptyd o aktywności biologicznej hormonu uwalniającego



go somatotropinę (XIV) oraz dziesięciopeptyd o aktywności biologicznej hormonu uwalniającego luteotropinę (XV). Ten ostatni wykazywał takie

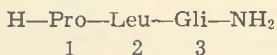
same właściwości biologiczne jak hormon uwalniający folikulinę, co potwierdzałyby poprzednie doniesienia o identyczności obu tych hormonów uwalniających (90).

Z badań nad syntetycznymi analogami hormonu uwalniającego luteotropinę (151, 156) wynika, że najmniejszym fragmentem peptydowym, który jeszcze wykazuje aktywność biologiczną jest N-końcowy trójpeptyd: piroglutamylhistydylotryptofanoamid. Zwraca uwagę duże podobieństwo chemiczne tego trójpeptydu do hormonu uwalniającego tyreotropinę (XVI).

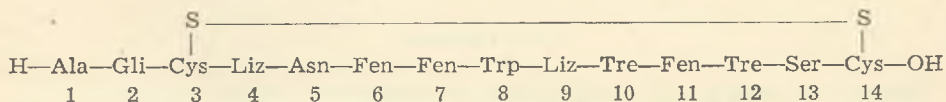
Grant i Vale (151) sądzą, że trzy ostatnie aminokwasy, występujące na aminowym końcu łańcucha peptydowego hormonu uwalniającego, decydują o związaniu się tego hormonu z receptorem na powierzchni komórek przysadki, a o wywołaniu odpowiedniego efektu wyrażającego się stymulacją wydzielania odpowiedniego hormonu przysadkowego decyduje pozostała część cząsteczki.

Podano także budowę i dokonano syntezy hormonu hamującego uwalnianie melanotropiny (160) (XVI).

(XVI)



Z podwzgórzcy owcy otrzymano heterodetyczny cykliczny czternastopeptyd (XVII) hamujący *in vitro* wydzielanie immunoreaktywnego hormonu wzrostowego (161). Badania przeprowadzone nad syntetycznym hormonem hamującym uwalnianie somatotropiny nie pozwoliły rozstrzygnąć w jakiej formie, zredukowanej czy utlenionej, hormon podwzgórzowy jest rozpoznawany przez receptory przysadkowe.



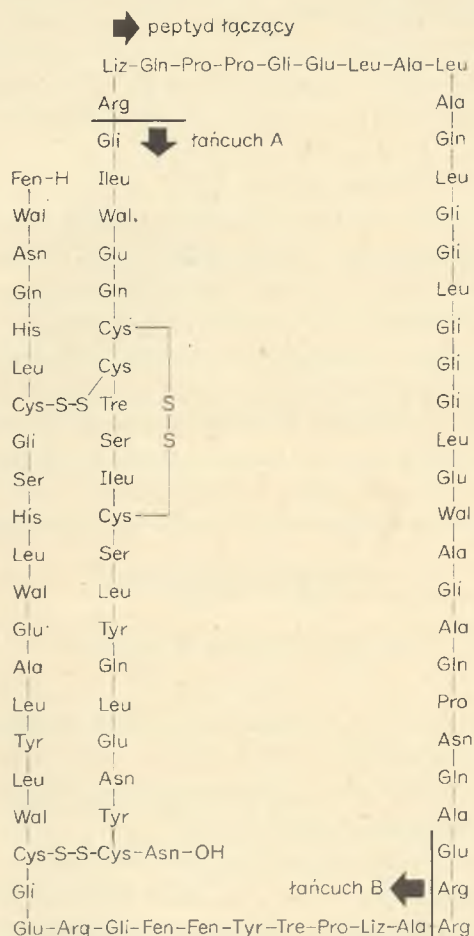
(XVII)

II-8. Skotofobina

Badania nad skotofobiną są jeszcze jednym z przykładów zastosowania syntezy chemicznej do ostatecznego wyjaśnienia struktury biologicznie czynnych peptydów. Skotofobina jest homodetycznym piętnastopeptydem liniowym należącym do dość licznej, jak się wydaje, grupy peptydów występujących w mózgu zwierząt, a będących składnikami tzw. kodu molekularnego, związanego z przenoszeniem informacji (162). Peptyd ten po raz pierwszy został wyodrębniony przez Ungara i Irwina (163) z mózgu szczurów (4000 mózgow), u których przez odpowiedni trening wywoływano odruch lęku przed ciemnością. Wstrzyknięcie tego peptydu szczurom, które nie były trenowane, powodowało powstanie u nich podobnego odruchu jak u szczurów poddanych odpowiedniemu treningowi.

Sekwencję 15 aminokwasów występujących w skotofobinie określił

siarczkowych w aktywną cząsteczkę. Ogromna ilość możliwych kombinacji łączenia się dwóch łańcuchów z udziałem sześciu grup -SH stwarza po dzień dzisiejszy poważny problem dla opracowania ekonomicznej syntezy tego hormonu (5). Co prawda kilka laboratoriów (55, 174—178) doniosło o otrzymaniu syntetycznej insuliny o właściwościach hormonu naturalnego, jednak ilość otrzymanego hormonu w stosunku do ogromnych kosztów i nakładu pracy, była niewielka i nie może rokować zastosowania tego typu syntezy do celów praktycznych, tj. w badaniach naukowych oraz w dalszej perspektywie w lecznictwie.

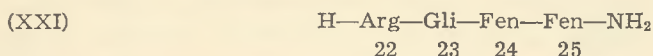


Ryc. 7. Kowalencyjna struktura proinsuliny świnińskiej zaproponowana przez Chance'a i wsp. (179)

Pierwsze nadzieje na rozwiązanie tego problemu, tj. właściwego łączenia obu łańcuchów insuliny w biologicznie aktywną cząsteczkę, stworzyły prace Chance'a i wsp. (179), którzy stwierdzili, że synteza insuliny

in vivo przebiega poprzez stadium jednołańcuchowego 84 aminokwasowego prekursora — proinsuliny. W cząsteczce proinsuliny łańcuchy insuliny są połączone przez tzw. peptyd łączący, odcięcie którego przez enzymy proteolityczne prowadzi do uwolnienia cząsteczki insuliny (Ryc. 7). Można sądzić, że w warunkach naturalnych peptyd łączący zapewnia takie wzajemne ułożenie dwóch łańcuchów cząsteczki insuliny, jakie umożliwia powstanie mostków dwusiarczkowych tylko w pozycjach odpowiadających natywnej cząsteczce (5). Wydaje się w związku z tym, że odtworzenie na drodze syntezy chemicznej procesu przebiegającego *in vivo*, tj. poprzez syntezę proinsuliny, mogło by stworzyć pomyślnie warunki dla sprawnego połączenia obu łańcuchów insuliny (5). Jednak wysoce wydajna synteza biologicznie aktywnej insuliny poprzez etap 84-aminokwasowego łańcucha proinsuliny, z użyciem obecnie stosowanych technik, nie wydaje się możliwą, z uwagi na fakt, że zwiększona ilość etapów syntezy znacznie obniża jej wydajność.

Trudności w opracowaniu odpowiedniej metody syntezy insuliny spowodowały, że niewiele wiadomo o zależności między jej budową chemiczną a aktywnością biologiczną (1, 16). Z badań nad chemiczną modyfikacją aminokwasów wchodzących w skład cząsteczki insuliny wynika, że zniszczenie dwóch reszt histydyny w łańcuchu B prowadzi do utraty aktywności (180). Estryfikacja grup karboksylowych inaktywuje hormon, gdy tymczasem acetylacja grup aminowych nie wywiera wpływu na jego aktywność biologiczną (180, 181). Usunięcie C-końcowego ośmiopeptydu z łańcucha B, wskutek działania trypsyny na wiązanie peptydowe między arginina a glicyną (pozycje 22 i 23), prowadzi do powstania nieaktywnego produktu (182). Pewne światło na udział tej C-końcowej sekwencji w aktywności



insuliny rzuciły prace Weitzela i wsp. (183). Wykazali oni, że syntetyczne peptydy, a mianowicie insulino-(22—24)-trójpeptyd oraz insulino-(22—25)-czteropeptyd (XX i XXI) wykazują właściwości antylipemiczne, podobne do tych, jakie posiada insulina. Insulino-(23—25)-trójpeptyd był nieaktywny. Można więc przypuszczać, że insulino-(22—24)-trójpeptyd jest odpowiedzialny za wiązanie się tego hormonu z receptorami komórek tkanki tłuszczowej.

Uwagi końcowe

Ustalenie konformacji peptydów biologicznie czynnych jest równie ważne jak w przypadku białek o wysoce specyficznych funkcjach, gdzie

architektura cząsteczki jest nierozzerwalnie związana z jej działaniem biologicznym (184). W niektórych peptydach istnieje bardziej lub mniej utrwalona geometria przestrzenna cząsteczek, określona przez wiązania dwusiarczkowe, wprowadzające pewne ograniczenie dla dowolnej zmiany ich konformacji, np. dwudziestoczłonowy pierścień oksytocyny i wazopresyny czy też obecność trzech mostków -S-S- w insulynie. Natywne jednak konformacje wszystkich peptydów wynikają głównie ze stabilizacji ich struktury przez słabe siły wiązania wodorowego i oddziaływanie łańcuchów bocznych. Metody stosowane dotychczas w poznawaniu konformacji białek (185) nie mogą być wykorzystywane z powodzeniem w badaniach konformacji większości znanych peptydów biologicznie aktywnych, z uwagi na brak zdolności do krystalizacji (148). Wydaje się więc, że doniosłą rolę w wyjaśnieniu natywnej konformacji peptydów biologicznie czynnych można przypisać doświadczeniom nad ich syntetycznymi analogami.

W związku z ogromnym postępem w zrozumieniu mechanizmów, poprzez które hormony peptydowe oddziałują na metabolizm komórkowy (186, 187) szczególnie interesujące wydają się być badania w układach modelowych z izolowaną cyklazą adenylową oraz syntetycznymi analogami tych hormonów. Ostatnie osiągnięcia na polu izolowania cyklazy adenylowej (188) pozwalają przypuszczać, że już w niedługim czasie tego typu badania pozwolą na dokładniejsze zrozumienie wzajemnych oddziaływań między hormonami a odpowiednimi receptorami komórkowymi.

(Artykuł nadszedł 30.10.1972, poprawiona wersja wpłynęła 12.9.1973)

PIŚMIENNICTWO

1. Schröder E., Lübke K., *The Peptides*, tom 2, Academic Press, New York 1966.
2. Ungar G., *Anesthesiology*, **27**, 539 (1966).
3. Law H. D., *Adv. Med. Chem.*, **4**, 86 (1965).
4. Baba Y., Matsuo H., Schally A. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 459 (1971).
5. Geiger R., *Angew. Chem.*, **83**, 155 (1971).
6. Parr W., Holzer G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1043 (1971).
7. Rinicker B., Sieber P., Rittel W., Zuber M., *Nature, New Biology*, **235**, 114 (1972).
8. Schally A. V., Arimura A., Wakabayashi I., Redding T. W., Dickerman E., Meites J., *Experientia*, **28**, 205 (1972).
9. du Vigneaud V., Winestock G., Murti V. V., Hope D. B., Kimbrough R. G., *J. Biol. Chem.*, **235**, PC 64 (1960).
10. Hope D. B., Murti V. V., du Vigneaud V., *J. Biol. Chem.*, **237**, 1563 (1962).
11. König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **103**, 788, 2024, 2034 (1970).
12. Wünsch E., Drees F., *Chem. Ber.*, **99**, 110 (1966).
13. Havran R. T., du Vigneaud V., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3626 (1969).

14. Havran R. T., Schwartz I. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1836 (1969).
15. Andreatta R., Hofmann K., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7334 (1968).
16. Elmore D. T., *Peptides and Proteins*, Cambridge University Press 1968.
17. Pearse A. G. E., *Nature*, **221**, 1210 (1969).
18. Margolish E., Schejtër A., *Adv. Protein Chem.*, **21**, 113, (1966).
19. Burgus R., Guillemin R., *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 499 (1970).
20. du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsouyannis P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3115 (1954).
21. IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.*, **1**, 379 (1967).
22. Weygand F., Hoffman D., Wunsch E., *Z. Naturforsch.*, **21b**, 426 (1966).
23. Wunsch E., Drees F., *Chem. Ber.*, **99**, 1451 (1966).
24. Goodman M., Kenner G. W., *Adv. Protein Chem.*, **12**, 465 (1957).
25. Greenstein J. P., Winitz M., *Chemistry of Amino Acids*, tom 2, J. Willey and Sons Inc, New York 1961.
26. Nowak K., Morawiec J., *Wiad. Chem.*, **19**, 19 (1965).
27. Schröder E., Lübke K., *The Peptides*, tom 1, Academic Press, New York 1965.
28. Ali A., Fahrenhoh F., Weinstein B., *Angew. Chem.*, **84**, 259 (1972).
29. McKay F. C., Albertson N. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4686 (1957).
30. Hofmann K., Woolner M. E., Spühler G., Schwartz E. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1486 (1958).
31. Schwyzer R., Sieber R., *Helv. Chim. Acta*, **42**, 972 (1959).
32. Taschner E., Chimiak A., Bator B., Sokołowska T., *Ann. Chem. Liebigs*, **646**, 134 (1961).
33. Lenard J., Robinson A. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 181 (1967).
34. Izumija N., Muraoka M., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2391 (1969).
35. Honzl J., Rudinger J., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **26**, 2333 (1961).
36. Kurzer F., Duraghi-Zadeh K., *J. Org. Chem.*, **67**, 107 (1967).
37. Zimmermann J. E., Anderson G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7151 (1967).
38. Wunsch E., *Angew. Chem.*, **83**, 773 (1971).
39. König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **103**, 2041 (1970).
40. Wunsch E., *Z. Naturforsch.*, **22b**, 1269 (1967).
41. Sieber P., Brugger M., Kamber B., Rinikier B., Rittel W., *Helv. Chim. Acta*, **51**, 2057 (1968).
42. Denkewalter R. G., Schwam H., Strachan R. G., Beesley T. E., Veber D. F., Schoenewaldt E. F., Borkemeyer H., Palevoda W. J., Jacob T. A., Hirschmann R., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3163 (1966).
43. Hofmann K., Smithers M. J., Finn F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4107 (1966).
44. Anderson G., Zimmermann J. E., Callahan F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 5012 (1967).
45. Denkewalter R. G., Veber F. F., Holly F. W., Hirschmann R., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 502 (1969).
46. Wissmann H., Geiger R., *Angew. Chem.*, **82**, 937 (1970).
47. Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2153 (1963).
48. Merrifield R. B., Stewart J. M., Jerenberg N., *Anal. Chem.*, **38**, 1905 (1967).
49. Izdebski J., Drabarek S., *Wiad. Chem.*, **22**, 35 (1968).
50. Felix A. M., Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1385 (1970).

51. Meienhofer J., Trzeciak A., Havran R. T., Walter R., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7199 (1970).
52. Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 304, (1964).
53. Merrifield R. B., *Science*, **150**, 178 (1965).
54. Marglin A., Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5051 (1966).
55. Judajew N. A., Szwaczkin J. P., Pozniak M. G., Fiedotow W. P., Wdowina P. G., Wołujskaja E. N., Rjabcew M. N., Kriwcow W. F., Graczewa A. K., Krasnoszczekowa S. P., Nowosielow W. A., Gruzdiev W. S., Olejnik A. M., Kalinkina Z. B., Iwanowa A. I., *Biochimija*, **38**, 221 (1973).
56. Sano S., Kurihara M., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1183 (1969).
57. Gutte B., Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 501 (1969).
58. Li C. H., Yamashiro D. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7608 (1970).
59. Ohno M., Anfinsen C. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5994 (1967).
60. Schröder E., Lübke K., *Fortsch. Chem. Org. Natur.*, **26**, 46 (1968).
61. Meinhofer J., Trzeciak A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1006, (1971).
62. Parr W., Grohmann K., *Angew. Chem.*, **84**, 266 (1972).
63. Stark G. R., *Fed. Proc.*, **24**, 225 (1965).
64. Laursen R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5344 (1966).
65. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3164, (1966).
66. Wieland T., Birr C., *Angew. Chem.*, **78**, 303 (1966).
67. Bayer E., Mutter M., *Nature*, **237**, 512 (1972).
68. Drabarek S., Lipkowski A., *Acta Physiol. Pol.*, **22**, 21 (1971).
69. du Vigneaud V., Gish D. T., Katsoyannis P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4751 (1954).
70. Lipkowski A., Drabarek S., *Wiad. Chem.*, **26**, 159 (1972).
71. Ressler C. J., *Science*, **128**, 1281 (1958).
72. Lutz W. B., Ressler C., Nittleton D. E., du Vigneaud V., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 167 (1959).
73. Fraefel W., du Vigneaud V., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1030 (1970).
74. Fraefel W., du Vigneaud V., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4426 (1970).
75. Jošt K., Šorm F., *Biochemistry*, **36**, 2795 (1971).
76. Procházká Z., Jošt K., Šorm F., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 289 (1972).
77. Zaoral M., Flegel M., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 1539 (1972).
78. Zaoral M., Flegel M., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 2639 (1972).
79. Šorm F., Rychlik J., *Oksytocyna i jej analogony*, red. Klimek R. i Król W., P. T. End., Kraków 1964.
80. Rychlik J., *Oxytocin, Vasopressin and their Structural Analogues*, red. Rudinger J., Czech. Med. Press, Praha 1964.
81. Walter R., Rudinger J., Schwartz I. L., *Am. J. Med.*, **42**, 653 (1967).
82. Chan W. Y., du Vigneaud V., *Endocrinology*, **71**, 977 (1962).
83. Boissonnas R. A., Guttman S., Berde B., Konzett H., *Experientia*, **17**, 377 (1961).
84. Walter R., Schwartz I. L., Hechter O., Douša T., Hoffman P. L., *Endocrinology*, **91**, 39 (1972).
85. Huguenin R. L., Stürmer E., Boissonnas R. A., Berde B., *Experientia*, **21**, 68 (1965).
86. Huguenin R. L., Boissonnas R. A., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1629 (1962).
87. Guttman S., Boissonnas R. A., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 200 (1960).
88. Drabarek S., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4477 (1964).

89. Boissonnas R. A., Guttman S., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 190 (1960).
90. Rudinger J., Krejčí I., *Experientia*, **18**, 585 (1962).
91. du Vigneaud V., Denning G. S., Drabarek S., Chan W. Y., *J. Biol. Chem.*, **238**, PC 1560 (1963).
92. Boissonnas R. A., Guttman S., Huguenin R. L., Jaquenoud P. A., Sandrin E., *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2347 (1963).
93. Zaoral M., Pliška V., Rezábek K., Šorm F., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **28**, 746 (1963).
94. Manning M., *Biochemistry*, **9**, 3925 (1970).
95. Berde B., Boissonnas R. A., Huguenin R. L., Stürmer E., *Experientia*, **20**, 42 (1964).
96. Zaoral M., Kolc J., Šorm F., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 1242 (1967).
97. Lindberg G., Kynčl J., Dreyfuss P., Bodanszky M., *J. Med. Chem.*, **15**, 629 (1972).
98. Zaoral M., Flegel M., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 3350 (1972).
99. Meienhofer J., du Vigneaud V., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 142 (1961).
100. Cash W. D., McCulloch Mahaffey L., Buck A. S., Nettleton D. E., Romas C., du Vigneaud V., *J. Med. Pharm. Chem.*, **5**, 413 (1962).
101. Rasmussen H., Schwartz I. L., Young R., Marc-Surele J., *J. Gen. Physiol.*, **46**, 1171 (1963).
102. Jošt K., Rudinger J., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **36**, 234 (1971).
103. Walter R., Chan W. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3892 (1967).
104. Jarvis D., du Vigneaud V., *Science*, **143**, 545 (1964).
105. Ferrier B. M., Jarvis D., du Vigneaud V., *J. Biol. Chem.*, **240**, 4264 (1965).
106. Branda L. A., Drabarek S., du Vigneaud V., *J. Biol. Chem.*, **241**, 2572 (1966).
107. Low B. W., Chen C. C. H., *Science*, **151**, 1552 (1966).
108. Chiu C. C., Schwartz J. L., Walter R., *Science*, **163**, 925 (1969).
109. Urry D. W., Walter R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 956 (1971).
110. Von Dreele P. H., Brewster A. I., Scheraga H. A., Ferger M. F., du Vigneaud V., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1028 (1971).
111. Tomaszewski J., Woźniak K., *Post. Biochem.*, **16**, 21 (1970).
112. Rittel W., Iselin B., Kappler H., Rinicker B., Schwyzer R., *Angew. Chem.*, **69**, 179 (1957).
113. Gross F., Turrian H., w Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels, red. M. Schachter, Macmillan (Pergamon), New York 1960, str. 137.
114. Arakawa K., Smeby R. R., Bumpus F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1424 (1969).
115. Page I. H., Bumpus F. M., *Physiol. Rev.*, **41**, 331 (1961).
116. Rinicker B., Schwyzer R., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 674 (1961).
117. Rinicker B., Schwyzer R., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 677 (1961).
118. Schwyzer R., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 667 (1961).
119. Seu J. H., Smeby R. R., Bumpus F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3883 (1962).
120. Schröder E., *Ann. Chem. Liebigs*, **680**, 142 (1964).
121. Rinicker B., Schwyzer R., *Helv. Chim. Acta*, **47**, 2357 (1964).
122. Aoyagi H., Arahava K., Izumija N., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4239 (1967).
123. Hollemans H. J. G., *Clin. Chim. Acta*, **27**, 99 (1970).
124. Smeby R. R., Arakawa K., Bumpus F. M., Marsh M. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 550 (1962).

125. Surovkina M. S., *Usp. Sovrem. Biol.*, **68**, 35 (1967).
126. Boissonnas R. A., Guttman S., Jaquenoud P. A., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1481 (1960).
127. Pless J., Stürmer E., Guttman S., Boissonnas R. A., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 394 (1962).
128. Siemion Z. I., *Roczniki Chem.*, **38**, 133 (1964).
129. Nicolaides E. D., De Walt H. A., Graft M. K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **104**, 15 (1963).
130. Schröder E., *Experientia*, **21**, 271 (1965).
131. Schröder E., *Ann. Chem. Liebigs*, **673**, 186 (1964).
132. Kruze D., Szukalski B., *Post. Biochem.*, **10**, 475 (1964).
133. Schwyzer R., Sieber P., *Nature*, **199**, 172 (1963).
134. Shephard R. D., Willson S. D., Howard K. S., Ball P. H., Davis S. D., Dawis D. S., Eigner E. A., Shakespeare N. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5067 (1956).
135. Lee T. H., Lemer A. B., Buttner-Janusch W., *J. Biol. Chem.*, **236**, 5067 (1961).
136. Hofmann K., Yajima H., Yanaihara N., Liu T. Y., Lande S., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 487 (1961).
137. Mikołajczyk H., *Podstawy działania hormonów*, PWN, Warszawa 1972.
138. Tanaka A., Pickering B. T., Li C. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 294 (1962).
139. Li C. H., Barnafi L., Chrétien M., Chung D., *Nature*, **208**, 1093 (1965).
140. Gregory H., Hardy P. M., Jones D. S., Kenner G. W., Sheppard R. C., *Nature*, **204**, 931 (1964).
141. Anderson J. C., Barton M. A., Gregory H., Hardy P. M., Kenner G. W., MacLeod J. K., Preston J., Sheppard R. C., *Nature*, **204**, 933 (1964).
142. Ondetti M. A., Sheehan J. T., Bodanszky M., *Synthesis of Gastrointestinal Hormones*, Plenum Press, New York 1968.
143. Weinstein B., *Experientia*, **24**, 406 (1968).
144. Ondetti M. A., Pluščec J., Sabo E. F., Sheehan J. T., Williams N., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 195 (1970).
145. Tracy H. J., Gregory R. A., *Nature*, **204**, 935 (1964).
146. Stewart J. M., Wooley D. W., *Nature*, **207**, 1160 (1965).
147. Hubel K. A., *Gastroenterology*, **62**, 318 (1972).
148. Bodanszky A., Ondetti M. A., Mutt V., Bodanszky M., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 944 (1969).
149. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Sundby F., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 909 (1971).
150. Perutz M. F., Kendrew J. C., Watson H. C., *J. Mol. Biol.*, **13**, 669 (1965).
151. Grant G., Vale W., *Nature, New Biology*, **237**, 182 (1972).
152. Szukalski B., Kobylńska M., *Farm. Pol.*, **28**, 1 (1972).
153. Matsuo H., Baba Y., Nair R. M. G., Arimura A., Schally A. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334 (1971).
154. Schally A. V., Arimura A., Nair R. M. G., Matsuo H., Redding T. W., Debeljuk L., White W. F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 393 (1971).
155. Schally A. V., Arimura A., Kastin A. J., *Science*, **179**, 341 (1973).

156. Vale W., Grant G., Rivier J., Monahan M., Amoss M., Blackwell R., Burgus R., Guillemin R., *Science*, **176**, 933 (1972).
157. Vale W., Rivier J., Burgus R., *Endocrinology*, **89**, 1485 (1971).
158. Hoffman K., Bowers C. V., *J. Med. Chem.*, **13**, 1099 (1970).
159. Redding T. W., Schally A. V., Arimura A., Matsuo H., *Endocrinology*, **90**, 764 (1972).
160. Nair R. M. G., Kastin A. J., Schally A. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1376 (1971).
161. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R., *Science*, **179**, 77 (1973).
162. Ungar G., *Naturwissenschaften*, **59**, 85 (1972).
163. Ungar G., Irwin L. N., *Nature*, **214**, 453 (1967).
164. Desiderio D. M., Ungar G., White P. A., *Chem. Commun.*, 1688 (1968).
165. Parr W. Holzer G., *Experientia*, **28**, 834 (1972).
166. Ungar G., Desiderio D. M., Parr W., *Nature*, **238**, 198 (1972).
167. Sanger F., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 23 (1955).
168. Wiśniewski K., *Post. Biochem.*, **16**, 33 (1970).
169. Wiśniewski K., *Post. Biochem.*, **17**, 347 (1971).
170. Zahn H., Bremer H., Zdebel R., *Z. Naturforsch.*, **20b**, 653, 661 (1965).
171. Katsoyannis P. G., *Science*, **154**, 1509 (1966).
172. Katsoyannis P. G., Zalut C., Tometzko A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 166 (1966).
173. Merrifield R. B., *Sci. Am.*, **218**, 56 (1968).
174. Meienhofer J., Schnabel E., Bremer H., Brinkhoff O., Zabel R., Sroka W., Klostermeyer H., Brandenburg D., Okuda T., Zahn H., *Z. Naturforsch.*, **18b**, 1120 (1963).
175. Katsoyannis P. G., Fukuda K., Tometsko A., Suzuki K., Tilak M., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 930 (1964).
176. Katsoyannis P. G., Tometzko A. M., Zalut C., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4502, 4505 (1967).
177. Katsoyannis P. G., Trakatellis A. C., Johnson S., Zalut C., Schwartz G., *Biochemistry*, **6**, 2642 (1967).
178. Zahn H., Okuda T., Shimonishi Y., *Angew. Chem.*, **79**, 424 (1967).
179. Chance R. E., Ellis R. M., Bromer W. W., *Science*, **161**, 165 (1968).
180. Sanger F., *Brit. Med. Bull.*, **16**, 183 (1960).
181. Repke D. W., Zull J. E., *J. Biol. Chem.*, **247**, 2189 (1972).
182. Carpenter F. H., Baum E. W., *J. Biol. Chem.*, **237**, 409 (1962).
183. Weitzel G., Renner R., Guglielmi H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1185 (1972).
184. Baranowski T., *Post. Biochem.*, **16**, 319 (1970).
185. Tichy M., *Post. Biochem.*, **18**, 3 (1972).
186. Szumiel I., Zajdel M. E., *Post. Biochem.*, **18**, 175 (1972).
187. Kahl A., *Post. Biochem.*, **18**, 199 (1972).
188. Pastan J., Pricer W., Blanchette-Mackie J., *Metabolism*, **19**, 809 (1970).

WANDA KISIEL *

**Nowa grupa związków biologicznie czynnych —
— laktony seskwiterpenowe z roślin rodzaju *Vernonia*.**

**Sesquiterpene Lactones of *Vernonia* sp.
— a New Group of Biologically Active Compounds**

W wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania zmierzające do uzyskania nowych, farmakologicznie aktywnych związków. W ostatnim dwudziestolecu szczególnie duże zainteresowanie budzą związki pochodzenia roślinnego o działaniu przeciwnowotworowym (1). Przebadano potencjalne działanie biologiczne wyciągów z wielu tysięcy różnych roślin, nieznaczną jednak tylko ich część (około 3%) wykazywała działanie przeciwnowotworowe (2). Z ekstraktów tych wyizolowano szereg nie znanych do tej pory związków, które wykazywały własności cytotoksyczne *in vitro* i hamowały wzrost niektórych nowotworów przeszczepialnych *in vivo*. Są to między innymi laktony seskwiterpenowe (3), których charakterystykę i własności biologiczne omówimy poniżej.

I. Budowa, występowanie i biogeneza oraz znaczenie chemotaksonomiczne laktonów seskwiterpenowych

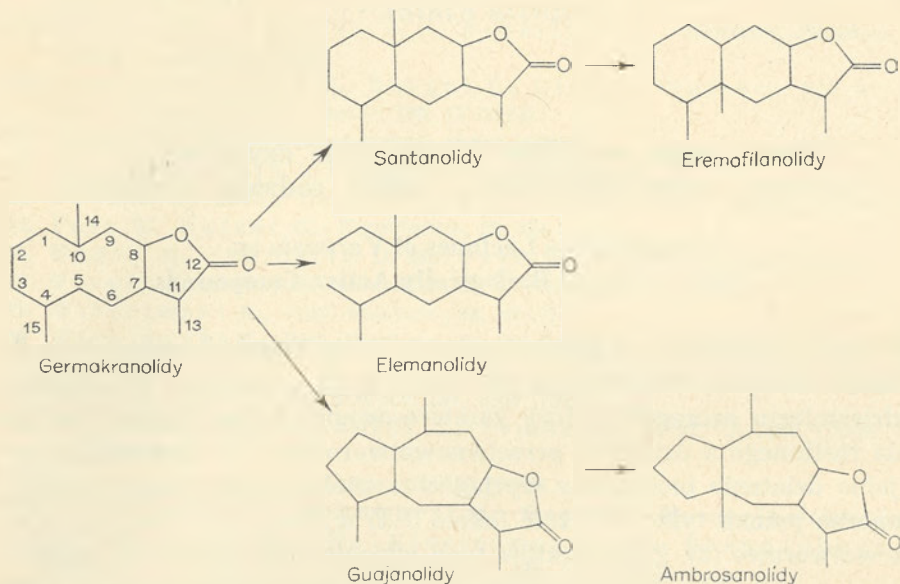
Laktony seskwiterpenowe są wtórnymi metabolitami roślin obok flawonoidów, alkaloidów, glikozydów, olejków eterycznych, związków acetylenowych, fenolokwasów i innych.

Kilka głównych grup laktonów seskwiterpenowych przedstawiono schematycznie na rycinie 1. Są to γ -laktony, które różnią się układem 15-członowego szkieletu węglowego (mono- lub dwucyklicznego). Germa-kranolidy i elemanolidy, występujące m.in. w *Vernonia* sp., należą do grupy laktonów seskwiterpenowych, które posiadają w swojej strukturze monocykliczny szkielet węglowy, oraz pierścień laktonowy zamknięty przy C-8 lub C-6.

* Mgr, Zakład Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, Kraków.

Wykaz stosowanych skrótów: ED₅₀ — 50% zahamowania wzrostu w stosunku do wzrostu kontrolnego; ED₅₀ ≤ 4μg/ml — znaczna toksyczność; ED₅₀ ≥ 100μg/ml — brak cytotoksyczności.

Występują one głównie w roślinach z rodziny *Compositae*, ale znaleziono je także w roślinach innych rodzin: *Umbelliferae*, *Lauraceae*, *Amaranthaceae*, *Magnoliaceae*, oraz w grzybach (4).



Ryc. 1. Główne grupy laktonów seskwiterpenowych (schemat)

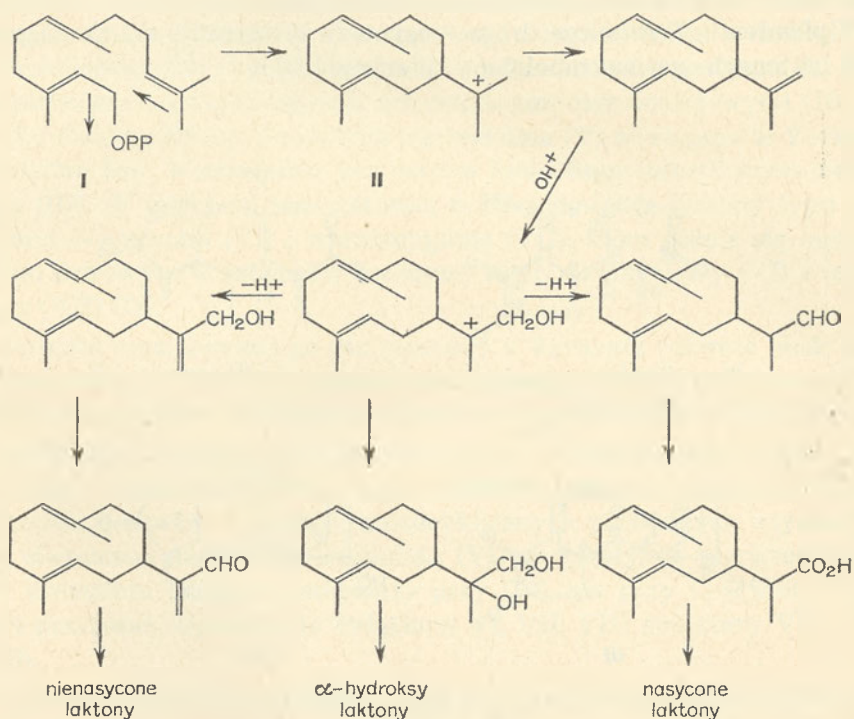
Liczba znanych laktonów seskwiterpenowych wzrasta bardzo szybko. Cztery lata temu znano 170 laktonów seskwiterpenowych, a obecnie tylko z roślin rodziny *Compositae* wyizolowano ponad 350 związków tego typu.

Szkielety węglowe tych związków można wyprowadzić ze wspólnego schematu biogenezy terpenoidów (Ryc. 2) (5), który obejmuje wstępne tworzenie *cis*- lub *trans*-pirofosforanu farnezyłu, prekursora seskwiterpenów, z pirofosforanu kwasu mewalonowego. Z cząsteczki *trans*-pirofosforanu farnezyłu (I) przy udziale podwójnego wiązania między atomami 11 i 12 oraz przy równoczesnym odłączeniu reszty pirofosforanowej powstaje kation germakradienowy (II). Oksydacyjna modyfikacja łańcucha bocznego tego kationu i dalsze utlenienie prowadzi do laktonów seskwiterpenowych typu germakranu (Ryc. 2).

Przedstawiony schemat biogenezy laktonów seskwiterpenowych (Ryc. 2) potwierdziło równoczesne występowanie w roślinach związków reprezentujących poszczególne etapy utlenienia (6, 7). Nie wiadomo jednak czy utlenienie łańcucha izoprenowego przebiega jednocześnie z tworzeniem szkieletu seskwiterpenowego, czy te procesy następują kolejno po sobie.

Germakranolidy i wywodzące się z nich elemanolidy są najprostszymi laktonami z monocyklicznymi szkieletami węglowymi. Główna droga bio-

syntetyczna rozgałęzia się przy stadium germakranolidu i biegnie do santanolidów, zwanych także eudesmanolidami, oraz guajanolidów (Ryc. 1). Z tych dwóch grup związków w wyniku wędrówki grupy metylowej powstają eremofilanolidy i pseudogujanolidy, zwane również ambrosanolidami (8), jak na rycinie 1.



Ryc. 2. Schemat biogenezy laktonów seskwiterpenowych typu germakranu (wg 5): (I) — *trans*-pirofosforan farnezylu, (II) — kation germakradienowy

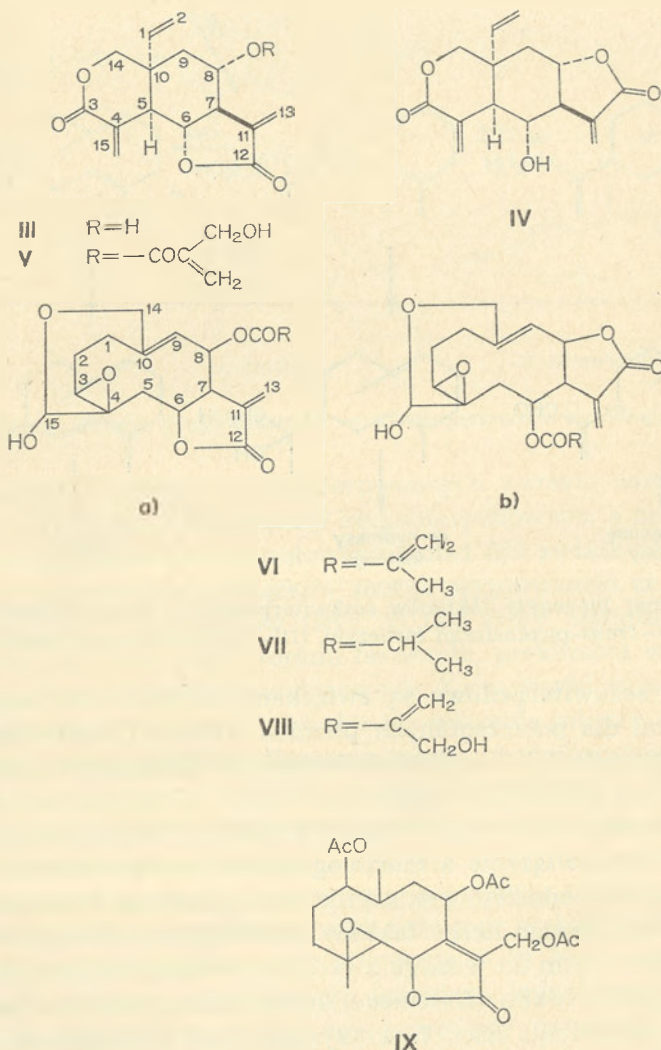
Laktony seskwiterpenowe są związkami bardziej lub mniej charakterystycznymi dla poszczególnych plemion rodziny *Compositae*. Usiłowano więc wykorzystać ich rozpowszechnienie do badania problemów taksonomicznych na poziomie rodzajów, gatunków, a szczególnie plemion rodziny *Compositae*, poszukując korelacji między biogenetycznym pokrewieństwem tych związków a morfologicznymi cechami roślin.

Dla przykładu: oddzielnie sklasyfikowane plemiona *Helenieae* i *Heliantheae* zawierają bardzo liczne laktony seskwiterpenowe typu ambrosanolidu. Zaliczenie roślin do jednego z tych plemion uzależniono od obecności (*Heliantheae*) lub braku (*Helenieae*) łusek na dnie kwiatowym, oraz od odmiennego ustawienia liści. Wykorzystując fakt występowania ambrosanolidów w tkankach tych roślin zaproponowano (8) połączenie obydwu plemion w jedno, zaliczając dotychczasowe *Helenieae* jako podplemię *Heleniineae* w plemieniu *Heliantheae*.

II. Laktony seskwiterpenowe *Vernonia* sp.

Laktony seskwiterpenowe występują również w roślinach plemienia *Vernoniaeae* (*Compositae*). Znanych jest ponad 500 gatunków rodzaju *Vernonia* w tropikalnej strefie Ameryki, Afryki i Azji. Niektóre z nich są stosowane w afrykańskiej medycynie ludowej (9).

W plemieniu *Vernoniaeae* droga biosyntezy zatrzymuje się na najprostszyc laktonach- germakranolidach i elemanolidach.



Ryc. 3. Wzory chemiczne laktonów seskwiterpenowych wyizolowanych z *Vernonia* sp.: (III) — wernolepina, (IV) — wernomenina, (V) — wernodalina, (VIb) — wernolid, (VIIb) — wernomygdina, (VIIIb) — hydroksywernolid, (IX) — konfertolid

Początkowo sądzono, że elemanolidy nie występują w naturze lecz tworzą się ze związków typu germakradienu w trakcie procesów ekstrakcji, w wyniku ogrzewania.

Biorąc pod uwagę tę możliwość przeprowadzono ekstrakcję *Vernonia hymenolepis* A. Rich. zimną wodą i gorącym etanolem (10). W obydwu przypadkach ilości uzyskanego elemanolidu wernolepiny (Ryc. 3. III) były porównywalne, co świadczy o występowaniu tego związku w roślinie.

Wernolepina (III) i wernomenina (IV) z *Vernonia hymenolepis* A. Rich. były pierwszymi wyizolowanymi dwulaktonami elemanolidowymi (10, 11).

Inny elemanolidowy dwulakton wernodalina (V) występuje w *Vernonia amygdalina* Del. Wernodalina jest estrem hydroksymetakrylowym wernolepiny (III). W roślinach tego gatunku znaleziono także laktony typu germakranu — wernolid (VI) i wernomygdinę (VII), które różnią się ugrupowaniem estrowym w łańcuchu bocznym: ester metakrylowy (VI) i izobutyłowy (VII) (12).

Wernolid wyizolowano po raz pierwszy z *Vernonia colorata* obok hydroksywernolidu (VIII), także germakranolidu o podobnej strukturze (w łańcuchu bocznym kwas hydroksymetakrylowy związany estrowo) (13).

Początkowo proponowano dla wernolidu strukturę VIa, chociaż nie wykluczono możliwości VIb. Przeprowadzone ostatnio badania (14) nad fragmentacją (spektra masowe) monocyklicznych pochodnych uzyskanych przez chemiczną degradację wernolidu (VI) wykazały, że pierścień laktonowy wernolidu (VI) jest zamknięty przy C-8, nie przy C-6, wobec tego należy przypisać odpowiednio związkom VI, VII, VIII struktury VIb, VIIb i VIIIb.

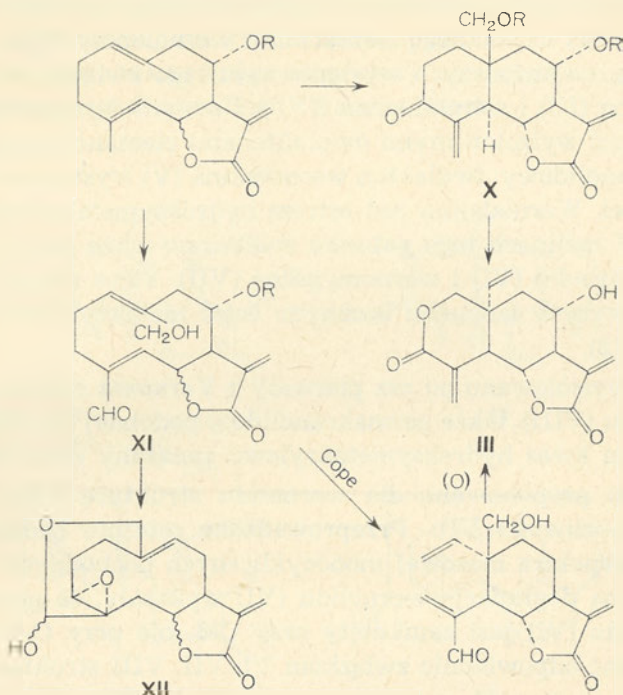
W *Vernonia conferta* Benth. występuje germakranolidowy lakton — konfertolid (IX), różniący się znacznie od poprzednio przedstawionych laktonów typu germakranu (15, 16).

W trakcie badań nad określeniem sposobu dziedziczenia kilku grup metabolitów wtórnych w roślinach rodzaju *Vernonia* wydzielono cztery nowe laktony seskwiterpenowe: glaukolid A z *V. glauca* L. Willd., glaukolid B z *V. baldwini* Torr. (*var. interior*), marginatinę z *V. marginata* Torr. Raf. (*var. marginata*) i baldwerninę z *V. baldwini* Torr. (*var. interior*) (17). Związki te w mniejszych lub większych ilościach występują także w kilku innych gatunkach *Vernonia*, a ich struktura nie została jeszcze dokładnie określona. Dotychczas zbadane własności glaukolidów A i B oraz marginatiny świadczą o tym, że są to germakranolidy ściśle spokrewnione z konfertolidem (IX).

Są dwie hipotezy dotyczące biosyntezy dwulaktonów reprezentowanych przez wernolepinę (III) (Ryc. 4):

a) cyklizacja germakradienu do eudesmanu (X) utlenionego przy C-10, a następnie biologiczne utlenienie Baeyer-Villiger'a, reLaktonizacja i dehydratacja, lub

b) przegrupowanie Cope'a germakranolidu (XI) z utlenionymi grupami metylowymi (przejście (XII) do wernolidu) i dalsze utlenienie do wernolepiny (III) (5).



Ryc. 4. Postulowany schemat biosyntezy wernolepiny (III) (wg 5.): (X) — eudesmanolid, (XI) — germakranolid z utlenionymi grupami metylowymi, (XII) — przejście do wernolidu, (III) — wernolepina

III. Aktywność biologiczna laktonów seskwiterpenowych *Vernonia* sp.

Wiele laktonów seskwiterpenowych działa jako inhibitory wzrostu (18, 19). Wśród nich kwas absycynowy, który razem z innymi hormonami roślinnymi reguluje wiele procesów fizjologicznych i biochemicznych w roślinach. Kwas absycynowy jest głównym składnikiem aktywnym tzw. „inhibitora β” występującego w większości roślin (20). Inny seskwiterpen heliangina hamuje wzrost koleoptyli owsa (21). Podobne własności wykazują dwulaktony seskwiterpenowe: elefantyna, elefantopina i wernolepina (III) (22).

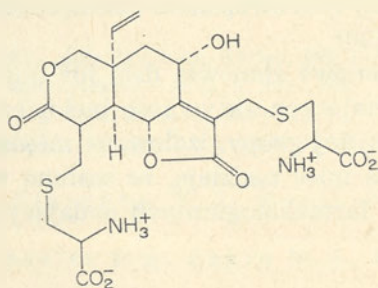
Wernolepina w znacznym stopniu hamuje wzrost koleoptyli pszenicy w dawkach od 5 do 50 μg/ml (20 do 80% zahamowania wzrostu). Koleoptyle odzyskują swoją aktywność wzrostową po przeniesieniu ich do roztworu kwasu indolilo-3-octowego, co świadczyłoby o małej toksyczności werno-

lepiny. Przy równoczesnym podaniu wernolepiny i kwasu indoliło-3-octowego można zaobserwować znaczną redukcję hamowania wzrostu, co oznaczałoby niezależne działanie tych związków.

Warto zaznaczyć, że w obecności tioli np. merkaptoetanolu wzrost ko-
leoptyli pszenicy nie jest hamowany przez wernolepinę, przypuszczalnie na skutek reakcji tego seskwiterpenu z grupami tiolowymi tych związków (22). Wysuwane są przeto sugestie, że wernolepina może być roślinnym regulatorem wzrostu, działającym poprzez blokowanie grup tiolowych enzymów, które wpływają na wzrost komórek (23).

Jak zaznaczono na wstępie, zainteresowanie laktonami seskwiterpenowymi wiąże się z ich działaniem przeciwnowotworowym. Niektóre naturalnie występujące laktony seskwiterpenowe są inhibitorami rozmnażania komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo* (24, 25).

Ekstrakty alkoholowe *Vernonia hymenolepis* A. Rich., ekstrakty chloroformowe *Vernonia amygdalina* Del. oraz wyizolowane z nich związki: wernolepina (III) ($ED_{50} = 2\mu\text{g/ml}$), wernomenina (IV) ($ED_{50} = 20\mu\text{g/ml}$), wernomygdina (VII) ($ED_{50} = 1,6\mu\text{g/ml}$) i wernodalina (V) ($ED_{50} = 0,62\mu\text{g/ml}$) wykazywały własności cytotoksyczne *in vitro* (komórki KB w hodowli tkankowej) (10, 12).



XIII

Ryc. 5. Tioeter (XIII) cysteiny z wernolepiną

Spśród czterech wyżej wymienionych laktonów seskwiterpenowych tylko wernolepina hamowała wzrost tumoru WM 256 *in vivo*. Podana szczurom w dawkach 12mg/kg i 10mg/kg redukowała wagę tumoru w 32 i 45%, natomiast dawka 14mg/kg była toksyczna dla zwierząt (26).

Większość laktonów seskwiterpenowych zawiera w swojej strukturze ugrupowanie α -metyleno- γ -laktonowe. Zwrócono uwagę na znaczenie tego ugrupowania przy porównywaniu własności cytotoksycznych wernolepiny i jej pochodnych.

Selektywna redukcja podwójnego wiązania etylidenowego wernolepiny nie wpływa na cytotoksyczność *in vitro* ($ED_{50} = 2\mu\text{g/ml}$). Natomiast aktywność tetrahydro pochodnej wernolepiny z ugrupowaniem α -metylo- γ -lakto-

nu maleje prawie dziesięciokrotnie ($ED_{50} = 19\mu\text{g/ml}$), a całkowicie uwodorniony związek jest nieaktywny ($ED_{50} > 100\mu\text{g/ml}$) (26).

Wernolepina podobnie jak i inne α,β -nienasycone laktony seskwiterpenowe, tworzy w reakcji typu Michaela stabilne połączenia z grupami tiolowymi (27). Wyizolowano (28) nieaktywny tioeter (XIII) (Ryc. 5) cysteiny z wernolepiną ($ED_{50} > 100\mu\text{g/ml}$). W warunkach, w których związek ten łatwo reaguje z grupą tiolową cysteiny, reakcja z grupami aminowymi aminokwasu zachodzi bardzo wolno (28).

Cytotoksyczność α -metyleno- γ -laktonów wzrasta wraz z lipofilnością tych związków. Można by się zastanowić, czy zmiany cytotoksyczności tych związków wynikają z szybkości ich penetracji do komórek.

Wernolepina, jak wspomniano wcześniej, nie hamuje wzrostu roślin w obecności związków tiolowych. Działanie inhibicyjne wernolepiny na wzrost komórek roślinnych może więc być wynikiem reakcji tego związku z grupami tiolowymi białek roślinnych, w tym niektórych enzymów.

Ostatnie badania wykazały, że wernolepina inaktywuje syntetazę glikogenu. Związek ten reaguje z grupami tiolowymi enzymu w stosunku ekwimolarnym. Stechiometrię tej reakcji ustalono przy zastosowaniu wernolepiny znaczonej trytem (29).

Wernolepina jest także inhibitorem fosfofruktokinazy. Blokuje grupy tiolowe enzymu, jest przy tym związkiem dziesięciokrotnie bardziej aktywnym od jodoacetamidu (30).

Laktony seskwiterpenowe stanowią dziś już dość liczną grupę związków naturalnych posiadających aktywność biologiczną. Stale jednak poznawane są nowe związki tej grupy, izolowane między innymi z roślin rodzaju *Vernonia* i można mieć nadzieję, że zostaną wśród nich znalezione związki o własnościach farmakologicznych nadających się do wykorzystania w lecznictwie.

(Artykuł nadszedł 9.4.1973, poprawiona wersja wpłynęła 8.10.1973)

PIŚMIENNICTWO

1. Marini-Bettólo G. B., (1971), w *Pharmacognosy and Phytochemistry*, red. Wagner H., Hörhammer L., str. 201—238, Springer-Verlag, Berlin—Heideberg—New York.
2. Kupchan S. M., (1970), *Pur. Appl. Chem.*, **21**, 227—246.
3. Kupchan S. M., (1970), *Trans, N. Y. Acad. Sci.*, **32**, 85—105.
4. Tomczyk H., Kisiel W., (1972), *Wiad. Bot.*, **16**, 183—188.
5. Herz W., (1971), w *Pharmacognosy and Phytochemistry*, red. Wagner H., Hörhammer L., str. 64—92, Springer—Verlag, Berlin—Heideberg—New York.
6. Toribio F. P., Geissman T. A., (1968), *Phytochemistry*, **7**, 1623—1630.
7. Toribio F. P., Geissman T. A., (1969), *Phytochemistry*, **8**, 313—314.
8. Herout V., (1971), w *Pharmacognosy and Phytochemistry*, red. Wagner H., Hörhammer L., str. 93—110, Springer—Verlag, Berlin—Heideberg—New York.

9. Watt J. M., Braeyer-Brandwijk M. G., (1962), *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, 2 wyd., str. 296—299, E. S. Livingstone LTD, Edinburgh and London.
10. Kupchan S. M., Hemingway R. J., Werner D., Karim A., Mc Phail A. J., Sim G. A., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3596—3597.
11. Kupchan S. M., Hemingway R. J., Werner D., Karim A. J., (1969), *J. Org. Chem.*, **34**, 3903—3907.
12. Kupchan S. M., Hemingway R. J., Karim A., Werner D., (1969), *J. Org. Chem.*, **34**, 3908—3911.
13. Toubiana R., Gaudemer A., (1967), *Tetrahedron Letters*, **14**, 1333—1335.
14. Ho C. M., Toubiana R., (1970), *Tetrahedron*, **26**, 941—947.
15. Toubiana R., Toubiana M., Das B., (1970), *C. R. Acad. Sci. Ser. C*, **270**, 1033—1035.
16. Toubiana R., Toubiana M., Das B., (1972), *Tetrahedron Letters*, **3**, 207—209.
17. Abdel-Baset Z. H., Lloyd Sauthwick, Padolino W. G., Hiro-suke Yoshioka, Mabry T. J., Jones S. B., (1971), *Phytochemistry*, **10**, 2201—2204.
18. Steward F. C., Krikorian A. D., (1971), *Plants, Chemicals and Growth*, str. 98—101, Academic Press, New York and London.
19. Herout V., (1971), w *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*, red. Goodwin T. W., str. 70—80, Academic Press, London and New York.
20. Rudnicki R., (1971), *Post. Bioch.*, **17**, 43—55.
21. Marimoto L., Sanno Y., Oshio H., (1966), *Tetrahedron*, **22**, 3173—3179.
22. Sequeira L., Hemingway R. J., Kupchan S. M., (1968), *Science*, **161**, 789—790.
23. Kupchan S. M., (1971), *Adv. in Chem. Series*, **108**, 1—13.
24. Rücker G., (1972), *Deuth. Apoth. — Ztg.*, **7**, 263—266.
25. Artico M., (1972), *Il Farmaco*, **8**, 683—712.
26. Kupchan S. M., Eakin M. A., Thomas A. M., (1971), *J. Med. Chem.*, **14**, 1147—1152.
27. Kupchan S. M., Giacobbe T. J., Krull J. S., (1970), *Tetrahedron Letters*, **33**, 2859—2862.
28. Kupchan S. M., Fessler D. S., Eakin M. A., Giacobbe T. J., (1970), *Science*, **168**, 376—377.
29. Smith C. H., Larner J., Thomas A. M., Kupchan S. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 94—104.
30. Hanson R. L., Lardy H. A., Kupchan S. M., (1970), *Science*, **168**, 378—380.

SPRAWOZDANIA

III Konferencja Linderströma-Langa Espoo k/Helsinki, 27—30.VI.1973.

Tegoroczna konferencja poświęcona była biochemicznej kontroli wzrostu komórki. Omawiano zagadnienia dotyczące regulacji wzrostu komórek bakteryjnych i eukariotycznych.

W ramach konferencji wysłuchano kilkunastu referatów przygotowanych przez biochemików skandynawskich, amerykańskich i angielskich.

W sprawozdaniu tym omówione zostaną jedynie niektóre z prac przedstawionych na konferencji. W referacie inauguracyjnym prof. Ch. Huggins (Chicago, USA) omówił problem doświadczalnych zmian fenotypowych komórek zwierzęcych *in vivo*. Uwagę swoją wykładowca skupił na zagadnieniu przekształcania się fibroblastów w chondrio- i osteoblasty oraz znaczenia tlenu dla tego procesu.

Prof. J. Bonner (Pasadena, USA) omawiał problem uorganizowania genomu w komórkach eukariotycznych. Mówił on o wielokrotnie powtarzających się sekwencjach nukleotydowych w DNA eukariontów i bezpośrednich produktach transkrypcji tych sekwencji. Zwrócił on uwagę, że cistrony odpowiedzialne za syntezę rRNA występujące w rDNA eukariontów mogą być zaliczone do sekwencji średniopowtarzających się: w komórkach szczura liczba kopii genów kodujących rRNA wynosi około 1800 na genom; natomiast geny kodujące rRNA bakterii występują w pojedynczych kopiach. W komórkach wątroby szczura powtarzające się ze średnią częstością sekwencje nukleotydowe DNA oddzielone są od siebie sekwencjami nukleotydowymi występującymi w pojedynczych kopiach i liczącymi 500—2000 nukleotydów (24% DNA), lub 200—1600 nukleotydów (około 50% DNA).

W referacie swoim Bonner omawiał również zagadnienie udziału histonów w regulacji transkrypcji DNA wątroby szczura. Podkreślił on, że transkrypcja pozostaje w zależności od stosunku histonów do DNA w chromatynie, tylko bowiem DNA nie pokryty histonami jest czynny w syntezie RNA. Tak np. w regenerującej wątrobie szczura odnotowuje się znaczny spadek stosunku histony: DNA i równoległy wzrost transkrypcji DNA. Autor referatu podkreślił, że jedynie niewielka część DNA genomu jest czynna w syntezie RNA. W komórkach wątroby szczura obejmuje ona około 20% DNA chromatyny. Jednym z istotnych pytań pozostających bez odpowiedzi jest kwestia, jaka część genomu jest wprzęgnięta w proces transkrypcji informacyjnych RNA w komórce.

Zagadnieniom przedziałowości metabolizmu (kompartamentacji) RNA i białek w komórkach eukariontów był poświęcony wykład prof. J. R. Tata'y (Londyn, Anglia). Autor omawiał metabolizm RNA w różnych podfrakcjach jąder komórkowych zwracając szczególną uwagę na polimerazy RNA: A — odpowiedzialną za syntezę rRNA i B — syntetyzującą mRNA. Autor podkreślił, że — jak wynika z jego doświadczeń — obie polimerazy RNA różnią się między sobą odpornością cieplną. O ile polimeraza A ulega denaturacji w zakresie 40—45°C, to polimeraza B ulega inhibicji w temperaturze nieco wyższej: 50—55°C. Wyniki te są więc rozszerzeniem dotychczas poznanych różnic we właściwościach fizyko-chemicznych obu polimeraz RNA (np. akty-

wacja przez siarczan amonu, wrażliwość na α -amanitynę). Autor wykazał, że polimeraza A występuje głównie w jąderkach; 7 innych podfrakcji jądrowych uzyskanych w pracowni Tata'y zawierało jedynie nieznaczną aktywność polimerazy A. Polimeraza B wykrywana była głównie w podfrakcji euchromatyny.

Tata omawiał również problem różnych puli rybosomów w komórce: tzw. wolnych zespołów polisomalnych i polisomów związanych z błonami. Każdy typ struktur polisomalnych odgrywa rolę w syntezie innych białek. W niektórych fazach rozwoju embrionalnego ssaków zwiększa się wydatnie pula polisomów związanych z błonami wewnątrzkomórkowymi. Być może, jest to uzależnione od miejsca przeznaczenia w komórce poszczególnych typów syntetyzowanych białek. Wyrazem tego zjawiska może być również fakt, iż rybosomy związane z mitochondrialnymi błonami zewnętrznymi uczestniczą najprawdopodobniej w syntezie białek wewnątrzmitochondrialnych. Białka syntetyzowane na polisomach związanych z błonami są najprawdopodobniej przekazywane do światła systemu kanalików w komórce i wydzielane z komórki (np. w komórkach sekrecyjnych).

Do najciekawszych referatów wygłoszonych na konferencji należał referat prof. N. O. Kjeldgaarda (Århus, Dania), czołowego dziś badacza mechanizmów kontroli syntezy RNA u bakterii. Omówił on znaczenie czterofosforanu guanozyny (ppGpp) i pięcioletofosforanu guanozyny (pppGpp), jako efektorów syntezy RNA u szczepów „ściśłych”, hamujących tę syntezę podczas „głodu aminokwasowego” komórek. Obie substancje są wprzęgnięte w proces kontroli syntezy rRNA. Ich powstawanie uzależnione jest od obecności w rybosomach pewnego czynnika białkowego, który nie występuje u szczepów „rozluźnionych”. W regulacji syntezy ppGpp i pppGpp bierze udział również niezacylowany tRNA. Aminoacylo-tRNA nie stymuluje syntezy tych związków. Zwiększoną syntezę obu efektorów stwierdza się tylko wówczas, gdy wolny tRNA pozostaje w miejscu akceptorowym (miejsce A) na rybosomie. Autor wykazał, że dla syntezy obu związków (której miarą może być ilość GTP przekształconego w ppGpp i pppGpp) niezbędna jest obecność bądź obu podjednostek strukturalnych rybosomu, bądź podjednostki 30S wraz z pewnymi białkami pochodzącymi z podjednostki 50S rybosomu (tzw. białka odszczepione, SP); podjednostki 30S nie syntetyzują omawianych efektorów syntezy RNA. Efektory te nie zostały wykryte w świecie zwierzęcym przypuszcza się jednak, że mogą one występować w roślinach.

W dyskusji poruszono kwestię, czy ppGpp jest produktem powstającym z pppGpp. W odpowiedzi Kjeldgaard wyjaśnił, że w pewnych warunkach powstaje jedynie pentafosforan guanozyny. Problem wzajemnych relacji między obiema substancjami nie jest jednak dostatecznie poznany.

Dr H. Lodish (Cambridge, USA) przedstawił problemy regulacji procesów translacji mRNA w retikulocytach i oocytach. Stwierdził on, że mRNA pochodzący z retikulocytów może ulegać transkrypcji w oocytach, a synteza owoalbuminy jest tak samo wydajna w retikulocytach — przy udziale heterologicznego mRNA — jak w jajowodzie.

Dr J. Jänne (Helsinki, Finlandia) — organizator konferencji — omawiał znaczenie poliamin (sperminy, spermidyny i putrescyny) w procesach wzrostu komórek. Przedstawił on złożony charakter oddziaływania poliamin w komórce; przypomniał m.in., że stosunek molowy azotu zawartego w poliaminach do fosforu kwasów nukleinowych pozostaje stały podczas wzrostu komórek. Ponieważ rosące komórki wykazują pokąźny przyrost ilości kwasów nukleinowych, jest oczywistym, że komórki te charakteryzują się jednocześnie intensywną syntezą poliamin. Wzrasta również aktywność enzymów wprzęgniętych w metabolizm poliamin (np. w czasie regeneracji wątroby szczura wzrasta znacznie aktywność dekarboksylazy ornitynowej). Anabolizm poliamin jest stymulowany przez cykliczny AMP. Wzmoczoną syntezę poliamin

(głównie spermidyny) obserwuje się pod wpływem tioacetamidu, który wywołuje — jak wiadomo — nagromadzenie się rRNA w jąderkach komórek wątroby szczura. Z danych tych wynika, że poliaminy uczestniczą w procesach związanych ze wzrostem komórek. Wieloraka ich funkcja wymaga jednak dalszych badań.

Stanley Cohen (Nashville, USA) omawiał ostatnie badania nad własnościami i strukturą czynnika pobudzającego wzrost komórek epidermalnych (EGF). Czynniki ten okazał się polipeptydem o masie cząsteczkowej około 6000 daltonów, wpływającym stymulująco na syntezę białek i RNA m.in. przez przyspieszenie transportu ich prekursorów. Pod jego wpływem zwiększa się pula polisomów w komórce, a także zwiększa się aktywność enzymów katalizujących syntezę poliamin.

Na konferencji omawiano również badania nad chalonami — czynnikami regulującymi wzrost komórek. Chociaż wielu badaczy powątpiewa w istnienie tych związków, wielu innych sugeruje, że chalony mogą znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów. Prof. K. Elgjo (Norwegia, Oslo), który przedstawiał badania nad chalonami prowadzone w swym kraju, zakończył swój wykład przezroczem przedstawiającym sylwetkę żółwia, podpisaną słowami: „*may be I am lucky going so slowly, because perhaps I am going in a wrong direction*”.

Dr M. M. Burger (Bazylea, Szwajcaria) poświęcił swój referat problemowi ucieczki komórek spod kontroli wzrostu. Podkreślił on, że warunkiem wystarczającym dla tego zjawiska są zmiany na powierzchni komórki. Zmiany takie mogą być wywołane przez infekujący komórkę wirus, przez egzogenne enzymy (np. hialuronidazę, pronazę, tripsynę) i inne czynniki.

W referacie na temat replikacji DNA wirusowego w komórkach ssaków dr P. Reichard (Sztokholm, Szwecja) omówił znaczenie fragmentów RNA kowalencyjnie połączonych z łańcuchami DNA. Fragmenty RNA — zdaniem autora — są niezbędne do zapoczątkowania syntezy łańcucha DNA.

Na zakończenie tego przeglądu warto podkreślić, że jednym z mówców był Seymour Cohen (Denver, USA), który omawiał działanie D-arabinozyloadeniny na komórkę. Stwierdził on, że ten nietypowy nukleotyd może być włączany nieterminalnie do DNA; hamuje on polimerazę DNA w komórkach ssaków, nie wpływając na czynność enzymu bakteryjnego. Cykliczny arabinozoadenozynomonofosforan wykazuje silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż fosforan niecykliczny. Dodajmy tu, że nukleozydy arabinozowe nie są tak „nienaturalnymi” związkami, jak możnaby sądzić, występują bowiem w pewnych gąbkach.

Innym słynnym uczestnikiem konferencji był prof. H. M. Kalckar (Boston, USA), który omawiał zjawisko wzmożonego transportu różnych cukrów (glukoza, mannoza, galaktoza) przez błony komórek zainfekowanych wirusami.

Kończącym akordem konferencji był wykład podsumowujący obrady wygłoszony przez Seymoura Cohena (Denver, USA).

W imieniu uczestników konferencji mówca podziękował fińskim organizatorom za wspaniałe przygotowanie techniczne sympozjum, jak też za serdeczne przyjęcie gości.

T. Gołaszewski

Międzynarodowe Sympozjum p.t.

Białka wiążące wapń

Jabłonna k/Warszawy, 9—12.VII.1973.

Bezpośrednio po Kongresie Biochemicznym w Sztokholmie, odbyło się w Jabłonie koło Warszawy międzynarodowe Sympozjum pod tytułem „Białka wiążące wapń”

zorganizowane przez Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Zagadnienia omawiane na sympozjum znajdują się w ostatnich latach w centrum zainteresowania w wielu dziedzinach biochemii i fizjologii. Wykazano, że szereg reakcji biochemicznych zachodzących w ustrojach zwierzęcych jest regulowana zmianami w stężeniu jonów wapnia. Wykryto szereg białek, których specyficzną cechą jest odwracalne wiązanie jonów wapnia i które spełniają rolę albo przenośnika albo akumulatora tych jonów. W tym ostatnim przypadku umożliwiają one kontrolowane zachodzenie procesów wymagających do prawidłowego przebiegu obecności wapnia. W procesach tych biorą z kolei udział inne białka, których forma aktywna właśnie zawiera specyficznie związany wapń. Białka należące do wszystkich tych typów wykryto w ostatnich latach w mięśniach, w mózgu, nerwe, kościach i jelicie. Ale zajmowali się nimi specjaliści pracujący w różnych dziedzinach, jak skurcz mięśnia, neurochemia, mitochondriologia, absorpcja w jelicie itd. Ideą, jaka przyświecała organizatorom sympozjum, było spotkanie się specjalistów z tych dziedzin celem przedyskutowania ostatnich osiągnięć w badaniach nad różnymi białkami wiążącymi wapń oraz znalezienia wspólnych cech je łączących.

Dokładniejsze omówienie własności i roli fizjologicznej białek wiążących wapń znajdzie czytelnik w ostatnio opublikowanej artykule na ten temat (B. Barylko, *Post. Biochem.*, 19, 361—377, 1973), tak, że w niniejszej notatce ograniczę się, na tle tego artykułu, do wymienienia omawianych na sympozjum ostatnich osiągnięć w tych dziedzinach, obejmujących dorobek jaki upłynął od napisania powyższego przeglądu.

Udział jonów wapnia jest najlepiej zbadany w procesie skurczu mięśnia i to w pierwszym rzędzie zdecydowało, że z trzy i półdniowego sympozjum dwa pełne dni poświęcone były tej tematyce. Być może, w jakimś stopniu wpłynęła na to również fakt, że organizatorzy sympozjum sami zajmują się od lat tą tematyką.

Badania ostatnich lat wykazały niezbicie, że jony wapnia spełniają rolę regulatora cyklu skurczowo-rozkurczowego w mięśniu. W komórce mięśniowej w spoczynku wapń jest zmagazynowany wewnątrz systemu kanalików sarkoplazmatycznego retikulum otaczających właściwy aparat kurczliwy mięśni czyli miofibryle. W wyniku bodźca nerwowego następuje uwolnienie wapnia z tych kanalików i wiązanie ich przez odkryte w ostatnich latach białko nazwane troponiną. Troponina w nieobecności wapnia blokuje właściwy proces skurczu; z kolei przyłączenie wapnia powoduje usunięcie hamującego wpływu tego białka. Po zakończeniu skurczu wapń zostaje z powrotem zmagazynowany we wnętrzu kanalików retikulum. Ostatnie badania, między innymi Pracowni Biochemii Mięśni Instytutu im. M. Nenckiego, wykazały, że troponina jest w istocie kompleksem trzech białek, z których tylko jedno, tzw. troponina C, posiada wysokie powinowactwo do wapnia.

Szczegółowe omówienie tych zagadnień znajdzie czytelnik w dwu artykułach (R. Dąbrowska i W. Drabikowski, *Post. Biochem.*, 16, 405, 1970 i 19, 343—360, 1973).

Jeden pełny dzień sympozjum obejmował referaty dotyczące badań nad troponiną, szczególnie nad jej składnikiem — troponiną C. Problemy związane z wieloma aspektami wiązania wapnia, jak kinetyka wiązania, specyficzność, stechiometria itd., wyniki badań nad interakcją wszystkich składników kompleksu troponiny, oraz próby wyjaśnienia na poziomie molekularnym mechanizmu działania tego kompleksu jako regulatora skurczu mięśnia znalazły wyraz w referatach najwybitniejszych uczonych pracujących nad tymi zagadnieniami jak Ebashi (Tokyo), Perry (Birmingham), Gergely (Boston), Hartshorne (Pittsburg) i innych. Tych zagadnień dotyczył również jeden z referatów z Instytutu Nenckiego (*Comparative Studies on TN-C Component of Troponin from Various Sources* — W. Drabikowski, B. Barylko, R. Dąbrowska, E. Nowak, A. Szpacenko). Pod względem budowy troponina C jest obecnie najlepiej scharakteryzowana ze wszystkich składników kompleksu. Na

sympozjum młody biochemik amerykański Collins z Bostonu przedstawił wyniki swej dopiero co ukończonej pracy uwieńczonej ustaleniem pełnej sekwencji 158 aminokwasów wchodzących w skład troponiny C izolowanej z mięśni królika.

Drugi dzień sympozjum poświęcony był sarkoplazmatycznemu retikulum. Kilka referatów dotyczyło jego roli jako akumulatora jonów wapnia w czasie spoczynku mięśnia oraz związku między funkcją a budową błony z jakiej zbudowana jest ta struktura morfologiczna. Inne prace dotyczyły budowy chemicznej błon sarkoplazmatycznego retikulum oraz szeregu szczegółów dotyczących molekularnych aspektów aktywnego transportu wapnia przez te błony przy pomocy specyficznej ATPazy. Kilka referatów na sympozjum (w tym jeden z Instytutu Nenckiego — *Solubilization, Fractionation and Reaggregation of Sarkoplasmic Reticulum Proteins* — M. G. Sarzała, E. Zubrzycka and W. Drabikowski) dotyczyły analizy składu białkowego błon sarkoplazmatycznego retikulum, sposobów solubilizacji i frakcjonowania białek wchodzących w ich skład. Przedstawiono również wyniki badań nad różnymi aspektami wiązania wapnia przez pęcherzyki sarkoplazmatycznego retikulum, oraz pierwsze próby identyfikacji i charakterystyki białek tych błon, oznaczających się wysokim powinowactwem do wapnia i biorących bezpośredni udział w transporcie wapnia przez błony sarkoplazmatycznego retikulum i magazynowaniu jonów tego pierwiastka wewnątrz jego kanalików.

Na osobnej sesji omówiono ostatnie osiągnięcia w badaniach nad parwalbuminami. Nazwa ta obejmuje klasę homologicznych białek o niskim ciężarze cząsteczkowym obecnych w sarkoplazmie ryb i płazów. Choć ich rola fizjologiczna jest nieznana, badania nad ich strukturą są b. daleko zaawansowane. Nie tylko poznano dokładnie sekwencje aminokwasową kilku z tych białek, ale również strukturę trzeciorzędową na podstawie analizy rentgenograficznej o zdolności rozdzielczej 1,85Å. Dokładnie określono pozycje pętli heliksów, w których uwiązane są dwa atomy wapnia wiązane przez drobinę tych białek. Parwalbuminy wykazują daleko idące podobieństwo w budowie i właściwościach do troponiny C, tak że kilku autorów zajmowało się również spekulacjami na temat wspólnej ewolucji obu tych białek.

Osobne zagadnienie stanowi pompa wapniowa oraz wiązanie wapnia w mitochondriach. W ostatnich latach wykryto glikoproteid, który wydaje się być odpowiedzialny za przenoszenie wapnia w mitochondriach. Inny glikoproteid o wysokim powinowactwie do wapnia, biorący udział w procesie kacyfikacji kości, również był tematem osobnego referatu.

Z kolei na sympozjum przedstawiono właściwości glikoproteidu izolowanego z nabłonka przewodu oddechowego i pokarmowego, również charakteryzującego się wysokim powinowactwem do wapnia.

Kilka referatów dotyczyło białek izolowanych z tkanki nerwowej. Jak się wydaje obecnie, w ośrodkowym układzie nerwowym znajduje się więcej niż jedno białko o wysokim powinowactwie do wapnia. Ich rola pozostaje nadal niejasna. Jedno z nich wydaje się identyczne z białkiem wyizolowanym z kanalików nerkowych. Inne białka wiążące wapń, których synteza jest zależna od witaminy D, wykryto w jelitach i nerce różnych zwierząt. Białka te biorą bezpośredni udział w transporcie jonów wapnia przez jelito.

Ogółem na sympozjum wygłoszono 44 referaty, w tym trzy z Instytutu Nenckiego. Na zorganizowanej poza regularnymi sesjami ogólnej dyskusji omówiono kilka problemów interesujących wszystkich uczestników, między innymi jeden metodologiczny, a mianowicie trudności w oznaczaniu mikroilości wapnia wiązanego przez białka oraz zastrzeżenie dotyczące analizy wyników przy zastosowaniu tzw. krzywej Scatcharda.

W sumie sympozjum pozwoliło nie tylko na przedyskutowanie przez specjalistów z różnych dziedzin biochemii ostatnich osiągnięć w badaniach nad różnymi białkami

wiązającymi wapń; ale również na próby znalezienia wspólnych cech w ich budowie i właściwościach. Jak się wydaje, wszystkie z omawianych na symposium białek można podzielić na dwie grupy. Do jednej z nich należeć będą różnego rodzaju glikoproteidy i w tym przypadku wydaje się, że komponenta cukrowa bierze udział w wiązaniu wapnia. Białka drugiej grupy nie zawierają reszt cukrowych, charakteryzując się stosunkowo niskim ciężarem cząsteczkowym — zazwyczaj kilkanaście tysięcy — i zdecydowanie kwaśnym charakterem, tak że kwasy glutaminowy i asparaginowy stanowią na ogół 35—40% reszt aminokwasowych.

W symposium uczestniczyło ogółem około 80 osób, w tym 52 z zagranicy, z czego duże grupy po kilkanaście osób stanowili naukowcy z Ameryki i Włoch. Około połowy uczestników z zagranicy, nawet z krajów tak odległych jak USA lub Japonia, ze względu na szczupłość funduszy wołało przyjechać wyłącznie na nasze symposium a zrezygnowało w ogóle z uczestnictwa w Kongresie w Sztokholmie. Było to w pewnym sensie miłym zaskoczeniem dla organizatorów i świadczyło o atrakcyjności wybranego tematu symposium.

Niezbyt zręcznie jest niżej podpisanemu, jako jednemu z organizatorów, ocenić stronę organizacyjną symposium. Z wypowiedzi szeregu uczestników wynikało, że stała ona na dobrym poziomie, jeśli pominąć niektóre sprawy, tzw. „niezależne od organizatorów”, jak np. sprawę zakwaterowania.

W. Drabikowski

XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Białystok, 10—12 września 1973 r.

Kolejny XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizowali Koledzy z Oddziału Białostockiego naszego Towarzystwa.

Zjazd otworzył przewodniczący Komitetu Organizacyjno-Naukowego doc. dr Wiktor Rzczycki, przekazując przewodnictwo prezesowi Towarzystwa prof. dr Tomaszowi Borkowskiemu. Prezes powitał przybyłych gości oraz uczestników Zjazdu i podziękował Władzom miasta oraz Akademii Medycznej za pomoc, która umożliwiła zorganizowanie w Białymstoku Zjazdu licznej rzeszy biochemików z całego kraju. W Zjeździe bowiem wzięło udział 560 zarejestrowanych uczestników, z których około 200 stanowili Koledzy nie będący członkami Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Tak liczny udział kolegów z poza kręgu P. T. Bioch. jest niewątpliwie wyrazem atrakcyjności naszych Zjazdów, a w szczególności tematyki sympozjów.

Jedno z Sympozjów XI Zjazdu P. T. Bioch. — który rozpoczął się w Białymstoku w tydzień po Centralnych Dożynkach — nosiło tytuł: „Biochemia — Rolnictwu”; drugie tytuł: „Właściwości błon biologicznych” oraz konferencja n.t. Nauczanie biochemii w szkołach wyższych. Referat programowy wygłosił prof. dr Bronisław Filipowicz (Łódź). Tekst referatu i główne tezy dyskusji publikujemy poniżej.

W ramach symposium na temat „Biochemia — Rolnictwu” (organizator i koordynator prof. dr Jerzy Kączkowski, Warszawa) przedstawiono 5 referatów sympozjalnych i ponad 50 doniesień.

„Biochemiczne i genetyczne podstawy produkcji enzymów przez drobnoustroje” (J. Krauze, Poznań);

„Przemiany związków azotowych w żwaczu zwierząt przeżuujących” (W. Barej, Warszawa);

„Badania nad mechanizmem działania podkomórkowych hormonów uwalnianych” (K. Kochman, Jabłonna k/Warszawy);

„Mechanizmy przerywania spoczynku nasion” (J. Buchowicz, Warszawa);

„Mechanizmy odpornościowe u roślin” (A. Grzelińska, Warszawa).

W ramach sympozjum na temat „Właściwości błon biologicznych” (organizator i koordynator prof. dr Lech Wojtczak, Warszawa) wygłoszono 13 referatów sympozjalnych i ponad 30 doniesień.

„Regulacja metabolizmu mitochondriów przez zmiany struktury i przepuszczalności błon” (J. Popinigis, Gdańsk);

„Properties of the membranes of brown adipose tissue (BAT) mitochondria” (E. N. Christiansen, Oslo);

„Wewnątrzmitochondrialna lokalizacja własności błon mitochondrialnych” (W. Turski, Łódź);

„Pewne zagadnienia biomembranologii teoretycznej dotyczące transportu mieszanin” (B. Mazgis, F. Ludwików, Wrocław);

„Transport fosforanu przez błony erytrocytów” (S. Przystalski, Wrocław);

„Wpływ kwasów tłuszczowych na zjawiska przepuszczalności i transportu w błonach mitochondrialnych” (L. Wojtczak, Warszawa);

„Transport metabolitów przez błony mitochondrialne i jego kinetyka” (J. W. Michejda, Poznań);

„Sarkoplazmatyczne retikulum jako model błon biologicznych” (M. G. Sarzała, Warszawa);

„Wpływ jonoforów molekularnych na błony” (J. Bielawski, Poznań);

„Elektryczne właściwości błon biologicznych” (J. Skierczyńska, Lublin);

„Udział jonów w genezie zjawisk bioelektrycznych” (L. Januszewski, Toruń);

„Mechanizm agregacji komórek pod wpływem niejonowych polimerów” (A. Morawiecki, Wrocław);

„Zmiany powierzchniowe towarzyszące zjawisku transformacji komórek” (B. Grzelakowska-Sztabert, Warszawa).

Ogółem na Zjazd zgłoszono 299 prac, z których wycofano nie więcej niż 20. Materiały zjazdowe, program i tom streszczeń — zostały wydane w estetycznej formie graficznej.

Do konkursu młodych biochemików zgłoszono 23 prace, których pełny tekst rozpatrzy powołana przez Zarząd Główny Komisja typując najlepsze prace do nagrody i wyróżnień.

Próby zorganizowania wystawy aparatury i odczynników tym razem nie powiodły się. Oprócz dwu krajowych wystawców (Unipan, Biomed) gościliśmy jedynie przedstawicieli firm Koch-Light (Anglia) i Pharmacia Fine Chemicals (Szwecja). Większość zaproszonych firm zagranicznych odmówiła udziału w naszym zjeździe ze względu na wystawienie swoich eksponatów w Lublinie z okazji Zjazdu Analityków Klinicznych.

Imprezy towarzyszące Zjazdowi P. T. Biochem. cieszą się zawsze dużą frekwencją. Piękno lasów białostockich mieliśmy okazję podziwiać dwukrotnie: Białowieski Park Narodowy w słoneczną i upalną niedzielę przed rozpoczęciem Zjazdu (ok. 200 osób) oraz lasy w okolicach Supraśla w chłodny wieczór jednego z dni obrad (ok. 250 osób). Spotkanie towarzyskie w pięknej sali Pałacu Branickich, obecnej auli Akademii Medycznej zgromadziło blisko 350 osób. Były świetne kanapki, raki, owoce — muzyka taneczna do północy. Uczestnicy Zjazdu mieli też okazję obejrzeć przedstawienie teatralne „Operę za trzy grosze”, Brechta, jako goście Miejskiej Rady Narodowej.

Jak zwykle bywa główny ciężar organizacji spoczął na barkach przewodniczącego i sekretarza Komitetu Organizacyjno-Naukowego Zjazdu. Koledzy Docenci W. Rzezczycki i W. Gałasiński włożyli nie tylko trud, lecz wiele inwencji i serdeczności, okazali sprężystość i talent organizacyjny. Dzięki nim i ich współpracownikom goście — uczestnicy zjazdu z innych ośrodków będą mile wspominać nasz białostocki Zjazd.

Zofia Zielińska

XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Konferencja na temat

Nauczanie biochemii i kształcenie biochemików

Referat wprowadzający

Przeżywamy bardzo żywy okres reorganizacji nauczania i to na wszystkich szczeblach, zresztą nie tylko w Polsce. Przeżywamy też pewną reorganizację nauczania biochemii i kształcenia biochemików. Toteż słusznie chyba Polskie Towarzystwo Biochemiczne postanowiło włączyć to zagadnienie do programu tegorocznego zjazdu w Białymstoku. Podobnie Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) włączyła problemy nauczania do swych zjazdów. Po raz pierwszy omawiano je szerzej w 1971 roku na VII Zjeździe FEBSu w Warnie, a temat ten cieszył się tam dużym powodzeniem i wywołał żywą dyskusję. Zagadnienia związane z kształceniem biochemików omawiano też na zeszłorocznym zjeździe Towarzystwa Biochemicznego Niemieckiej Republiki Demokratycznej.

Zapotrzebowanie na biochemików wykazuje tendencje wzrostowe zarówno w Polsce jak i w innych krajach. Powstaje coraz większa liczba zakładów uczelniczych, instytutów naukowych i resortowych, w których problematyka biochemiczna oraz metody biochemiczne zajmują poczesne miejsce. Metodyka i wysuwane przez biochemików koncepcje, niewątpliwie znacznie wpłynęły na rozwój takich dyscyplin jak mikrobiologia, genetyka, farmakologia, wiele dziedzin medycyny i rolnictwa inżynierii biochemicznej, a ostatnio biologii molekularnej.

Notabene na VII Zjeździe FEBS-u w Warnie, na pytanie prof. Kretowicza z Moskwy, jaka jest różnica między biochemią a biologią molekularną — zgodzono się po dyskusji, że nie ma zasadniczych różnic.

Zainteresowanych zagadnieniem terminologii i powiązań między biochemią a biologią molekularną odsyłam do angielskiego „Raportu Kendrew” opracowanego na polecenie Rady do Spraw Nauki (*Council of Scientific Policy*), opublikowanego w sierpniu 1968 r., oraz wydanego w sierpniu 1969 Raportu Podkomisji Brytyjskiego Towarzystwa Biochemicznego pracującej pod przewodnictwem Hansa Krebsa.

Termin „biologia molekularna” stał się jednak bardzo popularny również w Polsce. Dlatego, opierając się na wypowiedzi Sekcji Nauk Biologicznych PAN, Podsekcji Biologii Molekularnej, pozwalam sobie zacytować czym zajmuje się omawiana dyscyplina.

„Biologia molekularna, wykorzystując metody i osiągnięcia biochemii, biofizyki, genetyki, mikrobiologii, cytologii, wirusologii i in., zajmuje się najbardziej podstawowymi zagadnieniami życia: budową makromolekuł biologicznie czynnych, głównie kwasów nukleinowych i białek, zależnością między ich funkcją a strukturą, funkcją genów i jej regulacją, strukturami supermolekularnymi i subkomórkowymi wszelkimi procesami wewnątrz- i międzykomórkowymi, bioenergetyką, funkcją błon komórkowych, różnicowaniem i morfogenezą”.

Kształcenie biochemików w różnych krajach przebiega różnymi drogami i nawet w poszczególnych krajach, nie jest zunifikowane. Biochemicy wywodzą się tam głównie spośród studentów wydziałów chemicznych, zwłaszcza organicznych, spośród studentów wydziałów biologicznych i lekarskich.

Niemcy podkreślają rodowód biochemii z niemieckiej medycyny. Istotnie jedna z pierwszych, a może pierwszą katedrą chemii fizjologicznej kierował od 1872 roku Niemiec, sławny prof. Feliks Hoppe-Seyler, na wydziale lekarskim uniwersytetu w Strasburgu (miasto to znajdowało się wówczas w granicach Niemiec). W Strasburgu w latach 1877—1881 Hoppe-Seyler wydał świetny podręcznik „Physiologische

Chemie", a od 1877 zaczął wydawać, znany po dziś dzień „Zeitschrift für Physiologische Chemie”.

Niemniej jednak, jeszcze wcześniej, bo już w 1864 na wydziale lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego utworzono Zakład Chemii Patologicznej, przemianowany w 1873 na Katedrę Chemii Lekarskiej. Zakładem kierował od początku do 1906 roku profesor Aleksander Stopczyński. Zakład w 1867 roku przeniesiono na ul. Kopernika 7, gdzie dziś mieści się Instytut Chemii Lekarskiej. Dodam, że od 1864 roku w Szkole Głównej w Warszawie wprowadzono wykłady chemii fizjologicznej. Wykładowcą był prof. Herman Bolesław Fudakowski. Nasi pionierzy byli jednak mniej znani i popularni, mniej sławni niż Hoppe-Seyler, a Polska nie figurowała wówczas na mapie Europy.

Wracam jednak do spraw kształcenia biochemików w różnych krajach i w Polsce.

Najwcześnieją chyba specjalizację przeddyplomową z biochemii wprowadzono w Wielkiej Brytanii, bo już w 1921 roku w Cambridge. Program specjalizacji zalecał tam, aby kandydat, oprócz normalnego programu nauczania, przynajmniej połowę czasu ostatniego kursu poświęcał biochemii. W Uniwersytecie Harvarda w USA specjalizację wprowadzono już w 1926 r., pod nieco zmienionym tytułem — nauki biochemiczne (*biochemical sciences*). Tam, podobnie jak w Anglii dużą rolę odgrywała praca wychowawców — instruktorów (*tutors*), często specjalistów o wysokich kwalifikacjach, którzy opiekowali się małymi kilkusobowymi grupami studentów. Kierowali ich wychowaniem, nauką, a nawet pracami badawczymi bardziej utalentowanych kandydatów do tytułu magistra nauk biochemicznych czy innych.

Podobne praktyki, często oparte na wzajemnym samokształceniu się studentów, w niewielkich około 5-osobowych grupach, rozpowszechnione są również w Kanadzie.

W Stanach Zjednoczonych A. P. dyplomy biochemików wydaje aktualnie około 100 uczelni, w związku z dużym zapotrzebowaniem na wykładowców biochemii na wydziałach biologii. Biochemia wypełnia tam znaczną część programu, różną zresztą w różnych uczelniach. Do niedawna jednak większość specjalistów z zakresu biochemii w USA uzyskiwała swoje kwalifikacje w podyplomowej specjalizacji. Do omówienia podyplomowego kształcenia biochemików wrócę jeszcze.

W sąsiadującej z nami Niemieckiej Republice Demokratycznej kształcenie biochemików w uniwersytetach jest prowadzone głównie na wydziałach biologicznych. Na niektórych jednak uniwersytetach katedra biochemii prowadzi wykłady zarówno dla biologów jak i chemików, bądź medyków. O specjalizacji decydują dopiero wykłady i pracownie trzeciego i czwartego roku. Uzyskuje się trzy odmiany specjalizacji: biochemia zwierząt, biochemia roślin, technologia biochemiczno-mikrobiologiczna.

W Niemieckiej Republice Federalnej do niedawna nie wprowadzono w uniwersytetach specjalizacji z biochemii. Dopiero ostatnie lata przyniosły pewne zmiany w związku ze wzrostem zapotrzebowania na biochemików. Specjalizacja rozpoczyna się od trzeciego roku studiów.

Podobna sytuacja panowała również w Austrii i w Szwajcarii, gdzie do niedawna tylko Szwajcarski Instytut Technologiczny prowadził specjalizację z biochemii, od paru lat zaś, na ostatnich dwu latach studiów 6 uczelni wprowadziło m.in. specjalizację z biochemii. W Holandii dotychczas nie ma specjalizacji z tej dziedziny.

W ostatnich latach w Anglii uzyskiwało corocznie dyplomy około 750 biochemików, w 1972 roku około 850. Jest to dość znaczna liczba. Dla porównania podam, że w Polsce Ludowej do roku 1971, uzyskało dyplomy magistrów biochemii zaledwie około 600 osób, a coroczna rekrutacja wynosi razem około 150 osób. Nawiasem dodam, że angielscy biochemicy, po uzyskaniu dyplomu, nie łatwo znajdują w kraju, a nawet we wspólnocie brytyjskiej zatrudnienie w swojej specjalności.

W Polsce katedry biochemii w uniwersytetach na wydziałach przyrodniczych

kreowano dopiero po II Wojnie Światowej (pierwszą w Łodzi w 1945 roku). Biochemiczną specjalizację wprowadzono w roku 1958 w uniwersytetach warszawskim i łódzkim, a nieco później we wrocławskim. Dyplomanci uzyskiwali stopnie magistrów biochemii. W roku 1964 zaczęto wprowadzać specjalizację biochemiczną po drugim roku studiów na wydziałach biologii, dlatego uzyskiwany tytuł brzmiał magister biologii w zakresie biochemii. Dyplomy takie wydawano ostatnio w uniwersytetach Warszawskim, Łódzkim, Wrocławskim i Lubelskim, a od ubiegłego roku akademickiego w Poznaniu.

W nadchodzącym akademickim roku 1973/1974 na wydziałach biologii specjalizacja w zakresie biochemii nie została utrzymana. Wprowadzono natomiast specjalizację z biologii ogólnej, biologii środowiskowej, mikrobiologii i biologii molekularnej. Jakie będą losy biochemii przyszłość okaże.

Programy nauczania biochemii bardzo różnią się w różnych krajach, a różnica jest zwłaszcza podejście na poszczególnych wydziałach. Wszędzie na ogół panuje zgodność, że dobra znajomość chemii, chemii fizycznej, matematyki i fizyki jest konieczna, szczególnie dla tych studentów, którzy zamierzają specjalizować się w dziedzinie biochemii.

Trudno jednak ustalić idealny program, który odpowiadałby wszystkim studentom bez względu na to w jakiej dziedzinie będą zatrudnieni po uzyskaniu dyplomów. Z ankiety studenckich wynika np., że studenci uniwersytetów skarżą się często na przeładowanie chemii i biochemii technologią i zagadnieniami związanymi z rozwojem przemysłu, podczas gdy w kraju rośnie zapotrzebowanie na biochemików z wykształceniem politechnicznym. Już obecnie około 15% biochemików zatrudnia przemysł. Kreowane są też stopniowo odpowiednie katedry, w szkołach technicznych również w Polsce. W Anglii, w NRD jest sporo takich zakładów specjalizujących w technologii biochemicznej. W NRD do specjalizacji inżynierii biochemicznej dołączają często mikrobiologię, odgrywającą rzecz oczywista dużą rolę w przemysłowej produkcji żywności, leków i innych.

Kandydaci na lekarzy i biologów żądają głębszych powiązań w nauczaniu biochemii z fizjologią i biologią.

Jeszcze dalej są idące życzenia kandydatów, którzy od pierwszego roku zdecydowali się na specjalizację w biochemii. Gdziekolwiek te ich życzenia bywają respektowane. W Anglii np. organizuje się dla nich specjalne kursy biochemii już na pierwszym roku studiów, w Danii — jeden wykład biochemii tygodniowo w pierwszym i połowie drugiego trymestru. Przeważnie jednak nauczanie biochemii odbywa się na drugim lub na drugim i trzecim roku a ewentualna specjalizacja na dalszych latach studiów.

Treść i różnice programów nauczania biochemii w różnych uczelniach zostaną prawdopodobnie poruszone w czasie dyskusji. W swoim referacie ograniczę się do krótkiego omówienia nauczania biochemii w szkołach medycznych, gdyż jest to najbliższy mi temat.

Nauczanie to jest różnie prowadzone na świecie, zależnie w pewnej mierze od rekrutacji, liczby studentów, wyposażenia zakładów, liczby nauczycieli. W Kanadzie np. kandydatów na wydział lekarski przyjmuje się dopiero po ukończeniu trzechletnich studiów w szkole wyższej, a więc nawet z pewnym przygotowaniem biochemicznym. Biochemia nauczana jest tam w znacznej integracji z anatomią, fizjologią, histologią, ćwiczenia prowadzone we wspólnych wielodyscyplinowych laboratoriach.

Swoiście przebiega rekrutacja w wielu szkołach w Stanach Zjednoczonych. Zainteresowany już na I kursie uniwersytetu zgłasza swoją kandydaturę do odpowiadającej mu szkoły medycznej. Dziekan tej szkoły śledzi jego postępy w nauce i po dwóch lub trzech latach decyduje czy kandydat może przystąpić do konkursu na około 100 miejsc na wydziale lekarskim. Biochemia nauczana jest na I kursie i jest

tam uważana za podstawową dyscyplinę w naukach medycznych. Wykłady prowadzi przeważnie paru wykładowców przy bardzo wysokiej frekwencji studentów; ćwiczenia są oczywiście obowiązkowe. W okresie wakacji zdolni studenci mieli możliwość uczestniczenia w badaniach naukowych niektórych placówek — z okazji tej mogło korzystać dotąd parę procent studentów. Ostatnio jednak fundusze na ten cel, podobnie jak i na badania naukowe zostały w USA bardzo ograniczone. Dodam, że na wydziałach lekarskich studiuje zaledwie kilka procent kobiet; na stomatologii prawie sami mężczyźni.

Brak jest w USA zunifikowanego programu nauczania. Na 88 szkół medycznych prawie każda realizuje swój własny program. W latach 60-tych propagowano tam program pełnej integracji nauczania, przy prawie jednoczesnym udziale wszystkich dyscyplin. Okazało się, że wymaga to znacznego zwiększenia liczby nauczycieli, a koszty budowy odpowiednich pracowni, obsługujących kilka dyscyplin, są bardzo wysokie, więc zrezygnowano z tej idei, zainaugurowanej w Western Reserve University. Ideę pełnej integracji nauczania przedmiotów podstawowych realizuje np. P. N. Campbell, prof. biochemii Uniwersytetu w Leeds (Anglia) organizując odpowiednie pracownie. Projektuje prowadzenie w nich w pierwszych latach zintegrowanych ćwiczeń z biologii komórki, biochemii, fizjologii, a na następnych latach zintegrowane ćwiczenia z innych dyscyplin. Zdaniem Campbella wielu wykładowców biochemii, wymagając od studentów znajomości setek wzorów chemicznych i faktów nie związanych z medycyną, zapomina, że mają kształcić lekarzy, a nie naukowców.

Tego rodzaju poczynania jak w Leeds są wyjątkowe, chociażby ze względu na koszty. Na temat zakresu nauczania biochemii w angielskich szkołach medycznych panują zresztą różne, często diametralnie odmienne poglądy np. na temat przydatności medykom ćwiczeń biochemicznych. Niektórzy utrzymują, że studentom wystarczy przyswojenie sobie tylko pewnego zakresu wiedzy teoretycznej biochemii, a praca w laboratoriach nie wiele pomaga im w zrozumieniu przedmiotu. Znaczna większość sądzi jednak, że zajęcia praktyczne z biochemii korzystnie wpływają na ogólne medyczne wykształcenie studentów.

Inaczej przebiegają studia medyczne we Francji, w znacznej mierze z racji bardzo dużej liczby przyjmowanych studentów. Gdy w Anglii liczba przyjmowanych na pierwszy rok waha się około stu osób, to we Francji dochodzi do 1500. Studia trwają 6 lat. Biochemia na pierwszym, lecz głównie na drugim roku studiów. Np. na wydziale medycznym uniwersytetu w Créteil pod Paryżem, na pierwszym roku około 100 godzin biochemii, poświęcone głównie budowie i właściwościom różnych składników żywej materii. W drugim roku 6-tygodniowy kurs poświęcony enzymom i metabolizmowi oraz 4-tygodniowy kurs poświęcony głównie regulacji. Na wyższych latach integracja biochemii z wielu dyscyplinami klinicznymi.

Krótko jeszcze o kształceniu medyków w Szwecji, gdyż sporo wzorów zaczerpnęliśmy od nich, przeprowadzając poprzednią reformę studiów w naszych akademiach medycznych. W Szwecji czas studiów medycznych obejmuje przeciętnie 6 lat, choć wymagania maturalne są tam bardzo wysokie. Pierwszy rok, podobnie jak obecnie u nas jest rokiem morfologicznym (anatomia, histologia, statystyka, genetyka lekarska). Drugi rok — biochemiczno-fizjologiczny, obejmuje chemię, chemię lekarską, fizjologię, fizykę lekarską i psychologię. Materiał ćwiczeń w minimalnym stopniu uwzględnia metody diagnostyki laboratoryjnej, gdyż na III-cim i IV-tym roku wprowadzono tam nauczanie chemii klinicznej.

W Instytucie Karolinska Sjukhuset w Sztokholmie, na III-cim roku, trzy tygodnie ćwiczeń po 4 godz. dziennie. Na IV-tym roku praktyka w poszczególnych laboratoriach Instytutu — po 1 tygodniu w każdym. W wymienionym Instytucie przyjmują 70 studentów z tym, że w dwóch semestralnych ciągach. Jeden zaczyna się 1 września, drugi 7 stycznia. Tak więc na pierwszym roku jest około 140 studentów.

W Polsce na wydziałach lekarskich, z racji wprowadzonej w 1966 roku reformy studiów, pierwszy rok studiów poświęcono przedmiotom morfologicznym, trzeci semestr był przeznaczony na naukę chemii ogólnej (200 godz.), biochemii zaś nauczano tylko w czwartym semestrze (210 godzin).

Były to nie bardzo korzystne warunki dla nauczania chemii, której elementy skreślono z programu ostatniego roku szkoły średniej. Po dwuletniej zatem przerwie (wtórny analfabetyzm) z konieczności zaczęliśmy od powtarzania części programu szkoły średniej. Odbijało się to niekorzystnie na nauczaniu biochemii w krótkim semestrze letnim, zakłóconym, na jego początku, egzaminami z chemii ogólnej.

Trudności nauczania wynikają też z dużej liczby studentów. W ostatnich latach w katedrze, którą reprezentują nauczano rocznie około 430 medyków i stomatologów a do niedawna również 140 studentów wydziału farmaceutycznego. Bardzo mała powierzchnia sal do prowadzenia ćwiczeń i seminariów i dość skromne wyposażenie techniczne nie ułatwiało nam pracy.

Aby złagodzić te i inne trudności, dążyliśmy do jak najdalej idącej integracji, zwłaszcza biochemii i chemii ogólnej. Wynika to z charakteru tej ostatniej dyscypliny. Zgodnie z założeniami jej ramowego programu „zadaniem chemii ogólnej jest wyrobienie u słuchaczy umiejętności potrzebnych do realizowania programu nauczania biochemii”. W Łodzi rozwiązanie zagadnienia integracji między chemią i biochemią nie natrafiało na większe trudności, gdyż zakłady chemii ogólnej i biochemii wchodziły w skład wspólnej katedry. Na większe natomiast trudności natrafia się w akademiach medycznych przy próbach integrowania ze specjalnościami z innych lat, zwłaszcza gdy zainteresowane zakłady włączono w ramy Instytutów. Na pierwszych dwóch latach przyjęto za zasadę ustawianie instytutów wg schematu poziomego: w jednym katedry I roku, w drugim katedry II roku itd. Ułatwia to koordynowanie prac dydaktycznych, utrudnia natomiast integrację pracy katedr o podobnej tematyce i zainteresowaniach.

Nowym, dość trudnym zagadnieniem, jakie wyłoniło się w ostatnich latach, była konieczność pewnej korekty programu nauczania i chemii i biochemii, w związku z rozwojem tych dziedzin jak i różnych medycznych dyscyplin. Te nasze tendencje korygowania programu zbiegły się z podobnymi zamierzeniami Ministerstwa Zdrowia. W rezultacie Rada Naukowa przy Ministerstwie Zdrowia w 1967 roku powołała, między innymi, trzyosobową komisję do opracowania programu nauczania biochemii w akademiach medycznych. W skład komisji weszli: prof. dr W. Ostrowski, prof. dr M. Zydowo i prof. dr B. Filipowicz. Po kilku spotkaniach i sporej wymianie korespondencji, opracowaliśmy ramowy projekt nauczania biochemii. W tymże mniej więcej czasie powstała podobna komisja do opracowania programu nauczania chemii ogólnej w składzie: prof. dr S. Bączyk (przewodniczący) oraz prof. dr W. Ostrowski i prof. dr B. Filipowicz.

Dla skonfrontowania i uzgodnienia powstałych projektów zjechali się do Łodzi w 1970. wszyscy prawie wykładowcy chemii ogólnej i biochemii, a także ówczesny prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, prof. dr. Z. Zielińska i obserwator z ramienia Towarzystwa doc. dr L. Żelewski. Było to pierwsze chyba w Polsce takie wspólne zebranie chemików i biochemików, nauczających w akademiach medycznych. Dyskusja była bardzo ożywiona i chyba owocna. Za ogólną zasadę przyjęto, że tak jedna jak i druga dyscyplina główną uwagę skieruje na nauczanie podstaw chemii i biochemii. Chemicy zgodzili się poza tym przejąć znaczną część biochemii statycznej w ramy swojej dyscypliny, z wyłączeniem ważniejszych związków wielcząasteczkowych. Za główny temat biochemii przyjęto śledzenie przemian, jakie toczą się w organizmie, ich lokalizację, efekty energetyczne i mechanizmy ich regulacji, pamiętając jednak, że śledzenie chemicznych i fizycznych procesów nie powinno przesłaniać badanego organizmu jako całości. Do zadań biochemii należało też podkreśla-

nie, że wiele biochemicznych reakcji przemawia za jednością i ewolucyjnym rozwojem całego ożywionego świata.

Zgodzono się również, że zadaniem ćwiczeń winno być ilustrowanie podstawowych pojęć biochemicznych i zapoznanie studenta z zasadami ważniejszych metod stosowanych w biochemii. Analizy krwi, moczu i inne należy rozpatrywać z punktu widzenia metabolizmu, pamiętając, że na wyższych latach wprowadzono analitykę lekarską, a wprowadza się biochemię kliniczną. Opracowano plan wykładów zalecając, aby stałą pomocą w nauczaniu biochemii były seminaria, niewątpliwie dodatnio wpływające na ciągłość pracy studenta. Większość uczestników wypowiedziała się też za przesunięciem chemii ogólnej na pierwszy rok studiów, a biochemię na oba semestry drugiego roku.

Projekt opracowanego i skorygowanego przez uczestników konferencji programu, został im wszystkim przesłany i wydaje mi się, że w znacznej części jest realizowany w akademiach medycznych. Przesłano też projekt programu do Ministerstwa Zdrowia i jak się zdaje wpłynął on choć w części na przeprowadzoną obecnie reformę studiów w A. M.

Projektuje się całkowite włączenie chemii ogólnej do biochemii (biochemia z elementami chemii), z tym, że elementy chemii mają być nauczane na I roku, a biochemia przez trzeci i czwarty semestr. Nie podano jeszcze szczegółowego programu nauczania.

Zatrzymam się jeszcze nieco nad zagadnieniem techniki wykładania. Wydaje mi się, że wykłady w swojej tradycyjnej formie, zawierającej cały obowiązkowy zakres wiadomości, raczej zastępowane są obecnie fragmentami z trudniejszych części przedmiotu oraz monograficznymi wykładami ze specjalnych dziedzin. Prof. O. Hoffmann-Ostenhof z Austrii na zebraniu FEBS-u w Warnie proponował np., aby na wykłady z różnych dziedzin, zapraszać odpowiednich wykładowców, specjalizujących się w określonej dziedzinie. Prof. Raman ze Szwajcarii proponował, aby do dydaktyki wciągnąć również specjalistów z przemysłu, z instytutów naukowych i resortowych. FEBS mógłby ich rejestrować i pośredniczyć w angażowaniu i jak mi wiadomo Federacja podejmuje się tego zadania. W tym roku np. przesłała do Zarządu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego kilkadziesiąt nazwisk osób i instytucji interesujących się tym projektem.

Dużą pomocą w dydaktyce mogą być środki audiowizualne takie jak filmy i udźwiękowione przezroczka. Mogą one znajdować zastosowanie nie tylko do wykładów lecz również do własnej nauki studenta, do uczenia się. Obraz wzmocniony dźwiękiem bardzo przykuwa uwagę widza i słuchacza. Prof. D. S. Wiggins z Dallas (USA) podaje, że dla ułatwienia studentom własnej ich nauki, nagrywa na taśmie magnetofonowej swoje wykłady. Do taśmy dołącza przezroczka rysunków, fotografii oraz pytania i odpowiedzi na dany temat. Urządzono ponadto 12 boksów, czynnych 18 godzin dziennie, umożliwiających studentom powtarzanie tam sobie każdego wykładu.

W Łodzi w Zakładzie Biochemii rozwiązujemy tę część programu, skracając wykłady do minimum, na korzyść seminariów prowadzonych w kilkunastoosobowych grupach. Wykładam szerzej, często z pomocą wykładowcy, tylko niektóre działy: enzymy, utlenianie biologiczne, zwłaszcza regulację. Oprócz tego kilku moich zaawansowanych pracowników wyspecjalizowało się w pewnych dziedzinach np. biosynteza białka, immunochemia, metabolizm wody i elektrolitów, rola mitochondriów w organizmie i inne. Muszę przyznać, że te wykłady cieszą się często większą frekwencją niż moje.

Wykłady oczywiście nie obejmują całego obowiązującego programu materiału. Resztę uzupełnia student z zalecanej literatury i podręczników. Tych mamy już w języku polskim sporo, bądź oryginalnych bądź tłumaczenia. Dodam tylko, że po-

dobno zalecane są krótkie podręczniki. Czy słusznie? Nie mam wyrobionego zdania na ten temat, choć jestem współautorem bardzo krótkiego podręcznika biochemii. Lecz znam piękne i wzięte podręczniki A. White'a, P. Handlera, S. L. Smitha „Principles of Biochemistry”, A. Cantarowa i B. Schepartza: „Biochemistry”, F. Leut-hardta: „Lerbuch der Physiologischen Chemie”, S. M. Rapoport: „Medizinische Chemie”, W. A. Engelhardta: „Biochimija”, M. Polanowskiego: „Elements de Biochimie Médicale”, tłumaczone podręczniki Frutona, Harpera i inne. Objętość prawie każdego z nich oscyluje wokół 800—1000 stron, niektóre mają już wiele wydań, a więc cieszą się powodzeniem. Widziałem zresztą zagranicą studentów uczących się z tych i podobnych podręczników. Czy słusznie więc staramy się dostarczać naszym studentom krótkie podręczniki — kompendia z biochemii? Wydaje mi się, że nadmierne ograniczanie przedmiotu do suchych podstaw może zaciemniać jego powiązania ze specjalnością.

Krótko jeszcze o podyplomowym kształceniu biochemików, choć jest sprawa otwartą czy preferować specjalizację przed, czy podyplomową. W Anglii prowadzona jest dwukierunkowa akcja w tej dziedzinie. Pierwsza — dla kandydatów z innych specjalności, druga — dla dyplomowanych biochemików. W związku ze wzrastającą liczbą tych ostatnich, dla nich raczej rośnie liczba odpowiednich kursów. Są to przeważnie kilkudniowe kursy na określone tematy. Prowadzone są bądź z inicjatywy uniwersytetów lub innych uczelni, bądź na zlecenie Brytyjskiego Towarzystwa Biochemicznego. Słuchaczami są pracownicy uczelni, instytutów, przemysłu, zwłaszcza ci którzy tam prowadzą badania na dany temat, bądź przygotowują publikacje lub dysertacje doktorskie.

W podobny przeważnie sposób prowadzone jest podyplomowe kształcenie biochemików w wielu innych krajach. Dla przykładu podam, że w NRD tamtejsze Towarzystwo Biochemiczne organizuje corocznie w uniwersytetach i instytutach Akademii Nauk około 20 kursów dla około 300 uczestników. Moi współpracownicy uczestniczyli w 1973 roku w podobnych kursach w Schloss Reichardsbrunn w NRD i w Liblicach w Czechosłowacji, zorganizowanych przez tamtejsze Towarzystwo Biochemiczne. Do akcji tej, w ramach tak zw. „Szkół Letnich” włączyła się w ostatnich latach Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS). W 1972 roku 21-szy już kurs FEBS-u na temat „Enzyme Regulation” odbył się w Madrycie. W 1973 roku, 24-ty kurs FEBS-u, na temat „Protein—Nucleic Acids Interactions” zorganizowano w Hintermoos w Austrii. Wiadomo mi, że w tym 7-miodniowym kursie uczestniczyło 110 osób — a wykładowców było około 30.

W Polsce podyplomowe kształcenie biochemików odbywa się głównie w zakładach biochemii i pokrewnych, różnych uczelni i instytutów. Obok magistrów biochemii są tam kształceni również chemicy, lekarze, biolodzy i inni, głównie na zaspokojenie potrzeb danej placówki. Stąd programy ich kształcenia różnią się znacznie.

Bardziej ujednoczone programy wprowadzono na stacjonarnych studiach doktoranckich zapoczątkowanych w 1968 roku w Warszawie, a w roku następnym w Łodzi i we Wrocławiu. Programy przewidują trzyletnie kształcenie doktorantów w tym około 900 godzin przeznaczonych na wykłady i seminaria, przeprowadzone głównie na pierwszych dwóch latach studiów. Około 2/3 tego czasu przeznaczone jest na przedmioty związane z kierunkiem studiów, 1/3 na przedmioty ogólne i języki obce. Resztę trzyletniego okresu szkolenia przeznaczono na prace eksperymentalne. Doktoranci są czasowo zatrudnieni na warunkach asystentów w instytutach prowadzących studia, z tym, że nie mogą podejmować się dodatkowych prac.

Z dotychczasowych doświadczeń zgodnie wynika, że trzyletni okres nauczania jest zbyt krótki i należałoby przedłużyć go o jeden rok. Liczba kończących studia doktoranckie jest rzędu kilkunastu osób rocznie; część z nich, po ukończeniu studium, natrafia na trudności w znalezieniu odpowiedniej pracy. Może dlatego, że brak jest

sprecyzowanego zakresu zawodu biochemika, a może brak propagandy wśród pracodawców?

Pewnym skromnym rozwiązaniem tych trudności dla przyszłych doktorów są zapoczątkowane w Warszawie studia doktoranckie dla zatrudnionych już biochemików, bez konieczności przerwania pracy w ich macierzystym miejscu zatrudnienia.

Bronisław Filipowicz

Dyskusja:

Przewodniczył: Prof. dr Mariusz Żydowo

Protokółował: Dr R. Farbiszewski

Prof. dr I Chmielewska jako dyrektor Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego zwróciła uwagę by w dyskusji, która nastąpi wyraźnie oddzielić problem kształcenia biochemików od nauczania biochemii studentów innej specjalności; podkreśliła również konieczność podyplomowego szkolenia biochemików odnośnie studiów doktoranckich, uważa, że często przyjmowani są nie najlepsi kandydaci, ponieważ najlepsi dotychczas angażowani są bezpośrednio po uzyskaniu dyplomu przez placówki naukowe i resortowe w charakterze asystentów.

Prof. dr W. Brzeski z Akademii Rolniczej w Warszawie przedstawił sprawę nauczania biochemii w akademiach rolniczych sugerując jednolity program kursu podstawowego niezależnie od kierunku studiów, podkreślił on ponadto, że liczba godzin aktualnie przeznaczona programem na nauczanie biochemii jest niewystarczająca.

Prof. dr S. Karpiak z Akademii Rolniczej we Wrocławiu jest odmiennego zdania i sądzi, że zależnie od specjalności należałoby wprowadzić w nauczaniu biochemii silniejszy akcent na biochemię roślin, zwierząt, drobnoustrojów itd.; wyraził on też przekonanie, iż 3-letni okres na studia doktoranckie jest za krótki i należałoby je przedłużyć.

Przewodniczący zebrania *prof. dr M. Żydowo* zaproponował by skoncentrować się na problemach związanych z nauczaniem biochemii oraz by ukierunkować dalszą dyskusję odpowiadając kolejno na następujące pytania:

- 1) jaki jest cel nauczania biochemii,
- 2) jak to należy robić,
- 3) jakie środki należy stosować.

Prof. dr Z. Kaniuga z Instytutu Biochemii U. W. działający w Komisji Programowej Ministerstwa Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki podkreślał niewystarczającą liczbę godzin przeznaczonych w nowych programach studiów na nauczanie biochemii w stosunku do zakresu i poziomu wiedzy jaka jest obecnie niezbędna dla biologa.

Prof. dr R. Schramm z Uniwersytetu Poznańskiego wyraził pogląd, że podstawą przyrodniczego widzenia organizmu jest widzenie biochemiczne — nauczanie takiego właśnie patrzenia jest podstawowym zadaniem nauczania biochemii niezależnie od kierunków studiów. Prof. Schramm jest zdania, iż najefektywniejsze dla realizacji nakreślonego zadania są zajęcia typu seminaryjnego, których liczbę należy zwiększyć w miarę możliwości.

Prof. dr Z. Zielińska z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN poparła pogląd Prof. Schramma na temat zadań nauczania biochemii, podkreśliła celowość seminariów i ćwiczeń, zaznaczając, że podstawowe wiadomości student mógłby czerpać z podręczników, wykłady wówczas można poświęcić na monograficzne ujęcie wybranych tematów. Pewną rolę w doszkąlceniu podyplomowym biochemików odgrywają kursy organizowane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne (np. w 1973 roku Kurs enzymologii w Warszawie) oraz wykłady prelegentów zapraszanych na posiedzenia naukowe Oddziałów różnych ośrodków w kraju.

Prof. dr J. Opieńska-Blauth z Akademii Medycznej w Lublinie również zaznaczyła, że celem nauczania biochemii jest wdrożenie studentów do myślenia biochemiczno-przyrodniczego.

Prof. dr J. Kączkowski z Akademii Rolniczej w Warszawie sądzi, że wykłady muszą być podstawą zrozumienia biochemii, główny jednak ciężar nauczania jego zdaniem winien być przesunięty na ćwiczenia oraz zajęcia typu seminaryjnego. Odpowiedni poziom zajęć wymaga oczywiście dobrego przygotowania asystentów, co wymaga stałego samokształcenia.

Doc. dr K. Toczko z Instytutu Biochemii U. W. jest zdania, iż nauczanie biochemii jest konieczne dla wyrobienia odpowiedniego sposobu myślenia przyrodniczego. Dlatego wymiar zajęć z biochemii nie powinien ulec ograniczeniu.

Doc. dr A. Koj z Instytutu Biologii Molekularnej U. J. podkreślił brak podręczników monograficznych w języku polskim, brak nowoczesnych pomocy naukowych, a szczególnie filmów. Podobne zdanie wyraził *doc. dr T. Krajewski* z Uniwersytetu Łódzkiego.

Prof. dr M. Żydowo zaproponował zorganizowanie wymiany międzyośrodkowej instrukcji do ćwiczeń z biochemii — powierzając zadanie to Zarządowi Głównemu. Podsumowując obrady *Prof. Żydowo* stwierdził, że w dyskusji określono wspólny cel nauczania biochemii w szkołach wyższych — nauczania biochemicznego patrzenia na organizm, co wymaga niemałego zasobu wiadomości, zyskiwanych nie tylko biernie lecz i czynnie przez studentów.

KOMUNIKAT

Podkomisja Chromatograficzna Komisji Chemii Analitycznej PAN uprzejmie zawiadamia, że organizuje we wrześniu — październiku 1974 roku w Poznaniu dwudniowe Sympozjum na temat:

„Chromatografia związków czynnych w materiale biologicznym”

Zgłoszenia udziału w w/w Sympozjum oraz streszczenia komunikatów przyjmuje Prof. dr Aleksandra Smoczkiewiczowa, Instytut Towaroznawstwa WSE, Zakład Chemii Ogólnej i Analitycznej, ul. Marchlewskiego 146/150, 60—967 Poznań.

SPIS TREŚCI

B. Grzelakowska-Sztabert—Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej	3-21
J. Zborowski, M. G. Sarzała—Drogi biosyntezy różnomolekularnych fosfolipidów	21-34
W. Lutz, L. Kłyszajko-Stefanowicz—Chemiczna synteza i właściwości analogów hormonów peptydowych	35-66
W. Kisiel—Nowa grupa związków biologicznie czynnych—laktony seskwiterpenowe z roślin rodzaju <i>Vernonia</i>	67-75
Sprawozdania:	
III Konferencja Linderströma-Langa Espo k/Helsinki (T. Gołaszewski)	77-79
Międzynarodowe Sympozjum n.t. Białka wiążące wapń (W. Drabikowski)	79-82
XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok 9—12.IX.1973 (Z. Zielińska)	82-83
Referat wygłoszony na konferencji n.t. Nauczanie biochemii (w ramach XI Zjazdu PTBioch.—B. Filipowicz)	84-92
Komunikat	93

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1974

Articles in Polish

Volume 20

Number 1

B. Grzelakowska-Sztabert — Changes in Cell Surface after Viral Transformation (Nencki Inst. Exp. Biol., Polish Acad. Sci., Warszawa)	3-21
J. Zborowski, M. G. Sarzała — Biosynthetic Pathways of the Molecular Species of Phospholipids (Nencki Inst. Exp. Biol., Polish Acad. Sci., Warszawa)	21-34
W. Lutz, L. Kłyszajko-Stefanowicz — Chemical Synthesis and Properties of Peptide Hormone Analogues (Army Medical School, Łódź and Inst. of Biochem. and Physiol., University of Łódź, Łódź)	35-66
W. Kisiel — Sesquiterpene Lactones of <i>Vernonia</i> sp. — a New Group of Biologically Active Compounds (Pharmacology Dept., Polish Acad. Sci., Kraków)	67-75
<i>Meeting Reports:</i>	
3 rd Int. Linderström-Lang Confer., 27—30.4.1973 (T. Gotaszewski)	77-79
Int. Symposium on Calcium Binding Proteins, 9—12.7.1973 (W. Drabikowski)	79-82
11 th Meeting of the Polish Biochemical Society, 10—12.9.1973, (Z. Zielińska)	82-83
Teaching in Biochemistry, 12.9.1973 (B. Filipowicz)	84-92
Communication	93

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

Piśmiennictwo: W artykule powinny być cytowane prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy cytować jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem będzie obejmował prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnosniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydawania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co, London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London

Załączniki: Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egzemplarzach na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść. Należy zaznaczyć z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny tj. wykresy, rysunki, schematy, lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: \triangle \square \circ \square \bullet Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów aby zabezpieczyć maszynopisy i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

B. Grzelakowska-Sztabert—Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej	3-21
J. Zborowski, M. G. Sarzała—Drogi biosyntezy różnomolekularnych fosfolipidów	21-34
W. Lutz, L. Kłyszajko-Stefanowicz—Chemiczna synteza i właściwości analogów hormonów peptydowych	35-66
W. Kisiel—Nowa grupa związków biologicznie czynnych—laktony seskwiterpenowe z roślin rodzaju <i>Vernonia</i>	67-75
Sprawozdania:	
III Konferencja Linderströma-Langa Espo k/Helsinki (T. Gołaszewski)	77-79
Międzynarodowe Sympozjum n.t. Białka wiążące wapń (W. Drabikowski)	79-82
XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok 9—12.IX.1973 (Z. Zielińska)	82-83
Referat wygłoszony na konferencji n.t. Nauczanie biochemii (w ramach XI Zjazdu PTBioch.—B. Filipowicz)	84-92
Komunikat	93