

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 23 (4)
493-620 (1977)

1977

tom 23 nr 4



Pw

<http://rcin.org.pl>

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

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 odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów 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; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa 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, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) 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), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) 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 obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I—1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. 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. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. 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).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych do-
różnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Polak

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1977 TOM 23 ZESZYT 4

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 23(4)
(493—(1977)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice)

J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellebogen (Wrocław)

A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardelt (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa),

M. Fikus (Warszawa), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa),

W. Jachymczyk (Warszawa), S. Lewak (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa),

I. Szumieli (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1977

Nakład 2.260 (2144+116)

Ark. wyd. 10,0, ark. druk. 8,0

Pap. ilustrac. kl. III, 100 g, 70×100

Zam. nr 1046/77

F-9

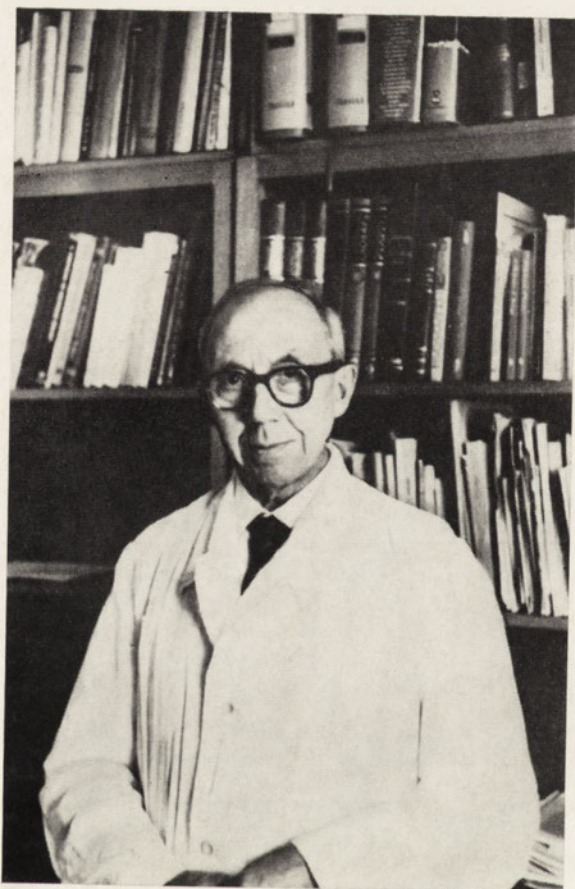
Oddano do składania 9.VIII.77

Podpisano do druku w listopadzie 1977 r.

Druk ukończono w listopadzie 1977 r.

Cena zł 20,—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA



WŁODZIMIERZ NIEMIERKO

W osiemdziesiątą rocznicę urodzin profesora

WŁODZIMIERZA NIEMIERKO

CZŁONKA RZECZYWISTEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
CZŁONKA HONOROWEGO I ZAŁOŻYCIELA
POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO,
TWÓRCY ODBUDOWANEGO PO WOJNIE
INSTYTUTU BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ IM. M. NENCKIEGO
I ZAKŁADU BIOCHEMII TEGOŻ INSTYTUTU

ZESZYT SWEGO KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”

dedykuje

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ERLING N. CHRISTIANSEN ^{*)}, LECH WOJTCZAK ^{**)}

Regulacja metabolizmu energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej

Regulation of Energy Metabolism in Brown Adipose Tissue Mitochondria

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Występowanie brunatnej tkanki tłuszczowej
- III. Budowa histologiczna i cytologiczna
- IV. Fizjologiczne znaczenie brunatnej tkanki tłuszczowej
- V. Biochemiczne właściwości mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej
 - V-1. Właściwości energetyczne
 - V-2. Rola kwasów tłuszczowych
 - V-3. Wpływ pH
 - V-4. Wpływ nukleotydów purynowych
 - V-5. Przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej
 - V-6. Procesy transportu w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej
 - V-7. Cytochrom b jako wskaźnik stanu energetycznego mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej
- VI. Biochemiczny mechanizm produkcji ciepła w brunatnej tkance tłuszczowej

Contents

- I. Introduction
- II. Occurrence of the brown adipose tissue
- III. Histology and cytology of the brown adipose tissue
- IV. Physiological role of the brown adipose tissue
- V. Biochemical properties of brown adipose tissue mitochondria
 - V-1. Energy coupling
 - V-2. Role of fatty acids
 - V-3. Effect of pH
 - V-4. Effect of purine nucleotides
 - V-5. Permeability of the inner membrane
 - V-6. Transport processes
 - V-7. Cytochrome b as a probe of energy level
- VI. Biochemical mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue

^{*)} Dr, Instytut Żywienia Uniwersytetu w Oslo (Institut for Ernaeringsforskning, Universitetet i Oslo), Blindern, Oslo 3, Norwegia;

^{**)} Prof. dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; (adres dla korespondencji).

I. Wstęp

Produkcja ciepła towarzyszy wszystkim procesom metabolicznym. U zwierząt stałocieplnych (ptaków i ssaków) ciepło to służy do utrzymania względnie stałej temperatury ciała. Oczywiście stałość ciepłoty tych zwierząt zależy również od wytworzonych w toku ewolucji przystosowań morfologicznych i fizjologicznych, chroniących zarówno przed zbytnią utratą ciepła jak i przed nadmiernym podniesieniem temperatury tkanek. W mechanizm termoregulacji wprzęgnięte zostały również czynniki natury nerwowej i hormonalnej.

Izolacja termiczna powierzchni ciała ssaków w formie futra lub podskórnej warstwy tłuszczowej jest na ogół wystarczająca, aby ciepło wytworzone jako „uboczny produkt metabolizmu” kompensowało straty. Często nawet konieczne staje się uruchamianie specjalnych mechanizmów zapobiegających przegrzaniu (na przykład rozszerzenie podskórnych naczyń krwionośnych, wydzielanie potu itp.). Natomiast w przypadku zwiększonych strat ciepła, na przykład w warunkach niskiej temperatury otoczenia, organizm większości ssaków zwiększa produkcję ciepła przez oddechowe wzmoczenie skurczów mięśni. Zjawisko to występuje i u człowieka i znane jest jako dreszcze. W pewnych jednak sytuacjach mechanizm ten może okazać się niewystarczający. Dotyczy to przede wszystkim długotrwałego oddziaływania niskiej temperatury otoczenia, budzenia się zwierząt ze snu zimowego (hibernacji) oraz zwierząt nowonarodzonych. Noworodki ssaków mają z reguły słabo wykształconą powierzchnię warstwę izolacji cieplnej. Podlegają one w momencie urodzenia gwałtownej zmianie ciepłoty otoczenia, a ich układ nerwowo-mięśniowy nie jest jeszcze wystarczająco wykształcony i dlatego zjawisko dreszczów nie występuje w pełni lub wcale. Natomiast przy budzeniu się ze snu zimowego następuje szybkie podniesienie temperatury tkanek zwierzęcia często o 20° lub więcej. Również w czasie hibernacji układ nerwowo-mięśniowy jest w znacznym stopniu unieczynniony i skurcze mięśni, poza sercem i ruchami oddechowymi, nie występują. We wszystkich tych sytuacjach funkcję ogrzewania organizmu ssaków przejmuje w znacznym stopniu specjalna tkanka zwana brunatną tkanką tłuszczową. Budowa, funkcje i znaczenie tej tkanki zostały w ostatnich latach opisane w szeregu monografii (1—9).

II. Występowanie brunatnej tkanki tłuszczowej

Brunatną tkankę tłuszczową znaleziono wyłącznie u ssaków. Jest ona szczególnie dobrze rozwinięta u zwierząt przechodzących sen zimowy, u zwierząt odznaczających się niewielkimi rozmiarami ciała, a prawdopodobnie także u wszystkich ssaków przez pewien czas po urodzeniu. Tkanka ta występuje najczęściej w części tułowiowej zwierzęcia, po jego

grzbietowej stronie. Na przykład u świnki morskiej i szczura tworzy ona parzysty płat pod skórą w okolicy łopatek, a także częściowo otacza szyję. Natomiast u jeża pasma brunatnej tkanki tłuszczowej znajdują się głębiej pomiędzy mięśniami tułowia. W ciele noworodków ludzkich brunatna tkanka tłuszczowa występuje wokół szyji, pod mostkiem, pomiędzy łopatkami i wzdłuż kręgosłupa (10).

Niezależnie od położenia anatomicznego brunatna tkanka tłuszczowa jest bogato unerwiona i unaczyniona. Produkowane przez nią ciepło sprawia, że temperatura krwi opuszczającej tę tkankę może być o kilka stopni wyższa niż temperatura krwi dopływającej. Przypuszcza się, że anatomiczne usytuowanie tkanki sprzyja podgrzewaniu krwi dopływającej do tak ważnych narządów jak mózg.

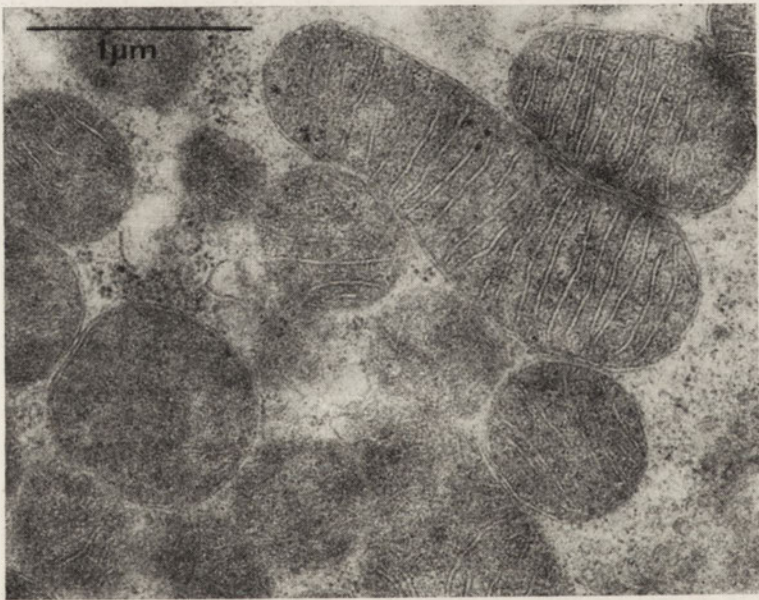
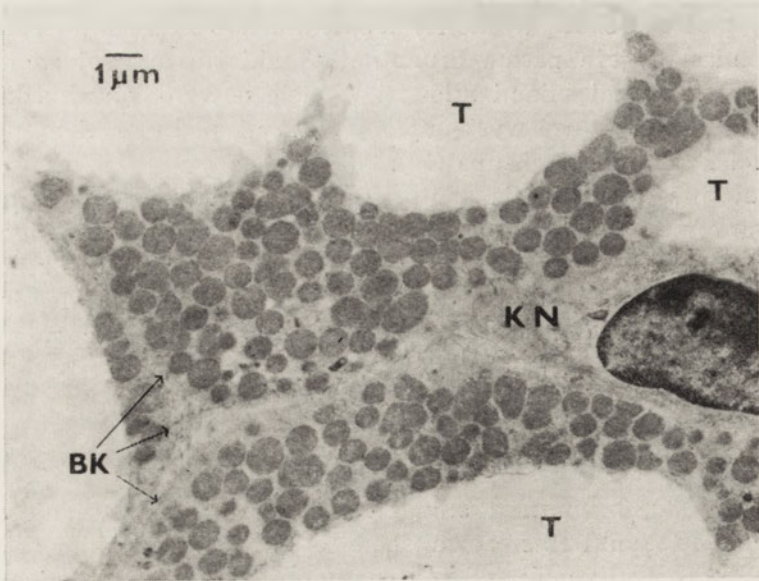
III. Budowa histologiczna i cytologiczna

Histologicznie brunatna tkanka tłuszczowa różni się zasadniczo od tak zwanej białej tkanki tłuszczowej, będącej przede wszystkim tkanką zapasową. W typowej komórce tkanki brunatnej jądro jest okrągłe i usytuowane w środku komórki. Cytoplazma zaś jest ściśle upakowana mitochondriami i zawiera liczne krople tłuszczowe (Ryc. 1 A). Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej charakteryzują się dobrze rozwiniętym układem grzebieni mitochondrialnych (Ryc. 1 B) i często występują w bliskim kontakcie z kroplami tłuszczowymi (11). Brunatne zabarwienie tkanki pochodzi przede wszystkim od cytochromów zawartych w licznych mitochondriach.

Adaptacja zwierzęcia do niskiej temperatury powoduje zazwyczaj zmiany w ultrastrukturze mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej, przejawiające się głównie zwiększeniem ilości grzebieni (12). Podobne zmiany zaobserwowano (13) w brunatnej tkance płodów na krótko przed urodzeniem (Ryc. 2).

IV. Fizjologiczne znaczenie brunatnej tkanki tłuszczowej

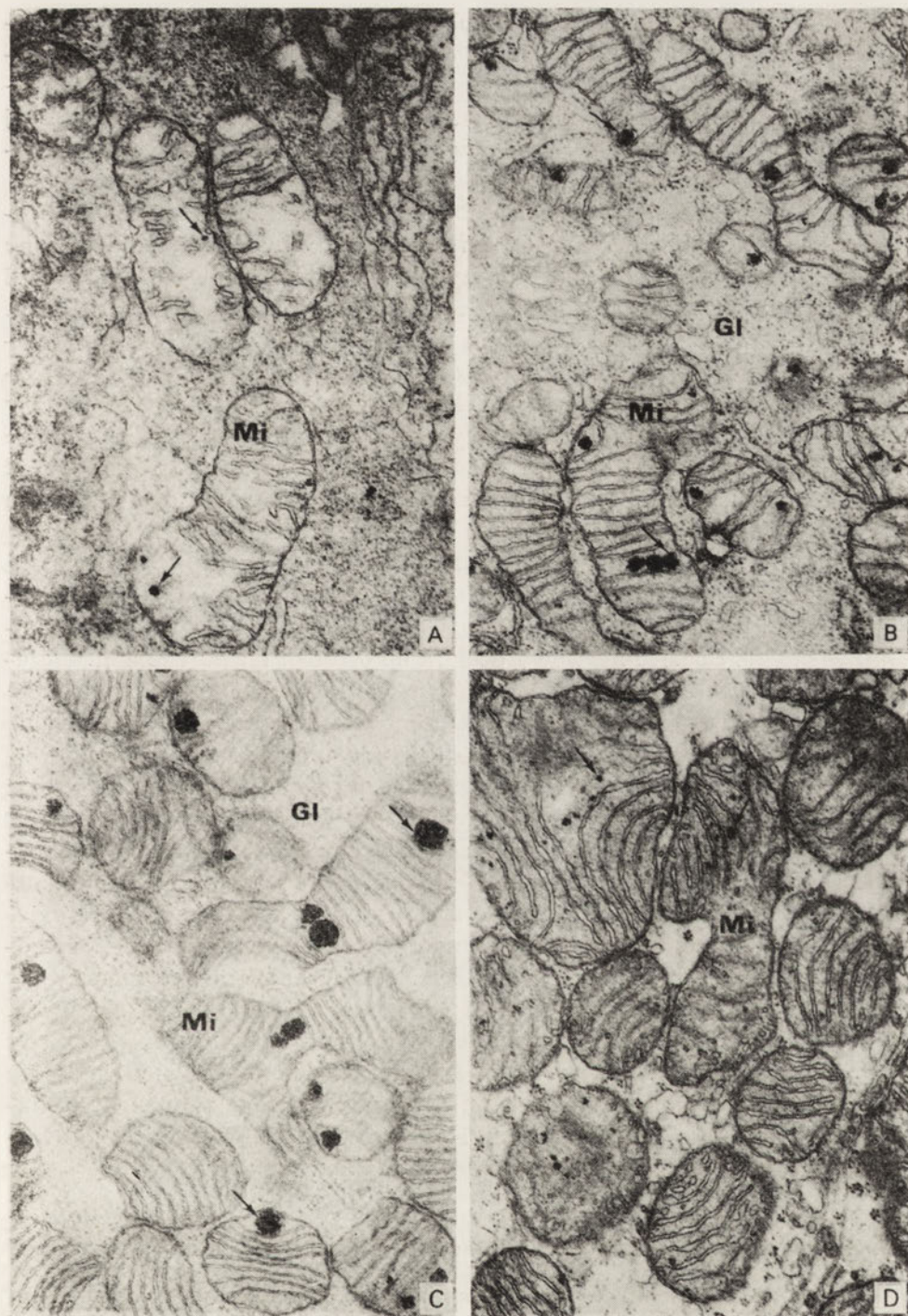
Jak już wspomniano we wstępie, rola brunatnej tkanki tłuszczowej polega na produkcji ciepła w celu ogrzania organizmu. Choć wiadomo, że temperatura brunatnej tkanki jest wyższa niż tkanek otaczających, jak również temperatura krwi wypływającej z tej tkanki jest wyższa niż krwi dopływającej, to jednak dokładniejsze obliczenie ilości ciepła produkowanego przez brunatną tkankę tłuszczową w warunkach fizjologicznych jest trudne. O ilości tej możemy sądzić głównie na podstawie danych pośrednich, przede wszystkim znajomości intensywności metabolizmu tej tkanki. I tak oznaczono, że zużycie tlenu przez brunatną tkankę tłuszczową nowonarodzonego królika może stanowić 70% zużycia O_2 przez całe zwierzę (14). Efektowny przykład „termoforowej” roli brunatnej



Ryc. 1. Brunatna tkanka tłuszczowa świnki morskiej.

Zdjęcie w mikroskopie elektronowym wykonane przez A. Wroniszewską.

Zdjęcie górne: Mniejsze powiększenie pokazujące znaczny fragment dwóch sąsiadujących komórek. Widoczne gęsto upakowane mitochondria, duże krople tłuszczowe (T), błona plazmatyczna (BP) oraz fragment komórki nabłonka naczynia krwionośnego (KN) z dużym jądrem. Zdjęcie dolne: Większe powiększenie ukazujące ultrastrukturę mitochondriów. Widoczne liczne, regularnie ułożone grzebienie mitochondrialne.



Ryc. 2. Brunatna tkanka tłuszczowa płodu szczura (13). A — 5 dni przed urodzeniem, B — 3 dni przed urodzeniem C — 1 dzień przed urodzeniem, D — w dniu urodzenia.

Oznaczenia: Mi — mitochondria, Gl — glikogen; strzałki wskazują „gęste ziarnistości” (ang. dense granules), zawierające głównie fosforany wapnia. Powiększenie około 25.000 razy.

tkanki tłuszczowej znajdujemy u foki grenlandzkiej, która rodzi swe potomstwo na taflach i krach lodowych przy temperaturze otoczenia nie-rzadko -30° . Tylko dobrze rozwinięta brunatna tkanka tłuszczowa, znajdująca się pod skórą nowonarodzonej foczki i otulająca niemal całe jej ciało (15), zdolna jest zapewnić przeżycie zwierzęciu poddanemu w momencie urodzenia szokowi termicznemu dochodzącemu do 70° !

Znacznie mniejszy jest udział brunatnej tkanki tłuszczowej w produkcji ciepła u zwierząt dorosłych adaptowanych do zimna. Obliczono na przykład, że u szczura przetrzymywanego w temperaturze kilku stopni powyżej zera wynosi on około 8% całej produkcji ciepła przez organizm. Natomiast znaczny udział w ogólnej produkcji ciepła zwierzęcia ma prawdopodobnie brunatna tkanka tłuszczowa u ssaków o bardzo małych rozmiarach, których straty ciepła na skutek niekorzystnej proporcji między objętością a powierzchnią ciała są wyjątkowo duże. Znajduje to odbicie w wielkości brunatnej tkanki tłuszczowej tych zwierząt. Na przykład u ryjówki aksamitnej (*Sorex araneus*), ważącej zaledwie 5 g, brunatna tkanka tłuszczowa stanowi aż około 8% ciężaru ciała (16).

Pobudzenie brunatnej tkanki tłuszczowej do wzmożonej produkcji ciepła odbywa się na drodze nerwowo-hormonalnej. Informację o obniżonej temperaturze otoczenia odbierają zakończenia nerwowe (receptory zimna) w skórze. Bodziec nerwowy dociera do ośrodka termoregulacji w części mózgu zwanej podwzgórzem (*hipotalamus*). Następuje pobudzenie układu nerwowego sympatycznego, którego zakończenia w brunatnej tkance tłuszczowej produkują noradrenalinę. Substancja ta z kolei wiąże się z adrenoreceptorami β w błonie plazmatycznej komórek brunatnej tkanki tłuszczowej i stymuluje syntezę cyklicznego AMP (1). Cykliczne AMP może, jak wiadomo, oddziaływać na metabolizm komórki, aktywując rozmaite szlaki przemiany materii. W komórce brunatnej tkanki tłuszczowej rola cAMP polega przede wszystkim na aktywacji lipaz, które działają na trójglicerydy, będące głównym składnikiem kropelek tłuszczowych znajdujących się w komórce (Ryc. 1 A). Uwalnianie tą drogą kwasy tłuszczowe są nie tylko substratem oddechowym w komórce, ale także, o czym obszerniej będzie mowa dalej, regulują metabolizm energetyczny komórki, przełączając go z syntezy ATP na produkcję ciepła. Uwalnianie kwasów tłuszczowych pod wpływem stresu wywołanego zimnem jest charakterystyczne dla brunatnej tkanki tłuszczowej (1, 8), natomiast nie występuje w białej tkance tłuszczowej.

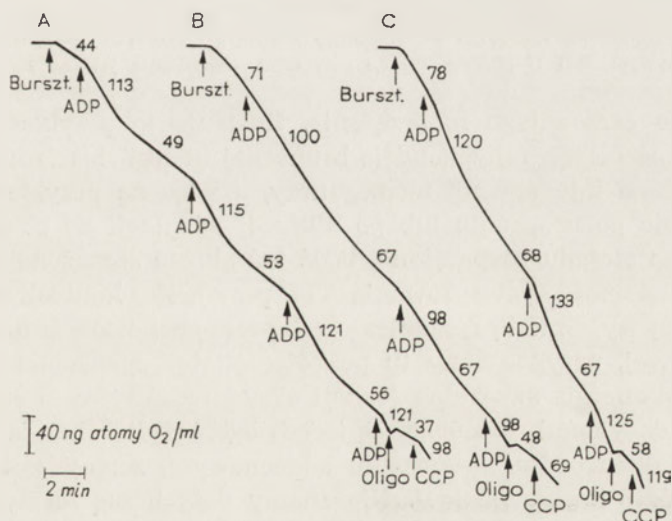
V. Biochemiczne właściwości mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej

Poznanie biochemicznych mechanizmów termogenezy w brunatnej tkance tłuszczowej i częściowe przynajmniej wyjaśnienie związanych z tym przemian energetycznych stało się możliwe w dużej mierze dzięki badaniom nad izolowanymi mitochondriami tej tkanki.

Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej są niezwykle bogate w enzymy łańcucha oddechowego (17—19). Pod względem zawartości cytochromów dorównują one mitochondriom serca, znanym z intensywnej przemiany oddechowej. Zawierają ponadto pełen zestaw enzymów umożliwiających aktywację i utlenianie kwasów tłuszczowych, które w tych mitochondriach są głównym substratem oddechowym (20). Charakterystyczna jest również obecność bardzo aktywnej flawinowej dehydrogenazy glicerofosforanu (21).

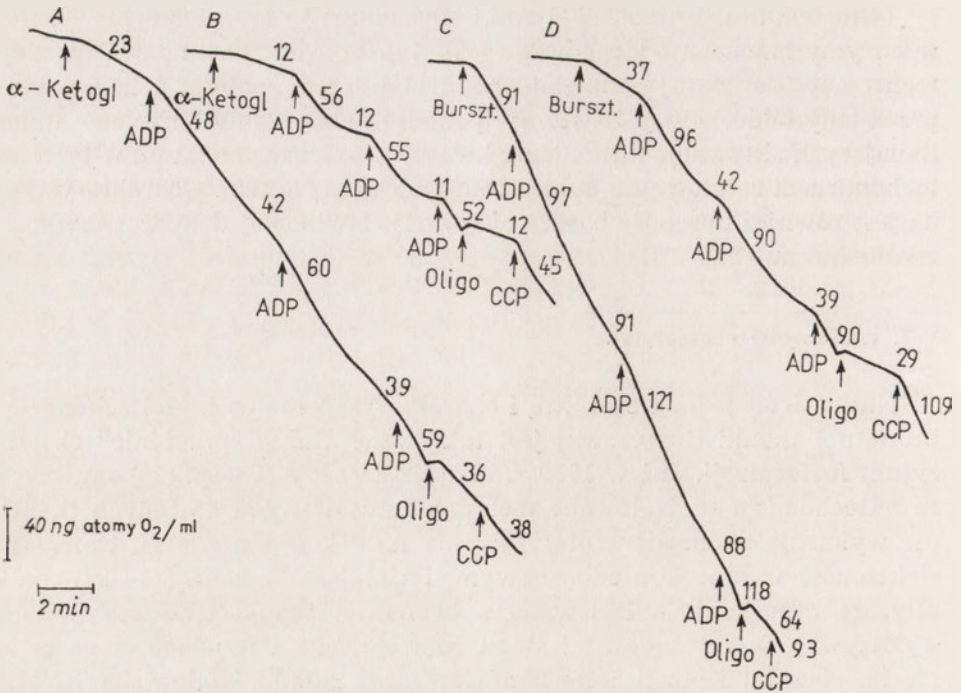
V-1. Właściwości energetyczne

Najbardziej jednak osobiłą i charakterystyczną cechą mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej jest tak zwane „luźne sprzężenie” oksydacyjnej fosforylacji. Już w 1959 r. Lepkovsky i wsp. (22) zauważyli, że mitochondria te, izolowane metodami stosowanymi do innych tkanek, nie wykazują zdolności syntetyzowania ATP kosztem energii transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. Późniejsze badania (23—27) ujawniły, że mitochondria izolowane z brunatnej tkanki tłuszczowej mogą wykazywać, w zależności od stanu rozwojowego i fizjologicznego zwierzęcia, sposobu izolacji mitochondriów oraz składu środowiska inkubacyjnego, rozmaity stopień sprzężenia energetycznego: od ścisłego sprzę-



Ryc. 3. Różnice w stopniu sprzężenia energetycznego mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej szczura w zależności od stanu rozwojowego zwierzęcia (66).

Krzywe przedstawiają polarograficzny zapis zużycia tlenu przez mitochondria. A — Mitochondria tkanki płodowej, B — 14 dni po urodzeniu, C — 4 tygodnie po urodzeniu, przez ostatnie 7 dni zwierzęta trzymane w temp. 36°. Oznaczenia (także dla Ryc. 4): a-Ketogl — a-ketoglutaran, Burszt — bursztynian, Oligo — oligomycyna, CCP — karbonylocyjanek chlorofenylohydrazonu (substancja rozprzegająca oksydacyjną fosforylację). Liczby przy krzywych wyrażają zużycie tlenu w ng atomach na minutę.



Ryc. 4. Wpływ GTP na sprzężenie mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej jeża (66).

Srodowisko inkubacyjne zawierało 2% albuminy surowiczej, pH = 6,8. Ponadto w przypadku krzywych B i D obecny był 0,5 mM GTP. Oznaczenia jak na Ryc. 3.

żenia aż do całkowitego rozprężenia. Ilustrują to przykładowo ryciny 3 i 4. Ogólnie biorąc, mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej ze zwierząt w okresie intensywnej termogenezy, a więc na przykład w pierwszym okresie po urodzeniu lub po dłuższej adaptacji do zimna, są bądź w znacznym stopniu rozprężone, bądź też „luźno sprzężone”, to znaczy, zachowują zdolność syntetyzowania ATP przy braku kontroli oddechowej.

By lepiej wyjaśnić tę zasadniczą cechę mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej, przypomnimy tu pokrótce istotę „sprężenia energetycznego”. Otóż energia swobodna reakcji oksydoredukcyjnych zachodzących pomiędzy enzymami łańcucha oddechowego, czyli energia swobodna transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, zostaje zmagazynowana w błonie mitochondrialnej. Nie znamy dotychczas formy, w jakiej energia ta jest pierwotnie akumulowana. Istnieją na ten temat trzy hipotezy (28). Hipoteza „chemicznego sprzężenia” zakłada tworzenie się bliżej nieokreślonych wysokoenergetycznych połączeń chemicznych (29). Natomiast teoria „chemiosmotyczna” przyjmuje, że pierwotną formą magazynowania energii utleniania jest tworzenie gradientu elektrochemicznego po obu stronach błony mitochondrialnej, w szczególności gradientu jonów H⁺ (30, 31). Wreszcie w myśl teorii konformacyjnej energia trans-

portu elektronów zostaje zmagazynowana w wyniku zmian konformacyjnych pewnych makrocząsteczek błony mitochondrialnej (32). Obszerniejsze dyskusowanie argumentów za i przeciw każdej z tych hipotez przekraczałoby ramy niniejszego artykułu. Podkreślimy jedynie, że niezależnie od swej natury wysokoenergetyczny stan błony mitochondrialnej jest źródłem energii dla syntezy ATP. Kompleks enzymatyczny biorący bezpośrednio udział w tej syntezie, czyli tak zwany czynnik F_1 Rackera (33), wykazujący również po wyizolowaniu aktywność ATP-azy (34), znajduje się po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej (28, 34, 35). Całość przekształceń energetycznych, w których energia transportu elektronów w łańcuchu oddechowym daje wysokoenergetyczny stan błony mitochondrialnej, ten zaś z kolei zostaje wykorzystany do syntezy ATP, nazywamy sprzężeniem energetycznym (28). W tak zwanych „ściśle sprzężonych” mitochondriach zapotrzebowanie na ATP reguluje intensywność oddychania. Innymi słowy, substraty oddechowe mogą się o tyle tylko utleniać, o ile mitochondria dysponują ADP i fosforanem, niezbędnymi do syntezy ATP (36). W ściśle sprzężonych mitochondriach, a do takich należą prawdopodobnie mitochondria wszystkich tkanek za wyjątkiem brunatnej tkanki tłuszczowej, energia swobodna utleniania ulega w znacznym stopniu zmagazynowaniu w postaci energii tworzenia ATP, a tylko mała jej część rozprasza się w postaci ciepła.

Operując izolowanymi mitochondriami możemy przy pomocy czynników chemicznych „rozładować” wysokoenergetyczny stan błony mitochondrialnej. Jest to tak zwane „rozprężenie”. Najlepiej poznanymi „rozprężaczami” są chlorowco- i nitro-pochodne fenolu, na przykład często stosowany w badaniach bioenergetycznych 2,4-dwunitrofenol. Działanie tych związków polega na zwiększaniu przepuszczalności błony mitochondrialnej wobec protonów. Znoszą one zatem gradient stężeń jonów H^+ , który zawsze towarzyszy wysokoenergetycznemu stanowi błony mitochondrialnej (28, 30). Pewne działanie rozprężające przejawiają również długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (37—41), prawdopodobnie także dzięki zwiększaniu przepuszczalności błony mitochondrialnej wobec protonów i innych kationów jednowartościowych (42, 43). Uzasadnione wydaje się więc przypuszczenie, że kwasy tłuszczowe mogą w pewnych warunkach regulować sprzężenie energetyczne *in vivo*.

V-2. Rola kwasów tłuszczowych

Szereg danych wskazuje na to, że czynnikiem powodującym brak sprzężenia energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej są właśnie kwasy tłuszczowe. Przede wszystkim mitochondria te zawierają dość znaczne ilości niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych, wyższe niż mitochondria innych tkanek, a mianowicie od 50 (8) do 140 (44) nmoli na mg białka mitochondrialnego (patrz również Tabela 1). Wykazano (45,

46), że jednym z czynników umożliwiających uzyskanie mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej w stanie sprzężonym jest obecność albuminy surowiczej, i to zarówno w czasie izolacji mitochondriów jak i w środowisku inkubacyjnym. To działanie albuminy, znanej z tego, że silnie wiąże kwasy tłuszczowe, było zresztą jedną z pierwszych przesłanek, że kwasy tłuszczowe są tym czynnikiem, który warunkuje całkowite rozprężenie lub też luźne sprzężenie mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej (27).

Tabela 1

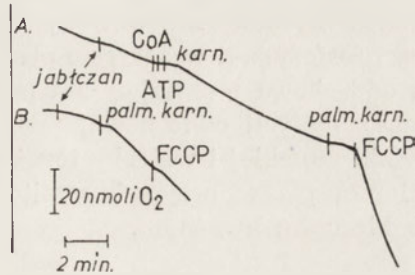
Zawartość niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych i ich tioestrów z koenzymem A (acylo-CoA) w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej (8).

stan zwierząt	niezestryfikowane kwasy tłuszczowe	acylo-CoA
	(nmole/mg białka)	
hodowane w temp. 21°	42	2,8
adaptowane do temp. 6°	59	4,9

Innym skutecznym sposobem usunięcia kwasów tłuszczowych obecnych w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej jest ich utlenienie przez same mitochondria. Możliwe jest to po dodaniu do środowiska inkubacyjnego karnityny (44). Enzym aktywujący długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (syntetaza acylo-CoA) znajduje się w większości tkanek głównie w endoplazmatycznym retikulum i w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (47). W brunatnej tkance tłuszczowej syntetaza acylo-CoA występuje głównie w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (48, 49). Wiadomo jednak, że wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna wobec acylo-CoA. Przeniesienie zaktywowanych kwasów tłuszczowych do wnętrza mitochondrionu, gdzie mogą być utleniane, wymaga przeto uprzedniego przekształcenia acylo-CoA w acylo-karnitynę (50—52), która łatwo przenika przez błonę wewnętrzną i po jej wewnętrznej stronie odtworza acylo-CoA. Tym tłumaczy się stymulujące działanie dodanej karnityny na utlenianie endogennych kwasów tłuszczowych w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej zaobserwowane przez Drahotę i współpracowników (20, 44). Należy przy tym zaznaczyć, że maksymalną szybkość utleniania uzyskuje się dopiero w obecności ATP i koenzymu A, potrzebnych do aktywacji kwasów tłuszczowych na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, i jableczanu niezbędnego do zainicjowania cyklu Krebsa. Zaobserwowano, że po takim traktowaniu mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej stają się sprzężone i wykazują kontrolę oddechową (47, 53, 54) (Ryc. 5).

Na rozprzegające działanie kwasów tłuszczowych zwrócono uwagę już 20 lat temu (37—40, przegląd piśmiennictwa patrz 41 i 43). Wykazano

również, że zarówno niezestryfikowane kwasy tłuszczowe (41, 55) jak i ich tioestry z koenzymem A (56—60) są inhibitorami transportu nukleotydów adeninowych (ADP i ATP) przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Nowsze badania wskazują ponadto na znaczne zwiększanie przez nie-



Ryc. 5. Wpływ preinkubacji z karnityną na kontrolę oddechową mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej adaptowanej do temperatury otoczenia 6° (79).

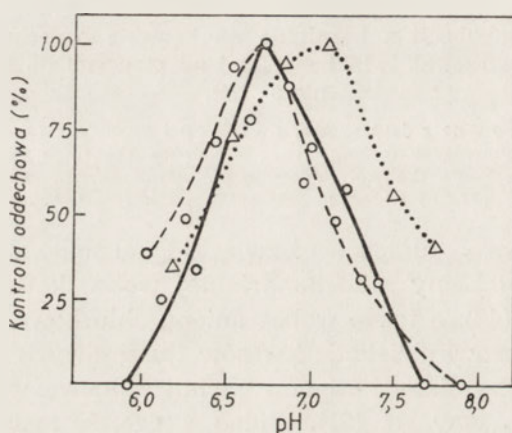
A — Mitochondria inkubowane z jabłczanem, CoA, ATP i karnityną (karn.). Substratem oddechowym była palmitylokarnityna (palm. karn.). B — Próba kontrolna (bez CoA, ATP i karnityny). Stymulacja oddychania (kontrola oddechu) pod wpływem substancji rozprzegającej (FCCP) widoczna jest tylko na krzywej A.

zestryfikowane kwasy tłuszczowe i związki typu acylo-CoA przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej wobec kationów metali jednowartościowych (42), a także wobec anionu chlorkowego (43). Postuluje się również jonoforowe działanie kwasów tłuszczowych w sensie umożliwiania przez nie wymiany kationów metali jednowartościowych, przede wszystkim K^+ , na jony H^+ (61). Widać z tego, że mechanizm działania kwasów tłuszczowych i ich tioestrów z koenzymem A na metabolizm energetyczny mitochondriów jest znacznie bardziej złożony niż mechanizm działania typowych substancji rozprzegających. Prawdopodobnie typowe działanie rozprzegające w sensie znoszenia transmembranowego potencjału elektrochemicznego mają dopiero wysokie, niefizjologiczne, stężenia kwasów tłuszczowych. Natomiast w niskich stężeniach kwasy tłuszczowe i acylo-CoA regulują stan energetyczny mitochondriów w bardziej subtelny sposób, głównie na drodze przemieszczania kationów i hamowania wymiany ATP i ADP między wnętrzem mitochondrionu a środowiskiem cytoplazmatycznym (43). O roli kwasów tłuszczowych i acylo-CoA w metabolizmie energetycznym i termogenezie brunatnej tkanki tłuszczowej będzie jeszcze mowa w dalszej części artykułu.

V-3. Wpływ pH

Na stan energetyczny izolowanych mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej duży wpływ ma pH środowiska inkubacyjnego. Zaobserwowano, że nawet w nieobecności innych czynników sprzęgających, jak albumina surowicza, karnityna lub nukleotydy purynowe (o których mowa

będzie dalej), można w niektórych przypadkach uzyskać syntezę ATP i kontrolę oddechową przez obniżenie pH środowiska inkubacyjnego. Optymalnym stężeniem jonów wodorowych dla uzyskania wydajnej fosforylacji przy utlenianiu pirogronianu okazało się pH 5,6 (46), natomiast najwyższą kontrolę oddechową uzyskiwano przy pH 6,8 (62). Warto przypomnieć, że w przypadku mitochondriów wątroby nie obserwowano większych zmian wydajności fosforylacji w zakresie pH od 6,0 do 8,0 (63, 64), podczas gdy kontrola oddechowa jest najwyższa przy pH 7,1 (65). Rycina 6 pokazuje zależność kontroli oddechowej mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej i wątroby tegoż zwierzęcia. Widoczne jest przesunięcie optimum pH w przypadku mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej w kierunku kwaśnym.



Ryc. 6. Zależność kontroli oddechowej od pH środowiska (65).

○—○— Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej adaptowanej do zimna,
 ○— — ○— mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej hodowanej w temperaturze około 20°, △.....△— mitochondria wątroby świnki morskiej. Za 100% kontroli oddechowej przyjęto wartość maksymalną dla każdej z krzywych, wynoszącą odpowiednio 2,2, 4,5 i 15,0.

W obecnym stanie badań trudno osądzić, czy zależność stopnia sprzężenia mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej od pH może mieć znaczenie regulacyjne w termogenezie, czy też jest tylko zjawiskiem obserwowanym *in vitro*. Nie jest również zrozumiałym sam mechanizm sprzęgającego działania kwaśnego środowiska. Być może, chodzi tu o cofnięcie dysocjacji grup fosforanowych fosfolipidów błony mitochondrialnej lub związanych z błoną kwasów tłuszczowych albo ich estrów z CoA.

V-4. Wpływ nukleotydów purynowych

Sprzężenie mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej można wywołać również działaniem niskich stężeń dwu- i trójfosfonukleotydów purynowych (45, 66, 67). Obrazuje to rycina 4. Mitochondria brunatnej tkanki

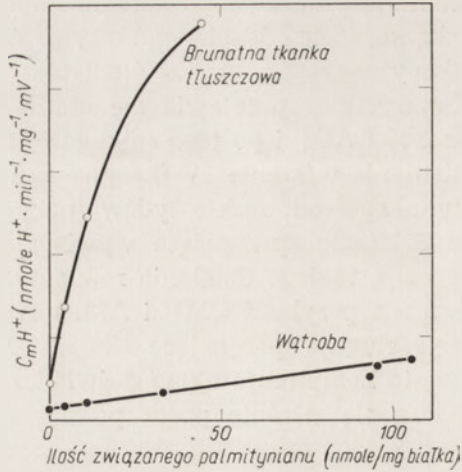
tłuszczowej jeża, utleniające zarówno α -ketoglutaran jak i bursztynian, wykazują bardzo niską kontrolę oddechową (krzywe A i C). Dodatek GDP do środowiska inkubacyjnego sprawia, że kontrola oddechowa znacznie wzrasta, co przede wszystkim przejawia się obniżeniem szybkości zużycia tlenu w nieobecności ADP i po jego całkowitej fosforylacji do ATP, czyli obniżeniem utleniania w stanie IV (krzywe B i D).

Najskuteczniejszym spośród nukleotydów purynowych okazał się GDP. Nieco słabsze działanie sprzęgające wywierają GTP i ATP oraz ADP. Natomiast nie mają takiego działania nukleotydy purynowe z jedną grupą fosforanową (na przykład GMP i AMP) oraz nukleotydy pirymidynowe. Na uwagę zasługuje sprzęgające działanie ATP, a także — choć słabsze — ADP, co często komplikuje układ doświadczalny, ponieważ kontrolę oddechową odczuwa się właśnie przez pomiar zużycia tlenu przed i po dodaniu ADP.

Jest godne uwagi, że sprzęgające działanie ATP i ADP nie ulega zniesieniu w obecności oligomycyny, która — jak wiadomo — hamuje fosforylację ADP do ATP, jak również przeciwdziała energizacji błony mitochondrialnej przez ATP. Podobnie atraktylozyd, który hamuje transport nukleotydów adeninowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, nie znosi sprzęgającego działania ATP. Dowodzi to, że nukleotydy purynowe wywierają działanie sprzęgające nie wnikając do wnętrza mitochondrionu lecz oddziałując bądź na błonę zewnętrzną, bądź też na zewnętrzną powierzchnię błony wewnętrznej (68, 69).

Badania ostatnich lat przyniosły znaczny postęp w zrozumieniu mechanizmu działania nukleotydów purynowych jak i roli kwasów tłuszczowych i ich tioestrów z koenzymem A w regulacji sprzężenia energetycznego mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej. Po pierwsze, wykazano, że mitochondria brunatnej tkanki są lepiej niż mitochondria innych tkanek przepuszczalne zarówno wobec protonów jak i jonu Cl^- (70). Przepuszczalność wobec protonów wydaje się być konsekwencją obecności w mitochondriach niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych lub acylo-CoA, bowiem usunięcie kwasów tłuszczowych i ich tioestrów z koenzymem A przy pomocy albuminy surowiczej powoduje spadek przepuszczalności (70, 71). Wiąże się to z postulowanym jonoforowym działaniem kwasów tłuszczowych obserwowanym i w przypadku mitochondriów z innych tkanek (42, 61), o czym pisaliśmy już wcześniej. Heaton i Nicholls (71) wykazali jednak, że mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej są znacznie bardziej wrażliwe na działanie kwasów tłuszczowych niż na przykład mitochondria wątroby. Przewodnictwo wobec protonów mitochondriów brunatnej tkanki chomika wzrasta wielokrotnie silniej w porównaniu z przewodnictwem mitochondriów wątroby tego samego zwierzęcia pod wpływem takiej samej ilości związanego z mitochondriami kwasu palmitynowego (71) (Ryc. 7).

Związek podwyższonej przepuszczalności błony mitochondriów bru-

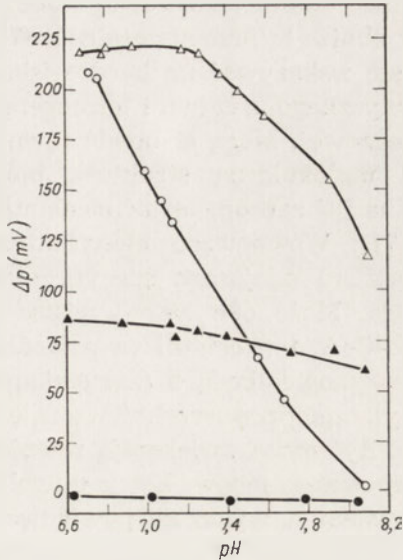


Ryc. 7. Wpływ palmitynianu na przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej wobec protonów (71).

Na osi odciętych zaznaczono ilość palmitynianu związanego z mitochondriami, na osi rzędnych — przepuszczalność wobec protonów. ●—●— Mitochondria wątroby, ○—○— mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej adaptowanej do niskiej temperatury.

natnej tkanki tłuszczowej wobec jonu chlorkowego z obecnością w nich niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych jest mniej jasny. Wprawdzie wykazano na przykładzie mitochondriów wątroby, że kwasy tłuszczowe podwyższają przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej wobec Cl^- (43), lecz traktowanie albuminą surowiczą mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej nie zmniejsza ich przepuszczalności wobec jonu chlorkowego (72). Cechująca mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej zwiększona przepuszczalność wobec protonów w połączeniu z podwyższoną przepuszczalnością wobec anionu chlorkowego jest w stanie całkowicie znieść gradient elektrochemiczny po obu stronach błony, a więc rozładować wysokoenergetyczny stan błony. Nie może w takich warunkach dojść do syntezy ATP, a energia utleniania wykorzystana zostaje na bezużyteczny transport jonów i w rezultacie rozprasza się w postaci ciepła.

Nicholls (70, 72, 73) wykazał, że nukleotydy purynowe, w szczególności GDP, obniżają przepuszczalność błony wewnętrznej mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej wobec jonu chlorkowego i, co być może jest jeszcze bardziej istotne dla sprzężenia energetycznego, wobec protonów. W rezultacie, oddychające mitochondria mogą w obecności GDP utrzymać gradient elektrochemiczny po obu stronach błony. Ilustruje to rycina 8. Na rysunku tym gradient elektrochemiczny, a więc stan energizacji błony mitochondrialnej, wyrażony jest przy pomocy tak zwanej siły protonomotorycznej (Δp). Jest to wielkość, podawana w jednostkach napięcia (miliwoltach), zależna zarówno od elektryczne-



Ryc. 8. Wpływ pH, albuminy surowiczej i GDP na siłę protonomotoryczną (Δp) mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej chomika syryjskiego, z glicerofosforem jako substratem oddechowym (73).

●—●— Bez dodatków, ▲—▲— z albuminą surowiczą 5 mg/ml, ○—○— z 1 mM GDP, △—△— z 1 mM GDP i albuminą surowiczą 5 mg/ml.

go potencjału transmembranowego (ΔE) jak i od gradientu pH (ΔpH) po obu stronach błony, zgodnie z równaniem (74):

$$\Delta p = \Delta E - 59\Delta pH$$

Jak widać na rycinie 8, dodanie albuminy surowiczej do oddychających mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej pozwala na uzyskanie siły protonomotorycznej około 60–90 mV (w zależności od pH środowiska). Dodanie 1 mM GDP również umożliwia mitochondriom wytworzenie siły protonomotorycznej. Jednakże w tym przypadku jest to wyraźnie zależne od pH środowiska. Dopiero łączne dodanie albuminy i GDP pozwala na osiągnięcie maksymalnej wartości siły protonomotorycznej w dość szerokim zakresie pH.

Doświadczenie pokazane na rycinie 8 wskazuje na współdziałanie albuminy surowiczej i GDP. Sugeruje to, że kwasy tłuszczowe związane z błoną mitochondrialną i dodany GDP działają antagonistycznie na przepuszczalność błony mitochondrialnej wobec jonów. Potwierdziły to ostatnie badania Heaton i Nicholls (71). Wykazano również (75, 76), że nukleotydy purynowe, w szczególności GDP, wiążą się z zewnętrzną powierzchnią wewnętrzną błony mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej. Okazało się, że palmitylo-CoA i GDP wywierają antagonistyczny wpływ na pasywną przepuszczalność wewnętrzną błony

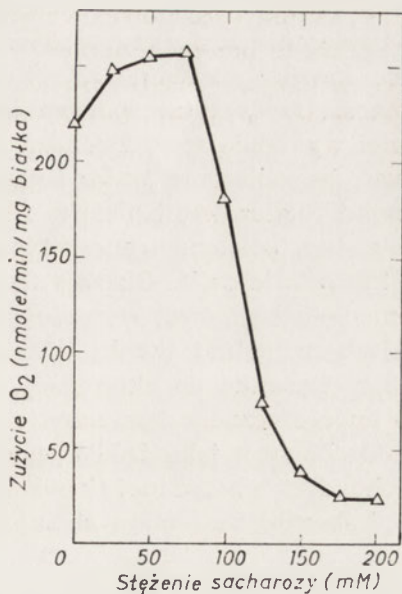
mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej wobec jonu Cl^- : palmitylo-CoA zwiększa, a GDP obniża tę przepuszczalność (77).

Badania te zdają się wskazywać na bardzo istotny mechanizm regulacji sprzężenia energetycznego, a zatem i termogenezy, w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej. Mogą stanowić również punkt wyjścia dla dalszych badań nad molekularną strukturą błony mitochondrialnej. W chwili obecnej można już zaproponować następujący, na razie spekulatywny, mechanizm (77): Wewnętrzna błona mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej zawiera miejsca o specyficznym powinowactwie do pierścienia purynowego. Może ona zatem wiązać zarówno nukleotydy purynowe, jak i acylo-CoA, ten ostatni za pośrednictwem reszty adeninowej. Nukleotydy purynowe, będące cząsteczkami o wysokiej hydrofilności, wiążą się wyłącznie powierzchniowo, nie zaburzając fosfolipidowej warstwy błony. Być może, zwiększają również w jakiś sposób nieprzepuszczalność błony wobec jonów. Estry długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z koenzymem A wykazują powinowactwo do tych samych miejsc wiążących. W tym jednak przypadku cząsteczka zawiera hydrofobowy łańcuch węglowodorowy kwasu tłuszczowego, który zagłębia się w lipidową warstwę błony i zaburza jej strukturę. W wyniku tego zwiększa się przepuszczalność wobec jonów (41, 43).

V-5. Przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej

Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej izolowane i zawieszane w 250 mM roztworze sacharozy wykazują w mikroskopie elektronowym strukturę wysoce skondensowaną (54). Potwierdzają to pomiary objętości matriks mitochondrialnej, wykonane przy zastosowaniu sacharozy piętnowanej przy pomocy ^{14}C i trytowanej wody. Otrzymane wartości poniżej 0,4 $\mu\text{l}/\text{mg}$ białka (78) są dwukrotnie niższe niż w przypadku na przykład mitochondriów wątroby. Wiąże się to z bardzo małą zawartością jonów w matriks mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej. Zawartość K^+ wynosi tam zaledwie 10% zawartości tego jonu w mitochondriach wątroby (20). Również zawartość jonu fosforanowego jest w przybliżeniu dwukrotnie niższa (79). Jest to wynikiem zwiększonej biernej przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej wobec kationów metali jednowartościowych (80), jonu chlorkowego (70) i fosforanu (79) spowodowanej, jak się wydaje, obecnością związanych z błoną długołańcuchowych niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych i ich tioestrów z koenzymem A. Mitochondria te nie są zatem zdolne do utrzymania własnego środowiska osmotycznego (78).

Zmiany objętości matriks a także konfiguracji wewnętrznej błony mitochondrialnej, towarzyszące zmianom zewnętrznego ciśnienia osmotycznego, są prawdopodobnie podłożem zmian szybkości transportu metabolitów przez błonę mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej.



Ryc. 9. Wpływ ciśnienia osmotycznego na utlenianie palmitylokarnityny przez mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej (78).

Krzywa polarograficzna. Ciśnienie osmotyczne regulowano zmieniając stężenie sacharozy w środowisku inkubacyjnym.

Stwierdzono między innymi, że transport nukleotydów adeninowych maleje wraz ze wzrostem osmolarności środowiska (81). Upośledzeniu ulega również aktywność oddechowa mitochondriów (78). Rycina 9 pokazuje, jak utlenianie palmitylokarnityny przez mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej maleje wraz ze wzrostem stężenia sacharozy w środowisku inkubacyjnym. Hamujący wpływ wysokiego ciśnienia osmotycznego na aktywność oddechową zaobserwowano również w przypadku mitochondriów wątroby (82), jednakże tu hamująco działała sacharoza dopiero w stężeniu rzędu 0,5 M. Potwierdza to fakt, że wewnętrzne ciśnienie osmotyczne izolowanych mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej jest bardzo niskie.

Jak już zaznaczyliśmy wcześniej, GDP i inne nukleotydy purynowe zmniejszają przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej wobec protonów i jonu chlorkowego (70, 72, 73, 77). Zmniejszają również bierną przepuszczalność błony mitochondrialnej wobec jonu fosforanowego (79).

V-6. Procesy transportu w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej

Wewnętrzna błona mitochondrialna wyposażona jest w szereg układów transportujących jony i metabolity (83). Pobieranie kationów, na przykład Ca^{++} , zachodzi na skutek działania potencjału elektrochemicz-

nego (84), a więc skorelowane jest z wysokoenergetycznym stanem błony mitochondrialnej. Pobieranie fosforanu zachodzi na wymianę z jonami OH^- (85), a więc również pośrednio zależy od stanu energetycznego (86). Podobnie ma się rzecz z transportem jonów kwasów karboksylowych, które z kolei wymieniają się z jonami fosforanowymi. Można było zatem oczekiwać, że pobieranie jonów i metabolitów przez mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej będzie w znacznym stopniu upośledzone w związku z niskim poziomem energetycznym tych mitochondriów. Badania w pełni to potwierdziły. Okazało się również, że czynniki, które przywracają kontrolę oddechową, stymulują również akumulację wapnia w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej (69). Podobny wpływ zaobserwowano w stosunku do akumulacji jonów K^+ (80), przy czym prócz sprzężenia energetycznego konieczna okazała się tu również obecność substratów oddechowych jako źródła energii. Również akumulacja fosforanu w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej wymagała zarówno sprzężenia jak i obecności utleniających substratów (79). Ilustruje to Tabela 2.

Tabela 2

Wpływ czynników sprzęgających, substratów oddechowych i inhibitorów oddychania na akumulację fosforanu w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej adaptowanej do zimna. Liczby wyrażają zawartość fosforanu nieorganicznego w mitochondriach oznaczonego przez wymianę z [^{32}P]fosforanem w środowisku inkubacyjnym (79).

Dodatki do środowiska inkubacyjnego	Mitochondrialny P (nmole/mg białka)
Bez dodatków	0,5
Bursztynian + GDP	2,5
Albumina surowicza	0,7
Albumina surowicza + bursztynian	5,9
Albumina surowicza + bursztynian + antymycyna	1,8
Albumina surowicza + GDP	2,9
Albumina surowicza + GDP + bursztynian	21,7
Albumina surowicza + GDP + bursztynian + antymycyna	3,1

Niezwykle istotny dla biologicznej funkcji mitochondriów jest transport ATP i ADP przez błonę mitochondrialną. Transport ten zachodzi przy udziale tak zwanej translokazy nukleotydów adeninowych (87, 88). Stwierdzono, że w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej transport nukleotydów adeninowych jest znacznie wolniejszy niż w mitochondriach innych tkanek (89). Czynniki sprzęgające, jak niskie pH i nukleotydy purynowe, okazały się w tym przypadku bez wpływu; również karnityna nie zwiększała transportu nukleotydów adeninowych w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej szczura (89), choć miała pewien stymulujący wpływ na transport ADP w mitochondriach brunatnej tkan-

ki świnki morskiej (65). Natomiast znaczną stymulację uzyskiwano zawsze pod wpływem albuminy surowiczej (89), i to niezależnie od tego, czy następowało przy tym, czy też nie, sprzężenie energetyczne. Bliższe badania wykazały (89), że czynnikiem ograniczającym transport nukleotydów adeninowych w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej są tioestry długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z koenzymem A i prawdopodobnie również same niezestryfikowane kwasy tłuszczowe związane z błoną mitochondrialną. Jak już wspomnieliśmy wcześniej, długołańcuchowe acylo-CoA (56—59, 60), a także w wyższych stężeniach prawdopodobnie i niezestryfikowane kwasy tłuszczowe (41, 55), są silnymi inhibitorami translokazy nukleotydów adeninowych. Wysunięto w związku z tym przypuszczenie, że substancje te mogą w brunatnej tkance tłuszczowej regulować wymianę ATP i ADP między mitochondriami a cytoplazmą, co może mieć znaczenie w kontroli termogenezy (89). Do zagadnienia tego wrócimy jeszcze w dalszej części artykułu.

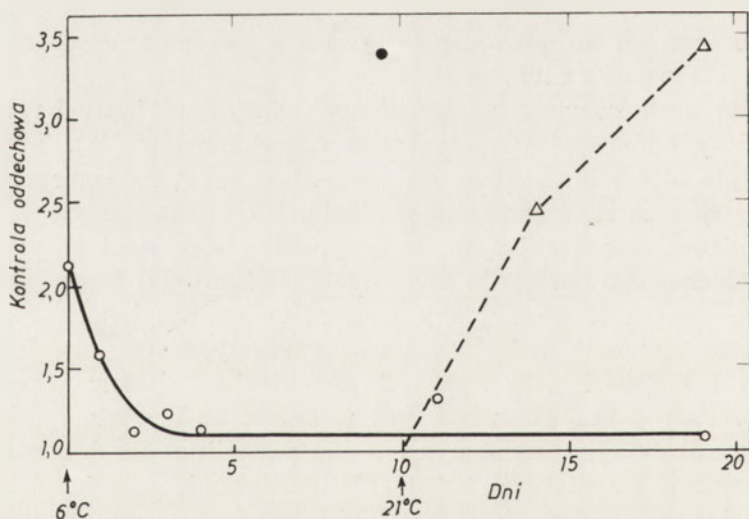
V-7. Cytochrom b jako wskaźnik stanu energetycznego mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej

Ciekawych informacji o sprzężeniu energetycznym mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej dostarczyły badania spektrofotometryczne nad cytochromem b, prowadzone przez norweskich autorów Flatmarka i Pedersena.

Stopień zredukowania poszczególnych enzymów łańcucha oddechowego zależy od stanu energetycznego mitochondriów (90). W sytuacji, gdy energia utleniania zużywa się na syntezę ATP, na transport jonów, lub też rozprasza się i zamienia w ciepło, jak to ma miejsce w obecności czynników rozprzegających, w przypadku większości enzymów łańcucha oddechowego następuje przesunięcie w kierunku formy utlenionej. Tak więc stopień oksydoredukcji wybranego ogniwa łańcucha oddechowego może stanowić wskaźnik stanu energetycznego mitochondrionu. Pedersen i Flatmark (68) wykazali, że cytochrom b jest w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej w stanie maksymalnie utlenionym i dodanie substancji rozprzegających nie powoduje już dalszych zmian. W nieobecności utleniających substratów energizację mitochondriów można wywołać przez dodanie ATP. Wykazano przy tym, że energizacja taka, mierzona stopniem redukcji cytochromu b, ulega w przypadku mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej samorzutnemu rozładowaniu około 15 razy szybciej niż w przypadku mitochondriów wątroby (68). Badania spektrofotometryczne potwierdziły zatem raz jeszcze, że mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej wykazują znaczną tendencję do rozpraszania energii zakumulowanej w wewnętrznej błonie.

VI. Biochemiczny mechanizm produkcji ciepła w brunatnej tkance tłuszczowej

Podczas adaptacji gryzoniów do niskiej temperatury otoczenia stwierdzono podwyższoną wydajność oddechową brunatnej tkanki tłuszczowej (62), co może być wynikiem rozrostu samej tkanki (91), jak również zwiększonej zawartości w niej mitochondriów. Zaobserwowano również zmiany w ultrastrukturze mitochondriów, polegające na zwiększeniu powierzchni grzebieni mitochondrialnych (12). Podobne zmiany ultrastrukturalne stwierdzono w brunatnej tkance tłuszczowej płodów na krótko przed urodzeniem (Ryc. 2). Adaptacja biochemiczna zachodząca w brunatnej tkance noworodków i zwierząt wystawionych na dłuższe działanie obniżonej temperatury otoczenia polega przede wszystkim na podwyższeniu zawartości enzymów oddechowych (92, 93). Wysuwane są przypuszczenia, że adaptacja do zimna wzmaga biogenezę mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej (1, 13, 94) i że powstające mitochondria różnią się od mitochondriów tejże tkanki u zwierząt żyjących w temperaturze normalnej. Za tym ostatnim przypuszczeniem przemawia nieco odmienny skład fosfolipidów błon mitochondriów brunatnej tkanki zwierząt adaptowanych do zimna i kontrolnych (95) oraz pojawianie się



Ryc. 10. Wpływ temperatury hodowli na kontrolę oddechową mitochondriów izolowanych z brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej (8).

Na osi odciętych zaznaczono dni od momentu przeniesienia zwierzęcia do temperatury 6°. Po 10 dniach część zwierząt (trójkąty i linia przerywana) przeniesiono do temperatury 21°, inne osobniki (kółka i linia ciągła) pozostały w temperaturze 6°. Punkt oznaczony zaciemnionym kółkiem wskazuje współczynnik kontroli oddechowej mitochondriów z dziewiątego dnia adaptacji do zimna, inkubowanych w obecności 0,5 mM GTP.

w wyniku adaptacji nowej frakcji białkowej, nie występującej u zwierząt kontrolnych (96).

Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej zwierząt żyjących w normalnych warunkach ciepłoty otoczenia i zwierząt adaptowanych do zimna różnią się stopniem sprzężenia energetycznego (66, 97). Pokazuje to rycina 10. Współczynnik kontroli oddechowej izolowanych mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej świnki morskiej hodowanej w temperaturze 21° wynosi ponad 2, lecz już po 2—3 dniach po przeniesieniu zwierzęcia do temperatury 6° spada do wartości 1. Jak już pisaliśmy, kontrolę oddechową w mitochondriach izolowanych z tak adaptowanych zwierząt można uzyskać traktując mitochondria nukleotydami purynowymi (na przykład GDP jak na Ryc. 4 i 10) lub karnityną (47, 53, 54). Przeniesienie zwierzęcia ponownie do temperatury 21° powoduje, że już po kilku dniach można uzyskać z brunatnej tkanki tłuszczowej mitochondria, które są sprzężone bez żadnego dodatkowego traktowania (Ryc. 10). Podobne różnice w stopniu sprzężenia obserwuje się również między mitochondriami brunatnej tkanki tłuszczowej płodów i noworodków. Mitochondria z tkanki płodowej wykazują kontrolę oddechową, podczas gdy mitochondria z brunatnej tkanki noworodków są rozprężone (Ryc. 3).

Brak ścisłego sprzężenia utleniania z syntezą ATP, tak charakterystyczny dla mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej w okresie wzmożonej termogenezy, umożliwia pełną zamianę energii utleniania w ciepło. Koncepcja mitochondriów rozprężonych *in vivo* tak jednak nie pasowała do ogólnie przyjętych pojęć o właściwościach i roli mitochondriów, że przez pewien czas poszukiwano innych mechanizmów mogących wytłumaczyć wysoką produkcję ciepła w brunatnej tkance tłuszczowej. Wchodziłyby tu w grę procesy intensywnie zużywające powstające w mitochondriach ATP, na przykład hydroliza ATP lub jego wykorzystanie do procesów biosyntetycznych, połączonych jednak z szybkim rozpadem powstałego w wyniku syntezy związku. Tej ostatniej możliwości poszukiwano w syntezie acylo-CoA, przy czym związek ten byłby szybko hydrolizowany lub też wykorzystywany do syntezy trójglicerydów, które z kolei ulegałyby szybkiej hydrolizie. Taki bezużyteczny cykl reakcji powodowałby szybką hydrolizę ATP i zamianę energii wiązania fosforanowego w ciepło. Okazało się jednak, że zarówno ATP-aza brunatnej tkanki tłuszczowej (24) jak i zachodząca w tej tkance synteza acylo-CoA (98) nie są wystarczająco szybkie, aby zapewnić nieograniczony dopływ ADP do mitochondriów. Tak więc rozprężenie, a ściślej mówiąc, luźne sprzężenie mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej stanowi jedyne i zarazem najprostsze rozwiązanie problemu.

Jak już pisaliśmy, niezestryfikowane kwasy tłuszczowe oraz ich estry z koenzymem A, dzięki właściwości zwiększania przepuszczalności mitochondriów wobec jonów, sprzyjają rozładowaniu wysokoenergetycznego stanu błony i mogą wywołać luźne sprzężenie. Sprawa wydaje się jednak

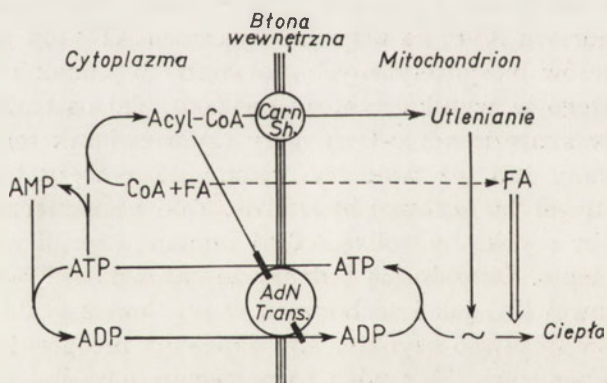
bardziej skomplikowana. Po pierwsze, zmiany w stopniu sprzężenia mitochondriów pod wpływem zimna są powolne. Pełne zniesienie kontroli oddechowej wymaga mianowicie kilku dni (Ryc. 10), podczas gdy nerwowo-hormonalny mechanizm powodujący wzmożoną lipolizę ujawnia swe działanie już w przeciągu minut. Po drugie, mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej zwierząt adaptowanych do zimna zawierają niewiele więcej niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych niż mitochondria zwierząt kontrolnych (Tabela 1). Wykazano wreszcie, że dla wywołania kontroli oddechowej wystarczy usunąć tylko część związanych z mitochondriami niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (54).

Na podstawie dotychczasowych rozważań można dojść do następujących wniosków:

1. Kwasu tłuszczowe i ich tioestry z koenzymem A stanowią nie tylko główny substrat oddechowy mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej, lecz są również odpowiedzialne za luźne sprzężenie energetyczne tych mitochondriów, umożliwiając zamianę energii utleniania w ciepło.

2. Temu rozprzegającemu działaniu kwasów tłuszczowych i acylo-CoA, polegającemu na zwiększaniu przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej wobec jonów, przeciwdziałają nukleotydy purynowe dwu- i trójfosforowe, obecne w cytoplazmie komórki. To antagonistyczne działanie kwasów tłuszczowych i ich tioestrów z koenzymem A z jednej strony a nukleotydów purynowych z drugiej umożliwia subtelną regulację stopnia sprzężenia energetycznego.

3. Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej są w szczególny sposób uczulone na działanie kwasów tłuszczowych i acylo-CoA. Uczulenie to



Ryc. 11. Hipotetyczny schemat regulacji syntezy ATP i produkcji ciepła w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej (89).

Opis w tekście. Oznaczenia: FA — niezestryfikowane kwasy tłuszczowe, Carn. Sh. — układ transacylaz karnitynowych, przenoszący zaktywowany kwas tłuszczowy przez błonę mitochondrialną, AdN Trans. — translokaza nukleotydów adeninowych; symbol \sim oznacza wysokoenergetyczny stan błony mitochondrialnej, podwójna strzałka — rozprzegające działanie kwasów tłuszczowych, gruba linia w poprzek translokazy — hamujące działanie acylo-CoA.

wzrasta w generacji mitochondriów powstającej w czasie adaptacji do niskiej temperatury otoczenia i u rozwijającego się płodu.

Autorzy niniejszego artykułu (89) zaproponowali mechanizm regulacji syntezy ATP i produkcji ciepła w komórce brunatnej tkanki tłuszczowej, opierający się na hamowaniu przez acylo-CoA transportu ATP i ADP między mitochondriami a cytoplazmą. W myśl tego mechanizmu, zobrazowanego na rycinie 11, kwasy tłuszczowe (FA), powstałe w wyniku wzmożonej lipolizy, zostają przy udziale ATP zaktywowane do acylo-CoA, przeniesione do wnętrza mitochondrionu za pośrednictwem układu transacylaz karbonylowych (*Carn. Sh.*) i utlenione. Powstały w wyniku utleniania wysokoenergetyczny stan błony (\sim) dostarcza energii potrzebnej dla fosforylacji ADP do ATP. Natomiast przy braku ADP może rozładowywać się, produkując ciepło. Gdy ilość ATP w cytoplazmie wzrasta, gromadzi się również nadmiar acylo-CoA, hamując translokazę nukleotydów adeninowych (*AdN Trans.*). Uniemożliwia to dalszą wymianę ADP i ATP między mitochondriami a cytoplazmą i sprzyja zamianie wysokoenergetycznego stanu błony w ciepło. Natomiast przy spadku poziomu cytoplazmatycznego ATP, a zatem i ilości acylo-CoA, translokaza ulega odhamowaniu i synteza ATP znów może funkcjonować. W ten sposób komórka brunatnej tkanki tłuszczowej, pobudzona przez noradrenalinę, mogłaby w subtelny sposób regulować produkcję ciepła i syntezę ATP potrzebną dla aktywacji kwasów tłuszczowych.

Jak już pisaliśmy, brunatna tkanka tłuszczowa jest prawdopodobnie jedyną tkanką, której mitochondria mogą w warunkach fizjologicznych znajdować się w stanie daleko posuniętego rozprężenia energetycznego, co jest warunkiem ważnego przystosowania biologicznego ssaków. Wysuwa się przypuszczenia, że mechanizmy regulujące sprzężenie w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej mogą mieć szersze znaczenie. Być może, są one między innymi odpowiedzialne za zmiany strukturalne zachodzące w mitochondriach mięśniowych pod wpływem stresu zimna (99). Wyrażano również przypuszczenie, że częściowe rozprężenie energetyczne może występować w różnych tkankach w niektórych stanach patologicznych, jak na przykład przy nadczynności tarczycy (100), cukrzycy (101) i przy pewnych schorzeniach mięśni (102). Podobnie, obniżenie wydajności serca pod wpływem kwasów tłuszczowych można by tłumaczyć rozprężającym działaniem tych kwasów (103). Mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej są wreszcie niezwykle dogodnym modelem pozwalającym na badanie oddziaływania kwasów tłuszczowych i acylo-CoA na właściwości energetyczne i przepuszczalność błon mitochondrialnych.

Artykuł otrzymano 18.2.1977, po rewizji autorskiej przyjęto 25.3.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Smith R. E., Horowitz B. A., (1969), *Physiol. Rev.* **49**, 330—425.
2. Himms-Hagen J., (1970), *Adv. Enzyme Regul.*, **8**, 131—151.
3. Lindberg O. (red.), (1970), *Brown Adipose Tissue*. Elsevier, New York.
4. Chaffee R. R. J., Roberts J. C., (1971), *Ann. Rev. Physiol.*, **33**, 155—202.
5. Girardier L., Seydoux J., (1971), *J. Physiol.* (Paris), **63**, 147—186.
6. Himms-Hagen J., (1972), w *Handbook of Experimental Pharmacology*, New Series, red. Eichler O., Farah A., Herken H., Welch A. D., T. XXXIII, str. 363—462. Springer Verlag, New York.
7. Janský L., (1973), *Biol. Rev.*, **48**, 85—132.
8. Flatmark T., Pedersen J. I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 53—103.
9. Nicholls D. G., (1976), *FEBS Letters*, **61**, 103—110.
10. Hull D., Hardman M. J., (1970), w *Brown Adipose Tissue*, red. Lindberg O., str. 97—115. Elsevier, New York.
11. Afzelius B. A., (1970), w *Brown Adipose Tissue*, red. Lindberg O., str. 1—31. Elsevier, New York.
12. Suter R., (1969), *J. Ultrastr. Res.* **26**, 216—241.
13. Barnard T., Lindberg O., (1969) *J. Ultrastr. Res.*, **29**, 293—310.
14. Dawkins M. J. R., Hull D., (1964), *J. Physiol.*, **172**, 216—238.
15. Grav H. J., Blix A. S., Päsche A., (1974), *Acta Physiol. Scand.*, **92**, 427—429.
16. Pucek Z., (1970), *Symp. Zool. Soc. London*, **26**, 189—207.
17. Rafael J. Klaas D., Hohorst H.-J., (1968), *Z. Physiol. Chem.*, **349**, 1711—1721.
18. Rafael J., Hüsck M., Stratmann D., Hohorst H.-J., (1970), *Z. Physiol. Chem.*, **351**, 1513—1523.
19. Pedersen J. I., Flatmark T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 219—229.
20. Drahotka Z., (1970), w *Brown Adipose Tissue*, red. Lindberg O., str. 225—244. Elsevier, New York.
21. Ohkawa K.-I., Vogt M. T., Farber E., (1969), *J. Cell Biol.*, **41**, 441—449.
22. Lepkovsky S., Wang W., Koike T., Dimick M. K., (1959), *Fed. Proc.*, **18**, 272.
23. Smith R. E., Roberts J. C., Hittelman K. J., (1966), *Science*, **154**, 653—654.
24. Lindberg O., DePierre J., Rylander E., Afzelius B. A., (1967), *J. Cell Biol.*, **34**, 293—310.
25. Pedersen J. I., Christiansen E. N., Grav H. J., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 492—500.
26. Christiansen E. N., Pedersen J. I., Grav H. J., (1969), *Nature*, **222**, 857—860.
27. Hittelman K. J., Lindberg O., (1970), w *Brown Adipose Tissue*, red. Lindberg O., str. 245—262. Elsevier, New York.
28. Ernster L., (1975), w *Enzymes, Electron Transport Systems*, red. Desnuelle P., Michelson A. M., FEBS Symposia t. 40, str. 253—276. North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, New York.
29. Slater E. C., (1972), w *Mitochondria: Biogenesis and Bioenergetics, Biomembranes: Molecular Arrangements and Transport Mechanisms*, FEBS Symposia t. 28, str. 133—146. North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, New York.

30. Mitchell P., (1966), Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Glynn Research Laboratory, Cornwall, England.
31. Mitchell P., Moyle J., (1967), w *Biochemistry of Mitochondria*, red. Slater E. C., Kaniuga Z., Wojtczak L., str. 53—74. Academic Press—P.W.N., London, New York, Warszawa.
32. Boyer P. D., (1975), *FEBS Letters*, **58**, 1—6.
33. Pullman M. E., Penefsky H. S., Datta A., Racker E., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 3322—3329.
34. Pedersen P. L., (1975), *Bioenergetics*, **6**, 243—275.
35. Wojtczak L., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 209—223.
36. Chance B., (1959), w *CIBA Foundation Symp.: Regulation of Cell Metabolism*, red. Wolstenholm G. E. W., O'Connor C. M., str. 91—129. Churchill Ltd., London.
37. Pressman B. C., Lardy H. A., (1955), *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 482—487.
38. Pressman B. C., Lardy H. A., (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 458—466.
39. Lehninger A. L., Remmert L. F., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2459—2464.
40. Borst P., Loos J. A., Christ E. J., Slater E. C., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 509—518.
41. Wojtczak L., Bogucka K., Sarzała M. G., Załuska H., (1969), w *Mitochondria: Structure and Function*, red. Ernster L., Drahota Z., str. 79—92. Academic Press, London.
42. Wojtczak L., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 25—30.
43. Wojtczak L., (1976), *J. Bioenergetics Biomembranes*, **8**, 293—311.
44. Drahota Z., Honová E., Hahn P., (1968), *Experientia*, **24**, 431—432.
45. Hohorst H.-J., Rafael J., (1968), *Z. Physiol. Chem.*, **349**, 268—270.
46. Grav H. J., Pedersen J. I., Christiansen E. N., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 11—23.
47. Yates D. W., Shepherd D., Garland P. B., (1966), *Nature*, **209**, 1213—1215.
48. Drahota Z., Alexandre A., Rossi C. R., Siliprandi N., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 491—498.
49. Pedersen J. I., Slinde E., Grynne B., Aas M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 191—203.
50. Fritz I. B., Yue K. T. N., (1963), *J. Lipid Res.*, **4**, 279—288.
51. Fritz I. B., (1968), w *Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism*, red. Gran F. C., str. 39—63. Universitetsforlaget i Academic Press, Oslo, London, New York.
52. Bremer J., (1968), w *Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism*, red. Gran F. C., str. 65—88. Universitetsforlaget i Academic Press, Oslo, London, New York.
53. Hittleman K. J., Lindberg O., Cannon B., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **11**, 183—192.
54. Bulychev A., Kramar R., Drahota Z., Lindberg O., (1972), *Exp. Cell Res.*, **72**, 169—187.
55. Wojtczak L., Załuska H., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 76—81.
56. Pande S. V., Blanchaer M. C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 402—411.
57. Shug A., Lerner E., Elson C., Shrago E., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 557—563.

58. Harris R., Farmer B., Ozawa T., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 199—209.
59. Lerner E., Shug A. L., Elson C., Shrago E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1513—1519.
60. Morel F., Lauquin G., Lunardi J., Duszyński J., Vignais P. V., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 25—30.
61. Haworth R. A., (1977), *Biophys. J.*, **17**, 256a.
62. Andersen H. T., Christiansen E. N., Grav H. J., Pedersen J. I., (1970), *Acta Physiol. Scand.*, **80**, 1—10.
63. Chance B., Conrad H., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 1568—1570.
64. Tobin R. B., Mackerer C. R., Mehlman M., (1972), *Am. J. Physiol.*, **223**, 83—88.
65. Christiansen E. N., (1975), Studies on Energy Utilization Reactions in Brown Adipose Tissue. Rozprawa doktorska. Institute for Nutrition Research, School of Medicine, University of Oslo, Oslo.
66. Skaane O., Christiansen E. N., Pedersen J. I., Grav H. J., (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, **42B**, 91—107.
67. Rafael J., Ludolph H.-J., Hohorst H.-J., (1969), *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1121—1131.
68. Pedersen J. I., Flatmark T., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 135—147.
69. Christiansen E. N., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 276—282.
70. Nicholls D. G., Lindberg O., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 523—530.
71. Heaton G. M., Nicholls D. G., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **67**, 511—517.
72. Nicholls D. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **49**, 585—593.
73. Nicholls D. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **49**, 573—583.
74. Mitchell P., Moyle J., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **7**, 1147—1162.
75. Nicholls D. G., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 223—228.
76. Rafael J., Heldt H. W., (1976), *FEBS Letters*, **63**, 304—308.
77. Cannon B., Sundin U., Romert L., (1977), *FEBS Letters*, **74**, 43—46.
78. Nicholls D. G., Grav H. J., Lindberg O., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 526—533.
79. Christiansen E. N., Wojtczak L., (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **49B**, 579—592.
80. Thomassen M. S., Christiansen E. N., Grav H. J., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 77—83.
81. Christiansen E. N., Grav H. J., Wojtczak L., (1974), *FEBS Letters*, **46**, 188—191.
82. Nicholls D. G., Lindberg O., (1972), *FEBS Letters*, **25**, 61—64.
83. Wojtczak L., (1971), w Monografiach Biochemicznych, Nr. 24, Utlenianie Biologiczne, red. Kaniuga Z., str. 9—27. P.W.N., Warszawa.
84. Lehninger A. L., Carafoli E., Rossi C. S., (1967), *Adv. Enzymol.*, **29**, 259—320.
85. Chappell J. B., Crofts A. R., (1966), w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, red. Tager J. M., Papa S., Quagliariello E., Slater E. C., str. 293—314. Elsevier, Amsterdam.
86. Lehninger A. L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1520—1524.
87. Vignais P. V., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 1—38.
88. Vignais P. V., (1976), *Bioenergetics*, **8**, 9—17.
89. Christiansen E. N., Drahotá Z., Duszyński J., Wojtczak L., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 506—512.
90. Chance B., Williams G. R., (1956), *Adv. Enzymol.*, **17**, 65—134.

91. Ricquier D., Mory G., Hémon P., (1976), *Pflüger's Archiv Eur. J. Physiol.*, **362**, 241—246.
92. Barnard T., Skála J., Lindberg O., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, **33**, 499—508.
93. Skála J., Barnard T., Lindberg O., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, **33**, 509—528.
94. Lindgren G., Barnard T., (1972), *Exp. Cell Res.*, **70**, 81—90.
95. Ricquier D., Mory G., Hémon P., (1975), *FEBS Letters*, **53**, 342—346.
96. Ricquier D., Kader J.-C., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 577—783.
97. Pedersen J. I., Grav H. J., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 75—83.
98. Prusiner S., Cannon B., Lindberg O., (1970), w *Brown Adipose Tissue*, red. Lindberg O., str. 283—318. Elsevier, New York.
99. Himms-Hagen J., Behrens W., Hbous A., Greenway D., (1974), *Symposium on Depressed Metabolism and Cold Thermogenesis*, Prague, Abstracts.
100. Hoch F. L., Lipmann F., (1954), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **40**, 909—921.
101. Marano Y., DePalma R. G., Lavine L., Miller M., (1972), *Diabetes*, **21**, 257—270.
102. Ernster L., Luft R., (1963), *Exp. Cell Res.*, **32**, 26—55.
103. Mjøs O. D. (1972), *Rozprawa doktorska*, Institute for Experimental Medical Research, Ullevål Hospital, University of Oslo.

KOMUNIKATY ZARZĄDU GŁÓWNEGO
POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

1. Nowe władze Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wybrane na IX Walnym Zebraniu w dniu 23 września 1977 r. w Gdańsku:

Zarząd Główny:

Prezes	prof. dr Lech Wojtczak
Vice-Prezes	prof. dr Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz
Sekretarz	dr hab. Ewa Sikorska
Skarbnik	dr Bogna Skoczylas

Pozostali członkowie Zarządu: dr Zenon Aleksandrowicz, dr hab. Wojciech Ardelt, prof. dr Jerzy Chmielowski, dr Barbara Czartoryska, prof. dr Lech Działoszyński, dr hab. Adam Krawczyk, prof. dr Andrzej Legocki, dr hab. Zygmunt Machoy, dr Grażyna Palamarczyk, dr hab. Zdzisław Wojciechowski, dr hab. Elżbieta Wolny, dr hab. Włodzimierz Zagórski

Komisja Rewizyjna:

dr hab. Henryk Panusz
prof. dr Maria Sarnecka-Keller
prof. dr Zofia Zielińska

2. Doroczną nagrodę im. Jakuba Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną otrzymał zespół w składzie: Jerzy Kościelak, Halina Miller-Podraza, Robert Krauze i Andrzej Piasek z Instytutu Hematologii w Warszawie za pracę pod tytułem „Isolation and characterization of poly(glycosyl) ceramides (megaloglycolipids) with A, H and I blood-group activities” opublikowaną w *European Journal of Biochemistry*, tom 71 (1976), str. 9—18.
3. XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Łodzi w dniach 14—17 września 1978 r. W czasie Zjazdu przewiduje się zorganizowanie następujących sympozjów:
1. biotechnologia enzymów,
 2. metale ciężkie i pierwiastki śladowe,
 3. biochemia białek chromatyny.

MAREK MICHALAK *) , M. GABRIELA SARZAŁA **)

Asymetria błon biologicznych

Asymmetry of Biological Membranes

Spis treści

- I. Metody badania asymetrii błon biologicznych
- II. Asymetryczne rozmieszczenie białek
 - II-1. Błony plazmatyczne
 - II-2. Błony wewnątrzkomórkowe
- III. Asymetryczne rozmieszczenie węglowodanów
- IV. Asymetryczne rozmieszczenie lipidów
 - IV-1. Błony plazmatyczne
 - IV-2. Błony wewnątrzkomórkowe
- V. Mechanizmy odpowiedzialne za asymetryczne rozmieszczenie składników w błonie.

Contents

- I. Methods used to characterize membrane asymmetry
- II. Asymmetry of protein
 - II-1. Plasma membrane
 - II-2. Intracytoplasmic membranes
- III. Asymmetry of carbohydrates
- IV. Lipid asymmetry
 - IV-1. Plasma membrane
 - IV-2. Intracytoplasmic membranes
- V. Maintenance of biological membranes asymmetry

Błony biologiczne, zarówno wewnątrzkomórkowe, jak i plazmatyczne poza funkcjami strukturalnymi odpowiadają za sterowanie szeregiem procesów metabolicznych w komórkach. W ostatnich latach stały się więc przedmiotem bardzo intensywnych badań zarówno morfologów, jak również biochemików i biofizyków.

Głównymi składnikami błon są lipidy, białka i węglowodany. Te ostatnie występują w postaci glikolipidów lub glikoproteidów. Zawartość ilościowa poszczególnych składników błon jest różna i zależy od typu błony, jak również jej funkcji (1).

*) Mgr, **) Doc. dr hab., Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Pierwsze modele budowy błon biologicznych uwzględniające ich fizyczne i chemiczne właściwości opierały się głównie na badaniach tzw. filmów lipidowych (2, 3). Do tej pory powszechnie przyjmowano pogląd, że lipidy błonowe tworzą warstwę bimolekularną, w której hydrofobowe łańcuchy lipidów skierowane są do środka, a hydrofilowe reszty na zewnątrz (4). Mozaikowy model budowy błony zaproponowany w 1972 roku przez Sintera i Nicolsona (5), w ogólnych zarysach jest dotychczas powszechnie akceptowany. Model ten uwzględnia hydrofilowo-hydrofobowy charakter składników błon. Białka o charakterze hydrofobowym są całkowicie lub częściowo zagłębione w dwumolekularnej warstwie lipidowej (5). Hydrofilowe reszty białek i polarne grupy lipidów są skierowane na zewnętrzną stronę błony, podczas gdy hydrofobowe, stabilizowane wiązaniami apolarnymi skierowane są do środka (5). Badania biochemiczne i biofizyczne wskazują, że zasadniczymi wiązaniami, które utrzymują strukturę każdej błony są wiązania hydrofobowe między lipidami i białkami wewnętrznymi błon.

Poznanie lokalizacji poszczególnych składników błony ma istotne znaczenie dla zrozumienia szeregu funkcji błon jak rozpoznawanie bodźców, transport przez błony czy sterowanie wewnętrznymi procesami komórkowymi.

Artykuł ten omawia szereg wybranych zagadnień dotyczących asymetrii błon biologicznych przede wszystkim na przykładzie błony plazmatycznej erytrocytów, błon sarkoplazmatycznego retikulum i endoplazmatycznego retikulum oraz otoczki wirusowej. W artykule pominięto problem asymetrii błon mitochondrialnych, gdyż był on szczegółowo omówiony w artykule wcześniej opublikowanym w *Postęпах Biochemii* (7).

I. Metody badania asymetrii błon

W celu określenia miejsca występowania w błonie poszczególnych jej składników oprócz badań ultrastruktury stosuje się szereg technik znakowania i modyfikacji składników błonowych metodami enzymatycznymi i nieenzymatycznymi. Związki stosowane do badań asymetrii powinny reagować w fizjologicznych warunkach pH, siły osmotycznej i temperatury. Ponadto musi istnieć możliwość wykrywania tych związków w ilościach śladowych (stosowanie znaczników fluorescencyjnych czy substancji radioaktywnych), jak również kontroli przepuszczalności błon dla tych związków. W Tabeli 1 podano przykłady używanych do tego typu badań związków chemicznych modyfikujących lub znakujących określone grupy funkcyjne białek, lipidów lub węglowodanów.

Techniki mikroskopii elektronowej są bardzo przydatne do badań asymetrii błon biologicznych. Dzięki zastosowaniu kompleksu ferrytyny z lektynami lub z przeciwciałami poznano rozmieszczenie białek i glikoprotei-

Tabela 1

Metody stosowane do określenia asymetrii błon

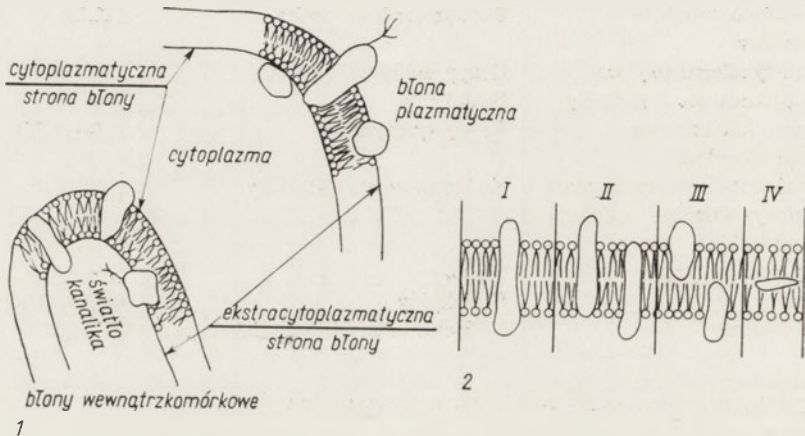
Substancje i metody	Składniki błon lub ich grupy funkcyjne	Piśmiennictwo
Ferrytyna + specyficzne przeciwciała	Białka	(36,83)
Ferrytyna + lektyny	Węglowodany	(36,83)
<i>Freeze-etching</i>	Hydrofobowe powierzchnie błony	(43,60,61)
Negatywowe barwienie	Struktura powierzchni zewnętrznej	(43,60—64,71)
Przeciwciała	Białka	(74)
Odczynniki sieciujące białka błonowe	Białka	(68)
Dwuazoniowa sól kwasu sulfanilowego	Pierwszorzędowe aminy	(10,14)
Pochodne 2,2'-dwyhydrostilbeno sulfonianu	Pierwszorzędowe aminy	(23,24)
Fosforan pirydoksyli — redukcja borowodorkiem	Pierwszorzędowe aminy	(100)
Formylometinylo sulfono metylofosforan	Pierwszorzędowe aminy	(22)
Kwas sulfono trójnitrobenzenowy	Pierwszorzędowe aminy	(22,23)
Fluram + cykoheptaamylaza	Grupy aminowe	(76)
Białko przenoszące fosfolipidy	Fosfolipidy	(98)
Jodowanie katalizowane laktoperoksydazą	Reszty tyrozynowe	(17—19,72)
Utlenianie katalizowane oksydazą galaktozy — wtórna redukcja borowodorkiem	Końcowa reszta galaktozy	(10,81)
Enzymy proteolityczne	Białka	(10—16,64,72—75)
Fosfolipazy	Fosfolipidy	(64,80,92,96)
Neuraminidaza	Końcowa reszta kwasu sialowego	(99)

dów. Technika *freeze-etching* daje możliwość obserwacji obu wewnętrznych płaszczyzn hydrofobowej części błony, podczas gdy metoda barwienia negatywowego pozwala na obserwacje powierzchni błony. Ostatnio do wykazania asymetrii błon użyto także kwasu taninowego, który wiąże się z białkami i w miejscu ich występowania obserwuje się na obrazach z mikroskopu elektronowego elektronowgęste, ciemne obszary.

Enzymatyczne metody badań asymetrii polegają na trawieniu białek błon enzymami proteolitycznymi, degradacji glikolitycznej cukrów, lub też trawieniu lipidów fosfolipazami. Do metod enzymatycznych zaliczyć można również enzymatyczne znakowanie białek [¹²⁵I] w obecności laktoperoksydazy, jak też enzymatyczne utlenianie cukrów z równoczesnym redukowaniem reszt cukrowych bromowodorkiem znakowanym trytem. Problem działania szeregu znaczników stosowanych do badań asymetrii błon został ostatnio szeroko omówiony w artykule w *Postęпах Biologii Komórki* (8).

II. Asymetryczne rozmieszczenie białek w błonach biologicznych

Według współczesnych poglądów w błonach biologicznych wyróżnia się dwie klasy białek: białka powierzchniowe (*peripheral, extrinsic*) luźno związane z błoną oraz integralne (*integral, intrinsic*) związane z błoną wiązaniami hydrofobowymi, zagłębione całkowicie lub częściowo w dwumolekularnej warstwie fosfolipidów (9). Jako kryterium klasyfikacji przyjęto rodzaj interakcji białek z lipidami, ich ułożenie w stosunku do warstwy lipidowej oraz sposób uwalniania białek z błony. Białka integralne w odróżnieniu od powierzchniowych stabilizowane są wiązaniami hydrofobowymi i charakteryzują się silną interakcją z acylowymi grupami fosfolipidów błonowych. Białka integralne podzielono ostatnio na dwie grupy na podstawie ich ułożenia w błonie w stosunku do warstwy lipidowej (6). Wyróżnia się tzw. endobiałka (*endoproteins*), których część hydrofilowa znajduje się na cytoplazmatycznej stronie błony oraz ectobiałka (*ectoproteins*), których część hydrofilowa znajduje się na przeciwnej do cytoplazmatycznej, stronie błony (Ryc. 2 II). W artykule tym strona błony przeciwna w stosunku do strony cytoplazmatycznej nazywana będzie ekstracytoplazmatyczną



Rys. 1. Strona cytoplazmatyczna i ekstracytoplazmatyczna błon komórkowych.

Ryc. 2. Typy orientacji białek integralnych w błonach biologicznych.

stroną błony (*extracytoplasmic side*) (Ryc. 1). Poza wymienionymi typami białek integralnych, mogą jeszcze występować w błonach białka penetrujące przez całą grubość warstwy lipidowej, mające fragmenty hydrofilowe wystające po obu stronach błony (Ryc. 2 I). Ponadto w błonach występują białka zanurzone całkowicie w hydrofobowej części dwuwarstwy lipidowej (Ryc. 2 IV).

II-1. Błony plazmatyczne

Większość z przedstawionych w Tabeli 1 metod badania asymetrii błon znalazło zastosowanie w badaniach lokalizacji białek w błonie plazmatycznej

nej erytrocytów. Błony erytrocytów trawiono enzymami proteolitycznymi (10—16), znakowano [^{125}I] w obecności laktoperoksydazy (17—19), stosowano też związki znakujące specyficzne grupy chemiczne białek (20—24) (Tabela 1). W doświadczeniach tych badano bądź całe erytrocyty, bądź przepuszczalne ich „cienie”, po angielsku *ghost* oraz „odwrócone” pęcherzyki z błony erytrocytów (25). Przyjęto założenie, że białka strony cytoplazmatycznej mogą ulegać znakowaniu jedynie w przypadku przepuszczalnych „cieni” erytrocytów oraz „odwróconych” pęcherzyków, podczas gdy w prawidłowych erytrocytach, znakowaniu mogą ulegać jedynie białka znajdujące się na powierzchni ekstracytoplazmatycznej.

Błona plazmatyczna erytrocytów składa się z około 20 białek i glikoproteidów (26—29). Większość z nich należy do klasy integralnych białek błony, które można uwolnić jedynie w wyniku zniszczenia jej struktury (26—31). Około 20—25% białek „cieni” erytrocytów ulega ekstrakcji roztworami o niskiej sile jonowej (32—33), co świadczy, że należą one do klasy białek powierzchniowych luźno związanych. Główne białka powierzchniowe tych błon to białka 210 000 i 240 000 daltonów (tzw. składniki 1 i 2) nazywane spektryną (34) lub tektyną A (32) oraz białko 43 000 (tzw. składnik 5), które według ostatnich badań okazało się aktyną (26, 27, 35). Składnik białkowy 5, podobnie jak spektryna, ulega enzymatycznemu znakowaniu [^{125}I] jedynie w „odwróconych” pęcherzykach błon (19, 20, 36, 37) co wskazuje, że oba te białka występują na cytoplazmatycznej powierzchni błony.

Najlepiej poznane są dwa integralne białka błon erytrocytów, glikoproteid o ciężarze cząsteczkowym 90 000—100 000 [nazywany składnikiem α (38) lub składnikiem 3 (39)], oraz glikoforyna (40), sjaoligkoproteid o ciężarze cząsteczkowym 30 000—50 000 (41), nazywany MN-glikoproteidem (42). Hydrofilowe fragmenty składnika 3 i glikoforyny znajdują się na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony (19, 20, 37). Glikoforyna jest białkiem dobrze scharakteryzowanym (40, 43). Jest to cząsteczka o charakterze amfipatycznym: hydrofilowo-hydrofobowo-hydrofilowa (40). Wykazano, że białko to penetruje przez całą dwumolekularną warstwę lipidową a N-koniec jego łańcucha peptydowego i reszta węglowodanowa znajdują się na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony, podczas gdy C-koniec znajduje się od strony cytoplazmatycznej (40, 43). Składnik 3 zawiera więcej węglowodanów niż glikoforyna i jest odpowiedzialny za transport anionów (16, 23, 24, 27). Ułożenie składnika 3 w błonie jest identyczne z ułożeniem glikoforyny (38). Ponieważ hydrofilowe fragmenty tych białek znaleziono na obu powierzchniach błony sugerowano, że mają one ułożenie symetryczne (44). Dzięki określeniu map peptydowych tych białek wykazano, że po każdej stronie błony wystaje inny fragment łańcucha peptydowego co świadczy bezspornie o ich asymetrycznym ułożeniu (45). Ponadto w przypadku obu białek węglowodany występują jedynie od ekstracytoplazmatycznej strony błony. Białka luźno związane z błoną

plazmatyczną znajdują się na ogół na cytoplazmatycznej stronie błony (26, 46).

Wyniki cytowanych prac wskazują, że wszystkie białka i glikoproteidy błony plazmatycznej erytrocytów ułożone są asymetrycznie (26, 46, 47, 48). Niektóre enzymy błony plazmatycznej erytrocytów występują na określonych powierzchniach błony (Tabela 2). Na przykład aktywność esterazy acetylocholinowej ulega zahamowaniu w wyniku trawienia erytrocytów enzymami proteolitycznymi, nie ulega jednak zahamowaniu w przypadku

Tabela 2

Markery poszczególnych stron błony plazmatycznej erytrocytów

Strona	Markery	Piśmiennictwo
cytoplazmatyczna	Dwunukleotyda adeninonikotynamidu	(102)
	Esteraza acetylocholinowa	(10,11,49)
	Kwas sjałowy	(99)
	Miejsca wiązania ouabainy	(101)
	Węglowodany	(11,82)
ekstracytoplazmatyczna	ATP-aza	(105)
	Dehydrogenaza amidu kwasu liponowego	(11,25)
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	(11,103)
	Kinaza białkowa	(104)
	Miejsca wiązania cyklicznego AMP	(103,104)

trawienia „odwróconych” pęcherzyków otrzymanych z tych błon (25, 49), co wskazuje na jej występowanie na ekstracytoplazmatycznej powierzchni błony.

II-2. Błony wewnątrzkomórkowe

Badania asymetrycznego rozmieszczenia poszczególnych składników błon wewnątrzkomórkowych jest znacznie bardziej skomplikowane. Błony wewnątrzkomórkowe w wyniku fragmentacji mogą się zamykać w ten sposób, że zewnętrzna powierzchnia pęcherzyka jest albo cytoplazmatyczną albo ekstracytoplazmatyczną stroną badanej błony. Wyniki uzyskane w badaniach mieszanej populacji takich pęcherzyków będą wypadkową obu możliwości.

Badania asymetrii błon w izolowanych pęcherzykach błon wewnątrzkomórkowych są pośrednie i polegają na porównaniu wyników uzyskanych w badaniach pęcherzyków wykazujących barierę przepuszczalności dla makrocząsteczek takich jak dekstran (50) lub inulina (51) z wynikami uzyskanymi przy badaniach błon przepuszczalnych dla tych cząsteczek. Najczęściej stosowana metoda, zwiększająca przepuszczalność błon polega na traktowaniu preparatów detergentami w niskich stężeniach. Jednakże detergent

stosowany nawet w niskich stężeniach, może powodować zmiany w błonie polegające na reorganizacji ułożenia fosfolipidów, rozerwanie lub rozluźnienie wiązań pomiędzy białkami, lub białkami i fosfolipidami. Przemawia za tym zwiększenie stopnia i szybkość degradacji białek błon enzymami proteolitycznymi po działaniu detergentów. Detergenty mogą ponadto, nawet w niskich stężeniach, usuwać czynnik maskujący określone białko lub przez subtelne modyfikacje białka odsłaniać miejsca niedostępne dla enzymów hydrolitycznych w natywnych błonach.

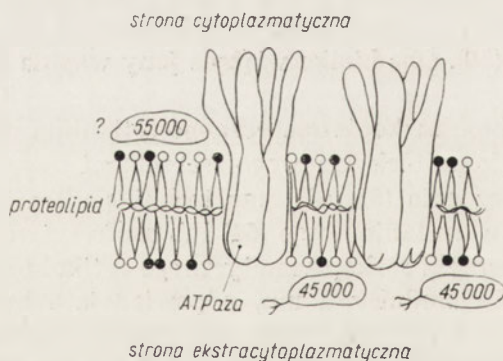
Sama procedura otrzymania czystych frakcji mikrosomalnych może wprowadzić także szereg zmian w błonach. Najkorzystniejsze byłoby stosowanie takich samych metod przy badaniach zarówno „odwróconych” jak również prawidłowych pęcherzyków. Jest to spełnione w przypadku błon sarkoplazmatycznego retikulum dzięki otrzymaniu wysoce oczyszczonej frakcji „odwróconych” pęcherzyków z tych błon (64).

Błony sarkoplazmatycznego retikulum charakteryzują się bardzo prostym składem chemicznym i wysoce wyspecjalizowaną funkcją (53, 54). Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum została już obszernie omówiona w artykule opublikowanym w *Postęпах Biochemii* (52). Poszczególne białka błon sarkoplazmatycznego retikulum udało się wyizolować i scharakteryzować oraz ustalić miejsca ich występowania (55—58). Głównym składnikiem białkowym tych błon (ciężar cząsteczkowy 100 000, około 70% wszystkich białek) jest ATP-aza transportująca jony wapnia. Drugim zaś integralnym białkiem występującym w tych błonach w niewielkiej ilości jest proteolipid (56, 59). Oprócz tych dwóch białek występują jeszcze białka wiążące jony wapnia to jest białko 55 000 daltonów, o wysokim powinowactwie do jonów wapnia (*HACBP, high affinity calcium binding protein*, 57) oraz białko 45 000 daltonów zwane kalsekwestryną (*calsequestrin*) (58). Oba białka wiążące jony wapnia są luźno związane z błoną (51, 58).

Asymetrię błon sarkoplazmatycznego retikulum wykazano przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego technikami *freeze-etching* (60, 61), negatywowego barwienia (62, 63) oraz techniką ultracienkich skrawków po zastosowaniu kwasu taninowego (64) lub azoferrytyny (65). Negatywowo barwione pęcherzyki sarkoplazmatycznego retikulum posiadają na powierzchni cząstki o średnicy 4 nm, odpowiadające hydrofilowej części ATP-azy wystającej na cytoplazmatycznej powierzchni błony (50, 62, 63). Okazało się, że nie obserwuje się takich cząstek na zewnętrznej powierzchni „odwróconych” pęcherzyków sarkoplazmatycznego retikulum (64). W „odwróconych” pęcherzykach zewnętrzna powierzchnia odpowiada ekstracytoplazmatycznej stronie błony. Technika barwienia negatywowego, pozwalającą jedynie na obserwacje zewnętrznej powierzchni badanego obiektu, nie można było sprawdzić czy cząstki o średnicy 4 nm są obecne wewnątrz „odwróconych” pęcherzyków. Dzięki zastosowaniu do utrwalenia błon sarkoplazmatycznego retikulum kwasu taninowego, związku wią-

żącego się z białkami wykazano, że jest on obecny na wewnętrznej powierzchni „odwróconych” pęcherzyków, odwrotnie niż w prawidłowych pęcherzykach. Kwas taninowy wiąże się z hydrofilową częścią ATP-azy (cząstki o średnicy 4 nm). W „odwróconych” pęcherzykach znajduje się ona na wewnętrznej powierzchni pęcherzyka, która odpowiada cytoplazmatycznej stronie błony.

W wyniku zastosowania techniki *freeze-etching* obserwuje się w hydrofobowym regionie błony cząstki o średnicy 8 nm (60, 61, 66). Cząstki te odpowiadające hydrofobowemu fragmentowi ATP-azy występują głównie w cytoplazmatycznej części błony (60, 61, 66). Uważano, że 4 nm cząstki widoczne w przypadku negatywowego barwienia odpowiadają cząstkom o średnicy 8 nm w hydrofobowym regionie błony (61, 66). Obliczono, że cząstki o średnicy 8 nm obserwowane w hydrofobowym regionie błony, powinny odpowiadać białkom o ciężarze cząsteczkowym nie mniejszym niż 200 000 (67), podczas gdy ATP-aza transportująca jony wapnia posiada ciężar cząsteczkowy 100 000. Precyzyjne obliczenia wykazały, że liczba cząstek o średnicy 4 nm na powierzchni negatywowo barwionych pęcherzyków błon sarkoplazmatycznego retikulum jest 4-krotnie większa niż liczba cząstek o średnicy 8 nm w hydrofobowym regionie błony (61, 66). Wysłunęto hipotezę, że 4 cząsteczki ATP-azy tworzą w błonie hydrofilowy kanał umożliwiający transport jonów wapnia. Hipoteza ta znalazła dodatkowe potwierdzenie po zastosowaniu do badań takich metod jak: sieciowanie białek błonowych (68), solubilizacja błon detergentami (69), elektroogniskowanie, elektrotachoforeza (70). W świetle wyników ostatnich badań wydaje się, że jednostką transportującą jony wapnia w błonie



Ryc. 3. Schemat budowy błon sarkoplazmatycznego retikulum.

55 000 — białko wiążące jony wapnia o niewyjaśnionej lokalizacji; 45 000 — kalsekwestryna, glikoproteid błon sarkoplazmatycznego retikulum. Część fosfolipidów zaciemniona w celu podkreślenia ich asymetrycznego rozmieszczenia w błonie.

nach sarkoplazmatycznego retikulum jest układ 4 cząsteczek ATP-azy (Ryc. 3). Ułożenie ATP-azy w błonach sarkoplazmatycznego retikulum badano stosując także enzymy proteolityczne (71, 64, 72, 73, 74, 75).

W wyniku działania trypsyny na pęcherzyki sarkoplazmatycznego retikulum trawi się białko 100 000 daltonów najpierw do fragmentów 55 000 i 45 000 daltonów (73, 77, 78), a fragment 55 000 daltonów ulegał dalszej degradacji do fragmentów 30 000 i 20 000 (64, 71, 72, 73, 74, 75). Po inkubacji trawionych błon z [³²P]γATP fosforylacji ulega jedynie fragment 55 000 i 30 000 daltonów, w których znajduje się miejsce wiązania ATP (74, 75). Stwierdzono, że fragment 30 000 daltonów powstaje z 55 000 daltonów i odpowiada hydrofilowej części ATP-azy (cząstkom o średnicy 4 nm widocznym na powierzchni negatywowo barwionych pęcherzyków), a fragment 45 000 daltonów wykazuje charakter hydrofobowy i odpowiada prawdopodobnie części ATP-azy zatopionej w dwumolekularnej warstwie fosfolipidów (74, 75). Białko 100 000 daltonów jest bardziej odporne na działanie trypsyny w przypadku „odwróconych” pęcherzyków niż prawidłowych (64). Wskazuje to, że ATP-aza w „odwróconych” pęcherzykach albo jest w mniejszym stopniu dostępna dla trypsyny, albo dostępny jest inny jej fragment niż w przypadku prawidłowych pęcherzyków. Wprawdzie powstające produkty degradacji białka 100 000 daltonów w „odwróconych” pęcherzykach mają identyczny ciężar cząsteczkowy co w prawidłowych pęcherzykach, ale obserwuje się akumulację fragmentu 55 000 daltonów. Natomiast fragment 45 000 daltonów występuje w niewielkiej ilości. Po ekstrakcji pęcherzyków roztworem EDTA w środowisku alkalicznym, kiedy stają się one przepuszczalne dla trypsyny (51), białko 100 000 daltonów w „odwróconych” i prawidłowych pęcherzykach ulega trawieniu z taką samą szybkością a produkty degradacji wykazują identyczne właściwości (64). Asymetryczna orientacja w błonie białka 100 000 daltonów wpływa zarówno na szybkość jak i na sposób jego degradacji.

Dzięki wyizolowaniu fragmentów powstałych w wyniku trawienia trypsyną ATP-azy wykazano ponadto, że N-koniec jej łańcucha peptydowego wystaje z błony po jej stronie ekstracytoplazmatycznej, podczas gdy C-koniec po stronie przeciwnej (cytoplazmatycznej) (74). Taki charakter orientacji łańcucha peptydowego w błonie opisany został również w przypadku białek integralnych błony plazmatycznej erytrocytów (40, 43).

Asymetrycznie rozmieszczone są również białka powierzchniowe błon sarkoplazmatycznego retikulum. Stosując działanie enzymów proteolitycznych (70) i specyficzne przeciwciała jak również znakowanie fluramem (78) czy [¹²⁵I] w obecności laktoperoksydazy (77) wykazano, że kalsekwestryna występuje po ekstracytoplazmatycznej stronie błony. Miejsce występowania białka HACBP nie jest jeszcze całkowicie wyjaśnione, gdyż w literaturze podawane są dane wskazujące na jego obecność zarówno po cytoplazmatycznej (77, 78, 64) jak również ekstracytoplazmatycznej stronie błony (56, 58, 71, 81).

W przeciwieństwie do błon sarkoplazmatycznego retikulum, wykazują-

cych wyspecjalizowaną funkcję i prosty skład chemiczny, błony endoplazmatycznego retikulum wątroby, odpowiedzialne za różne funkcje metaboliczne, zawierają cały szereg enzymów, z których większość jest rozłożona asymetrycznie.

Rozmieszczenie enzymów w błonach mikrosomalnych badano przez określenie stopnia przepuszczalności dla określonych substratów, oraz okresu latencji aktywności enzymów (50). Okres latencji pewnych enzymów może wynikać z faktu, że błony pęcherzyków mikrosomalnych są nieprzepuszczalne dla substancji o określonym ładunku, co wskazuje, że miejsca wiążące tych enzymów znajdują się na wewnętrznej stronie pęcherzyków (50). Metodami histochemicznymi wykazano, że nieorganiczny fosforan uwalniany w wyniku działania glukozy-6-fosfatazy, obecny jest w świetle kanalika endoplazmatycznego retikulum (79). Biochemicznie wykazano, że produkty enzymów łańcucha transportującego elektrony uwalniane są do cytoplazmy.

Asymetryczne rozmieszczenie białek enzymatycznych w pęcherzykach mikrosomalnych wątroby wykazano stosując trawienie błon proteazami (80). Stosując różne warunki trawienia oraz kontrolując stopień przepuszczalności błon dla enzymu wykazano, że reduktaza NADH i NADPH-cytochrom c i cytochrom c były bądź uwalniane z błony, bądź też ich aktywności ulegały zahamowaniu co świadczyło, że znajdują się po cytoplazmatycznej stronie błony (80). Wprowadzenie trypsyny do wnętrza pęcherzyków hamowało aktywność glukozy-6-fosfatazy i częściowo cytochromu P-450, co świadczyło, że ich centrum aktywne znajduje się po stronie ekstracytoplazmatycznej.

III. Asymetryczne ułożenie węglowodanów błonowych

W błonie plazmatycznej erytrocytów wszystkie reszty węglowodanowe zarówno glikoproteidowe jak glikolipidowe, występują na powierzchni ekstracytoplazmatycznej (11, 36, 81, 83, 87). W błonach wewnątrzkomórkowych, jak błony endoplazmatycznego retikulum czy aparatu Golgiego, węglowodany obecne są także jedynie na ekstracytoplazmatycznej stronie błony (36, 83). Podobną prawidłowość wykazano także w przypadku glikoproteidów otoczki wirusów, gdzie również wszystkie cukry znajdują się na zewnętrznej powierzchni (92). Kalsekwestryna, glikoproteid błon sarkoplazmatycznego retikulum (85, 86) znajduje się również po ekstracytoplazmatycznej stronie błony (71, 76, 77). Glikolipidy błony plazmatycznej erytrocytów występują podobnie jak glikoproteidy na powierzchni ekstracytoplazmatycznej (82, 87). Cytowane wyniki wskazują, że na stronie cytoplazmatycznej błony nie występują węglowodany.

IV. Asymetryczne rozmieszczenie lipidów błonowych

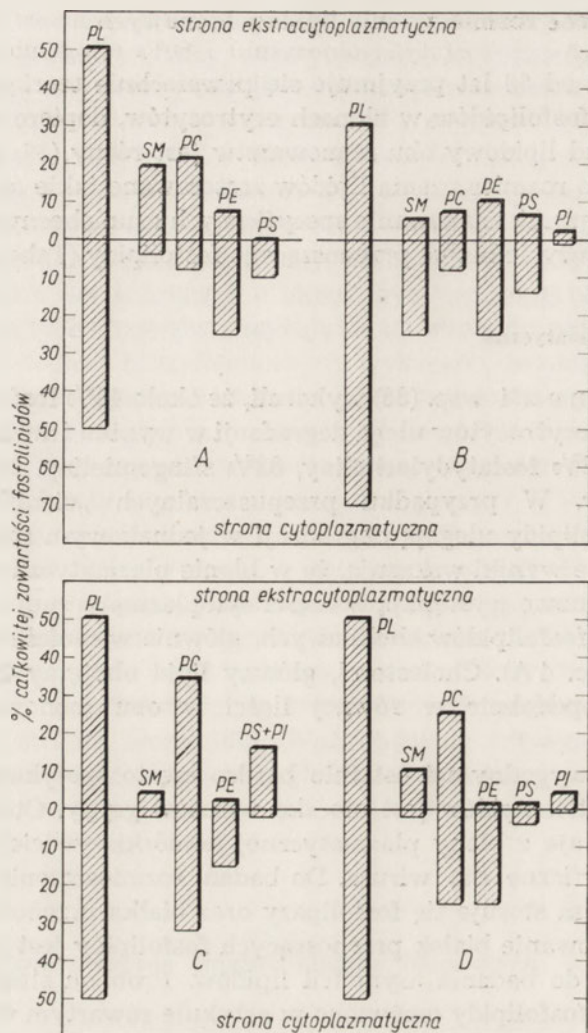
Chociaż już od 50 lat przyjmuje się powszechnie teorię dwuwarstwowego ułożenia fosfolipidów w błonach erytrocytów, dopiero w 1972 r. wykazano, że skład lipidowy obu monowarstw jest różny (89, 90). Do badań asymetrycznego rozmieszczenia lipidów zastosowano takie metody jak trawienie fosfolipazami, znakowanie specyficznych grup obecnych w tych cząsteczkach oraz użycie białka przenoszącego fosfolipidy (Tabela 1).

IV-1. Błony plazmatyczne

Van Deenen i wsp. (88) wykazali, że około 48% fosfolipidów błony plazmatycznej erytrocytów ulega degradacji w wyniku trawienia fosfolipazami w tym 76% fosfatydylocholicy, 82% sfingomieli, 20% fosfatydyloetanoloaminy. W przypadku przepuszczalnych „cieni” erytrocytów wszystkie fosfolipidy ulegają degradacji w jednakowym stopniu.

Wszystkie te wyniki wskazują, że w błonie plazmatycznej erytrocytów fosfolipidy aminowe występują w części cytoplazmatycznej błony, podczas gdy większość fosfolipidów cholinowych, głównie w części ekstracytoplazmatycznej (Ryc. 4 A). Cholesterol, główny lipid obojętny tych błon, jest obecny prawdopodobnie w równej ilości w obu monowarstwach (89, 90, 93).

Niezwykle wygodnym i ostatnio bardzo często spotykanym obiektem badania asymetrii lipidów jest otoczka wirusów grypy. Otoczka lipidowa wirusów powstaje z błony plazmatycznej komórki żywiciela (84), ale jej białka są specyficzne dla wirusa. Do badań rozmieszczenia fosfolipidów w otoczce wirusa stosuje się fosfolipazy oraz białka przenoszące fosfolipidy (94). Zastosowanie białek przenoszących fosfolipidy jest jak dotąd najlepszą metodą do badania asymetrii lipidów. Problem stosowania białek przenoszących fosfolipidy omówiono w artykule zawartym w tym zeszycie Postępów Biochemii (91). Białka przenoszące fosfolipidy występują w cytoplazmie wielu komórek eukariotycznych. Białka te zdolne są do przenoszenia z błon specyficznych fosfolipidów i tworzą z nimi rozpuszczalny kompleks białko-fosfolipid (95). Przenoszone są przez nie wyłącznie fosfolipidy z zewnętrznej warstwy błony (97). W przypadku otoczki wirusa wykazano dwa typy asymetrii lipidowej (94). Strona wewnętrzna otoczki jest bogatsza w fosfolipidy niż strona zewnętrzna, oraz rozłożenie poszczególnych rodzajów fosfolipidów w obu monowarstwach jest ilościowo różne (94), (Ryc. 4 A). Rozłożenie fosfolipidów w otoczce wirusa jest nieco różne niż w błonie plazmatycznej erytrocytów, jednakże i w tym przypadku fosfatydyloetanoloamina znajduje się głównie na cytoplazmatycznej stronie błony (Ryc. 4 B). Cholesterol, podobnie jak w błonie plazmatycznej erytrocytów rozłożony jest symetrycznie w obu monowarstwach otoczki wirusowej (98).



Ryc. 4. Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w błonach biologicznych.

A — błona plazmatyczna erytrocytów (92); B — błona otoczki wirusowej (94); C — błony sarkoplazmatycznego retikulum (64); D — błony endoplazmatycznego retikulum (96); PL — całkowita ilość fosfolipidów, SM — sfingomieliina; PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanolamina; PS — fosfatydyloseryna; PI — fosfatydyloinozytol.

IV-2. Błony wewnątrzkomórkowe

Dzięki otrzymaniu (64) frakcji „odwróconych” pęcherzyków błon sarkoplazmatycznego retikulum, można było określić dokładniej typ asymetrii lipidowej w obrębie tych błon. W prawidłowych pęcherzykach sarkoplazmatycznego retikulum trawieniu fosfolipazami ulega około 40% fosfatydylocholiny, 70% fosfatydyloetanolaminy, oraz 10% fosfatydyloseryny + fosfatydyloinozytolu i 10% sfingomieliiny, podczas gdy w „odwróconych”

pęcherzykach 40% fosfatydylocholiny, 20% fosfatydyloetanolaminy, 90% fosfatydyloseryny + fosfatydyloinozytolu i 80% sfingomieliny. Po traktowaniu błon sarkoplazmatycznego retikulum roztworem EDTA w alkalicznym pH, gdy błony stają się przepuszczalne dla fosfolipazy (51), fosfolipidy trawią się w tym samym stopniu w prawidłowych i „odwróconych” pęcherzykach (64). Doświadczenia te wskazują, że fosfatydyloetanolamina znajduje się głównie w zewnętrznej, cytoplazmatycznej części błony, podczas gdy fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i sfingomielina w części wewnętrznej, ekstracytoplazmatycznej. Fosfatydylocholina jest prawdopodobnie rozłożona równomiernie w obu monowarstwach (Ryc. 4 C). Takie charakterystyczne rozmieszczenie fosfatydyloetanolaminy w błonach sarkoplazmatycznego retikulum stwierdzono także przy użyciu kompleksu fluramu z cykloheptoamylózą (znacznik grup aminowych), związku nie przenikającego przez błony (76).

Podobne rozmieszczenie fosfolipidów wykazano w błonach endoplazmatycznego retikulum (Ryc. 4 D) (96). Występowanie fosfatydyloetanolaminy w monowarstwie od strony cytoplazmatycznej błony jest jak się wydaje powszechne i cechuje również błony aparatu Golgiego i błonę jądrową (96), co wyraźnie wskazuje, że we wszystkich błonach biologicznych wspólną cechą asymetrycznego rozłożenia fosfolipidów jest obecność fosfatydyloetanolaminy w cytoplazmatycznej części błony.

Wszystkie opisane wyniki wyraźnie wskazują na asymetryczne rozłożenie fosfolipidów w błonach. Każdy rodzaj fosfolipidów występuje w obu monowarstwach, jednakże w różnej ilości. Nie wyjaśniono dotąd roli asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonie. Może ona wpływać z jednej strony na różny stopień płynności obu monowarstw lipidowych (43), czy też na ich różne napięcia powierzchniowe (106). Może ona również wynikać z faktu, że określone lipidy, występujące nawet w niewielkich ilościach, niezbędne są do utrzymania odpowiedniej konformacji cząsteczki enzymu. Fosfatydyloseryna na przykład jest niezbędna dla utrzymania prawidłowej aktywności ATP-azy zależnej od Na^+ i K^+ w błonach erytrocytów (107). Ostatnio wykazano, że do pełnej rekonstytucji błon sarkoplazmatycznego retikulum niezbędna jest fosfatydyloetanolamina (108).

V. Mechanizmy odpowiedzialne za asymetryczne rozmieszczenie składników w błonie

Błony są strukturami dynamicznymi. Poszczególne ich składniki wykazują dużą ruchliwość, głównie w lateralnej płaszczyźnie błony, a ponadto białka występujące w błonach mają możliwość ruchów rotacyjnych wokół własnej osi (109), nie mogą natomiast przemieszczać się z jednej płaszczyzny błony na drugą. Zjawisko *flip-flop* w przypadku cząsteczek fos-

folipidów jest bardzo wolne i występuje jedynie w niektórych błonach (101). Błony zachowują asymetrię na skutek braku ruchów, lub bardzo wolnego przemieszczania się cząstek w transwersalnej (poprzecznej) płaszczyźnie.

Spośród podstawowych składników błon: białka, glikoproteidy i glikolipidy są zawsze rozmieszczane asymetrycznie, podczas gdy fosfolipidy tych samych klas znajdują się w obu monowarstwach, a asymetria w ich rozmieszczeniu polega na różnicach ilościowych. Za asymetryczne rozmieszczenie poszczególnych składników błon odpowiedzialne są mechanizmy związane z ich biosyntezą w czasie biogenezy błon.

Artykuł otrzymano 30.4.1977, po rewizji autorskiej przyjęto 15.6.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Rothfield L., (1971), *Structure and Function of Biological Membranes*, Academic Press, New York.
2. Danielli J. F., Davson H., (1935), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**, 495—508.
3. Davson H., Danielli J. F., (1952), w *The Permeability of Natural Membranes*, wyd. 2, Cambridge University Press, London.
4. Gorter E., Grendel F., (1925), *J. Exp. Med.*, **41**, 439—443.
5. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, **175**, 720—731.
6. Rothman J. E., Lenard J., (1977), *Science*, **195**, 743—753.
7. Wojtczak L., (1971), *Postępy Biochemii*, **17**, 209—223.
8. Kawiak J., (1976), *Postępy Biologii Komórki*, **3**, 265—286.
9. Singer S. J., (1971), w *Structure and Function of Biological Membranes*, wyd. Rothfield L. J., str. 145—222, Academic Press, New York, London.
10. Bender W. W., Garan H., Berg H. C., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 783—797.
11. Steck T. L., (1972), w *Membrane Research*, wyd. Fox C. F., Academic Press, New York, London, 71—93.
12. Philips D. R., Morrison M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1103—1108.
13. Steck T. L., Fairbanks G., Wallach D. F. H., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2617—2624.
14. Carraway K. L., Kobylka D., Triplett R. B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 934—940.
15. Triplett R. B., Carraway K. L., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2897—2903.
16. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1974), *J. Membrane Biol.*, **15**, 227—248.
17. Philips D. R., Morrison M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1766—1771.
18. Reichstein E., Blostein R., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 494—499.
19. Hubbard A. L., Cohn Z. A., (1972), *J. Cell. Biol.*, **55**, 390—405.
20. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 775—781.
21. Arrotti J. J., Garvin J. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 205—211.
22. Tarone G., Prat M., Comoglio P. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 214—221.
23. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1972), *J. Membrane Biol.*, **10**, 311—330.

24. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1974), *J. Membrane Biol.*, **15**, 207—226.
25. Steck T. L., Kant J. A., (1974), w *Methods in Enzymology*, wyd. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. 31A, str. 172—180, Academic Press, New York, London.
26. Steck T. L., (1974), *J. Cell Biol.*, **62**, 1—19.
27. Guidotti G., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 731—752.
28. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Coley C. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 159—182.
29. Tanner M. J. A., Boxer D. H., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 333—347.
30. Scheider D. L., Kagawa Y., Racker E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4074—4079.
31. Larraga V., Munoz F., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 207—218.
32. Clarke M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1063—1070.
33. Fuller G. M., Boughter J. M., Marrazoni M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3036—3041.
34. Marchesi V. T., Steers Jr., E., Tillack T. W., Marchesi S. L., (1969), w *The Red Cell Membrane Structure and Function*, wyd. Jamieson G. A., Greenwalt T. J.; I. B. Lippincott Co., Philadelphia, 117—130.
35. Painter R. G., Sheetz M., Singer S. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**, 1359—1363.
36. Nicolson G. L., Singer S. J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **68**, 942—945.
37. Morrison M., Mueller T. J., Huber C. T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2658—2660.
38. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **59**, 351—357.
39. Findlay J. B. C., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398—4403.
40. Segrest J. P., Kahne I., Jackson R. L., Marchesi V. T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 167—183.
41. Winzeler R. J., Harris E. D., Pekas D. J., Johnson C. A., Weber P., (1967), *Biochemistry*, **6**, 2195—2202.
42. Morawiecki A., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 339—347.
43. Marchesi V. T., Tillack T. W., Jackson R. L., Segrest J. P., Scott R. E., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1445—1449.
44. Carraway K. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 379—410.
45. Staros J. V., Richards F. M., Maley B. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8174—8178.
46. Juliano R. L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 341—378.
47. Wallach D. H. F., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 61—83.
48. Marchesi V. T., (1976), w *Biochemistry of Cell Walls and Membranes*, wyd. Fox C. F., str. 123—148, Butterworth, London.
49. Martin K., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **203**, 182—184.
50. Nilsson R., Peterson E., Dallner G., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 762—776.
51. Duggan P. F., Martonosi A., (1970), *J. Gen. Physiol.*, **56**, 147—167.
52. Sarzała M. G., (1974), *Postępy Bioch.*, **20**, 403—424.
53. MacLennan D. H., Holland P. C., (1976), w *The Enzymes of Biological Membranes*, wyd. Martonosi A., t. 3, str. 221—259, Plenum Press, New York, London.
54. Martonosi A., (1972), w *Current Topics in Membranes and Transport*, wyd. Bronner F., Kleinzeller A., str. 83—197, Academic Press, New York, London.

55. MacLennan D. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4508—4518.
56. MacLennan D. H., Yip C. C., Iles G. H., Seeman P., (1973), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 460—468.
57. Ostwald T. J., MacLennan D. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 974—979.
58. MacLennan D. H., Wong P. T. S., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1231—1235.
59. Racker E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8189—8191.
60. Deamer D. W., Baskin R. J., (1969), *J. Cell Biol.*, **42**, 296—307.
61. Inesi G., (1976), *Biophysical J.*, **16**, 735—751.
62. Ikemoto N., Sreter F. A., Nakamura A., Gergely J., (1968), *J. Ultrastr. Res.*, **23**, 216—232.
63. Drabikowski W., Sarzała M. G., Wroniszewska A., Łągwińska E., Drzewiecka B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 158—170.
64. Michalak M., Sarzała M. G., Drabikowski W., (1977), praca w przygotowaniu.
65. Hasselbach W., Elfvin L. G., (1967), *J. Ultrastr. Res.*, **17**, 598—622.
66. Jilka R. L., Martonosi A., Tillack T. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7511—7524.
67. Green D. E., MacLennan D. H., (1967), w *Metabolic Pathways*, wyd. Grenberg D. M., t. 1, str. 47—111, Academic Press, New York, London.
68. Murphy A. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 160—166.
69. Le Maire M., Möller J. V., Tanford C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2336—2342.
70. Madeira V. M. G., Antunes-Madeira M. C., (1977), *Experientia*, **33**, 188—190.
71. Stewart P. S., MacLennan D. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 985—993.
72. Thorley-Lawson D. A., Green M. N., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 403—413.
73. Inesi G., Scales D., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3298—3306.
74. Stewart P. S., MacLennan D. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 712—719.
75. Thorley-Lawson D. A., Green M. N., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **59**, 193—200.
76. Hidalgo C., Ikemoto N., (1977), *J. Biol. Chem.* w druku.
77. Yu B. P., Masoro E. J., Morley T. F., (1975), *Life Science*, **17**, 343—348.
78. Hasselbach W., Migala A., Agostini B., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 600—607.
79. Leskes A., Siekevitz P., Palade G. E., (1971), *J. Cell Biol.*, **56**, 762—776.
80. Nilsson O. S., Dallner G., (1977), *J. Cell Biol.*, **72**, 568—583.
81. Meissner G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 51—68.
82. Steck T. L., Dawson G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2135—2142.
83. Nicolson G. L., Singer S. J., (1974), *J. Cell Biol.*, **60**, 236—248.
84. Lenard J., Compans R. W. (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 51—94.
85. Sarzała M. G., Zubrzycka E., Pilarska M., Drabikowski W., (1973), w *Protides of the Biological Fluids*, wyd. Peeters H., str. 109—113, Pergamon Press, New York.
86. MacLennan D. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 980—984.
87. Bretscher M. S., (1973), *Science*, **181**, 622—629.
88. Verkley A. J., Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Comfurius P., Kostelijn D., van Deenen L. L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 178—193.
89. Bretscher M. S., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 11—12.

90. Bretscher M. S., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 523—528.
91. Zborowski J., (1977), *Postępy Biochem.*, **23**,
92. Renoij W., van Golde L. M. G., Zwaal R. F. A., van Deenen L. L. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 53—58.
93. Fisher K. A., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 173—177.
94. Rothman J. E., Tsai D. K., Dawidowicz E. A., Lenard J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2361—2370.
95. Wirtz K. W. A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 95—117.
96. Nicolsson O. S., Dallner G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 453—458.
97. Rothman J. E., Dawidowicz E. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2809—2816.
98. Lenard J., Rothman J. E., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 391—395.
99. Eylar E. H., Madoff M. A., Brady O. V., Oncly J. L., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1992—2000.
100. Rifkin D. B., Compans R. W., Reich F., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6432—6437.
101. Kornberg R. D., McConnell H. M., (1976), *Biochemistry*, **10**, 1111—1120.
102. Alivisatos S. G. A., Kashket S., Denstedt O. F., (1956), *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34**, 46—60.
103. Kant J. A., Steck T. L., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 116—121.
104. Rubin C. S. R., Rosenfeld R. D., Rosen O. M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3735—3743.
105. Marchesi V. T., Palade G. E., (1967), *J. Cell. Biol.*, **35**, 385—404.
106. Wu S. H., McConnell H. M., (1975), *Biochemistry*, **14**, 847—854.
107. Roelofsen B., van Deenen L. L. H., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 245—257.
108. Knowles A. F., Eytan F., Racker F., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5161—5165.
109. Cone R. A., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 39—43.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE UPRZEJMIE INFORMUJE, ŻE W NIEDŁUGIM CZASIE UKAŻĄ SIĘ NASTĘPUJĄCE MONOGRAFIE BIOCHEMICZNE:

Tom 30 — Genom organizmów zwierzęcych — struktura i transkrypcja, pod redakcją M. Chorążego — ukaże się w 1977 roku.

Spis treści:

Kompleksy DNA-białko w jądrze komórkowym
(J. Rzeszotarska-Wolny)

Analiza DNA metodą ultrawirowania w gradiencie gęstości
(J. Filipski)

Organizacja sekwencji DNA w genomie Eucariota
(S. Szala)

Polimerazy organizmów zwierzęcych
(Z. Krawczyk)

Transkrypcja chromatyny
(M. Chorąży, M. Grabowska)

Tom 31 — Regulacja syntezy DNA w tkankach roślinnych
(Lidia D. Wasilewska) — ukaże się w roku 1978.

Tom 32 — Elementy enzymologii
pod redakcją J. Witwickiego i W. Ardelta — ukaże się
w 1978 roku.

Spis treści:

Ogólna charakterystyka enzymów
(J. Witwicki)

Budowa i funkcja enzymów
(I. Szumiel, M. Kłoczewiak)

Kinetyka reakcji enzymatycznych
(M. Kłoczewiak)

Badania grup czynnych enzymów
(G. Palamarczyk)

Spektrochemiczne badania konformacji i funkcji enzymów
(G. Muszyńska)

Inaktywacja i stabilizacja enzymów
(K. Kleczkowski)

Zasady izolowania enzymów
(W. Ardel)

Dystrubucja poprzez Biuro Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Freta 16, 00-227 Warszawa.

JÓZEF ZBOROWSKI*)

Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi

Exchange of Phospholipids between Biological Membranes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami struktur subkomórkowych. Udział frakcji cytoplazmatycznej w wymianie
- III. Białka przenoszące fosfolipidy
 - III-1. Białka przenoszące fosfatydylocholinę. Izolacja i własności
 - III-2. Białka przenoszące inne fosfolipidy
 - III-3. Immunologiczne dane świadczące o odrębności białek specyficznie przenoszących fosfatydylocholinę i fosfatydyloinozytol
- IV. Wymiana fosfatydylocholinoi pomiędzy błonami monomolekularnymi
- V. Liposomy w badaniach wymiany fosfolipidów. Transport fosfolipidów netto
- VI. Zastosowanie białek przenoszących fosfolipidy w badaniach nad asymetrią błon
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Exchange of phospholipids between subcellular structures. Effect of the cytoplasmic fraction on the exchange
- III. Phospholipid-transfer proteins
 - III-1. Phosphatidylcholine-transfer proteins. Purification and properties
 - III-2. Proteins participating in the transfer of other phospholipids
 - III-3. Immunological data on the specificity of proteins transferring phosphatidylcholine and phosphatidylinositol
- IV. Exchange of phosphatidylcholine between monolayers
- V. Application of liposomes in studies on phospholipid exchange. Net transfer of phospholipids
- VI. Phospholipid-exchange proteins as a tool in studies of asymmetry of membranes
- VII. Concluding remarks

*) Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

I. Wstęp

Większość fosfolipidów oprócz grupy polarnej zawiera dwa hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych. Taka budowa sprawia, iż fosfolipidy wprowadzone do roztworów wodnych spontanicznie tworzą pęcherzyki (liposomy), których błona wykazuje strukturę dwuwarstwową. W błonach biologicznych fosfolipidy układają się również w struktury dwuwarstwowe (bimolekularne). Łańcuchy kwasów tłuszczowych, dwóch warstw monomolekularnych fosfolipidów zwrócone są do siebie, podczas gdy ich grupy polarne skierowane są na zewnątrz. Grupy polarne fosfolipidów odpowiedzialne są za własności elektryczne błon oraz za interakcję z białkami wbudowanymi w fosfolipidową warstwę błony. Częstezki fosfolipidów mogą łatwo przemieszczać się w obrębie jednej warstwy monomolekularnej (dyfuzja lateralna) (1), podczas gdy ich wymiana pomiędzy dwiema warstwami monomolekularnymi w obrębie błony jest bardzo powolna (2—4).

Duża różnorodność błon biologicznych pod względem składu lipidowego i białkowego, a także niekiedy brak enzymów syntetyzujących te składniki błon nasuwa pytanie, w jaki sposób zachodzi ich biogeneza. Dobrym przykładem mogą być tu mitochondria wątroby, w których nie zachodzi ani synteza takich fosfolipidów jak fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina (5—8) występujących w obydwu błonach, ani też synteza fosfatydyloinozytolu (9) występującego tylko w błonie zewnętrznej.

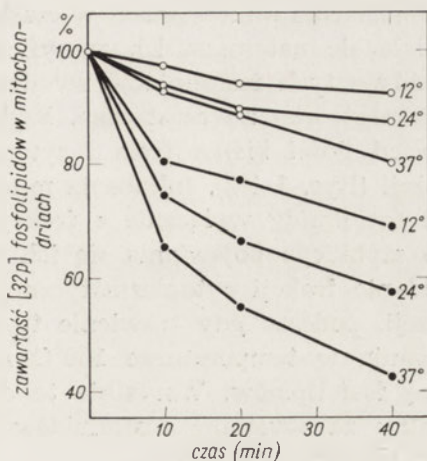
W ostatnich latach sporo uwagi poświęcono zagadnieniu wymiany fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi. Wykazany został udział w tym procesie specyficznych białek cytoplazmatycznych działających jako przenośniki fosfolipidów. Białka przenoszące fosfolipidy, jak wykazano w przypadku sztucznych błon lipidowych mogą również prowadzić transport netto określonych fosfolipidów. Być może, podobną rolę białka te pełnią i w warunkach fizjologicznych dostarczając fosfolipidów dla tworzenia niektórych błon biologicznych.

Różne aspekty badań nad wymianą i transportem fosfolipidów przedstawione były w szeregu artykułach przeglądowych w języku angielskim (10—13).

II. Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami struktur subkomórkowych. Udział frakcji cytoplazmatycznej

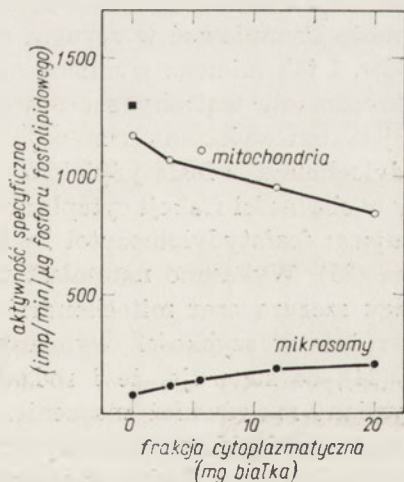
Pierwsze badania dotyczyły wymiany fosfolipidów pomiędzy różnymi lipoproteidami surowicy krwi (14—16) i lipoproteidami a chylomikronami (17). Wykazano też wymianę fosfolipidów mitochondrialnych z fosfolipidami surowicy krwi (18). Wirtz i Zilversmit (19) podjęli ba-

dania nad wymianą fosfolipidów pomiędzy mitochondriami a mikrosomami wątroby. Frakcje te, z których bądź jedna, bądź druga zawierały radioaktywne [32 P]fosfolipidy inkubowano w środowisku o niskiej sile jonowej z dodatkiem EDTA dla zapobieżenia fuzji błon. W tych warunkach w ciągu 30—60 minut inkubacji w temperaturze 37°C ilość wymienionych fosfo-



Ryc. 1. Wpływ temperatury na wymianę [32 P]fosfolipidów pomiędzy mitochondriami a mikrosomami wątroby szczura inkubowanymi w obecności frakcji cytoplazmatycznej z tej tkanki (20).

Środowisko inkubacyjne zawierało 0,25 M roztwór sacharozy + 1 mM roztwór EDTA (pH 7,4). Zawartość [32 P]fosfatydylocholina i [32 P]fosfatydyloetanoloaminy w mitochondriach po inkubacji odniesiono w procentach do ich ilości przed inkubacją; ○—○— fosfatydyloetanoloamina; ●—●— fosfatydylocholina.



Ryc. 2. Wpływ różnych ilości białka frakcji cytoplazmatycznej z wątroby szczura na wymianę fosfolipidów pomiędzy mitochondriami a mikrosomami tej tkanki (20).

Inkubację prowadzono 40 min. w temp. 37°C. ■ — aktywność specyficzna fosfolipidów mitochondrialnych przed inkubacją.

lipidów pomiędzy strukturami subkomórkowymi była niska. Znaczną stymulację wymiany powodowało dodanie frakcji cytoplazmatycznej z wątroby (supernatantu z nad mitochondriów pozbawionego lipoproteidów przez wytrącenie ich w pH 5,1). W obecności tej frakcji głównie wymieniana była fosfatydylocholina, znacznie wolniej natomiast wymieniana była fosfatydyloetanolamina. Ilość fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy w mitochondriach i mikrosomach w czasie inkubacji nie ulegała zmianie, zmieniała się natomiast ich specyficzna radioaktywność, co świadczyło, że każdy z tych fosfolipidów wymieniany jest pomiędzy błonami w proporcji cząsteczka na cząsteczkę. Szybkość wymiany obu fosfolipidów zależała od ilości białka frakcji cytoplazmatycznej, czasu i temperatury inkubacji (Ryc. 1 i 2). Inkubacja mitochondriów zawierających radioaktywne fosfolipidy wyłącznie z frakcją cytoplazmatyczną prowadziła do bardzo szybkiego pojawiania się ich w niewielkiej ilości w tej ostatniej. Poddanie frakcji cytoplazmatycznej dializie nie powodowało jej inaktywacji, podczas gdy trawienie trypsyną lub kilkuminutowe przetrzymywanie w temperaturze 100°C znosiło jej działanie stymulujące wymianę fosfolipidów. Wszystkie te dane sugerowały, że czynnik odpowiedzialny za wymianę fosfolipidów obecny we frakcji cytoplazmatycznej ma charakter białkowy.

Obecność czynnika (czynników) stymulujących wymianę fosfolipidów pomiędzy błonami wykazano we frakcji cytoplazmatycznej z różnych tkanek zwierzęcych jak wątroby szczura (19), świnki morskiej (21), królika (12) i wołu (22), mózgu szczura (23), świnki morskiej (24), wołu (25) i owcy (26), serca wołu (27), mięśni szkieletowych królika (28), nerki szczura (cyt. wg. 12), jelita szczura (29), płuc królika (12), tarczycy świni (30), a także drożdży (12, 31) i roślin (32). Zależnie od pochodzenia tkankowego frakcja cytoplazmatyczna może stymulować w różnym stopniu wymianę poszczególnych fosfolipidów. I tak mierząc wymianę fosfolipidów pomiędzy mitochondriami a mikrosomami wątroby szczura w obecności frakcji cytoplazmatycznej z tej tkanki wykazano następującą zależność szybkości wymiany: fosfatydylocholina > fosfatydyloinozytol > fosfatydyloetanolamina, podczas gdy w obecności frakcji cytoplazmatycznej z mózgu zależność ta była następująca: fosfatydyloinozytol > fosfatydylocholina > fosfatydyloetanolamina (25). Wykazano natomiast używając frakcji cytoplazmatycznej z mózgu szczura oraz mitochondriów i mikrosomów tej tkanki brak istotnych różnic w szybkości wymiany fosfatydylocholiny i fosfatydyloinozytolu (24), co sugeruje, że i rodzaj błon biologicznych użytych do badania wymiany ma również znaczenie.

Badania nad wymianą fosfolipidów pomiędzy mikrosomami a mitochondriami wykonane niezależnie w dwóch pracowniach (33, 34) wykazały, że wymiana ta w nieuszkodzonych mitochondriach dotyczy głównie błony zewnętrznej. Mała ilość radioaktywnej fosfatydylocholiny pojawiająca się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej po kilkunastominutowej

inkubacji prawdopodobnie związana jest z uszkodzeniem błony zewnętrznej mitochondriów i umożliwieniem bezpośredniego kontaktu z błoną wewnętrzną (34). Za sugestią tą przemawia brak białka przenoszącego fosfolipidy w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (33), a także stwierdzenie znacznie bardziej aktywnej wymiany fosfolipidów pomiędzy mikrosomami a pozbawionymi błony zewnętrznej mitochondriami (34). Ponadto, opierając się na badaniach dotyczących przemieszczania fosfolipidów pomiędzy dwiema warstwami monomolekularnymi (2—4) można sądzić, że barierę stanowi sama błona zewnętrzna mitochondriów. Można także przypuszczać, że przyleganie niektórych odcinków obydwu błon między sobą może umożliwiać wymianę fosfolipidów wewnątrz mitochondrionu. Za tą możliwością przemawia obserwacja znacznie większej inkorporacji fosfolipidów z mikrosomów do wewnętrznej błony mitochondrialnej mitochondriów spęczniałych otrzymanych po perfuzji wątroby *in situ* roztworem octanu wapnia w porównaniu do mitochondriów niespęczniałych otrzymanych z wątroby nieperfundowanej (35).

III. Białka przenoszące fosfolipidy

III-1. Białka przenoszące fosfatydylocholinę. Izolacja i własności

Pierwszą próbę izolacji białka przenoszącego fosfatydylocholinę podjęli Wirtz i Zilversmit (27). Frakcjonując homogenat serca wołu uzyskali oni około 80-krotne oczyszczenie białka w stosunku do frakcji cytoplazmatycznej. Tak oczyszczone białko stymulowało jednak obok wymiany fosfatydylocholiny i wymianę fosfatydyloinozytolu. W odróżnieniu od preparatu wyjściowego białko to nie wykazywało aktywności w stosunku do fosfatydyloetanoloaminy. Stosując dwukrotne wysalanie siarczanem amonu oraz sączenie molekularne przez Sephadex oczyszczono białko z wątroby wołu ponad 300-krotnie (22). Modyfikacja tej metody (36) pozwoliła na bardzo znaczne, bo ponad 2600-krotne oczyszczenie (Tabela 1). Otrzymane białko dawało pojedyncze pasmo w elektroforezie dyskowej na żelu poliakryloamidowym i było również homogenne przy zastosowaniu immunoelektroforezy i ogniskowania izoelektrycznego. Ciężar cząsteczkowy białka przenoszącego fosfatydylocholinę wynosi 22 000. Począwszy od drugiego etapu oczyszczania białko to wykazywało specyficzną wiązanie i przenoszenie wyłącznie fosfatydylocholiny. Oczyszczone białko zawiera fosfatydylocholinę w ilości 1 mol na mol białka (37) związaną niekowalencyjnie i odszczepialną przy pomocy rozpuszczalników organicznych (36) lub detergentów (38).

Białka przenoszące fosfatydylocholinę z innych tkanek nie zostały tak dalece oczyszczone jak białko z wątroby wołu. Wychodząc z frakcji cytoplazmatycznej serca wołu i stosując wysalanie siarczanem amonu,

Tabela 1

Oczyszczanie z wątroby wołu białka przenoszącego fosfatydylocholinę (36)

Etapy oczyszczania	Objętość (ml)	Białko (mg)	Aktywność specyficzna	Odzysk (%)	Stopień oczyszczenia w stosunku do frakcji cytoplazmatycznej
1. Doprowadzenie do pH 5,1	16 700	407 000	0,5	100	—
2. Doprowadzenie do pH 3,0	14 800	131 000	2	135	4
3. Wytrącenie siarczaniem amonu	2 590	66 000	3	104	6
4. Chromatografia na DEAE-celulozie	5 600	4 600	28	63	56
5. Chromatografia na CM-celulozie	340	235	430	50	860
6. Sączenie molekularne przez Sephadex G-50	670	39	1340	26	2680

dwukrotne sączenie molekularne przez Sephadex G-75 otrzymano dwie frakcje białkowe zdolne do wiązania i przenoszenia fosfatydylocholinę różniące się aktywnością i stopniem oczyszczenia. Frakcje te zdolne były również do wiązania i przenoszenia sfingomielinę (39). Zastępując powtórne sączenie molekularne chromatografią jonowymienną otrzymano z tego samego materiału frakcję białkową zdolną do wiązania i przenoszenia fosfatydylocholinę oczyszczoną 200—300 razy (40, 41). Ogniskowanie izoelektryczne tej frakcji prowadziło do wykazania obecności dwóch aktywnych białek.

Wysoką specyficzną wiązania i przenoszenia fosfatydylocholinę wykazywało również jedno z trzech oczyszczonych białek z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura. Białko to ma ciężar cząsteczkowy 16 000 i punkt izoelektryczny przy pH 8,4. Pozostałe dwa białka o punkcie izoelektrycznym przy niskim pH podobnie jak w przypadku białek z mózgu przenoszą fosfatydyloinozitol, a także i fosfatydylocholinę (42). Białko specyficzne wobec fosfatydylocholinę mające punkt izoelektryczny przy pH 8,4 izolowano także niezależnie w pracowni Zilversmita (43). Białko o punkcie izoelektrycznym przy pH 8,4 specyficznie wiążące fosfatydylocholinę przenosi 50% lub więcej tego fosfolipidu przenoszonego przez wszystkie białka przenoszące fosfolipidy w przypadku tkanki wątrobowej szczura (42, 43), podczas gdy zaledwie 10% w przypadku tkanki wątrobowej wołu, a w mięśniu sercowym tego zwierzęcia nie występuje w ogóle (43).

Ostatnio z frakcji cytoplazmatycznej mózgu wołu oczyszczone zostało także białko specyficzne wobec fosfatydylocholinę (44). Białko to ma punkt izoelektryczny przy pH 5,7. Jego udział w transporcie fosfatydylo-

choliny w stosunku do wszystkich białek tkanki mózgowej przenoszących ten fosfolipid określono na około 20%.

III-2. Białka przenoszące inne fosfolipidy

Jak już wspomniano frakcje białkowe otrzymane z serca stymulują oprócz wymiany fosfatydylocholiny także wymianę sfingomieliny (39). Helmkamp i wsp. (45) wyizolowali z mózgu wołu 2 białka różniące się między sobą punktem izoelektrycznym, stymulujące wymianę fosfatydyloinozytolu. Białka te stymulują także i wymianę fosfatydylocholiny. Stosunek ilości transportowanego przez te białka fosfatydyloinozytolu do ilości fosfatydylocholiny wynosi 1,7. Obydwa białka przenoszące fosfatydyloinozytol charakteryzują się niemal identyczną zdolnością wiązania i wymiany określonego rodzaju fosfolipidu i mają bardzo zbliżony ciężar cząsteczkowy i skład aminokwasowy. Białko o niższym punkcie izoelektrycznym jest mniej podatne na trawienie trypsyną.

Ostatnio z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura przy zastosowaniu sączenia molekularnego przez Sephadex G-75 wyodrębniono dwie frakcje białkowe stymulujące wymianę fosfatydyloetanolaminy (46). Z frakcji o mniejszej masie cząsteczkowej wyizolowano następnie 2 białka zdolne do wiązania i wymiany fosfatydyloetanolaminy. Obydwa białka oprócz wymiany fosfatydyloetanolaminy stymulowały także wymianę fosfatydylocholiny, fosfatydyloinozytolu, sfingomieliny oraz cholesterolu. W przeciwieństwie do białek przenoszących fosfatydylocholinę lub fosfatydyloinozytol oczyszczonych z wątroby i mózgu białka te były odporne na kilkuminutowe ogrzewanie w wyższych temperaturach (46). Własność tę wykorzystano przy ich oczyszczaniu.

Częściowo oczyszczone zostało także białko przenoszące fosfolipidy z bulw ziemniaka. Białko to o ciężarze cząsteczkowym około 22 000 stymuluje wymianę fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy i w znacznie mniejszym stopniu fosfatydyloinozytolu (47). Niektóre własności oczyszczonych białek zestawiono w Tabeli 2.

III-3. Immunologiczne dane świadczące o odrębności białek specyficznie przenoszących fosfatydylocholinę i fosfatydyloinozytol

Zastosowanie naprzemienne przeciwciał przeciwko białku przenoszącemu fosfatydylocholinę i fosfatydyloinozytol wykazało ich immunologiczną odrębność. Jednocześnie przeciwciała przeciwko oczyszczonym z mózgu białkom I i II przenoszącym fosfatydyloinozytol dawały nawzajem immunoprecipitaty (białko I z przeciwciałem przeciwko białku II i *vice versa*), co świadczy o ich zgodności pod względem immunologicznym. Zbadany został także efekt przeciwciał otrzymanych przeciwko oczyszczonym białkom specyficznym wobec fosfatydylocholiny i fosfatydyloinozy-

Źródło (tkanka)	Masa cząsteczkowa		obliczona ze składu amino- kwasowego	Punkt izoelektryczny	Przeniesiony fosfolipid ^a	Stożek oczyszczenia w stosunku do frakcji cytoplazmatycznej oznaczony dla główne- transportowanego fosfolipidu	Piśmiennictwo
	oznaczona przez Sephadex	przy pomocy elektroforezy w żelu poliakrylo- amidowym w obecności soli sodowej siar- czanu dodecylu					
Wątroba wołu	22 000	23 000	21 328	5,8	PC	2 680	(36)
Serce wołu							(39)
białko I	21 000	21 000		4,7	PC, SM ^b	295	
białko II		25 900		5,5	PC, SM ^b	179	
Serce wołu	21 000				PC ^c	210—300	(40, 41)
Mózg wołu							(44, 45)
białko I	26 500	32 300	31 200	5,2	PI, PC	508	
białko II	27 500	32 800	32 300	5,5	PI, PC	426	
białko III				5,7	PC		
Mózg owcy	22 000			5,4—5,6	PI, PC ^c	1 86 ^d	(26)
Wątroba szczura							(42)
białko I				5,1	PI, PC	348	
białko II				5,3	PI, PC	556	
białko III	16 300	15 800	15 023	8,4	PC	7 410	
Wątroba szczura							(43)
białko I	17 000	18 700		4,2—5,6	PC ^c	140	
białko II				8,4	PC ^c		
Wątroba szczura							(46)
białko I	20 000—30 000			4,7—5,8	PE ^e		
białko II	13 800			8,2—8,8	PI, PE, PC, SM	876 ^e	
białko III	13 500	12 500		8,6—9,0	PI, PE, PC, SM	f	
Bulwa ziemniaka	22 000—23 000				PC, PE, PI		(47)

PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanolamina; PI — fosfatydyloinozytol; SM — sfingomielina;

a — podkreślenie wskazuje na znaczną preferencję białka w stosunku do fosfolipidu;

b — możliwość transportu fosfatydyloinozytoli nie była badana;

c — możliwość transportu innych fosfolipidów nie była badana;

d — stopień oczyszczenia oznaczono względem PC;

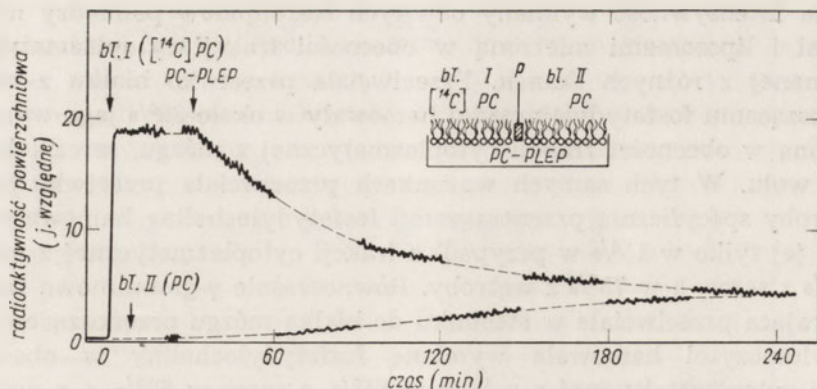
e — stopień oczyszczenia oznaczono względem PE;

f — stopień oczyszczenia w stosunku do frakcji cytoplazmatycznej nie mógł być oznaczony ze względu na obecność w niej enzymów lipolitycznych.

tolu na intensywność wymiany obu tych fosfolipidów pomiędzy mikro-somami i liposomami mierzoną w obecności frakcji cytoplazmatycznej otrzymanej z różnych tkanek. Przeciwciała przeciwko białku z mózgu przenoszącemu fosfatydyloinozytol hamowały w około 80% jego wymianę mierzoną w obecności frakcji cytoplazmatycznej z mózgu, serca lub wątroby wołu. W tych samych warunkach przeciwciała przeciwko białku z wątroby specyficznie przenoszącemu fosfatydylocholinę hamowały wymianę jej tylko w 15% w przypadku frakcji cytoplazmatycznej z mózgu, w 20% z serca, a w 75% z wątroby. Równocześnie γ -globulinowa frakcja zawierająca przeciwciała w stosunku do białka mózgu przenoszącego fosfatydyloinozytol hamowała wymianę fosfatydylocholinę w obecności frakcji cytoplazmatycznej z mózgu w 65%, z serca w 60%, a z wątroby w 10% (44).

IV. Wymiana fosfatydylocholinę pomiędzy błonami monomolekularnymi

Bezpośredniego dowodu, że białko oczyszczone z frakcji cytoplazmatycznej wątroby działa jako przenośnik fosfatydylocholinę dostarczyły badania Demela i współautorów (37) wykonane przy użyciu błon monomolekularnych zbudowanych z radioaktywnej [^{14}C]fosfatydylocholinę. Tworząc warstwę z około 20 nmoli radioaktywnej fosfatydylocholinę i wprowadzając do warstwy wodnej 20 nmoli oczyszczonego białka przenoszącego ten fosfolipid stwierdzono stopniowe obniżanie się powierzchniowej radioaktywności dochodzące do 50% po około 3 godzinach. Spadek radioaktywności powierzchniowej spowodowany był wymianę radioaktywnej fosfatydylocholinę wchodzącej w skład warstwy monomolekularnej z nieradioaktywną związaną z białkiem przenoszącym. W doświadczeniu przedstawionym na rycinie 3 wykazano (37) rzeczywisty udział białka przenoszącego fosfatydylocholinę w wymianie tego fosfolipidu pomiędzy dwiema błonami monomolekularnymi. Błona I zbudowana była z radioaktywnej fosfatydylocholinę, błona II z nieradioaktywnej fosfatydylocholinę o tym samym składzie kwasów tłuszczowych. Błony rozdzielone przegrodą, mogły kontaktować się jednak przez fazę wodną. Iniekcja białka przenoszącego fosfatydylocholinę do fazy wodnej prowadziła do spadku radioaktywności powierzchniowej błony I i przyrostu radioaktywności błony II aż do osiągnięcia stanu równowagi po około 240 minutach. Napięcie powierzchniowe obu błon wynoszące 30 dyn/cm w ciągu całego doświadczenia nie ulegało zmianie, co łącznie z wynikami pomiarów radioaktywności powierzchniowej świadczy zdecydowanie o wymianie cząsteczek fosfatydylocholinę pomiędzy błonami monomolekularnymi. Wymiana ta zachodzi wskutek kolizji białka przenoszącego fosfatydylocholinę z błoną monomolekularną. Białko przenoszące fosfatydylocholinę może również uczestniczyć w wymianie tego fosfolipidu pomiędzy błoną monomolekularną a liposomami. Wymiana ta zachodzi niezależnie od napięcia



Ryc. 3. Wymiana fosfatydylocholiny pomiędzy dwiema błonami monomolekularnymi w obecności specyficznego białka przenoszącego (37).

Błona I zbudowana jest z radioaktywnej fosfatydylocholiny (^{14}C PC), błona II z nieradioaktywnej fosfatydylocholiny o tym samym składzie kwasów tłuszczowych (PC). PC — PLEP — białko przenoszące fosfatydylocholinę; P — przegroda pomiędzy błonami monomolekularnymi.

powierzchniowego błony monomolekularnej, co sugeruje że białko przenoszące fosfatydylocholinę nie musi wnikać do błony dla utworzenia kompleksu (37).

V. Liposomy w badaniach wymiany fosfolipidów. Transport fosfolipidów netto

Badania nad wymianą fosfatydylocholiny pomiędzy liposomami podjęli Hellings i wsp. (48) opierając się na stwierdzeniu, że liposomy o dostatecznie dużym ujemnym ładunku powierzchniowym (zawierające 7 mol % kwasu fosfatydowego lub 9 mol % fosfatydyloinozytolu) zostają zatrzymane na kolumnie z DEAE-celulozy i można je w ten sposób oddzielić od liposomów obojętnych, zbudowanych wyłącznie z fosfatydylocholiny. W omawianych badaniach użyto liposomów z ^{14}C fosfatydylocholiny i liposomów zawierających nieradioaktywną fosfatydylocholinę, fosfolipidy kwaśne oraz ^3H cholesterol, który służył do badania odzysku liposomów z kolumny. Wymianę fosfatydylocholiny mierzono w obecności specyficznego białka z wątroby. Użycie liposomów zawierających wzrastające ilości kwasu fosfatydowego lub fosfatydyloinozytolu (wyższe ponad konieczne dla rozdzielu na kolumnie) powodowało hamowanie wymiany fosfatydylocholiny, przy czym znacznie większy efekt wywoływały liposomy zawierające fosfatydyloinozytol. Prawie całkowite zahamowanie wymiany następowało w przypadku liposomów zawierających 20 mol % kwasu fosfatydowego lub fosfatydyloinozytolu. Wyniki te wskazują wyraźnie, że ładunek powierzchniowy akceptora odgrywa istotną rolę w wymianie fosfolipidów odbywającej się przy udziale specyficznych białek przenoszących. W doświadczeniach kinetycznych wykaza-

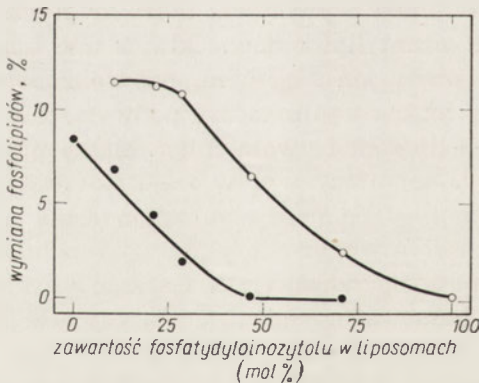
no (49) obniżenie stałej dysocjacji kompleksu białko przenoszące — liposom wraz ze wzrostem w tych ostatnich ilości kwasu fosfatydowego. Zwiększenie ujemnego ładunku powierzchniowego liposomów wskutek wprowadzenia kwasu fosfatydowego ułatwia interakcję białka wymieniającego fosfatydylocholinę z powierzchnią błony akceptora. W rezultacie mniej białka uwalnia się do środowiska i stąd hamowanie wymiany. Region grup polarnych liposomów zbudowanych z fosfatydylocholino i kwasu fosfatydowego jest prawdopodobnie luźniej „upakowany”, aniżeli liposomów utworzonych z samej fosfatydylocholino (50). Tłumaczyłoby to dlaczego białko transportujące fosfatydylocholinę ma ułatwiony kontakt z zewnętrzną warstwą monomolekularną w przypadku liposomów naładowanych ujemnie.

Wpływ ładunku powierzchniowego akceptora na wymianę fosfatydylocholino badano także w układzie mitochondria — liposomy (51). Wymianę mierzono w obecności oczyszczonego białka z wątroby specyficznego wobec fosfatydylocholino. Zależnie od składu liposomów a więc i ładunku obserwowano bądź większą, bądź mniejszą wymianę w stosunku do liposomów zbudowanych wyłącznie z fosfatydylocholino. Stymulację obserwowano w przypadku liposomów o ładunku dodatnim (związany z obecnością sterylaminy), hamowanie w przypadku liposomów o ładunku ujemnym związanym z obecnością fosfolipidów kwaśnych (kwasu fosfatydowego, fosfatydyloinozytolu, fosfatydyloseryny lub fosfatydyloglicerolu). Hamujące działanie fosfolipidów kwaśnych znosi dodanie do środowiska jonów Mg^{++} w stężeniu potrzebnym do zubożenia ich ujemnego ładunku (51). Jon Mg^{++} w stężeniu, które znosiło hamujący wpływ ujemnie naładowanych fosfolipidów wywoływał także drastyczne zmiany w ruchliwości elektroforetycznej liposomów. Odwrócenie hamowania wymiany fosfatydylocholino przez jon Mg^{++} na drodze zubożenia ujemnego ładunku liposomów można wytłumaczyć podwyższeniem stałej dysocjacji kompleksu białko — liposom i uwolnieniem białka przenoszącego do środowiska. Odmienny, hamujący wpływ ma natomiast jon Mg^{++} na wymianę fosfatydylocholino pomiędzy mitochondriami a liposomami o ładunku dodatnim (zawierającymi sterylamine) lub liposomami nie posiadającymi ładunku netto zbudowanymi wyłącznie z fosfatydylocholino. Podobnie jon Mg^{++} hamował wymianę fosfatydylocholino pomiędzy błoną monomolekularną a liposomami zbudowanymi wyłącznie z tego fosfolipidu. Działanie to wykazywały również i inne kationy ($La^{+++} > Mg^{++} \geq Ca^{++} > K^{+} = Na^{+}$) (51). Wpływ ich można wiązać z zaburzeniem oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy białkiem przenoszącym a grupą polarną fosfatydylocholino. Ostatnio (52) przy użyciu różnych syntetycznych analogów fosfatydylocholino wykazano, że za interakcję z miejscem wiążącym białka przenoszącego odpowiedzialna jest fosforylocholina wchodząca w skład cząsteczki fosfatydylocholino. Usunięcie bowiem z czwartorzędowego azotu fosfatydylocholino jednej z grup

metylowych lub zastąpienie grupy metylowej etylową lub propylową hamowało lub całkowicie znosiło stymulowaną przez białko wymianę. Mniejsze znaczenie miało natomiast zastąpienie wiązania estrowego eterowym lub wprowadzenie dwóch nasyconych kwasów tłuszczowych do cząsteczki fosfatydylocholinylu. Białko przenoszące fosfatydylocholinę nie przenosi jednak lizofosfatydylocholinylu, co sugeruje, że obecność dwóch węglowodorowych łańcuchów działa stabilizująco na kompleks fosfolipid — białko przenoszące.

Użycie liposomów o określonym składzie lipidowym otworzyło możliwość zbadania czy udział białek przenoszących ogranicza się wyłącznie do wymiany fosfolipidów, czy też mogą one pośredniczyć w transporcie jednokierunkowym (transporcie netto).

Transport netto fosfatydylocholinylu wykazany został przez Kaga i Johnsona i Rackera (53). Używając liposomów z fosfatydylocholinylu oraz białka specyficznego wobec tego fosfolipidu wykazali oni zdolność do rekonstrukcji fosforylacji pęcherzyków zawierających fosfatydyloetanoloaminę, kardiolinę i odpowiednie białka enzymatyczne. Możliwość jednokierunkowego transportu sfingomieliny wykazana została przez Ehnholm i Zilvermita (39). Również wykazany został transport netto fosfatydyloinozytolu do błony liposomów fosfatydylocholinylowych (54, 55). Nie wiadomo jednak czy przenoszenie fosfatydylocholinylu w kierunku odwrotnym nie kompensuje transportu fosfatydyloinozytolu. Transport fosfatydyloinozytolu podobnie jak fosfatydylocholinylu zależy od ładunku powierzchniowego błony. Zwiększenie ujemnego ładunku li-



Ryc. 4. Wpływ składu lipidowego liposomów na wymianę fosfatydylocholinylu i fosfatydyloinozytolu (26).

Liposomy zbudowane z [^{14}C]fosfatydylocholinylu i [^{32}P]fosfatydyloinozytolu w różnych stosunkach molarnych inkubowano w ciągu 1 godz. w temp. 30°C z mitochondriami i frakcją cytoplazmatyczną z mózgu owcy. Po inkubacji mitochondria odwirowywano i analizowano na zawartość obydwóch rodzajów radioaktywnych fosfolipidów. Wymianę każdego z fosfolipidów obliczano w procentach w stosunku do ich zawartości w liposomach wyjściowych. ● — wymiana fosfatydylocholinylu, ○ — wymiana fosfatydyloinozytolu. Doświadczenie przedstawione na rycinie sugeruje obecność we frakcji cytoplazmatycznej dwóch różnych białek przenoszących fosfolipidy.

posomów fosfatydylocholinowych przez wprowadzenie fosfatydyloinozytolu hamowało transport tego ostatniego fosfolipidu z mikrosomów (jako donatora) w obecności oczyszczonego z mózgu białka I specyficznego wobec fosfatydyloinozytolu (54), lub frakcji cytoplazmatycznej z wątroby zawierającej to białko (55). Używając liposomów zbudowanych z fosfatydylocholin i fosfatydyloinozytolu w różnych stosunkach molarnych Brammer i Shelta wy (26) stwierdzili różną wymianę tych fosfolipidów w zależności od ich proporcji, a więc i ładunku liposomów (Ryc. 4). Możliwość transportu innych fosfolipidów takich jak kwas fosfatydowy, a także fosfatydyloseryna, która w warunkach fizjologicznych ulega w mitochondriach dekarboksylacji do fosfatydyloetanolaminy (56) nie jest jasna. Transport kwasu fosfatydowego będącego głównym prekursorem biosyntezy wielu fosfolipidów (patrz poz. 57), z mitochondriów, gdzie może być syntetyzowany (8, 58, 59) do mikrosomów mógłby mieć ogromne znaczenie fizjologiczne. Transport kwasu fosfatydowego przy udziale białka przenoszącego był wprawdzie postulowany (44), lecz sugestia ta wydaje się być jednak wątpliwa na podstawie zaobserwowanej stymulacji transportu tego fosfolipidu pomiędzy liposomami a mitochondriami zarówno przez frakcję cytoplazmatyczną, matriks mitochondrialną jak i albuminę surowiczą (60). Podobnie wątpliwy jest udział specyficznego białka w transporcie fosfatydyloseryny do mitochondriów (61).

Inny aspekt badań nad wymianą fosfolipidów dotyczy wymiany różnomolekularnych ich rodzajów (patrz poz. 57). Ostatnio zasugerowano (62) istnienie we frakcji cytoplazmatycznej wątroby szeregu białek przenoszących różne rodzaje molekularne fosfatydylocholin. Sugestia ta została oparta o stwierdzenie pewnej specyficzności wymiany cząsteczek fosfatydylocholin w zależności od rodzaju kwasu tłuszczowego w pozycji 2 a niezależnie od temperatury przejścia fazowego fosfolipidu. Według wcześniejszych danych frakcja cytoplazmatyczna z wątroby w układzie mikrosomy — mitochondria tej tkanki stymulowała w sposób niespecyficzny wymianę różnych rodzajów molekularnych fosfatydylocholin (63).

VI. Zastosowanie białek przenoszących fosfolipidy w badaniach nad asymetrią błon

Pierwsze badania nad asymetrycznym rozmieszczeniem różnych fosfolipidów dotyczyły błony erytrocytów. Zastosowano w nich (64, 65) związki organiczne nieprzechodzące przez błonę, reagujące z fosfatydyloseryną i fosfatydyloetanolaminą lub wyłącznie z fosfatydyloetanolaminą. Dla wykazania asymetrycznego rozmieszczenia różnych fosfolipidów w błonie erytrocytów zastosowano też trawienie przy pomocy szeregu oczyszczonych fosfolipaz i sfingomielinazy (66).

Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów (67) i cholesterolu (68)

w dwuwarstwowej błonie liposomów wykazano przy pomocy techniki jądrowego rezonansu paramagnetycznego.

Inną dogodną możliwością badania asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonach biologicznych i liposomach stwarza użycie białek przenoszących fosfolipidy. Białka te znalazły zastosowanie ze względu na to, iż nie wnikając w głąb dwuwarstwowej fosfolipidowej struktury błony mogą wymieniać fosfolipidy zawarte tylko w zewnętrznej warstwie monomolekularnej. Mierząc wymianę radioaktywnej fosfatydylocholiny pomiędzy liposomami o pojedynczej warstwie bimolekularnej a mitochondriami wątroby (3) lub błoną erytrocytów (4) wykazano, że z całej puli tego fosfolipidu w błonie liposomu może ulegać wymianie 60—70%. Pozostałe 30—40% fosfatydylocholiny nie ulegało wymianie, a zatem — jak wnioskowano — znajduje się w wewnętrznej warstwie monomolekularnej. Podobną asymetrię stwierdzono poddając liposomy działaniu fosfolipazy D (3). Fosfatydylocholina wprowadzona do zewnętrznej warstwy błony liposomów może być z niej usuwana także na drodze wymiany. Bardzo powoli natomiast zachodzi wymiana fosfatydylocholiny pomiędzy dwiema warstwami monomolekularnymi w obrębie tej samej błony (angielski termin *flip-flop*). Jak wykazano przy użyciu białek przenoszących połowiczny czas osiągnięcia równowagi pomiędzy dwiema warstwami monomolekularnymi jest rzędu od kilku do kilkunastu dni w temperaturze 37°C (3, 4, 69). Według wcześniejszych danych Kornberga i Mc Connella (2) czas ten oznaczony przy pomocy fosfatydylocholiny zawierającej paramagnetyczny „znacznik” spinowy wynosił 6,5 godziny. Krótszy czas osiągnięcia równowagi stwierdzony w tych badaniach spowodowany jest najprawdopodobniej wprowadzeniem heterocyklicznego znacznika spinowego do cząsteczki fosfatydylocholiny. Przy zastosowaniu białek przenoszących fosfolipidy wykazano asymetryczne rozmieszczenie różnych fosfolipidów w błonie erytrocytów (4, 69) i wirusa grypy (70). Białka przenoszące dostarczając fosfolipidów mogą uczestniczyć również w tworzeniu nowych asymetrycznych błon. Wykazano to zarówno w przypadku liposomów (4, 71) jak i błon biologicznych (72, 73).

VII. Uwagi końcowe

Białka wykazujące zdolność specyficznego wiązania i wymiany fosfolipidów mogą być w dużym stopniu odpowiedzialne za obserwowaną asymetrię błon cytoplazmatycznych. Białka te mogą również uczestniczyć w biogenezie błon dostarczając nowych fosfolipidów na drodze transportu netto. Wprowadzenie fosfolipidów, a wraz z nimi określonego ładunku elektrycznego może także mieć istotne znaczenie w regulacji aktywności wielu enzymów błonowych.

PIŚMIENICTWO

1. Kornberg R. D., Mc Connell H. M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2564—2568.
2. Kornberg R. D., Mc Connell H. M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1111—1120.
3. Johnson L. W., Hughes M. E., Zilversmit D. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 176—185.
4. Rothman J. E., Dawidowicz E. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2809—2816.
5. Wilgram G. F., Kennedy E. P., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 2615—2619.
6. Mc Murray W. C., Dawson R. M. C., (1969), *Biochem. J.*, **112**, 91—108.
7. Jungalwala F. B., Dawson R. M. C., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 399—402.
8. Zborowski J., Wojtczak L., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 73—84.
9. Strunecká A., Zborowski J., (1975), *Comp. Biochem. Physiol.*, **50B**, 55—60.
10. Dawson R. M. C., (1973), *Sub-Cell. Biochem.*, **2**, 69—89.
11. Wirtz K. W. A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 95—117.
12. Zilversmit D. B., Hughes M. E., (1976), w *Methods in Membrane Biology*, red. Korn E. D., t. 7, str. 211—259, Plenum Press, New York, London.
13. Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1977), *Trends in Biochemical Sciences*, **2**, 49—51.
14. Eder H. A., Bragdon J. I., Boyle E., (1954), *Circulation*, **10**, 603.
15. Kunkel H. G., Bearn A. G., (1954), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **86**, 887—891.
16. Florsheim W. H., Morton M. E., (1957), *J. Appl. Physiol.*, **10**, 301—304.
17. Mc Candless E. L., Zilversmit D. B., (1958), *Am. J. Physiol.*, **193**, 294—300.
18. Tarlov A., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 458.
19. Wirtz K. W. A., Zilversmit D. B., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3596—3602.
20. Wirtz K. W. A., Zilversmit D. B., (1969), *Biochem. Biophys. Acta*, **193**, 105—116.
21. Zilversmit D. B., (1971), *J. Lipid Res.*, **12**, 36—42.
22. Wirtz K. W. A., Kamp H. H., van Deenen L. L. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 606—617.
23. Possmayer F., (1974), *Brain Res.*, **74**, 167—174.
24. Miller E. K., Dawson R. M. C., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 823—835.
25. Harvey M. S., Wirtz K. W. A., Kamp H. H., Zegers B. J. M., van Deenen L. L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 234—239.
26. Brammer M. J., Sheltawy A., (1975), *J. Neurochem.*, **25**, 699—705.
27. Wirtz K. W. A., Zilversmit D. B., (1970), *FEBS Letters*, **7**, 44—46.
28. Sarzała M. G., Zborowski J., dane niepublikowane.
29. Lutton C., Zilversmit D. B., (1976), *Lipids*, **11**, 16—20.
30. Jungalwala F. B., Freinkel N., Dawson R. M. C., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 19—33.
31. Cobon G. S., Crowfoot P. D., Murphy M., Linnane A. W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 255—259.
32. Abdelkader A. B., Mazliak P., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **15**, 250—262.
33. Blok M. C., Wirtz K. W. A., Scherphof G. L., (1971), *Biochem. Biophys. Acta*, **233**, 61—75.
34. Wojtczak L., Barańska J., Zborowski J., Drahota Z., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 41—52.

35. Ruigrok Th. J. C., van Zaane D., Wirtz K. W. A., Scherphof G. L., (1972), *Cytobiologie*, **5**, 412—421.
36. Kamp H. H., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 313—325.
37. Demel R. A., Wirtz K. W. A., Kamp H. H., Geurts van Kessel W. S. M., van Deenen L. L. M., (1973), *Nature, New Biology*, **246**, 102—105.
38. Kamp H. H., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 401—414.
39. Ehnholm C., Zilversmit D. B., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1719—1724.
40. Johnson L. W., Zilversmit D. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 165—175.
41. Zilversmit D. B., Johnson L. W., (1975), w *Methods in Enzymology*, red. Lowenstein J. M., t. 35, str. 262—269, Academic Press, New York.
42. Lumb R. H., Kloosterman A. D., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 15—22.
43. Lutton C., Zilversmit D. B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 370—379.
44. Helmkamp G. M. Jr., Nelemans S. A., Wirtz K. W. A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 168—182.
45. Helmkamp G. M. Jr., Harvey M. S., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6382—6389.
46. Bloj B., Zilversmit D. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1613—1619.
47. Kader J. C., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 31—44.
48. Hellings J. A., Kamp H. H., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 601—605.
49. van den Besselaar A. M. H. P., Helmkamp G. M. Jr., Wirtz K. W. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1852—1858.
50. Flanagan M. T., Hesketh T. R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 535—545.
51. Wirtz K. W. A., Geurts van Kessel W. S. M., Kamp H. H., Demel R. A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 515—523.
52. Kamp H. H., Wirtz K. W. A., Baer P. R., Slotboom A. J., Rosenthal A. F., Paltauf F., van Deenen L. L. M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1310—1316.
53. Kagawa Y., Johnson L. W., Racker E., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 245—251.
54. Harvey M. S., Helmkamp G. M. Jr., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1974), *FEBS Letters*, **46**, 260—262.
55. Zborowski J., Wojtczak L., (1975), *FEBS Letters*, **51**, 317—320.
56. Dennis E. A., Kennedy E. P., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 263—267.
57. Zborowski J., Sarzała M. G., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 23—34.
58. Monroy G., Rola F. H., Pullman M. E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6884—6894.
59. Bjerve K. S., Daae L. N. W., Bremer J., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 249—254.
60. Wojtczak L., Zborowski J., (1975), *10th FEBS Meeting, Paris*, Abstracts, Abst. No. 1042.
61. Barańska J., Wojtczak L., (1976), *FEBS Letters*, **71**, 83—86.
62. Schulze G., Jung K., Kunze D., Egger E., (1977), *FEBS Letters*, **74**, 220—224.
63. Wirtz K. W. A., van Golde L. M. G., van Deenen L. L. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 176—179.

64. Bretscher M. S., (1973), *Science*, **181**, 622—629.
65. Gordesky S. E., Marinetti G. V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1027—1031.
66. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Comfurius P., van Deenen L. L. M., (1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **406**, 83—96.
67. Berden J. A., Berker R. W., Radda G. K., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 186—208.
68. Huang C.-H., Sipe J. P., Chow S. T., Martin R. B., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 359—362
69. Bloj B., Zilversmit D. B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1277—1283.
70. Rothman J. E., Tsai D. K., Dawidowicz E. A., Lenard J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2361—2370.
71. Barsukov L. I., Shapiro Y. E., Viktorov A. V., Volkova V. I., Bystrov V. F., Bergelson L. D., (1975), *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 211—226.
72. Rousselet A., Colbeau A., Vignais P. M., Devaux P. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 372—384.
73. Barsukov L. I., Kulikov V. I., Bergelson L. D., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 704—711.

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT *)

Metabolizm aminoanalogów folianu

Metabolism of Aminoanalogues of Folate

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Podstawienia we fragmencie pterydynowym cząsteczki
 - II-1. Hydroksylacja
 - II-2. Acetylacja
 - II-3. Formylacja i deaminacja
- III. Biosynteza poliglutaminianów ametoptyerynowych
- IV. Rozkład aminowych analogów folianu
 - IV-1. Przekształcenie w kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy
 - IV-2. Rozkład do prostych pterydyn
- V. Własności metabolitów analogów folianu
 - V-1. Metabolity analogów folianu jako inhibitory reduktazy dihydrofolianowej
 - V-2. Porównanie własności biologicznych ametoptyeryny oraz produktów jej przemian
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Substitutions in the pteridine moiety of the analogue molecule
 - II-1. Hydroxylation
 - II-2. Acetylation
 - II-3. Formylation and deamination
- III. Biosynthesis of amethopterin polyglutamates
- IV. Decomposition of amino analogues of folate
 - IV-1. Formation of 2,4-diamino-10-methylpteroic acid
 - IV-2. Formation of simple pteridines
- V. Properties of the metabolites of folate analogues
 - V-1. Metabolites of folate analogues as inhibitors of dihydrofolate reductase
 - V-2. Comparison of biological properties of amethopterin and its metabolites
- VI. Concluding remarks

*) Dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

I. Wstęp

W 1947 roku zsyntetyzowano pierwszy analog folianu — aminopterynę, związek różniący się od witaminy jedynie obecnością dodatkowej grupy aminowej przyłączonej do atomu węgla w pozycji 4 rdzenia pterydynowego (1, 2). W następnych latach otrzymano cały szereg różnego typu analogów folianu (patrz artykuły przeglądowe 3, 4), z których nadal najszerze zastosowanie posiadają 4-aminowe analogi, jak wspomniana już aminopteryna a zwłaszcza jej N-10 metylowa pochodna — ametoptyryna^{*)} (Schemat 1). Ametopterynę stosuje się obecnie w leczeniu coraz większej liczby chorób nowotworowych takich, jak na przykład białaczki limfoblastyczne o ostrym przebiegu (6), rak kosmówkowy (choriocarcinoma, 7), osteosarkoma (8, 9), niektóre raki wątroby (10) itp.

Efektywność ametoptyryny, jako leku przeciwnowotworowego, warunkuje między innymi wielkość dawki (11), sposób podania (11, 12, 13), jak również współdziałanie z innymi chemioterapeutykami (14—18).

Znaczna toksyczność ametoptyryny dla ssaków oraz częste występowanie oporności na działanie tego antymetabolitu, skłaniają do ciągłych poszukiwań zmierzających do otrzymania różnych pochodnych tego analogu. Są to związki bądź to łatwiej pobierane przez komórki jak np. estry alkilowe ametoptyryny (19, 20) bądź też dłużej niż ametoptyryna pozostające w osoczu krwi — ametoptyryna w kompleksie z albuminą (21, 22), czy też z rozpuszczalnymi w wodzie makrocząsteczkami na przykład typu dekstranów (22). Kompleksy ametoptyryny z makrocząsteczkami, chociaż nie zawsze bardziej skuteczne w leczeniu nowotworów niż ametoptyryna, są jednak tolerowane przez organizm myszy w wyższych stężeniach niż ametoptyryna (21). Podanie do krwioobiegu liposomów z „uwięzioną” ametoptyryną (23, 24) to jeden ze sposobów nie tylko pozwalających na stosunkowo precyzyjne wprowadzenie analogu do określonych organów (w szczególności wątroby i śledziony), lecz także powodujących obniżenie szybkości spadku ilości analogu we krwi, a w konsekwencji przedłużenie jego działania.

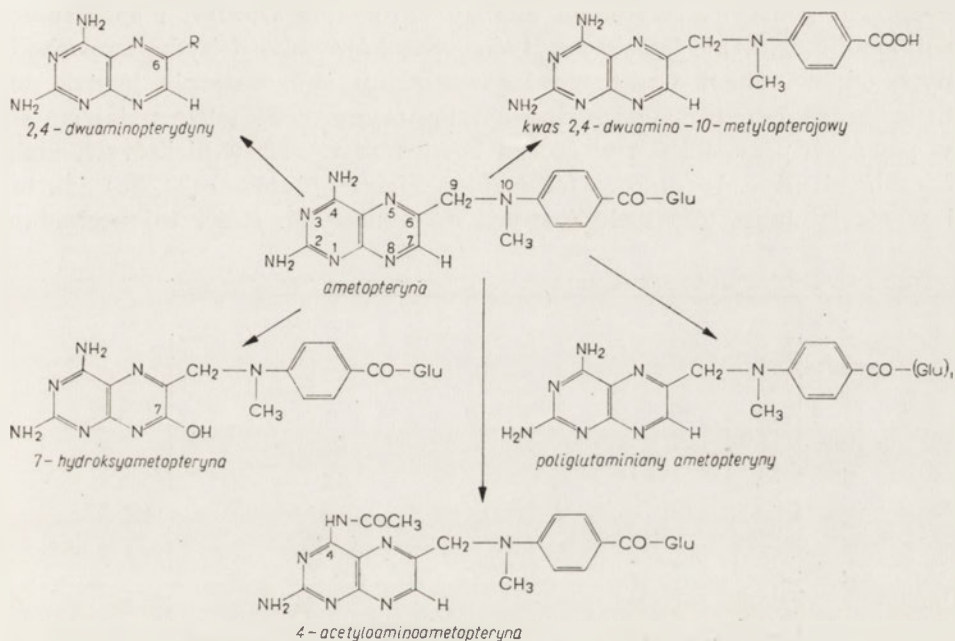
Przez szereg lat sądzono, że 4-aminowe analogi folianu są związkami stosunkowo stabilnymi i przynajmniej w tkankach ssaków nie ulegającymi znacznieszym przemianom. Niemniej jednak już w 1954 roku ukazały się prace J a c o b s o n a (25, 26) wskazujące na zanik hamującego wzrost fibroblastów działania aminopteryny, po 24-godzinnej inkubacji tego analogu bądź to z embrionalnymi osteoblastami kurczęcia bądź też mysimi komórkami białaczkowymi. Reaktywacja zinaktywowanej aminopteryny następowała po krótkiej kwaśnej hydrolizie (26, 27) co sugerowało, że w procesie inaktywacji aminopteryny następowały pewne

^{*)} Biochemiczne podstawy działania ametoptyryny będą omówione w artykule publikowanym w następnym numerze *Postępów Biochemii* (5).

przegrupowania w obrębie cząsteczki, być może polegające na cyklizacji w reszcie kwasu glutaminowego.

Intensywne badania zmierzające do wykazania przemian analogów folianu zarówno w bakteriach jak i tkankach zwierząt wyższych, rozpoczęte w latach sześćdziesiątych, stają się obecnie coraz bardziej pilne i niezbędne ze względu na częste stosowanie w terapii nowotworów analogów folianu w ilościach wielokrotnie przewyższających dawki stosowane uprzednio (28—32). Jak zostanie omówione poniżej, właśnie po zastosowaniu ametoptyeryny w dawce rzędu kilkuset miligramów na kg wagi ciała pojawiają się w tkankach i płynach ustrojowych ssaków znaczne ilości różnych produktów jej przemian, co nie może być bez znaczenia w chemioterapii.

Przemiany ametoptyeryny (Schemat 1) mogą polegać na modyfikacjach



Schemat 1. Przemiany ametoptyeryny w bakteriach i tkankach zwierząt.

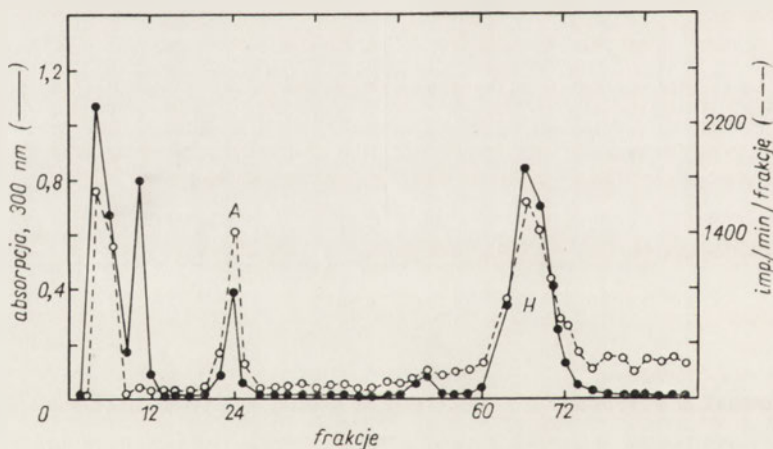
R — oznacza podstawnik w pozycji 6 rdzenia pterydynowego, którym może być grupa metylowa, hydroksylowa lub aldehydowa. Glu — kwas glutaminowy, n — liczba reszt glutaminowych w cząsteczce.

cząsteczki analogu, takich jak hydroksylacja, acetylacja czy też dołączanie dodatkowych reszt glutaminianowych lub na rozszczepieniu cząsteczki w różnych miejscach i w efekcie na usunięciu z niej krótszych lub dłuższych fragmentów. W większości przypadków powstałe produkty przemiany analogu charakteryzują się odmiennymi właściwościami od związku wyjściowego, mogą więc wywoływać objawy uboczne.

II. Podstawienia we fragmencie pterydynowym cząsteczki

II-1. Hydroksylacja

Znalezienie w 1960 r. przez Oliverio i Loo (33) w moczu niektórych ssaków traktowanych dwuchloroametoptyeryną hydroksypochodnej tego analogu stanowiło pierwsze doniesienie o możliwości przemian aminoanalogów folianu w tkankach ssaków (Schemat 1). Związek podobnego typu wykryto wkrótce także w moczu królików po podaniu im ametoptyeryny (34). Pierwotnie sądzono, że takie pochodne dwuchloroametoptyeryny lub ametoptyeryny posiadają dwie grupy hydroksylowe umiejscowione w pozycji 4 i 7 rdzenia pterydynowego (33—35). Obecność grupy hydroksylowej w pozycji 4 mogła bowiem wynikać z deaminacji grupy aminowej dołączonej do rdzenia pterydynowego w tej pozycji. Na podstawie wyników analizy chromatograficznej i spektralnej ustalono ostatecznie strukturę tych związków jako 7-hydroksypochodnych odpowiednich 4-aminoanalogów folianu (36). Ostatnio jednak doniesiono, że 7-hydroksypochodna ametoptyeryny może także pojawiać się w pewnych przypadkach w osoczu krwi oraz w moczu niektórych małp naczelnych (Ryc. 1) (*Macaca fasciculata*, *Macaca mulatta*) (37, 38), jak też i w moczu ludzi (38) traktowanych ametoptyeryną. Ilości tej pochodnej



Ryc. 1. Ametoptyeryna oraz 7-hydroksyametoptyeryna w moczu małpy *Rhesus* po infuzji [^3H]ametoptyeryny (200 mg/kg) (38).

Mocz zbierano po 12—24 h i próbki chromatografowano na kolumnie z DEAE-celulozy. A — ametoptyeryna; H — 7-hydroksyametoptyeryna. Radioaktywność we frakcjach 2—8 pochodzi z radioaktywnych zanieczyszczeń ametoptyeryny.

niekiedy są znaczne i mogą stanowić po 48 godzinach od momentu iniekcji ametoptyeryny aż 33% ogólnej ilości leku wydalonego w moczu pacjenta (38). Obecność utlenionej pochodnej ametoptyeryny w moczu ssaków

naczelnych była zaskakująca w świetle powszechnie wówczas panującego poglądu, że ametoptyeryna nie ulega znaczącym przemianom w tkankach ssaków naczelnych i wydalana jest w moczu w postaci niezmienionej (39, 40). Należy podkreślić, że w badaniach, w których wykryto 7-hydroksypochodną ametoptyeryny w płynach ustrojowych ssaków, analog ten zastosowano w ilościach wielokrotnie przewyższających tzw. dawki konwencjonalne i sięgających rzędu 200 mg ametoptyeryny/kg masy ciała człowieka.

Hydroksylacja rdzenia pterydynowego analogów folianu następuje na drodze enzymatycznej (41, 34). Enzym katalizujący tę reakcję, zwany początkowo oksydazą ametoptyeryny, okazał się identyczny z metaloflawoproteidem, oksydazą aldehydową (E.C.1.2.3.1), której substratami są przede wszystkim alifatyczne i aromatyczne aldehydy oraz różnego typu N-heterocykliczne związki (42, 36). Spośród licznych analogów folianu oksydaza aldehydowa najefektywniej utlenia alifatyczne estry ametoptyeryny (36, 43). Tak np. K_m dwumetylowego estru ametoptyeryny wynosi 0,004 mM, podczas gdy K_m ametoptyeryny jest kilkadziesiąt razy wyższe i wynosi 0,26 mM (43). Produkt bakteryjnego rozkładu ametoptyeryny — kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy (patrz rozdział IV-1) również ulega enzymatycznej hydroksylacji i to z podobną intensywnością jak ametoptyeryna (44). Folian natomiast nie stanowi substratu oksydazy aldehydowej (36). Poziom aktywności tego enzymu, jak również jego specyficzność w stosunku do różnych analogów folianu są bardzo różne w wątrobie ssaków różnych gatunków (Tabela 1). Tak np. oksydaza aldehy-

Tabela 1

Intensywność utleniania*) niektórych analogów folianu przez oksydazę aldehydową z wątroby ssaków kilku gatunków (36, modyf.).

Źródło enzymu	Dwuchloroametoptyeryna	Ametoptyeryna	Aminopteryna
Królik	2 740	2 182	316
Szczur	83	4	< 0,1
Świnka morska	17 000	49	490
Człowiek	3—5	< 0,1	< 0,1

*) Intensywność utleniania wyrażono w $\mu\text{molach} \times 10^4$ przereagowanego substratu/h/mg białka

dowa z wątroby królika charakteryzuje się wysoką aktywnością w stosunku do ametoptyeryny i jej chlorowcowej pochodnej, niską zaś w stosunku do aminopteryny. Enzym z wątroby człowieka odznacza się bardzo niską aktywnością wobec wszystkich badanych substratów, przy czym znacząca aktywność wykazuje on tylko w stosunku do dwuchloroametoptyeryny. Wydaje się przeto, że niska aktywność oksydazy aldehydowej z wątroby człowieka w stosunku do 4-aminoanalogów folianowych może stanowić

przyczynę braku hydroksylacji ameopteryny w przypadku stosowania tego analogu w niskich dawkach. Dopiero użycie ameopteryny w wysokich dawkach, powodujących zwiększenie jej stężenia w tkankach do wartości przewyższających wartość K_m (rzędu 0,1 mM; 42) enzymu, może doprowadzić do nagromadzenia się utlenionej pochodnej ameopteryny w moczu.

II-2. Acetylacja

Ameopteryna i aminopteryna w wyniku inkubacji z wyciągami z wątroby gołębia (w warunkach zapewniających prawidłowy przebieg acetylacji amin aromatycznych) tracą aktywność jako inhibitory wzrostu *Streptococcus faecalis* (45). Ulegają one wówczas pod działaniem enzymów acylujących przekształceniu w 4-acetyloaminopochodne. Intensywność acetylacji analogów folianu hamują w znacznym stopniu także aminy aromatyczne, jak np. kwas p-aminobenzoowy lub sulfonamidy, folian natomiast nie jest inhibitorem tego procesu. Folian nie jest także substratem enzymów acylujących z wątroby gołębia.

Współzawodniczenie o ten sam układ enzymatyczny pochodnych kwasu p-aminobenzoowego oraz syntetycznych 4-aminoanalogów folianu wyjaśnia więc wcześniejsze dane mówiące o hamowaniu przez ameopterynę acetylacji niektórych amin aromatycznych (46, 47).

II-3. Formylacja i deaminacja

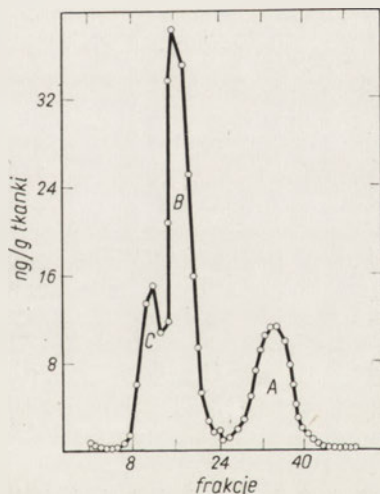
W wyniku inkubacji aminopteryny z wyciągami buforowymi z wątroby szczura pojawia się uformylowana pochodna tego związku (48). W procesie katalizowanym najprawdopodobniej przez formylazę tetrahydrofolianu następuje dołączenie grupy formylowej, pochodzącej z przemian histydyny, do azotu w pozycji 10 aminopteryny. Jednocześnie obok formyloaminopteryny pojawiają się pewne ilości 10-formylofolianu (49). Ponieważ w stosowanych warunkach eksperymentalnych aminopteryna nie ulegała przekształceniu w folian Slavik przypuszcza, że formyloaminopteryna a nie aminopteryna może stanowić substrat deaminaz wątrobowych.

Wzrost niektórych pierwotniaków (50) oraz bakterii (*Streptococcus faecalis/A*, szczep oporny na ameopterynę, 51) na podłożu z dodatkiem aminopteryny sugeruje występowanie także i w tych organizmach mechanizmu detoksykacji aminopteryny, polegającego na jej deaminacji do folianu. Za możliwością tego typu przemian aminoanalogów folianu w bakteriach przemawia także znalezienie pewnych ilości kwasu 10-metylofoliowego po inkubacji *Lactobacillus casei* z radioaktywną ameopteryną (Ryc. 4) (52).

III. Biosynteza poliglutaminianów *) ametoptyerynowych

W 1973 roku po raz pierwszy wykazano (53, 54) przekształcenie *in vivo* ametoptyeryny w γ -glutamylowe pochodne analogicznie jak to ma miejsce w przypadku koenzymatycznych form folianu (55). Identyfikację poliglutaminianów ametoptyerynowych przeprowadza się analizując równolegle na kolumnach z DEAE-celulozy lub Sephadex G-15 eluaty wyciągów tkankowych traktowane i nietraktowane enzymami odszczepiającymi reszty glutamylowe od cząsteczki analogu, stosując jako wzorce syntetyczne poliglutaminiany ametoptyerynowe. Najwięcej danych o przemianach ametoptyeryny w poliglutaminianowe pochodne dotyczy ich syntezy w wątrobie i nerkach szczurów i myszy (Tabele 2, 3) (52, 54, 56—61). Biosynteza poliglutaminianów ametoptyerynowych ma również miejsce, chociaż w znacznie niższym stopniu niż w wątrobie, w czerwonych ciałkach krwi (54) i leukocytach ludzkich (62) oraz w mysich komórkach leukemicznych L1210 (61).

Po stosunkowo krótkim czasie od iniekcji szczurom radioaktywnej ametoptyeryny, a mianowicie już po dwóch godzinach, w wątrobie tych zwierząt pojawiają się znaczne ilości dwu- i trójglutaminianu ametopte-



Ryc. 2. Poliglutaminiany ametoptyerynowe w wątrobie szczura w dwie godziny po podskórnych iniekcjach [^3H]ametoptyeryny (59).

Ametoptyerynę w ilości 240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ podano w 9 dawkach co 15 minut. Wyekstrahowane pochodne ametoptyeryny chromatografowano na kolumnie z Sephadex G-15. A — ametoptyeryna; B — dwuglutaminian ametoptyerynowy; C — trójglutaminian ametoptyerynowy.

*) Terminologia tego typu pochodnych ametoptyeryny nie została jeszcze ostatecznie opracowana. W artykule zastosowano nazwy analogiczne do używanych w przypadku poliglutaminianów folianowych. Ametoptyeryna traktowana jest jako monoglutaminian, a związki z dołączonymi do ametoptyeryny resztami glutaminianowymi jako odpowiednie dwu-, trój- i poliglutaminiany ametoptyerynowe.

rynowego (Ryc. 2). Nie wykazano jednakże, ażeby w miarę dalszego upływu czasu pojawiały się w tym organie pochodne analoga zawierające więcej niż dwie dodatkowe reszty glutaminianowe w cząsteczce (59). Co więcej następował w tkankach powolny spadek zawartości tego typu pochodnych ametoptyeryny ($T_{1/2}$ dwuglutaminianu ametoptyerynowego wynosi 6,5 dnia).

Przyczyny niemal ośmiokrotnie szybszego spadku w tkankach zawartości dwuglutaminianu ametoptyerynowego niż ametoptyeryny nie są jeszcze dotychczas wyjaśnione. Niezależnie jednak od tego, czy spadek ten wynika z szybkiego usuwania dwuglutaminianowej pochodnej z komórek, czy też jej konwersji w ametoptyerynę pod wpływem komórkowych γ -glutamylkarboksypeptydaz (55), nie wydaje się prawdopodobne, ażeby taka pochodna ametoptyeryny mogła stanowić „wewnątrzkomórkowy zapas” tego analoga.

Ilość powstających w organizmie poliglutaminianów ametoptyerynowych zależy w znacznym stopniu od wielkości zastosowanej dawki (Tabela 2)

Tabela 2

Poziom ametoptyeryny i jej poliglutaminowych pochodnych (w ng/g tkanki) w różnych organach szczura po iniekcjach [3 H] ametoptyeryny (z danych 59).

Tkanka	Dawka [3 H]ametoptyeryny μ g/kg	Ametoptyeryna	Dwuglutaminian ametoptyerynowy	Trójglutaminian ametoptyerynowy
Wątroba	80	190,4	60,9	2,5
	241	102,8	77,9	44,2
	298	142,9	228,8	59,3
Nerki	80	178,8	20,0	0,0
	241	179,9	22,0	3,7
	298	291,4	58,5	18,1
Jelito cienkie	80	49,5	0,0	0,0
	241	128,7	0,0	0,0
	298	150,7	2,0	—
Tarczyca	80	37,3	0,0	—
	241	37,3	0,0	—
	298	—	—	—

Ametoptyerynę w ilości około 27 μ g/kg zastosowano w 3 lub 9 podskórnych iniekcjach, w odstępach 15 lub 30 minutowych. Zwierzęta zabijano w 4 godziny po pierwszym zastrzyku. Wyekstrahowane pochodne z poszczególnych organów chromatografowano na kolumnie Sephadex G-15.

jak i sposobu jej podania. Przy niskich dawkach ametoptyeryny pojawia się przede wszystkim jej dwuglutaminianowa pochodna oraz śladowe ilości trójglutaminianu i to jedynie w wątrobie, organie charakteryzującym się zdolnością stosunkowo najintensywniejszej przemiany ametoptyeryny.

Dopiero po zastosowaniu ametoptyeryny w trzykrotnie wyższej dawce (240 $\mu\text{g}/\text{kg}$) pojawiły się w wątrobie i nerkach szczura znaczące ilości trójglutaminianu ametoptyerynowego.

Większe ilości dwuglutaminianu ametoptyerynowego w komórkach różnych organów szczura syntetyzują się po dootrzewnym niż po doustnym podaniu ametoptyeryny, jak również wówczas, gdy nawet niewielką dawkę analogu zastosowano zamiast jednorazowo w trzech mniejszych porcjach (59). Zdaniem Whitehead'a i wsp. obserwacje te przemawiają za przypuszczeniem, że synteza poliglutaminianów ametoptyerynowych ograniczona jest jedynie do momentów, w których ametoptyeryna występuje w komórkach w wysokim stężeniu. Niewątpliwie bowiem ametoptyeryna nie jest fizjologicznym substratem enzymów przeprowadzających syntezę poliglutaminianów folianowych (55). Należy zauważyć, że najwyższą stosunkową zdolnością syntezy takich pochodnych ametoptyeryny charakteryzują się wątroba i nerki. W jelicie cienkim na przykład (Tabela 2) znaleziono jedynie śladowe ilości dwuglutaminianu ametoptyerynowego i to dopiero po zastosowaniu analogu w najwyższej dawce (240 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Jak już wspomniano, biosynteza poliglutaminianów ametoptyerynowych zachodzi również w mysich komórkach białaczkowych linii wrażliwej (L1210) oraz linii odpornej (L1210/MTX) na działanie tego analogu, namnażających się w myszach DBA/2 (61). Proces ten obserwowano jednak dopiero po iniekcjach ametoptyeryny myszom w ilości dziesięciokrotnie przewyższającej najwyższe dawki stosowane w badaniach przemian ametoptyeryny w organach szczura.

W tabeli 3 zebrano wyniki obrazujące poziom ametoptyeryny oraz jej poliglutaminianowych metabolitów w komórkach białaczkowych jak

Tabela 3

Poziom ametoptyeryny oraz jej poliglutaminianowych metabolitów w komórkach leukemicznych oraz różnych organach myszy (ng/g tkanki lub $\text{ng}/10^6$ komórek $\pm\text{SD}$) (61)

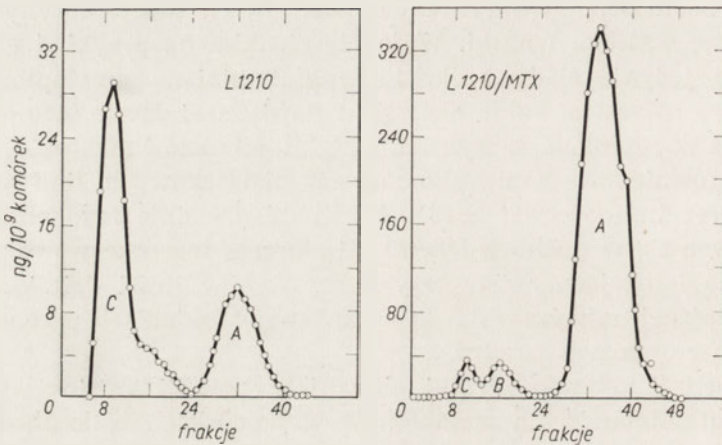
Tkanka	Ametoptyeryna	Dwuglutaminian ametoptyerynowy	Trójglutaminian ametoptyerynowy	Suma
L1210	281 \pm 162	47 \pm 22	196 \pm 145	524 \pm 237
L1210/MTX	3511 \pm 1483	166 \pm 97	112 \pm 104	3789 \pm 1554
Wątroba	1130 \pm 270	370 \pm 96	64 \pm 48	1564 \pm 312
Nerki	464 \pm 108	67 \pm 16	22*	537 \pm 125
Jelito cienkie	1131 \pm 710	35 \pm 13	18 \pm 8	1184 \pm 706

* Dane uzyskane w jednym doświadczeniu.

W 4 godziny po iniekcji ametoptyeryny (2,4 mg/kg) zwierzęta zabijano i sporządzano ekstrakty komórkowe, które następnie chromatografowano na kolumnie z Sephadex G-15.

również w różnych organach myszy po jednorazowej dawce analogu. Jak widać, ilość ametoptyeryny pobrana przez komórki linii odpornej na działanie ametoptyeryny (L1210/MTX) ponad dziesięciokrotnie przewyższała

ilość ametoptyeryny znajdującej w komórkach linii wrażliwej (L1210). Fakt ten wydaje się mieć związek z wysokim, w porównaniu z komórkami linii wyjściowej, poziomem reduktazy dihydrofolianowej w komórkach tego mutantu (63). Pomimo różnic w ilościach niezmetabolizowanej ametoptyeryny w komórkach obu linii ilości poliglutaminianów ametoptyerynowych, w przeliczeniu na 10^9 komórek, są bardzo zbliżone. Wydaje się to wskazywać na podobny poziom aktywności enzymów uczestniczących w syntezie tych związków w komórkach wrażliwych i opornych na działanie ametoptyeryny. Niemniej jednak jej poliglutaminianowe pochodne odpowiadają około 50% ogólnej ilości ametoptyeryny i wszystkich jej pochodnych znajdujących w komórkach L1210 a 10–25% w komórkach L1210/MTX (Ryc. 3, Tabela 3).



Ryc. 3. Poliglutaminiany ametoptyerynowe w komórkach L1210 i L1210/MTX w 4 godziny po jednorazowej iniekcji [3 H]ametoptyeryny (2,4 mg/kg) myszom DBA/2, (61 zmodyf.).

Wyekstrahowane pochodne ametoptyeryny chromatografowano na kolumnie z Sephadex G-15. A — ametoptyeryna; B — dwuglutaminian ametoptyerynowy; C — trójglutaminian ametoptyerynowy.

Trójglutaminian ametoptyerynowy jest formą dominującą w komórkach L1210, podczas gdy w komórkach L1210/MTX dwu- i trójglutaminian ametoptyeryny występują w podobnych ilościach (Ryc. 3). Chociaż dotychczas nie wykazano w komórkach L1210 obecności metabolitów ametoptyeryny zawierających powyżej dwóch dodatkowych reszt glutaminianowych, to jednak zdaniem Whitehead'a (61) jest prawdopodobne, że komórki te mogą syntetyzować poliglutaminiany ametoptyerynowe o większej liczbie reszt glutaminianowych, a tylko niedoskonałość zastosowanych w tej pracy metod rozdzielczych nie pozwala na ich uwidocznienie. Być może, że do rozwiązania tego problemu pomocna byłaby chromatografia poliglutaminianowego fragmentu cząsteczki, pozostałego po utleniającym odszczepieniu części pterydynowej od cząsteczki pochod-

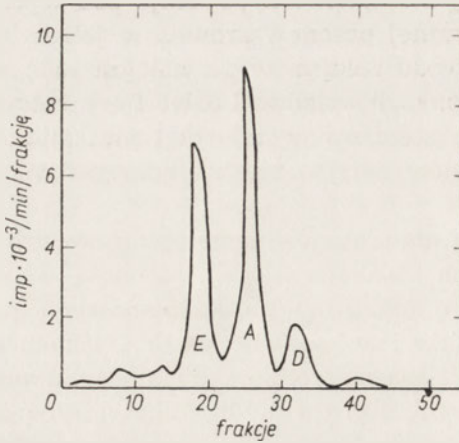
nej ametoptyeryny według metody opracowanej przez Houlihana i Scotta i stosowanej przede wszystkim do rozdziału poliglutaminianów folianowych (64). Stosując tę właśnie metodę udało się Hoffbrandowi i wsp. (62) wykazać konwersję ametoptyeryny w pochodne zawierające w cząsteczce nawet 5 reszt glutaminianowych w stymulowanych do podziałów działaniem fitochemoglutyniny ludzkich leukocytach.

Biosyntezę poliglutaminianów ametoptyerynowych wykryto przede wszystkim w różnych tkankach ssaków. Jak dotąd ukazała się tylko jedna praca mówiąca o obecności glutaminianowych pochodnych aminopodstawionych folianu także i w komórkach bakteryjnych (65). A mianowicie w komórkach *Pediococcus cerevisiae* po ich inkubacji z radioaktywną tetrahydroametoptyeryną lub dwuhydroaminoametoptyeryną znaleziono trójglutaminianowe pochodne tych uwodorowanych analogów. Należy zauważyć, że tego typu przemian zredukowanych analogów folianu nie znaleziono w komórkach *L. casei*, które metabolizowały takie uwodorowane analogi do odpowiednich pochodnych kwasu pterojowego — kwasu 2,4-dwuamino-10-metylopterojowego i 2,4-dwuamino-10-metylopterojowego (patrz rozdział IV-1).

IV. Rozkład aminowych analogów folianu

IV-1. Przekształcanie w kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy

Zdolność przemiany analogów folianu polegającą na odszczepieniu poszczególnych fragmentów cząsteczki jak dotąd przypisuje się jedynie mikroorganizmom (52, 65, 66). Bakterie takie jak np. *L. casei* (52, 65) pobrana w procesie aktywnego transportu radioaktywną ametoptyerynę przeprowadzają przede wszystkim w kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy (Ryc. 4). Kwas ten powstający na skutek odszczepienia z cząsteczki analogu reszty kwasu glutaminowego dyfunduje następnie do środowiska. Oprócz kwasu 2,4-dwuamino-10-metylopterojowego pojawiają się w tych bakteriach pewne ilości takich metabolitów ametoptyeryny, jak kwas 10-metylofoliowy i 10-metylopterojowy. Prawdopodobnie związki te powstają na skutek deaminacji ametoptyeryny lub też kwasu 2,4-dwuamino-10-metylopterojowego. W tabeli 4 zebrano dane ilustrujące ilości poszczególnych metabolitów ametoptyeryny znalezionych po 24-godzinnej inkubacji bakterii *L. casei* z radioaktywną ametoptyeryną. Zwraca uwagę bardzo niewielka ilość radioaktywnej niezmetabolizowanej ametoptyeryny znajdującej się w komórkach po 24 godzinach inkubacji. Kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy pojawia się również w tych bakteriach w wyniku ich inkubacji z uwodorowaną pochodną ametoptyeryny — tetrahydroametoptyeryną oraz z aminoametoptyeryną (65). Wydajność jednak rozkładu



Ryc. 4. Ametopteryna oraz produkty jej przemian w komórkach *L. casei* (wg. 52). Komórki inkubowano z [³H]ametopteryną przez 24 godziny w 37°C. Chromatografia wyciągów komórkowych na kolumnie z DEAE-celulozy. A — ametoptyryna; D — kwas 10-metylofoliowy; E — kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy.

Tabela 4

Przemiany ametoptyryny w komórkach *L. casei* (52)

Związek	Radioaktywność (%)	
	Komórki	Środowisko
Ametopteryna	4,0	—
Kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy	5,0	74,6
Kwas 10-metylopterojowy		6,8
Kwas 10-metylofoliowy	2,0	5,8
Produkty niezidentyfikowane	1,0	0,8

Komórki *L. casei* inkubowano z [³H]ametopteryną w 37°C przez 24 godziny. Wyniki wyrażono jako procent wyjściowej radioaktywności.

aminoptyryny przez *L. casei* jest kilkakrotnie niższa niż znajdująca w przypadku ametoptyryny.

Nie wszystkie gatunki bakterii zdolne są do odszczepiania reszty kwasu glutaminowego z cząsteczki ametoptyryny. Tak np. komórki *S. faecalis* inkubowane w środowisku z radioaktywną ametoptyryną pobierają tylko niewielkie ilości tego związku i po 24 godzinach ponad 90% radioaktywności wykrywanej w komórkach pochodzi z niezmetabolizowanej ametoptyryny, a w środowisku występuje również tylko niezmienniona ametoptyryna (52). Podobnie nie wykazano dotychczas, ażeby komórki *P. cerevisiae* metabolizowały ametoptyrynę lub aminoptyrynę (65).

Kwas 2,4-amino-10-metylopterojowy można wykryć także w odchodach i w moczu wielu gatunków ssaków, które otrzymywały radioaktywną ametoptyrynę bądź to doustnie (44, 66) bądź też w iniekcjach (67).

Najprawdopodobniej metabolit ten powstaje pod wpływem działania jelicitowej flory bakteryjnej obecnej zarówno w jelicie grubym jak i wyższych partiach przewodu pokarmowego, nie jest zaś rezultatem przemian ametoptyeryny w tkankach ssaków. Udział flory bakteryjnej w metabolizmie ametoptyeryny u ssaków wydaje się niewątpliwy, intensywność bowiem przemian ametoptyeryny obniża się znacznie w przypadku doustnego traktowania myszy antybiotykiem — neomocyną lub sulfonamidem, a także jest ona niższa u myszy hodowanych w warunkach sterylnych (*germ-free*) (68).

Degradację ametoptyeryny, polegającą na odszczepieniu reszty glutaminianowej przeprowadza egzoptydaza, tzw. karboksypeptydaza G_1 , wykryta dotychczas w bakteriach z rodzaju *Pseudomonas* (69—73) oraz ostatnio z rodzaju *Acinetobacter* (74). Enzym ten hydrolizuje wiązanie peptydowe pomiędzy kwasem glutaminowym a pozostałym fragmentem cząsteczki w folianie, jego koenzymatycznych pochodnych oraz analogach (Tabela 5) a także w licznych peptydach zawierających kwas glutami-

Tabela 5

Folian, jego koenzymatyczne pochodne oraz analogi jako substraty karboksypeptydazy G_1 (z danych 72)

Związek	K (μ M)
Folian	1,1
5-formylotetrahydrofolian	18,1
5-metylotetrahydrofolian	12,9
Ametoptyeryna	3,9
Kwas 4-amino-10-metylopteroilo-asparaginowy	580,0
Aminoptyeryna	8,3
Kwas 4-aminopteroiloasparaginowy	104,0

nowy jako N-końcowy aminokwas (carboxyl terminal AA). Jak wynika z danych zebranych w tabeli 5 karboksypeptydaza G_1 z większą wydajnością rozkłada folian niż jego koenzymatyczne pochodne. Efektywność zaś tego enzymu w stosunku do ametoptyeryny i aminoptyeryny jako substratów jest tego samego rzędu co efektywność wobec folianu. Asparaginanowe analogi ametoptyeryny i aminoptyeryny także ulegają rozkładowi pod wpływem karboksypeptydazy G_1 , jednakże z bardzo niską wydajnością. Niemniej jednak działają one jako kompetytywne inhibitory rozkładu ametoptyeryny.

Zdolność karboksypeptydazy G_1 do rozkładania zarówno pochodnych folianu jak i jego aminoanalogów stanowi przesłankę do stosowania tego enzymu w chemioterapii nowotworów. Wykazano mianowicie, że w obecności karboksypeptydazy G_1 w środowisku hodowlanym wzrost mysich komórek białaczkowych L1210, L5178Y, komórek limfoblastycznych RPMI 4265 oraz komórek raka Walkera ulega znacznemu upośledzeniu,

prawdopodobnie dzięki drastycznemu zmniejszeniu komórkowej puli pochodnych folianowych (75, 76).

Często pożądane jest również obniżenie w osoczu krwi stężenia ametoptyeryny, która obecna nawet w stężeniu rzędu 10^{-8} — 10^{-9} M wywiera toksyczne działanie na organizm ssaków, przede wszystkim poprzez upośledzenie podziałów komórkowych w szpiku kostnym i nabłonku jelitowym (77—81). Pojawiają się także doniesienia, że podanie karboksypeptydazy G_1 myszom, które uprzednio otrzymały w iniekcjach ametoptyerynę, powoduje rozkład tego analogu znajdującego się w osoczu krwi, dzięki czemu zanikają objawy toksyczne a czas przeżycia myszy ulega znaczącemu wydłużeniu (71, 76).

IV-2. Rozkład do prostych pterydyn

Oprócz kwasu 2,4-dwuamino-10-metylopterojowego wykryto także proste, nieskonjugowane pterydyny w odchodach i w moczu szczurów, którym podano doustnie (82) lub dootrzewnowo (83) radioaktywną ametoptyerynę (83). Na podstawie wyników analizy chromatograficznej oraz charakterystyki widm w świetle ultrafioletowym wśród produktów rozkładu ametoptyeryny zidentyfikowano 2,4-dwuaminopterydynę oraz jej pochodne z takimi podstawnikami w pozycji 6 rdzenia pterydynowego jak grupa metylowa, hydroksymetylowa, aldehydowa i karboksylowa. Pozostaje nadal niewyjaśnione, czy rozbicie wiązania pomiędzy C—9 a N—10 w cząsteczce ametoptyeryny następuje w wyniku działania enzymów obecnych w tkankach szczurów, czy też w rezultacie działania bakterii przewodu pokarmowego. Udział bakterii w tym procesie wydaje się wielce prawdopodobny, tym bardziej iż wiadomo, że niektóre z nich, takie jak *Aerobacter aerogens* (84) czy też *Streptococcus faecalis* (85) mogą odszczepiać resztę kwasu p-aminobenzoglutaminowego od cząsteczki aminoanalogów folianu. Co więcej, z niektórych bakterii wyizolowano pochodne pterydynowe z podstawnikami w pozycji 6 rdzenia pterydynowego (86).

V. Własności metabolitów analogów folianu

V-1. Metabolity analogów folianu jako inhibitory reduktazy dihydrofolianowej

Ametoptyeryna jest niezwykle silnym inhibitorem reduktazy dihydrofolianowej, z którą wiąże się w sposób stechiometryczny, tzn. jedna cząsteczka inhibitora blokuje jedną cząsteczkę enzymu (87). Nasunęło się pytanie, czy różnego rodzaju metabolity ametoptyeryny, z zachowaną grupą aminową w pozycji 4 rdzenia pterydynowego, będą również silnymi inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej jak ametoptyeryna. W tabeli 6 zestawiono wartości K_i ametoptyeryny i jej różnych metabolitów uzyskane w badaniach z zastosowaniem reduktazy dihydrofolianowej oczyszczono-

Tabela 6

Hamowanie reduktazy dihydrofolianowej przez ametoptyerynę i jej różne metabolity

Związek	K_i (M)	Piśmiennictwo
Ametoptyeryna	4×10^{-11}	(87)
Kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy	$1,3 \times 10^{-9}$	(44)
2,4-dwuamino-6-metylopterydyna	$4,7 \times 10^{-7}$	(88, 89)
2,4-dwuamino-6-formylopterydyna	$8,1 \times 10^{-6}$	(88, 89)
2,4-dwuamino-6-hydroksypterydyna	9×10^{-8}	(88, 89)
2,4-dwuamino-6-karboksypterydyna	8×10^{-6}	(82)
7-hydroksyamotoptyeryna	$1,3 \times 10^{-9}$	(90)
dwuglutaminian ametoptyerynowy	rzędu 10^{-11}	(91)

nej z komórek L1210 (90, 91) oraz wątroby szczura (87) lub kurczęcia (88, 89). Jak widać, jedynie poliglutaminianowe pochodne ametoptyeryny hamują aktywność tego enzymu w podobnym stopniu jak ametoptyeryna. Co więcej, przy oznaczeniach aktywności enzymu w pH 8,5 dwuglutaminian ametoptyerynowy działa nawet nieco silniej niż sama ametoptyeryna (91). Dwu-, trój- i siedmioglutaminiany ametoptyerynowe (zsyntetyzowane na drodze chemicznej) równie silnie jak ametoptyeryna wiążą się z reduktazą dihydrofolianową z komórek L1210 lub wątroby świnki morskiej (61). Tak więc nie znalazło potwierdzenia przypuszczenie (62), że poliglutaminiany ametoptyerynowe okażą się silniejszymi inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej niż ametoptyeryna, podobnie jak poliglutaminiany dihydrofolianu są lepszymi niż dihydrofolian substratami reduktazy dihydrofolianowej izolowanej z tkanek ssaków (92).

7-Hydroksyamotoptyeryna okazała się być stukrotnie słabszym inhibitorem tego enzymu niż ametoptyeryna (90). Co więcej analogiczna pochodna dwuchloroametoptyeryny działa nawet 1000-krotnie słabiej hamując na enzym z wątroby myszy z białaczką L1210 niż związek wyjściowy (93).

Spośród badanych produktów przemian analogów folianu pochodne pterydynowe, powstające w wyniku bakteryjnego metabolizmu ametoptyeryny, są najsłabszymi inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej tak dla enzymu z wątroby kurczęcia (88, 89) (Tabela 6) jak i z ciała tłuszczowego owadów (94).

Z przedstawionych danych wynika, że nawet niewielkie modyfikacje w obrębie fragmentu pterydynowego a w szczególności eliminacja poszczególnych fragmentów cząsteczki, zmieniają w bardzo silnym stopniu własności tych związków jako inhibitorów reduktazy dihydrofolianowej.

V-2. Porównanie własności biologicznych ametoptyeryny oraz produktów jej przemian

Większość metabolitów ametoptyeryny, podobnie jak sama ametoptyeryna, może stanowić czynniki ograniczające w różnym stopniu wzrost

mikroorganizmów i komórek w hodowli *in vitro* jak również wykazywać pewne działanie przeciwnowotworowe.

Poliglutaminiany ametoptyerynowe jako jedyne spośród wszystkich metabolitów tego analoga charakteryzują się własnościami biologicznymi zbliżonymi do ametoptyeryny. Tak na przykład dwuglutaminian ametoptyerynowy hamuje w takim samym stopniu jak ametoptyeryna wzrost w hodowli mysich komórek białaczkowych L1210. Co więcej, jest on równie aktywny jak ametoptyeryna w eksperymentach *in vivo* polegających na hamowaniu rozwoju białaczki L1210 w myszach CDF₁ (91). W efekcie obydwu analogi podwajają czas przeżycia myszy w porównaniu z myszami kontrolnymi nie otrzymującymi leku. Wyniki te nie potwierdziły zatem pierwszych obserwacji Naira i Baugh (53), którzy stwierdzili wprawdzie hamowanie wzrostu *S. faecium* 8043 przez syntetyczne poliglutaminiany ametoptyerynowe, jednakże związki te działały słabiej niż ametoptyeryna a ich hamujący efekt był tym słabszy im dłuższy był fragment poliglutaminianowy cząsteczki. Obecnie jednak sądzi się, że rzeczywistą przyczyną niższej toksyczności poliglutaminianów ametoptyeryny niż samej ametoptyeryny było przede wszystkim słabsze pobieranie tych związków przez komórki.

Dwa inne metabolity ametoptyeryny — 7-hydroksyametoptyeryna (34) i kwas 2,4-dwuamino-10-metylopterojowy (44) okazały się mniej toksyczne dla myszy CDF₁ niż ametoptyeryna. Wartości LD₅₀ tych związków były nawet pięciokrotnie wyższe niż wartość LD₅₀ ametoptyeryny.

Jak już powiedziano (patrz rozdział II-1) 7-hydroksyametoptyeryna nagromadza się w szczególnie dużych ilościach przy stosowaniu ametoptyeryny w wysokich dawkach. Częstym pojawiającym się wówczas objawem są między innymi zaburzenia w funkcjonowaniu nerek. Jacobs i wsp. (38) wiążą to z odkładaniem się w kanalikach nerkowych zarówno ametoptyeryny jak i 7-hydroksyametoptyeryny, charakteryzującej się kilkakrotnie niższą od ametoptyeryny rozpuszczalnością w wodzie. O mniejszej toksyczności tego związku, w porównaniu z ametoptyeryną, można również wnioskować pośrednio. Zwierzęta takie jak królik czy świnka morska, w wątrobie których wykrywa się wysoką aktywność oksydazy aldehydowej utleniającej pierścień pterydynowy, odznaczają się mniejszą wrażliwością na działanie ametoptyeryny niż zwierzęta, w których enzym ten wykazuje niską aktywność (36). Jako jedyny nasuwa się wniosek, że powstały produkt utleniania ametoptyeryny jest mniej szkodliwy dla tkanek niż sama ametoptyeryna. Podobnie, traktowanie karboksypeptydazą G₁ zwierząt, które otrzymywały uprzednio ametoptyerynę znosi objawy toksyczności wywołane przez ten analog (71). Tak więc eliminację kwasu glutaminowego z cząsteczki (z utworzeniem kwasu 2,4-dwuamino-10-metylopterojowego) jak również hydroksylację rdzenia pterydynowego można traktować jako procesy detoksykacji analogu.

O innych produktach metabolizmu ametoptyeryny dane są bardziej

fragmentaryczne. Acetyloametoptyryna, powstająca pod wpływem enzymów acylujących z wątroby ssaków, nie hamuje wzrostu *S. faecalis* (45), podobnie jak zbliżona do niej strukturalnie 4-dwumetyloametoptyryna (95). Mało również jest danych na temat toksyczności prostych pterydyn — rezultatu bakteryjnego rozkładu ametoptyryny. Wzrost niektórych bakterii w obecności aminowych analogów folianu (patrz rozdział III-3) wskazuje jednak, że w układach bakteryjnych produkty przemian tych analogów mogą także działać mniej toksycznie niż ametoptyryna. Wydaje się, że również dla komórek owadzych hodowanych *in vitro* różne pochodne pterydynowe są mniej szkodliwe niż aminowe analogi folianu (96, 97).

Na podstawie przedstawionych danych można zatem sądzić, że tylko związki hamujące równie mocno aktywność reduktazy dihydrofolianowej jak ametoptyryna wykazują zbliżone do niej działanie biologiczne.

VI. Uwagi końcowe

Dotychczas wykryte przemiany 4-aminowych analogów folianu to utlenienie pierścienia pterydynowego, acetylacja grupy aminowej dołączonej do pozycji 4 rdzenia pterydynowego, przyłączenie reszt kwasu glutaminowego do cząsteczki analogu, jak również rozbicie jego cząsteczki z odłączeniem krótszych lub dłuższych fragmentów. Przemiany te katalizowane są bądź to przez enzymy o wysokiej specyficzności względem folianu i jego koenzymatycznych pochodnych — karboksypeptydazę G_1 i syntetazę poliglutaminianową, bądź też przez enzymy o niskiej specyficzności — takie jak oksydaza aldehydowa czy enzymy acetylujące aminy aromatyczne, których substratami mogą być także aminowe analogi folianu.

W odróżnieniu od przemian folianu, które w większości zachodzą na poziomie zredukowanej pochodnej — tetrahydrofolianu, wszystkie biologiczne przemiany analogów folianu są na ogół przemianami niewodorowanych związków. Jest bowiem rzeczą oczywistą, że w układach biologicznych nie mogą powstać zredukowane pochodne aminoanalogów folianu — związków będących bardzo silnymi inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej jedyne, jak dotąd, znanego enzymu katalizującego redukcję fragmentu pterydynowego folianu.

Artykuł otrzymano 10.4.1977, po rewizji autorskiej przyjęto 5.6.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Seeger D. R., Smith J. M., Hultquist M. E., (1947), *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2567.
2. Seeger D. R., Cosulich D. B., Smith J. M., jr., Hultquist M. E., (1949), *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1753—1758.
3. Grzelakowska B., (1963), *Post. Biochem.*, **9**, 311—327.

4. Grzelakowska B., (1966), *Chem. listy*, **60**, 499—522.
5. Manteuffel-Cymborowska M., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, (w druku).
6. Holland J. F., Glidewell O., (1972), *New Engl. J. Med.*, **287**, 769—777.
7. Ross G. T., Goldstein D. P., Herte R., Lipsett M. B., O'Dell W. D., (1965), *Am. J. Obstet., Gynecol.*, **93**, 223—229.
8. Jaffe N., Frei E. III., Traggis D., Bishop Y., (1974), *New Engl. J. Med.*, **291**, 994—997.
9. Pratt C. B., Roberts D., Shanks E., Warmath E. L., (1975), *Cancer Chem. Rep.*, **6**, 13—18.
10. Geddes E. W., Falkson G., (1970), *Cancer*, **25**, 1271—1278.
11. Condit P. T., (1971), *Ann. N. Y., Acad. Sci.*, **186**, 475—485.
12. Anderson L. L., Collins G. J., Ojima Y., Sullivan R. D., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 1344—1348.
13. Wan S. H., Huffman D. H., Azarnoff D. L., Stephens R., Hoogstraten B., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 3487—3491.
14. Goldin A., (1971), *Ann. N. Y., Acad. Sci.*, **186**, 423—437.
15. Harrap K. R., Jackson R. C., (1975), *Adv. Enzyme Reg.*, **13**, 77—96.
16. Bruckner H. W., Schreiber C., Waxman S., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 801—806.
17. Barlow J. J., Piver M. S., (1976), *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 527—533.
18. Bertino J. R., Sawicki W. L., Linquist C. A., Gupta V. S., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 327—328.
19. Curt G. A., Tobias J. S., Kramer R. A., Rosowsky A., Parker L. M., Tattersall M. H. N., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1943—1946.
20. Johns D. G., Farquhar D., Chabner B. A., Wolpert M. K., Adamson R. H., (1973), *Experientia*, **29**, 1104—1105.
21. Harding N. G. L., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 270—283.
22. Jacobs S. A., d'Urso-Scott M., Bertino J. R., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 284—286.
23. Colley C. M., Ryman B. E., (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 157—159.
24. Kimelberg H. K., Tracy T. F., Biddlecome S. M., Bourke R. S., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 2949—2957.
25. Jacobson W., (1954), *J. Insect Physiol.*, **123**, 618—632.
26. Jacobson W., (1954), w *Chemistry and Biology of Pteridines*, Wolstenholme G. E. W. i M. P. Cameron red., str. 329—355. Little Brown and Company, Boston.
27. Jacobson W., Cathie I. A. B., (1960), *Biochem. Pharm.*, **5**, 143—156.
28. Sirotnak F. M., Donsbach R. C., Dorick D. M., Moccio D. M., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 4672—4678.
29. Leme P. R., Creaven P. J., Allen L. M., Berman M., (1975), *Cancer Chem. Rep.*, **59**, (część 1) 811—817.
30. Djerassi I., (1975), *Cancer Chem. Reports*, **6**, (część 3) 3—6.
31. Tattersall M. H. N., Parker L. M., Pitman S. W., Frei E. III., (1975), *Cancer Chem Rep.*, **6**, (część 3) 25—29.
32. Pitman S. W., Parker L. M., Tattersall M. H. N., Frei E. III., (1975), *Cancer Chem. Rep.*, **6**, (część 3) 43—49.
33. Oliverio V. T., Loo T. L., (1960), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **3**, 140.
34. Redetzki H. M., Redetzki J. E., Elias A. L., (1966), *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 425—433.
35. Loo T. L., Adamson R. H., (1965), *J. Med. Chem.*, **8**, 513—515.
36. Johns D. G., Valerino D. M., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci., U. S. A.*, **186**, 378—386.

37. Kimelberg H. K., Biddlecome S. M., Bourke R. S., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 157—165.
38. Jacobs S. A., Stoller R. G., Chabner B. A., Johns D. G., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 534—538.
39. Freeman M. V., (1958), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **122**, 154—162.
40. Henderson E. S., Adamson R. H., Oliverio V. T., (1965), *Cancer Res.*, **25**, 1018—1024.
41. Loo T. L., Adamson R. H., (1962), *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 170—171.
42. Johns D. G., Iannotti A. T., Sartorelli A. C., Booth B. A., Bertino J. R., (1965), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 380—382.
43. Johns D. G., Farquhar D., Chabner B. A., McCormack J. J., (1974), *Biochem. Soc. Trans*, **2**, 602—604.
44. Valerino D. M., Johns D. G., Zaharko D. S., Oliverio V. T., (1972), *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 821—831.
45. Krishnamurthy V., Braganca B. M. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **74**, 456—466.
46. Johnson W., Corte G., Jasmin R., (1958), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**, 677—680.
47. Jacobson K. B., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2713—2716.
48. Slavik K., Tomašowa H., Slavikova V., (1958), *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **23**, 1387—1391.
49. Slavik K., (1958), *Ernährungsforschung* **3**, 475—479.
50. Kidder G. W., (1954), w Chemistry and Biology of Pteridines, G. E. W. Wolstenholme i M. P. Cameron red., str. 304—313. Little Brown and Co., Boston.
51. Hutchison D. J., Burchenal J. H., (1952), *Proc. Exp. Biol. Med.*, **81**, 251—254.
52. Shin Y. S., Buehring K. U., Stokstad E. L. R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5772—5777.
53. Nair M. G., Baugh C. M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3923—3926.
54. Baugh C. M., Krumdieck C. L., Nair M. G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 27—34.
55. Grzelakowska-Sztabert B., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 345—385.
56. Brown J. P., Davidson G. E., Weir D. G., Scott J. M., (1974), *Int. J. Biochem.*, **5**, 727—733.
57. Bühring U., Shin Y. S., Fölsch E., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 299—304.
58. Whitehead V. M., (1973), *Clin. Res.*, **21**, 655.
59. Whitehead V. M., Perrault M. M., Stelcner S., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 2985—2990.
60. Whitehead V. M., Perrault M. M., Stelcner S., (1976), w Chemistry and Biology of Pteridines, W. Pfeleiderer, red., str. 475—483, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
61. Whitehead V. M., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 408—412.
62. Hoffbrand A. V., Tripp E., Lavoie A., (1976), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **50**, 61—68.
63. Friedkin M., Crawford E., Humphreys S. R., Goldin A., (1962), *Cancer Res.*, **22**, 600—606.
64. Houlihan C. M., Scott N. M., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1675—1681.
65. Bühring K. U., Fölsch E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **421**, 22—32.
66. Zaharko D. S., Oliverio V. T., (1970), *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2923—2925.
67. Huffman D. H., Wan S. H., Azarnoff D. L., Hoogstraten B., (1973), *Clin. Pharm. Therap.*, **14**, 572—579.

68. Zaharko D. S., Bruckner H., Oliverio V. T., (1969), *Science*, **166**, 887—888.
69. Levy C. C., Goldman P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2933—2938.
70. Goldman P., Levy C. C., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **58**, 1299—1306.
71. Chabner B. A., Johns D. G., Bertino J. R., (1972), *Nature*, **239**, 395—397.
72. McCullough J. L., Chabner B. A., Bertino J. R., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7207—7213.
73. Chabner B. A., Bertino J. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 234—240.
74. Albrecht A. M., Boldizar E., Hutchison D. J., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 3203.
75. Bertino J. R., Levitt M., jr., McCullough J. L., Chabner B., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 486—495.
76. Chabner B. A., Johns D. G., Bertino J. R., (1972), *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **13**, 33.
77. Zaharko D. S., Dedrick R. L., Peale A. L., Drake J. C., Lutz R. J., (1974), *J. Pharm. Exper. Therap.*, **189**, 585—592.
78. Margolis S., Philips F. S., Sternberg S. S., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 2037—2046.
79. Brown C. H. III, Carbonne P. P., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 185—190.
80. Vogler W. R., Mingioli E. S., Garwood F. A., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1628—1633.
81. Pinedo H. M., Zaharko D. S., Bull J., Chabner B. A., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 445—450.
82. Valerino D. M., (1972), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **4**, 529—542.
83. Freeman-Narrodd M., Surrey S., Narrodd S., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 560.
84. Webb M., (1955), *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 212—225.
85. Wood R. C., Hitchings G. H., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2381—2385.
86. Urushibara T., Forrest H. S., (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1189—1193.
87. Werkheiser W. C., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 888—893.
88. Zakrzewski S. F., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1485—1490.
89. Zakrzewski S. F., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 4002—4004.
90. Johns D. G., Loo T. L., (1967), *J. Pharm. Sci.*, **56**, 356—359.
91. Jacobs S. A., Adamson R. H., Chabner B. A., Derr C. J., Johns D. G., (1975), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 692—698.
92. Coward J. K., Parameswaran K. N., Cashmore A. R., Bertino J. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3899—3903.
93. Misra D. K., Adamson R. H., Loo T. L., Oliverio V. T., (1963), *Life Sci.*, **2**, 407—409.
94. Manteuffel-Cymborowska M., Grzelakowska-Sztabert B., (1970), *J. Insect Physiol.*, **16**, 1419—1428.
95. Roth B., Smith J. M. jr., Hultquist M. E., (1950), *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1914—1918.
96. Saska J., Grzelakowska-Sztabert B., Zielińska Z. M., (1972), *J. Insect Physiol.*, **18**, 1733—1737.
97. Zielińska Z. M., Saska J., (1973), w *Proc. Third Intern. Colloquium on Invertebrate Tissue Culture*, red. J. Řehaček, D. Blaškovič, W. F. Hink, str. 167—186, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava.

BARBARA ODERFELD-NOWAK *)

Wpływ niektórych uszkodzeń mózgu na mechanizmy cholinergiczne hipokampa

Effect of Some Brain Lesions on Cholinergic Mechanisms of Hippocampus

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Mechanizmy cholinergiczne mózgu i udział w nich mechanizmów cholinergicznych hipokampa
 - II-1. Występowanie, metabolizm i rola acetylocholin w mózgu
 - II-2. Hipokamp, budowa i połączenia
 - II-3. Przesłanki wskazujące na rolę mechanizmów cholinergicznych hipokampa
- III. Charakterystyka układu cholinergicznego hipokampa
- IV. Zależność układu cholinergicznego hipokampa od przegrody
 - IV-1. Wpływ uszkodzeń strzępka na aktywność esterazy acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej w hipokampie
 - IV-2. Wpływ różnych uszkodzeń przegrody na układ cholinergiczny hipokampa
 - IV-3. Rola przegrody w regulacji procesów wydzielania i syntezy acetylocholin w hipokampie
- V. Uszkodzenia przegrody i hipokampa a zmiany w układzie cholinergicznym innych struktur mózgu
- VI. Biochemiczne i morfologiczne przejawy odnowy w cholinergicznym układzie hipokampa po uszkodzeniach mózgu
 - VI-1. Regeneracja przeciętych włókien cholinergicznyc

*) Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; AChE — esteraza acetylocholinowa (E.C.3.1.1.7. hydrolaza acetylocholinowa); ChAc — acetylotransferaza cholinowa, (E.C.2.3.1.6/O — acetylotransferaza acetyloCoA:cholina); AcCoA — acetyloCoA — acetylokoenzym A; CoA — koenzym A; AcTCh — acetylotiocholina; DFP — ang. *diisopropylphosphorofluoridate* — dwuizopropylodfluorofosforan; HC-3 — hemicholinium-3; NGF — ang. *Nerve Growth Factor* — czynnik wzrostowy nerwu; QNB — ang. *3-quinclidinylbenzilate* — 3-chinuklidynobenzylan.

Polskie odpowiedniki łacińskich nazw anatomicznych wprowadzono według słownictwa stosowanego w książce Bochenek A., Reicher M. (1963) *Anatomia człowieka*, t. 6, P.Z.W.L., Warszawa, i *Lexicon medicum* (1971) red. Złotnicki B., P.Z.W.L., Warszawa.

VI-2. Reinerwacja poprzez wyrastanie bocznych wypustek z nieprzeciętych włókien cholinergiczych

VI-3. Hipotezy dotyczące czynników regulujących procesy odnowy w mózgu

VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Brain cholinergic mechanisms and hippocampal cholinergic mechanisms involved
 - II-1. Occurrence of acetylcholine, its metabolism and role in the brain
 - II-2. Hippocampus: its structure and anatomical connections
 - II-3. Indications of the physiological significance of hippocampal cholinergic mechanisms
- III. Characteristics of hippocampal cholinergic system
- IV. Dependence of hippocampal cholinergic system on integrity of septohippocampal connections
 - IV-1. Effect of fimbria cutting on activity of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in hippocampus
 - IV-2. Effect of various septal lesions on cholinergic system of hippocampus
 - IV-3. Role of the septum in regulation of the release and synthesis of acetylcholine in hippocampus
- V. Changes in cholinergic system of various brain structures evoked by septal and hippocampal lesions.
- VI. Biochemical and morphological signs of recovery in hippocampal cholinergic system after various brain lesions
 - VI-1. Regeneration of the cut cholinergic fibers
 - VI-2. Reinnervation through a collateral sprouting from cholinergic nerve fibers.
 - VI-3. Hypotheses concerning factors involved in regulation of recovery processes in the brain
- VII. Final remarks

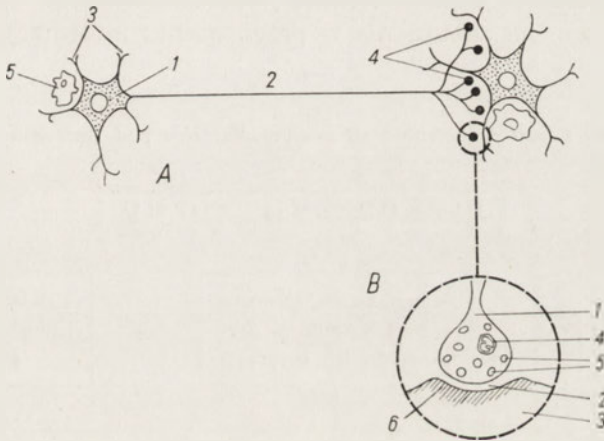
I. Wstęp

Obserwacje kliniczne dostarczają przykładów różnorodnych objawów patologicznego zachowania się pacjentów np. zanik pamięci, zaburzenia emocjonalne — jak ataki agresji czy stany lękowe, napady padaczkowe itp. — w następstwie różnych uszkodzeń mózgu, między innymi w następstwie urazów mechanicznych. Wiele z występujących zmian w zachowaniu się ma charakter nieodwracalny, inne po pewnym czasie ulegają stopniowej kompensacji. Zagadnienie mechanizmów zaburzeń występujących po uszkodzeniach mózgu stanowi jeden z niezwykle istotnych problemów neurobiologii. Możliwości terapeutyczne w dużej mierze zależą od postępu badań podstawowych nad mechanizmami tych zaburzeń.

Badania efektów eksperymentalnych uszkodzeń mózgu zwierząt prowadzi się w bardzo wielu ośrodkach. Wybiórcze uszkodzenia różnych połączeń i struktur mózgu wywołuje się m.in. elektrokoagulacyjnie, mecha-

nicznie, bądź chemicznie, najczęściej przy zastosowaniu tzw. aparatów stereotaktycznych, pozwalających na precyzyjną lokalizację miejsca uszkodzenia. Efekty uszkodzeń mierzy się następnie przy pomocy różnych metod, stąd zagadnienie to łączy wysiłki specjalistów z wielu dziedzin takich jak eksperymentalna psychologia, neurofizjologia, neuroanatomia, farmakologia i neurochemia. Na podstawie różnych prac, m.in. i polskich neurofizjologów (1) powstała koncepcja, że odrębne ośrodki mózgu odpowiadają za sterowanie określonymi objawami behawioralnymi (tj. zachowania się). Wiadomo również, że zmienione na skutek zniszczenia określonej części mózgu, zachowanie się zależy także od różnych zmian w innych częściach mózgu bezpośrednio lub pośrednio połączonych z uszkodzoną strukturą i tworzących wraz z nią jeden system funkcjonalny (1—5).

W poszukiwaniu mechanizmów odpowiedzialnych za efekty wywołane uszkodzeniami mózgu, szczególną uwagę zwraca się na rolę różnych neurotransmiterów.



Ryc. 1. A) Schemat neuronu i jego połączeń z sąsiednim neuronem.

1 — perikarion (ciało komórki nerwowej), 2 — akson, 3 — dendryty, 4 — zakończenia nerwowe,
5 — komórka glejowa;

B) Schemat synapsy nerwowej

1 — część presynaptyczna, 2 — szelcina synaptyczna, 3 — część postsynaptyczna, 4 — mitochondrium, 5 — pęcherzyki synaptyczne wypełnione neurotransmiterem, 6 — błona postsynaptyczna

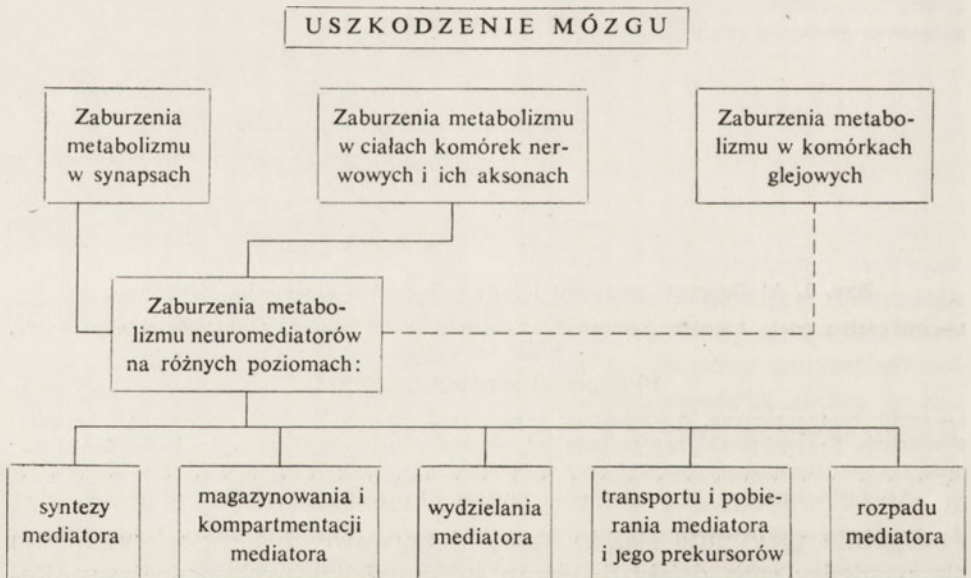
Ogólnie przyjmuje się, że komórki nerwowe w mózgu komunikują się pomiędzy sobą dzięki działaniu substancji zwanych neurotransmiterami (neuromediatorami). Miejsce kontaktu funkcjonalnego pomiędzy dwoma neuronami tj. miejsce, gdzie zakończenia nerwowe jednego neuronu wchodzi w kontakt z błoną komórkową drugiego neuronu nazywa się synapsą (por. Ryc 1 A i B). Pod wpływem impulsu nerwowego neuro-

transmitery wydzielają się z zakończenia nerwowego, tj. z części presynaptycznej synapsy do szczeliny synaptycznej. Łączą się one następnie z receptorem (por. 6), wywołując potencjał postsynaptyczny błony. Po przeniesieniu impulsu nerwowego — neurotransmitery zostają natychmiast usunięte, bądź przez rozkład enzymatyczny, bądź przez tzw. wychwyt przez zakończenia nerwowe (ang. *reuptake*) albo też częściowo przez dyfuzję ze szczeliny synaptycznej. Znamy obecnie cały szereg substancji w mózgu, spełniających ogólnie przyjęte kryteria stawiane substancjom neuromediatorowym (7). Są to: acetylocholina (ACh), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), dopamina (DA), kwas gamma-aminomasłowy (GABA), glicyna, kwas glutaminowy i histamina. Jako potencjalne neurotransmitery wymienia się również i inne substancje (8—11).

Prawidłowy proces przenoszenia informacji poprzez synapsy w grupach specyficznych neuronów warunkuje określone czynności mózgu. Uszkodzenia mózgu i związane z nimi zmiany w poszczególnych elementach neuronów: parikarionach, aksonach, zakończeniach nerwowych a także w satelitarnych komórkach glejowych (5), mogą wpływać na zaburzenia w wydzielaniu i metabolizmie neurotransmiterów (por. Ryc. 1 A, Tabela 1) a zatem na zaburzenia w przenoszeniu informacji i zaburzenia

Tabela 1

Schemat możliwych zaburzeń metabolizmu neuromediatorów pod wpływem uszkodzeń mózgu



w czynnościach mózgu. Stopień i charakter zmian w metabolizmie neurotransmiterów zależy zarówno od czasu po uszkodzeniu jak i od miejsca i obszaru uszkodzenia. Niemal bezpośrednio po przerwaniu dróg (projek-

cji) nerwowych obserwuje się przejściowy, bardzo silny wzrost w ilości niektórych neurotransmitterów (12—17) w strukturach mózgu unerwianych przez uszkodzone projekcje nerwowe. Wzrost ten wiąże się głównie z przerwaniem impulsacji nerwowej. W późniejszym natomiast czasie, na skutek degeneracji odciętych od perikarionów aksonów i zakończeń nerwowych, zachodzi znaczny spadek ilości neurotransmitterów. Obniżenie to dotyczy również zawartości innych składników układów neuromediatorowych tj. prekursorów neuromediatorów oraz enzymów syntetyzujących i rozkładających neuromediatory (18, 19). Należy podkreślić, że na skutek uszkodzeń mózgu zmienia się metabolizm neurotransmitterów nie tylko w strukturze unerwianej przez przerwana projekcję, ale również w ciałach komórek z których ta projekcja pochodzi (20—22). Elementy nerwowe sąsiadujące z uszkodzoną projekcją również odpowiadają na uszkodzenie (tzw. efekty transsynaptyczne), co także rzutuje na poziom i metabolizm neurotransmitterów (23—26). Intensywne dzielenie się komórek glejowych w okolicy uszkodzenia prawdopodobnie również odgrywa pewną rolę. Obserwowane niejednokrotnie po okresie zmian degeneracyjnych procesy odnowy w mózgu (2—5) wiążą się ze znacznymi zmianami w poziomie i metabolizmie neurotransmitterów (27—29).

Dzięki badaniom z zastosowaniem techniki selektywnych uszkodzeń a także dzięki badaniom efektów elektrycznej i farmakologicznej stymulacji różnych struktur i dróg nerwowych w mózgu wykazano, że określone neurotransmitery występują w odrębnych jądrach (tj. grupach ciał komórkowych) i szlakach nerwowych (4, 18, 19). Umożliwiło to sporządzenie tzw. map neurotransmitterowych w mózgu. Badania przy zastosowaniu wymienionych technik, łącznie z odpowiednimi testami behawioralnymi, pozwoliły wykazać rolę poszczególnych neurotransmitterów w regulacji wielu form zachowania się zwierząt. Badaniom tym poświęcono wiele opracowań monograficznych (30—40). Szczególnie dużo miejsca zajmują badania roli mechanizmów cholinergiczných w mózgu.

II. Mechanizmy cholinergiczne mózgu i udział w nich mechanizmów cholinergiczných hipokampa

II-1. Występowanie, metabolizm i rola acetylocholinę w mózgu

Acetylocholina jest obecnie powszechnie uznawanym neurotransmitterem w ośrodkowym układzie nerwowym. Opublikowano cały szereg opracowań monograficznych dotyczących różnorodnych badań nad acetylocholiną: biochemicznych (41—46), farmakologiczných (38, 42, 45, 47, 48) i elektrofizjologiczných (por. 49). Acetylocholina występuje w całym mózgu, aczkolwiek jej zawartość różni się w poszczególnych jego strukturach. Tylko niewielka część (około 20%) acetylocholinę znajduje się

w perikarionach i aksonach. Stanowi ona pulę acetylocholinę wolnej. Większa część acetylocholinę występuje w zakończeniach nerwowych (por. Ryc. 1 A, B) jako acetylocholina związana z pęcherzykami synaptycznymi (pula acetylocholinę związanej stabilnie) oraz w cytoplazmie zakończenia nerwowego (pula acetylocholinę związanej labilnie) (50). Pod wpływem impulsu nerwowego acetylocholina wydziela się z zakończenia nerwowego w postaci porcji — kwantów (51, 52). Istnieją wciąż jeszcze rozbieżności zarówno co do tego, która z pul acetylocholinę zakończeń nerwowych jest preferencyjnie wydzielana, jak i co do mechanizmów regulujących proces wydzielania tego mediatora (46, 53—56). Neurony, które wydzielają na swych zakończeniach acetylocholinę określa się jako „cholinergiczne”, natomiast neurony wrażliwe na działanie acetylocholinę — jako „cholinoceptywne” (57). Kryterium „cholinergiczności” neuronu jest ponadto obecność w nim składników układu cholinergicznego, tj. acetylocholinę oraz enzymów: acetylotransferazy cholinowej (ChAc) — syntetyzującej acetylocholinę i esterazy acetylocholinowej (AChE) — rozkładającej acetylocholinę. Ze względów praktycznych, jako podstawę zaklasyfikowania neuronów do grupy neuronów cholinergicznych, przyjmuje się występowanie w nich esterazy acetylocholinowej, którą łatwo można wykryć histochemicznie.

Acetylocholina powstaje w zakończeniu nerwowym z acetylokoenzymu A i cholinę (46). Enzymy — syntetyzujący acetylocholinę, podobnie jak rozkładający ją, tworzą się w perikarionie i przemieszczają się do zakończeń nerwowych dzięki ruchowi aksoplazmy (58). Mózg nie może syntetyzować cholinę (59), dostarczana jest ona do mózgu przez układ krwionośny wątroby. Cholinergiczne zakończenia nerwowe pobierają cholinę dzięki aktywnemu transportowi za pomocą układów nośnikowych o wysokim i niskim powinowactwie do cholinę (59—62). Pierwszy charakteryzuje się niską K_m rzędu kilku μM , stymuluje go jony sodu (60, 63), hamują zaś kompetetywnie analogi cholinę, m.in. hemicholinium — 3 (61, 63—65). Drugi układ charakteryzuje się wysoką K_m , rzędu kilkadziesiąt μM , nie zależy od obecności jonów sodu i jest znacznie mniej wrażliwy na HC-3. Nie znamy dotąd dokładnie mechanizmów regulacji biosyntezy acetylocholinę (46). Istotną rolę w biosyntezie tego neuromediatora wydaje się odgrywać stosunek stężeń CoA do acetylo-CoA (44, 66, 70). Czynnikiem ograniczającym szybkość syntezy acetylocholinę jest system pobierania cholinę o wysokim powinowactwie do substratu (60, 63, 67, 68). Nie wyklucza się jednak, że aktywność acetylotransferazy cholinowej może również wpływać na szybkość syntezy acetylocholinę (69, 70).

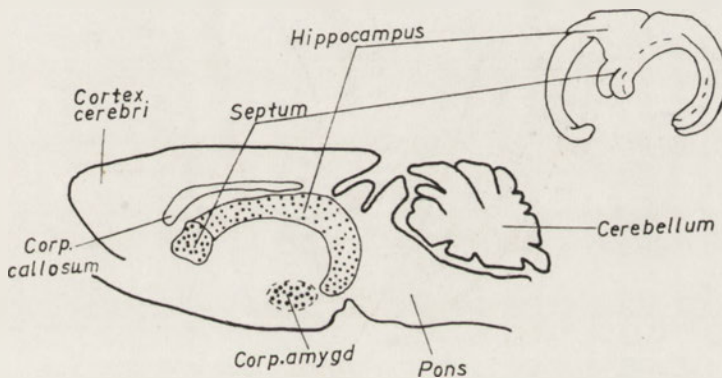
Dzięki intensywnym badaniom farmakologicznym, między innymi stosując mikrojontoforezę, tj. podając acetylocholinę do różnych neuronów mózgu za pomocą mikroelektrod z zastosowaniem prądu stałego (71), udało się wykazać rolę acetylocholinę w różnych czynnościach mózgu,

a w szczególności w regulacji wielu form zachowania się zwierząt. Między innymi mechanizmy cholinergiczne mózgu wydają się mieć znaczenie w regulacji napędów, aktywności ruchowej, w różnych stanach emocjonalnych jak strach i agresja (30, 33, 36, 72, 73). Wiele jest hipotez dotyczących roli układu cholinergicznego w procesach uczenia i zapamiętywania (38, 72, 74—76).

Wyniki bardzo wielu prac eksperymentalnych zwróciły uwagę na to, że w mechanizmach cholinergicznym mózgu kluczową rolę odgrywają mechanizmy cholinergiczne tzw. układu struktur limbicznych (por. Ryc. 2), zaangażowanego w regulacji bardzo wielu istotnych dla organizmu czynności (73, 77—79), a zwłaszcza jednej z jego struktur — hipokampa.

II-2. Hipokamp, budowa i połączenia

Poniżej ograniczymy się do bardzo uproszczonego przedstawienia anatomii hipokampa, podając jedynie informacje adekwatne do omawianego w następnych rozdziałach materiału. Czytelnik może zapoznać się szczegółowo z tym zagadnieniem w odpowiednim piśmiennictwie (80—87).



Ryc. 2. Położenie hipokampa w stosunku do innych struktur mózgu, w szczególności do niektórych struktur układu limbicznego (obszary zakropkowane), na schemacie przekroju strzałkowego mózgu szczura; u góry hipokamp i przegroda (lewe i prawe struktury) widziane z przodu.

Hippocampus — hipokamp, *septum* — przegroda, *corp. amygd.* (*corpus amygdaloideum*) — ciało migdałowe, *corp. (corpus) callosum* — ciało modzelowate, *pons* — most, *cerebellum* — mózdzek.

Hipokamp — filogenetycznie stara część kory mózgowej jest strukturą parzystą (Ryc. 2 — górna), w skład której wchodzi: hipokamp właściwy oraz zawój zębaty (Ryc. 3). Charakterystycznymi komórkami hipokampa właściwego są komórki piramidowe, podczas gdy zawoju zębatego — komórki ziarniste. W obu częściach występują także komórki polimorficzne, głównie tzw. komórki koszyczkowe. Perikariony komórek

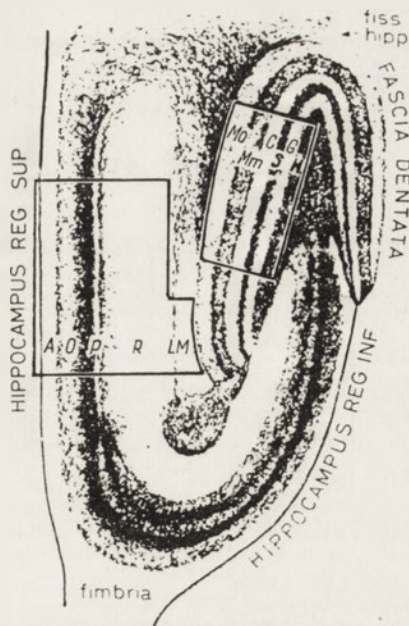
Zaobserwowano równoległość pomiędzy niektórymi behawioralnymi efektami uszkodzeń hipokampa (oraz ściśle połączonej z nim przegrody) a efektami działania tzw. substancji antycholinergicznych (np. atropina lub skopolamina) tj. działających antagonistycznie w stosunku do acetylocholin (111, 122—130). Wykazano też (73, 131—133), że pewne inhibitory esterazy acetylocholinowej — potęgujące działanie acetylocholin wywierają efekt przeciwny. Obserwacje te sugerują, że w zaburzeniach behawioralnych występujących po wspomnianych uszkodzeniach mózgu, odgrywają rolę mechanizmy cholinergiczne hipokampa i przegrody. Sugestię tę popierają wyniki szeregu innych badań wskazujących na rolę mechanizmów cholinergicznych w funkcjonowaniu hipokampa (38, 73, 76, 134—143). W oparciu o wyniki doświadczeń, w których wykazano, że po iniekcji substancji antycholinergicznych do hipokampa następuje utrata zdolności do tzw. odpowiedzi hamulcowej (ang. *response inhibition*) sugeruje się (38, 73, 123, 144—146), że między innymi rola układu cholinergicznego hipokampa wiąże się z regulacją behawioralnych procesów hamowania.

Mimo licznych i prowadzonych od dawna prac z dziedziny farmakologii i fizjologii na temat mechanizmów cholinergicznych w hipokampie, biochemiczne aspekty niezbędne dla poznania całokształtu tych mechanizmów, a zwłaszcza badania zmian biochemicznych w układzie cholinergicznym hipokampa pod wpływem uszkodzeń mózgu, znalazły się w centrum zainteresowania stosunkowo niedawno. Wynika to głównie z rozwoju w ostatnich latach czułych i precyzyjnych metod oznaczeń składników układu cholinergicznego mózgu (60, 147—151). Prosta, warstwowa budowa hipokampa, znane pochodzenie unerwienia określonych obszarów tej struktury, łatwość selektywnego przecinania dróg nerwowych do hipokampa, a także łatwość manipulowania pobudzeniem i zahamowaniem impulsacji nerwowej w tej strukturze, stwarzają dla tych badań niezwykle dogodne warunki.

III. Charakterystyka układu cholinergicznego hipokampa

Hipokamp należy do struktur mózgu o stosunkowo wysokiej zawartości acetylocholin i enzymów ją metabolizujących. W zależności od stosowanych metod zawartość acetylocholin w hipokampie mózgu szczerą waha się od 20—25 nmoli/g (13, 152—155), aktywność acetylotransferazy cholinowej od 4—8 μ moli ACh/g/godz (154, 156—158) i esterazy acetylocholinowej od 450—550 μ moli AcTCh/g/godz (154, 158, 159).

Informacje o rozmieszczeniu układu cholinergicznego w obrębie hipokampa opierają się głównie, podobnie jak w przypadku innych części mózgu (por. rozdział II-1.), na wynikach histochemicznych i mikroilościowych oznaczeń aktywności esterazy acetylocholinowej. Obraz histo-



Ryc. 4. Warstwowe rozmieszczenie aktywności esterazy acetylocholinowej (AChE), badanej histochemicznie, na przekroju horyzontalnym przez hipokamp i zawój zębaty mózgu szczura (156).

Obszary, które wycinano do analiz mikroilościowych ograniczone liniami. *Hippocampus reg. sup.* (*regio superior*) i *reg. inf.* (*regio inferior*)—hipokamp obszar górny i dolny, *A*—*alveus*, *O*—*oriens*, *P*—*piramidale*, *R*—*radiatum*, *LM*—*lacunosomoleculare*; *M_o*, *M_m*, *C* i *S*—podwarstwy *stratum* (warstwy) *moleculare* zawoju zębatego, *G*—*granulare*, *H*—*hilus fasciae dentatae*, *mf*—ang. *mossy fibers*—(włókna kiciaste) *fiss. hipp.*—*fissura hippocampi*—(szczelina hipokampa). Inne objaśnienia jak w opisie pod rycinami 2 i 3.

chemiczny ukazuje warstwowe rozmieszczenie tego enzymu w hipokampie (Ryc. 4). Zarówno w hipokampie właściwym jak i w zawoju zębatym są warstwy mniej lub bardziej bogate w esterazę acetylocholinową (Ryc. 4, Tabela 2) (19, 93, 156, 160—162). Histochemicznie (163) stwierdzono, że w perikarionach komórek piramidowych hipokampa i komórek ziarnistych zawoju zębatego nie występuje aktywność enzymu, zaś w neuropilu tj. włóknach (w tym przypadku dochodzących do wspomnianych komórek) jest ona bardzo wysoka. Są natomiast dane o obecności esterazy acetylocholinowej w perikarionach krótkoaksonowych komórek koszyczkowych (164).

Korzystając z laminarnego rozmieszczenia esterazy acetylocholinowej w hipokampie (Ryc. 4), wycinano z uprzednio liofilizowanych skrawków mózgu różne obszary hipokampa i przeprowadzano w nich mikroilościowe oznaczenia aktywności tego enzymu (19, 156, 165) jak również aktywności acetylotransferazy cholinowej (19, 165, 166) (Tabela 2). Wyższa aktywność esterazy acetylocholinowej oznaczana mikroilościowo w odpowiednich stre-

Tabela 2

Porównanie aktywności AChE i ChAc w różnych warstwach hipokampa i zawoju zębatego (156, 165)

Hipokamp — obszar górny				Zawój zębaty				
Warstwa*	AChE**	ChAc***	stosunek AChE/ChAc	Warstwa*	AChE****	ChAc	stosunek AChE/ /ChAc	
A	550	6,5	85	M	M _o	2280	28,5	
O	O ₁	1960	19,9		M _m	2610	30,1	87
	O ₀	2780	31,2		C ₀	1910	23,6	81
P	3730	43,8	85	S	4530	61,7	74	
R	R ₁	2540	28,7	G	3380	48,9	69	
	R _m	1570	15,8	H	4140	53,7	77	
	R ₀	1030	15,6					
L	1480	20,4	74					
M	1160	15,1	78					

* Sposób wycinania poszczególnych warstw hipokampa (por. rozdział III i Ryc. 4). Oznaczenia warstw — por. Ryc. 4; O₁ i O₀ oraz R₁, R_m i R₀ — podwarstwy *stratum oriens* i *stratum radiatum*.

** μmole AcTCh hydroliz. /godz/g suchej masy

**** μmole ACh hydroliz. /godz/g suchej masy

*** μmole ACh syntetyz. /godz/g suchej masy. Wyniki stanowią średnią z 4—12 oznaczeń.

fach hipokampa, pokrywała się z intensywnością reakcji histochemicznej tego enzymu (165). Zgodności takiej nie stwierdzono jednakże w okresie rozwoju ontogenetycznego hipokampa (167). Uderza (por. Tabela 2) bardzo podobny stosunek aktywności esteraazy acetylocholinowej do acetylotransferazy cholinowej we wszystkich badanych warstwach w hipokampie i w zawoju zębatym.

Metodami autoradiograficznymi, z zastosowanie silnych ligandów jak np. [³H]-QNB stwierdzono, że w warstwach o silnej reakcji histochemicznej esteraazy acetylocholinowej, zawierających dendryty komórek piramidowych i ziarnistych, występuje duże zgrupowanie muskarynowych [tj. pobudzanych przez muskarynę a hamowanych przez atropinę (6)] receptorów cholinergicznym (168—170). W hipokampie, podobnie jak w większości struktur mózgu, receptory typu muskarynowego stanowią przeważający typ receptora cholinergicznego. Tylko niewielka część receptorów hipokampa jest typu nikotynowego (171) [receptory pobudzane przez nikotynę a hamowane przez kurarę (6)].

Wydaje się, że większość zakończeń cholinergicznym w hipokampie jest typu akso-dendrytowego (172, 173), co wskazuje na ich pobudzający charakter (por. 19). Potwierdzają to również dane elektrofizjologiczne (88, 174, 175). Pobudzające działanie acetylocholinyl zarówno na komórki piramidowe jak i ziarniste wykazano mikrojontoforetycznie (176).

Metodą frakcjonowanego wirowania badano rozmieszczenie subkomórkowe składników układu cholinergicznego w hipokampie (165, 177—

180). Rezultaty nie dały jednoznacznego obrazu rozmieszczenia esterazy acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej. Z prac jednych autorów (165, 177) wynika, że enzymy te znajdują się we frakcji synaptosomalnej (tj. frakcji wyizolowanych zakończeń nerwowych). Inne prace natomiast (179) wskazują, że esteraza acetylocholinowa występuje głównie we frakcji lżejszej, którą stanowi neuropil (włókna). Ten ostatni wynik pozostaje w zgodzie z obserwacjami elektronowo-mikroskopowymi (nielicznymi dotąd) (172), w których wykazano, że esteraza acetylocholinowa znajduje się wprawdzie w części presynaptycznej, lecz nie w zakończeniach nerwowych a w rozgałęzieniach aksonów bezpośrednio przed zakończeniami (ang. *preterminal parts*). Acetylocholina w hipokampie, podobnie jak to wykazano dla całego mózgu, w przeważającej części występuje we frakcji synaptosomalnej, a tylko około 20% mediatora znajduje się we frakcji pochodzącej z perikarionów i aksonów (16, 141, 155, 181).

Miejsce syntezy składników układu cholinergicznego hipokampa budziło od dawna zainteresowanie badaczy. Niektóre wczesne prace (160) sugerowały, że hipokampalna esteraza acetylocholinowa jest syntetyzowana w hipokampie a tylko niewielka jej część dostarczana jest poprzez różne drogi aferentne hipokampa. Późniejsze jednak dane, uzyskane różnymi metodami (19, 182), wskazują wyraźnie, że układ cholinergiczny hipokampa zależy od przegrody.

IV. Zależność układu cholinergicznego hipokampa od przegrody

Wykazano, że pod wpływem stymulacji przyśrodkowej części przegrody zwiększało się wielokrotnie spontaniczne wydzielanie acetylocholininy z hipokampa (183, 184). Modyfikujące działanie substancji antycholinergicznym i antycholinesterazowym wywierane na rytmy teta w hipokampie (134, 135), obserwowano jedynie przy zachowaniu ciągłości połączeń przegroda — hipokamp (185, 186). O pochodzeniu z przegrody składników układu cholinergicznego hipokampa świadczą także badania przeprowadzane podczas rozwoju ontogenetycznego (167, 187, 188). Dowodzą tego również wyniki doświadczeń, w których po nieodwracalnym zahamowaniu przez DFP aktywności esterazy acetylocholinowej, stwierdzano pojawianie się aktywności tego enzymu najpierw w przegrodzie a następnie w hipokampie (189). Szczególnie przekonujących dowodów o pochodzeniu składników układu cholinergicznego hipokampa z przegrody dostarczyły badania nad wpływem uszkodzeń różnych dróg aferentnych hipokampa i uszkodzeń przegrody (19, 156—166, 190, 191, 193, 197).

IV-1. Wpływ uszkodzeń strzępka na aktywność esterazy acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej w hipokampie

Po przecięciu strzępka — drogi dochodzącej z przegrody do hipokampa (por. Ryc. 3) — obserwuje się zarówno metodami jakościowymi (156, 161) jak i ilościowymi (156), drastyczne spadki w aktywności esterazy acetylocholinowej w hipokampie. Zjawisku temu towarzyszy równie wyraźny spadek w aktywności acetylotransferazy cholinowej (190, 191). Zmiany w aktywności obu enzymów badane w całym hipokampie po uszkodzeniu strzępka obserwuje się wcześniej, bo już około 2-ego dnia po uszkodzeniu pozostaje zaledwie 50% aktywności kontrolnych. Po 4—5 dniach spadek dochodzi aż do 80—90% i dalszych zmian nie obserwuje się, nawet po bardzo długim czasie od przecięcia (166). Ilościowe zmiany w aktywności obu enzymów w poszczególnych warstwach hipokampa właściwego i zawoju zębatego badano stosując uprzednio opisaną (por. rozdział III, Ryc. 4) metodę wycinania warstw ze skrawków (156, 165). We wszystkich warstwach zachodzi bardzo silny, aczkolwiek nie jednakowy, spadek w aktywności enzymów (Tabela 3): w warstwie

Tabela 3

Wpływ przecięcia strzępka na aktywność ChAc i AChE w hipokampie właściwym i zawoju zębatym hipokampa (156, 166).

Obszar	Warstwa	Czas po operacji (dni)	ChAc % kontroli	AChE % kontroli
Hipokamp obszar górny	P	4,5	5 ± 1	19 ± 2
		7	11 ± 2	19 ± 3
		22	< 8	
	M	625	19 ± 3	
		22	20 ± 3	
		625	28 ± 2	
R	4,5		28 ± 4	
	7		26 ± 3	
Hipokamp obszar dolny	P	22	12 ± 2	
		625	< 9	
Zawój zębaty	M ₀ + M _m	7	< 13	
		G	7	10 ± 3
	H	22	12 ± 2	
		625	< 8	
		22	16 ± 3	
		625	< 8	

Aktywność enzymów wyrażono w % aktywności kontrolnej. Za 100% przyjęto aktywność enzymów po stronie nieoperowanej hipokampa. Wartości stanowią średnią z kilku oznaczeń ± s. Objasnienia symboli warstw — jak w opisie pod ryciną 3 i 4.

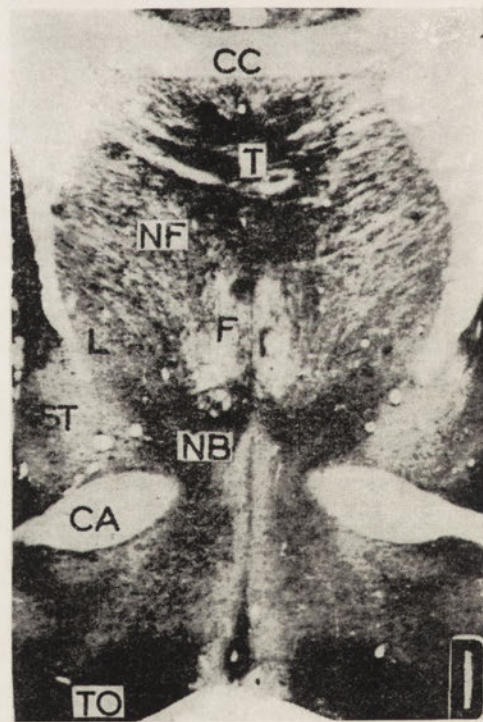
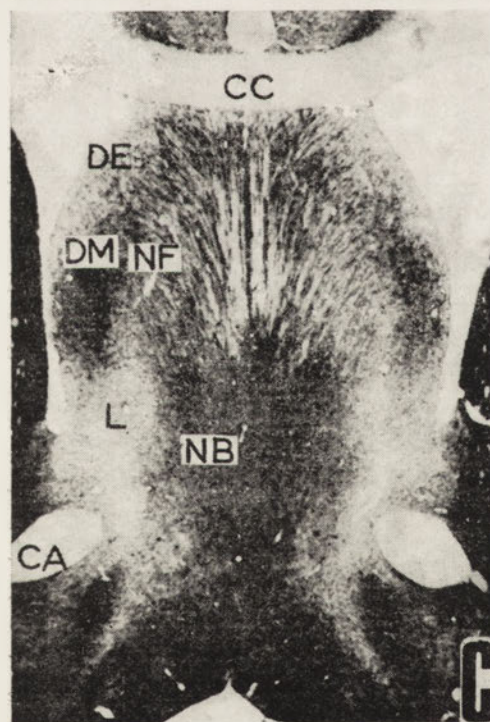
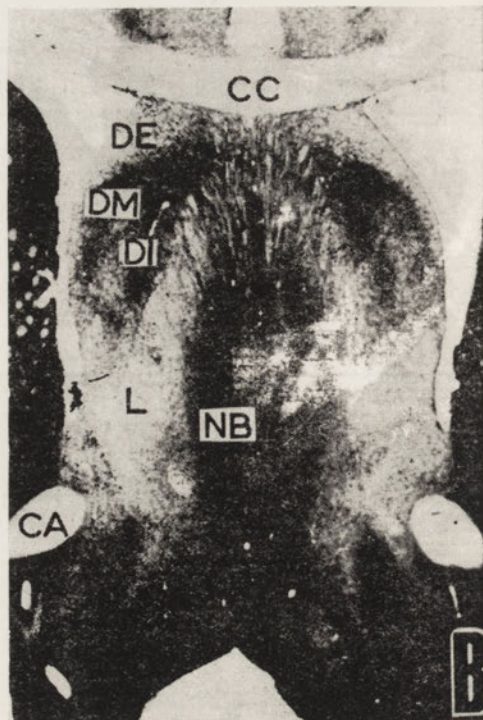
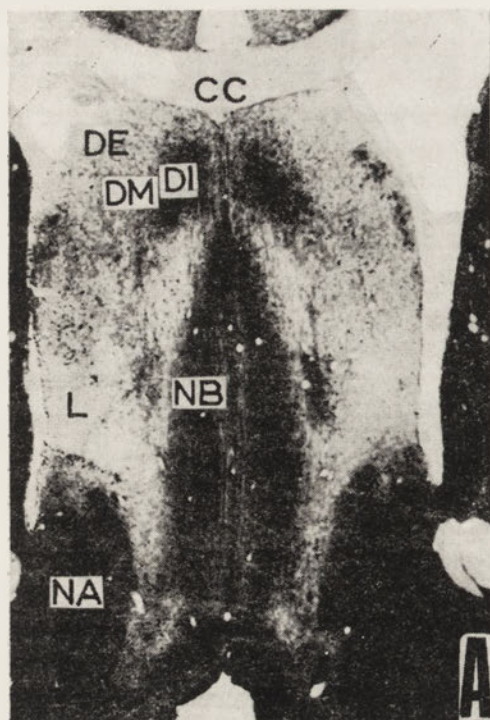
drobinowej po uszkodzeniu strzępka pozostaje nieco wyższa aktywność acetylotransferazy cholinowej niż w innych warstwach. Przecięcie aferentnych dróg z kory śródwęchowej oraz włókien spoidłowych (156, 166) nie powodowało obniżenia aktywności enzymów cholinergiczných w hipokampie.

Na podstawie zarówno lokalizacji histochemicznej i rozmieszczenia subkomórkowego esterazy acetylocholinowej w hipokampie (19, 156, 160—166, 177—180), zmian aktywności tego enzymu pod wpływem uszkodzeń aferentnej drogi z przegrody — strzępka (19, 156, 161, 166, 190, 191) i uszkodzeń przegrody (19, 158, 159, 162) (por. rozdział IV-2, Ryc. 6 i 7), można wyróżnić trzy komponenty tego enzymu w hipokampie: a) główna część — pochodzenia egzogennego, zależna od połączenia z przegrodą, zlokalizowana w neuropilu (włóknach), b) niewielka część, egzogenna, prawdopodobnie pochodząca z aferentów cholinergiczných *cingulum* (ob-ręczy) (163, 192), występująca w neuropilu warstwy drobinowej hipokampa, oraz c) również niewielka część — oporna na odnerwienie hipokampa — zlokalizowana w perikarionach (163, 164). Prawdopodobnie pozostałe składniki układu cholinergicznego hipokampa mają podobne pochodzenie i rozmieszczenie (16, 155, 158).

IV-2. Wpływ różnych uszkodzeń przegrody na układ cholinergiczny hipokampa

Systematyczne badania wpływu selektywnych uszkodzeń przegrody (158, 159, 162, 193, 194) wykazały, że zniszczenia poszczególnych jej części odmiennie wpływają na poziom składników układu cholinergicznego hipokampa. Ma to niewątpliwie związek ze zróżnicowaniem rozmieszczenia esterazy acetylocholinowej w poszczególnych jądrach (grupach neuronów) przegrody (Ryc. 5), może być ono bowiem wskaźnikiem miejsca, z którego bierze początek cholinergiczna projekcja do hipokampa.

Częścią przegrody, której zniszczenie powoduje spadek w aktywności esterazy acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej w hipokampie jest pionowa linia jądra pasma przekątnego (ang. *vertical limb of nucleus of diagonal band*) (158, 161). Uszkodzenia w tym obszarze (Ryc. 6(2), (3)), za wyjątkiem tylko bardzo niewielkich (Ryc. 6(4)), powodują znaczne obniżenie aktywności obu enzymów, niekiedy takie samo, jak całkowite zniszczenie przegrody (Ryc. 6(1)). Drugim obszarem przegrody, od którego wyraźnie zależy aktywność enzymów w hipokampie, jest jądro strzępkowe (Ryc. 6(2)). Fakt ten prawdopodobnie wiąże się z uszkodzeniem bogatych w esterazę acetylocholinową aksonów (Ryc. 5) (195, 196), rozprzestrzenionych w całym jądrze strzępkowym i przebiegających tamtędy z jądra pasma przekątnego. Zniszczenie innych obszarów przegrody nie wpływa na aktywność enzymów cholinergiczných w hipokampie (Ryc. 6(6) (7) (8)). Charakter zmian aktywności enzymatycznej w czasie



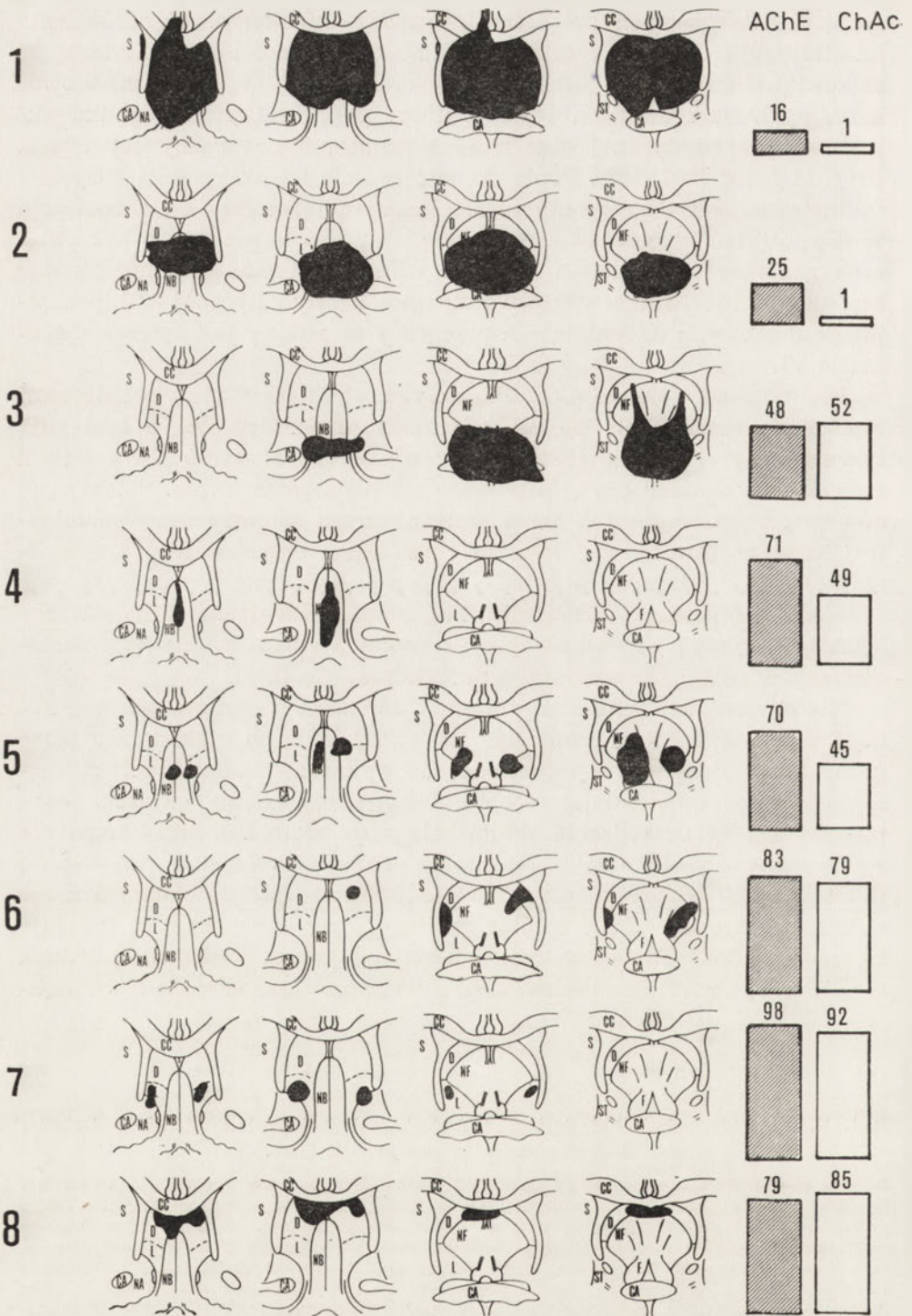
(157, 158, 197) Ryc. 7) wskazuje, że spadek aktywności wiąże się z degeneracją cholinergiczných połączeń przegroda — hipokamp. W odróżnieniu od utrzymującego się w czasie obniżenia się aktywności enzymatycznej po całkowitym zniszczeniu przegrody (Ryc. 7), po dużych, przyśrodkowo-brzusznych uszkodzeniach tej struktury, po początkowym spadku aktywności enzymatycznej obserwuje się następnie wyraźny jej wzrost (Ryc. 11 A, B) (197, 198). Ponieważ zwiększenie się aktywności enzymów dochodzące aż do 60% aktywności kontrolnej zależało od zachowania części połączeń hipokampa z przegrodą, zjawisko to nie mogło być związane z syntezą enzymów w obrębie własnego układu cholinergicznego hipokampa. Mechanizm wzrostu aktywności enzymatycznej w hipokampie po niektórych uszkodzeniach przegrody omawiany jest szerzej w rozdziale VI.

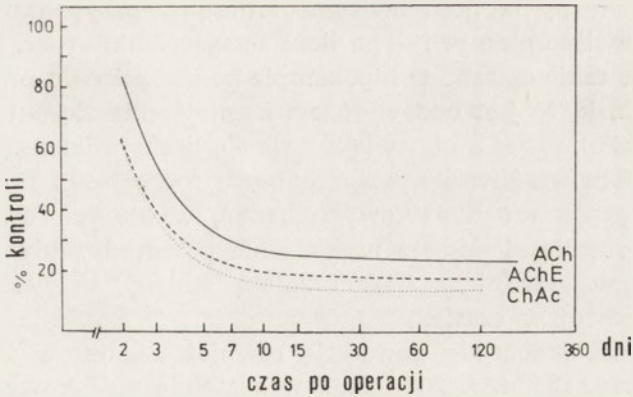
Stwierdzono (199), że nie tylko aktywność esterazy acetylocholinowej hipokampa zmienia się po uszkodzeniach przegrody, ale że następują także zmiany w obrazie elektroforetycznym jej izoenzymów. We frakcji związanej z błonami (Ryc. 8) pojawia się dodatkowa forma. Selektywną odpowiedź poszczególnych form molekularnych esterazy acetylocholinowej na różne warunki fizjologiczne i patologiczne opisywano już uprzednio (200—202). Mimo, iż przyczyny zmian wzorca izoenzymatycznego nie są jeszcze poznane, to warto podkreślić, że skład izoenzymatyczny esterazy acetylocholinowej po uszkodzeniu przypomina skład izoenzymów obserwowany w mózgu we wczesnym okresie rozwoju (203).

Nie stwierdzono natomiast zmian w zdolności receptora cholinergicznego hipokampa do wiązania liganda — [³H]-QNB po uszkodzeniu przegrody (204). Ponieważ jednocześnie nie wykazano zmian kinetyki wiązania lub nasycenia miejsc receptorowych przez badany związek, przypuszcza się, że uszkodzenie cholinergiczných aferentów hipokampa nie zmienia konformacji miejsc receptorowych. Wypływa stąd wniosek, że w odróżnieniu od presynaptycznej lokalizacji receptora cholinergicznego w korze mózgowej (205), receptor cholinergiczny w hipokampie znajduje się najprawdopodobniej w części postsynaptycznej (204). Inną jednak możliwością tłumaczącą brak zmian w wiązaniu liganda może być zwięks-

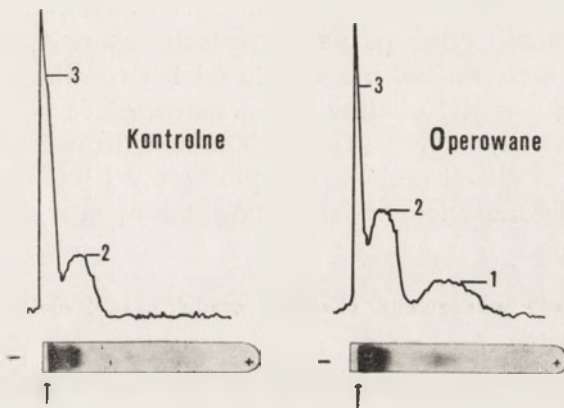
Ryc. 5. Rozmieszczenie aktywności esterazy acetylocholinowej (AChE), badanej histochemicznie, w przegrodzie (195).

Kolejne (A—D) przekroje czołowe przegrody od przodu ku tyłowi. CA — *commissurae anteriore* (spoidło przednie), CC — *corpus callosum* (ciało modzelowate), D — *Nucleus dorsalis* (jądro grzbietowe), DE — *Nucleus dorsalis, pars externa* (jądro grzbietowe, część zewnętrzna), DI — *Nucleus dorsalis, pars interna* (jądro grzbietowe, część wewnętrzna), DM — *Nucleus dorsalis, pars intermedia* (jądro grzbietowe, część pośrednia), F — *forńiz* (sklepienie), L — *Nucleus lateralis* (jądro boczne), NA — *Nucleus accumbens* (jądro półleżące), NB — *Nucleus tractus diagonalis Brocae* (jądro pasma przekątnego Broca), NF — *Nucleus fimbriatus* (jądro strzępkowe), ST — *Stria terminalis* (prążek końcowy), T — *Nucleus triangularis* (jądro trójkątne).





Ryc. 7. Zmiany w poziomie acetylocholiny (ACh) i aktywności esterazy acetylocholinowej (AChE) i acetylotransferazy cholinowej (ChAc) w hipokampie w zależności od czasu, po całkowitych (por. Ryc. 6 (1)) uszkodzeniach przegrody, (z danych 155, 197).



Ryc. 8. Typowe przykłady zapisów densytometrycznych i obrazów elektroforetycznych izoenzymów esterazy acetylocholinowej (AChE) frakcji związanej z błonami komórkowymi hipokampa, kontrolnego i operowanego szczura (199).

zenie się liczby miejsc receptorowych po pewnym czasie od uszkodzenia, jak to np. ma miejsce w zakończeniach nerwowo-mięśniowych (206), Zwiększaniu się liczby miejsc receptorowych towarzyszy na ogół wzrost wrażliwości na bodziec (ang. *denervation supersensitivity*). Wiąże się to

Ryc. 6. Wpływ różnych uszkodzeń przegrody na aktywność esterazy acetylocholinowej (AChE) i acetylotransferazy cholinowej (ChAc) w hipokampie (4–7 dni po uszkodzeniu), (z danych 158).

Schematy przedstawiają czołowe przekroje przegrody od przodu ku tyłowi. Obszar uszkodzenia zaznaczono na czarno. Słupki obok schematów przedstawiają aktywność AChE i ChAc w procentach wartości kontrolnych. S — striatum, pozostałe objaśnienia jak w opisie pod ryciną 5.

z nadwrażliwością na ilość neuromediatora, w przypadku odnerwienia elementów cholinergicznyc — na ilość acetylocholin (por. 207). Wprawdzie zjawisko takie opisano w hipokampie po uszkodzeniu przegrody (207), sądzi się jednak, że jest ono wyrazem zmniejszenia się aktywności esterazy acetylocholinowej a nie zwiększenia się liczby miejsc receptorowych, czy też wzrostu wrażliwości poszczególnych receptorów. Ten ważny problem wymaga jeszcze dodatkowych badań, w których uwzględnionoby precyzyjnie rozmiar i miejsce uszkodzenia przegrody, gdyż od obu tych parametrów w zasadniczy sposób zależą zmiany aktywności esterazy acetylocholinowej w czasie.

Uszkodzenia przegrody powodują również zmiany w ilości acetylocholin (13, 16, 155, 157, 208—210), w systemie nośnikowym pobierania cholin o wysokim powinowactwie do substratu (68, 157), natomiast nie stwierdzono wpływu na poziom cholin w hipokampie (209). W okresie bardzo znacznego spadku aktywności enzymów cholinergicznyc w hipokampie, obserwowanego zarówno po całkowitych jak i po niektórych cząstkowych uszkodzeniach przegrody, zmiany ilościowe neurotransmitera przebiegają podobnie tylko po uszkodzeniach całkowitych (155). Uszkodzenia cząstkowe natomiast, niezależnie od ich rozmiaru, powodują obniżenie zawartości acetylocholin nie przekraczające 30—40% kontroli. Interpretacja tych wyników jest wciąż jeszcze kontrowersyjna (155).

Zagadnieniu regulacji poziomu acetylocholin i jej wydzielania w hipokampie poświęcono wiele badań. Omówione są one szerzej w następnym podrozdziale.

IV-3. Rola przegrody w regulacji procesów wydzielania i syntezy acetylocholin w hipokampie

Wyniki różnorodnych doświadczeń, w których zwiększano lub hamowano impulsację nerwową w hipokampie (13, 16, 68, 153, 181, 211, 212), wskazują wyraźnie na sprzężenie impulsacji z wydzielaniem acetylocholin i jej poziomem w tej strukturze. Jednocześnie uzyskano silne poparcie hipotezy, że czynnikiem ograniczającym szybkość syntezy acetylocholin jest układ nośnikowy pobierania cholin o wysokim powinowactwie do substratu (68, 213, 214). Natomiast aktywność enzymów cholinergicznyc w hipokampie po uszkodzeniach przegrody (16, 155, 181), podobnie jak to stwierdza się w wielu innych eksperymentalnych sytuacjach (por. 210, 215), wydaje się odgrywać znacznie mniejszą rolę. Wszystkie czynniki obniżające impulsację i wydzielanie acetylocholin z zakończeń nerwowych jak tzw. ostry (niemal natychmiast po zabiegu) wpływ elektrokoagulacyjnego uszkodzenia przyśrodkowej części przegrody (13, 16, 68), działania różnych środków jak np. anestetyków (68, 152, 153, 181, 216, 217) podwyższyły poziom acetylocholin w hipokampie i obniżyły pobieranie cholin (zmiany w V_{max}) przez frakcję synaptosomalną hipokampa. Natomiast czynniki, które podwyższyły impulsację i wydzielanie

acetylocholinę, jak drażnienie elektryczne przyśrodkowej części przegrody (łącznie z dokomorowym podaniem hemicholinium-3) (153), czy też niektóre środki farmakologiczne jak np. z grupy tzw. konwulsantów (68), dawały efekt przeciwny. Interesującym jest fakt, że zmiany ilości acetylocholinę dotyczyły głównie (181, 216) lub wyłącznie (16, 181) puli acetylocholinę zakończeń nerwowych. Nie poznano dotąd wpływu impulsacji nerwowej na pobieranie cholinę o wysokim powinowactwie do substratu. Możliwe wydaje się przyjęcie hipotezy (68), że za regulację pobierania cholinę przez zakończenia nerwowe odpowiadają zmiany w przepływie jonów sodu przez błonę. Pewne dane (181, 218—220) wskazują, że znaczne podniesienie się ilości acetylocholinę w hipokampie może niekiedy występować niezależnie od zmian impulsacji zakończeń cholinergiczných. Nie wykluczone, że proces wydzielania i syntezy acetylocholinę zależy od współdziałania tego mediatora z innymi transmitterami hipokampa (por. 155). Wiadomo, że w hipokampie oprócz acetylocholinę występuje jeszcze szereg innych neuromediatorów (19, 104). Drogi „adrenergiczne” (19, 100—103, 104) i „serotonergiczne” (19, 103, 105, 221, 222) do hipokampa przechodzą przez przegrodę. Uszkodzenia tej struktury mogą więc wpływać na ilość noradrenalinę i serotoninę w hipokampie lub na szybkość ich metabolizmu, podobnie jak to opisywano po innych uszkodzeniach mózgu (103, 223). Interakcje pomiędzy różnymi neurotransmitterami są znanym zjawiskiem. Wiadomo na przykład (224), że w doświadczeniach *in vitro*, dodana do środowiska inkubacyjnego noradrenalina stymuluje pobieranie cholinę przez układ nośnikowy o wysokim powinowactwie. Nie wykluczone, że na podobnej zasadzie również i endogenna noradrenalina, a być może i serotoninę, mogłyby wpływać na modyfikację syntezy acetylocholinę w hipokampie. W warunkach uszkodzeń mózgu interakcje pomiędzy acetylocholiną a innymi neurotransmitterami hipokampa byłyby zależne od stopnia zniszczenia poszczególnych projekcji neurotransmiterowych do tej struktury.

V. Uszkodzenia przegrody i hipokampa a zmiany w układzie cholinergicznym innych struktur mózgu

Uszkodzenia przegrody, strzępka oraz grzbietowej części hipokampa powodują spadek ilości acetylocholinę w korze mózgowej (części czołowej) o przeszło 30% (157, 208). Po uszkodzeniu przegrody obserwowano w korze czołowej spadek w aktywności acetylotransferazy cholinowej (157) i w pobieraniu cholinę przez układ o wysokim powinowactwie do substratu (157). O ile spadki spowodowane uszkodzeniami przegrody można przynajmniej częściowo tłumaczyć degeneracją włókien cholinergiczných biegnących znanymi drogami nerwowymi (161, 225) z przegrody do kory mózgowej, o tyle spadek ilości acetylocholinę w korze mózgowej po

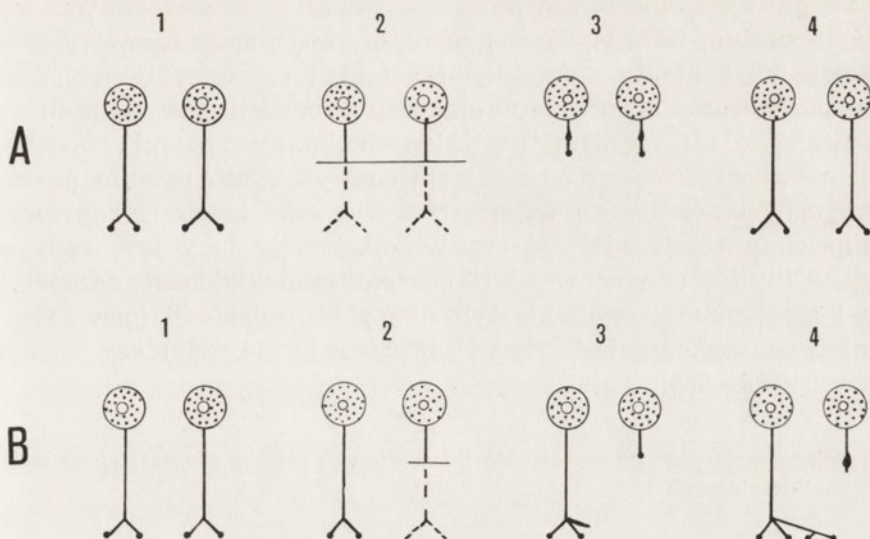
uszkodzeniu strzępka i hipokampa jest znacznie trudniejszy do interpretacji. Główna bowiem projekcja wychodząca z hipokampa nie jest projekcją cholinergiczną, dochodzi ona natomiast do grup cholinergicznym neuronów w innych strukturach (161). Neurony te, dające z kolei projekcje cholinergiczne do wielu podkorowych i korowych struktur, między innymi do kory mózgowej, są niejako pod kontrolą struktur przegrada-hipokamp. Niewykluczone zatem, że spadek ilości acetylocholino w korze mózgowej po uszkodzeniach hipokampa mógłby mieć związek ze zmianami transsynaptycznymi (23—26). Podobnie możnaby tłumaczyć nieliczne dotąd dane (226) wskazujące na zmiany w aktywności esteraazy acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej w podwzgórzu i ciele migdałowatym po niektórych grzbietowych uszkodzeniach hipokampa.

VI. Biochemiczne i morfologiczne przejawy odnowy w cholinergicznym układzie hipokampa po uszkodzeniach mózgu

Wyniki badań ostatnich lat podważyły długo utrzymujący się pogląd, oparty na klasycznych pracach Cajala (227), że w odróżnieniu od obwodowego układu nerwowego, po uszkodzeniach w ośrodkowym układzie nerwowym nie występują procesy odnowy, prowadzące do powstania funkcjonalnych połączeń synaptycznych. Według jego poglądów w ośrodkowym układzie nerwowym mogą pojawiać się jedynie poronne procesy regeneracyjne, (regenerujące wypustki nerwowe zostają stopniowo zresorbowane). W ostatnich latach opublikowano wiele prac i opracowań monograficznych (28, 228—234) poświęconych zagadnieniu odnowy w ośrodkowym układzie nerwowym po uszkodzeniach.

Okazało się, że neurony ośrodkowego układu nerwowego zdolne są do dwu form odnowy (schematycznie przedstawia to Ryc. 9). Jedną z nich (Ryc. 9 A), jest wyrastanie wypustek nerwowych z proksymalnego końca aksonu. Nowe wypustki mogą wyrastać wzdłuż swej pierwotnej drogi i mogą tworzyć właściwe synaptyczne połączenia. Ten typ odnowy jest charakterystyczny dla regeneracji w obwodowym układzie nerwowym. Drugą formą odpowiedzi (jak wydaje się, przeważającą w ośrodkowym układzie nerwowym) (Ryc. 9 B), jest tzw. wyrastanie bocznych wypustek nerwowych (ang. *collateral sprouting*) z aksonów nieuszkodzonych lecz sąsiednich w stosunku do uszkodzonych. Również i ten typ odpowiedzi spotyka się w obwodowym układzie nerwowym.

Wykazano, stosując szereg metod: techniki mikroskopii elektronowej (236—242), neuroanatomicznych i histochemicznych (234, 235, 243—247) oraz biochemicznych (197, 245, 246, 248, 249), że zarówno neurony adrenergiczne (27, 28, 243, 251, 252), serotoninergiczne (27, 28, 253—255), gabaergiczne (28, 248), jak i cholinergiczne (28, 197, 244, 246, 247, 249)



Ryc. 9. Schemat form odnowy w ośrodkowym układzie nerwowym po uszkodzeniach (27).

A) Wyrastanie nowych wypustek nerwowych z przeciętych aksonów: części aksonów dystalnie do przecięcia degenerują, części proksymalne tworzą „stożki wzrostowe”; wyrastają nowe aksony i zakończenia nerwowe.

B) Wyrastanie bocznych wypustek z aksonów sąsiednich w stosunku do uszkodzonych aksonów. Dystalna część przeciętego aksonu degeneruje, a kolateralne wypustki z sąsiedniego aksonu zajmują miejsce zdegenerowanych zakończeń nerwowych i tworzą nowe połączenia synaptyczne.

ośrodkowego układu nerwowego, posiadają zdolność do odpowiedzi według obu wspomnianych typów. Wiele badań poświęca się obecnie mechanizmom zjawiska odnowy w mózgu (3, 27, 28, 256—261).

VI-1. Regeneracja przeciętych włókien cholinergiczných

Do badań nad możliwościami odnowy po uszkodzeniach przebiegającej wg. typu A (Ryc. 9 A) Björklund i wsp. (234, 247, 250, 262—264) zastosowali model transplantacji uprzednio odnerwionej tkanki obwodowej do różnych miejsc ośrodkowego układu nerwowego. Zabieg wprowadzenia tkanki obwodowej do mózgu powoduje równocześnie uszkodzenie określonych dróg nerwowych w miejscu transplantacji. Wprowadzając tęczęwkę do szlaku nerwowego przegroda-hipokamp, a także do kilku innych dróg cholinergiczných w mózgu, stwierdzono (247), że między 18-ym a 30-ym dniem po transplantacji odnerwiona tęczęwka jest na nowo bogato unerwiona włóknami wykazującymi aktywność esteraży acetylocholinowej. Szczególnie intensywne było unerwienie cholinergiczne pochodzące z uszkodzonych włókien szlaku przegroda — hipokamp. Po 60 dniach — unerwienie tęczęwki (charakterystyczne sploty) niemal nie róż-

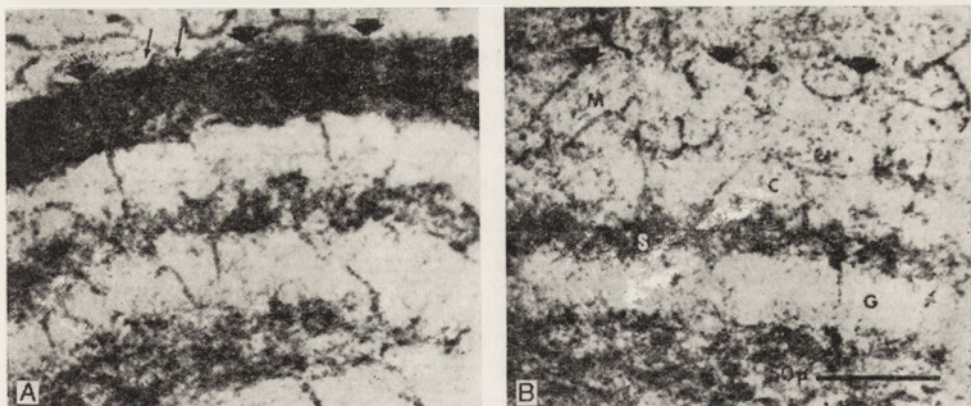
niło się od oryginalnego. Równolegle prowadzone badania na wszczepionej żyłce wrotnej (258) wykazały, że regenerujący splot nerwowy tworzy funkcjonalne kontakty z mięśniami gładkimi transplantowanej tkanki. Być może warunki stworzone w omawianym modelu doświadczalnym są korzystniejsze dla regeneracji włókien cholinergicznym niż miałyby to miejsce bez wprowadzenia tkanki obwodowej. Tym niemniej przedstawione dane wskazują, że włókna cholinergiczne biegnące z przegrody do hipokampa mają zdolność regeneracji. Należy przy tym zaznaczyć, że omawiany typ odnowy w mózgu obserwowano w układzie adrenergicznym i serotonergicznym nie tylko przy transplantacji (por. 234), ale również po uszkodzeniach chemicznych (253, 254, 265) czy elektrolytycznych (266—268).

VI-2. Reinerwacja poprzez wyrastanie bocznych wypustek z nieprzeciętych włókien cholinergicznym

Występowanie zjawiska reinerwacji w ośrodkowym układzie nerwowym (por. Ryc. 9 B) wykazano stosując prosty i dający przekonywujące wyniki model doświadczalny tzw. podwójnych uszkodzeń, wprowadzony przez Liu i Chambersa (235). Wykonuje się mianowicie uszkodzenia określonych szlaków w mózgu, a następnie, po czasie niezbędnym dla usunięcia produktów degeneracji zniszczonych dróg przeprowadza się następne uszkodzenie innego szlaku nerwowego, prowadzącego do tej samej struktury. Kilka dni po tym zabiegu bada się liczbę degenerujących zakończeń nerwowych tego szlaku, porównując ją z liczbą degenerujących zakończeń strony kontrolnej tj. przeciwległej mózgu, w której dokonano tylko powtórnego zabiegu. Jeżeli liczba degenerujących zakończeń po stronie podwójnych uszkodzeń jest większa, to dowodzi, że zaszło zjawisko rozrostu wypustek nerwowych drugiego szlaku w miejscu zajmowanym uprzednio przez zakończenia nerwowe szlaku pierwszego.

Hipokamp jest doskonałym modelem do badania zjawiska reinerwacji w mózgu. Sprawia to jego charakterystyczna budowa anatomiczna, ułatwiająca wybiórcze uszkodzenia poszczególnych włókien dochodzących do hipokampa (por. rozdział III-2, Ryc. 3). Lynch, Cotman i wsp. w ogromnej serii prac (28, 241, 242, 244, 245, 248, 256, 269—274) zbadali odpowiedzi wszystkich połączeń dochodzących do zawoju zębatego hipokampa na uszkodzenia sąsiednich aferentów. Z nielicznymi wyjątkami (271, 272), stwierdzili oni silny rozrost zakończeń nerwowych świadczący o ich niezwyklej plastyczności. Również i system krótkoaksonowych neuronów hipokampa wykazywał tę właściwość (248).

Po przecięciu szlaku wiodącego z kory śródwchowej do hipokampa w mózgu szczurów obserwuje się (244, 246) znaczne zwiększenie reakcji histochemicznej esteraży acetylocholinowej w warstwie drobinowej zawoju zębatego (Ryc. 10 A). Zjawisko to występowało znacznie inten-



Ryc. 10. Aktywność esterazy acetylocholinowej (AChE), badanej histochemicznie, w zawoju zębatym 40 dni po jednostronnym uszkodzeniu kory śródwęchowej: A) strona badana, B) strona kontrolna (kontralateralna) (244).

Małymi strzałkami zaznaczono pojawiającą się aktywność AChE w warstwie, w której uprzednio reakcja histochemiczna była bardzo słaba. Dużymi strzałkami zaznaczono szczylinę hipokampa. M — *moleculare*, C — strefa włókien spoidliowych, S+G *stratum granulare*: S — *supra-granulare*, G — *granulare* (warstwa ciał komórek ziarnistych). Pozostałe objaśnienia jak w opisie Ryc. 3 i 4.

sywniej w mózgach młodych szczurów niż dorosłych (245, 274). Wzrost reakcji histochemicznej w warstwie, w której normalnie jest tylko bardzo słaba aktywność AChE (por. Ryc. 10 B) związany jest najprawdopodobniej z wyrastaniem cholinergicznymi zakończeniach nerwowych w tej strefie. Nowe cholinergiczne zakończenia nerwowe pochodzące z włókien biegnących z przegrody zajmują miejsce zdegenerowanych, niecholinergicznymi zakończeniach. Przekonywującym potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań elektronowo-mikroskopowych (241, 242) wskazujące na rozrost zakończeniach nerwowych w wymienionych warunkach.

Ilościową charakterystykę zmian aktywności esterazy acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej po uszkodzeniu kory śródwęchowej, wskazującą na wyraźny wzrost aktywności enzymów podano w Tabeli 4 (246). Wykazano, że jeśli po uszkodzeniu drogi z kory śródwęchowej uszkodzić przegrodę to aktywność esterazy acetylocholinowej nie wzrasta (244). Wskazywać to może, że proces wzrostu aktywności zależy od zachowania ciągłości połączeń przegroda — hipokamp. Jest to zgodne z omawianymi powyżej danymi o pochodzeniu układu cholinergicznego hipokampa z przegrody.

Wzrost aktywności esterazy acetylocholinowej w obrębie zawoju zębatego i pola CA₃ stwierdzono zarówno metodami histochemicznymi jak i biochemicznymi, również w badaniach po uszkodzeniach grzbietowej części hipokampa (275, 276). Interesujący jest fakt, że wzrost w aktywności enzymu zachodził również w kontralateralnym hipokampie. O mechanizmie obserwowanych zmian niewiele jeszcze można powiedzieć.

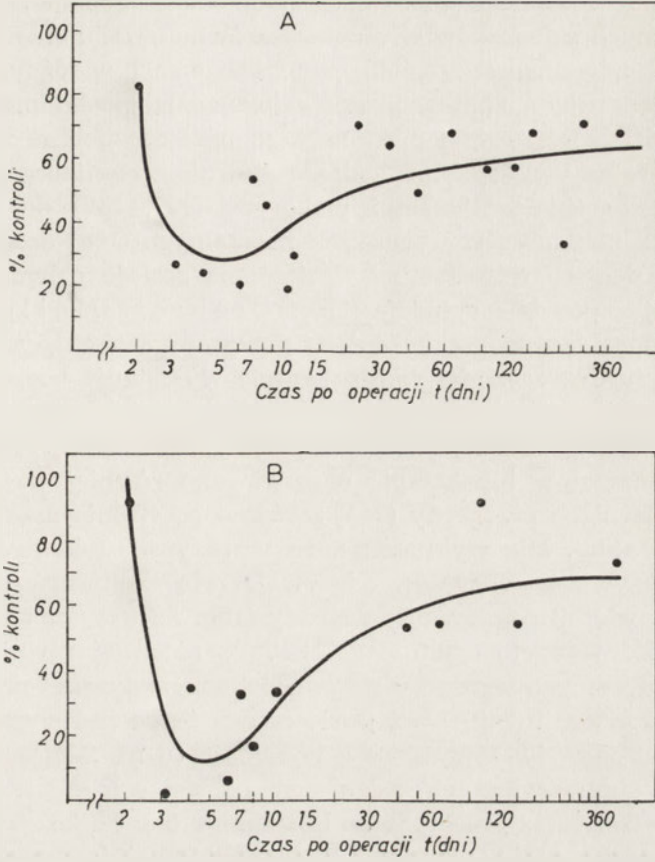
Tabela 4

Aktywność AChE i ChAc w zawoju zębatym hipokampa po przecięciu połączeń z kory śródwęchowej. (246)

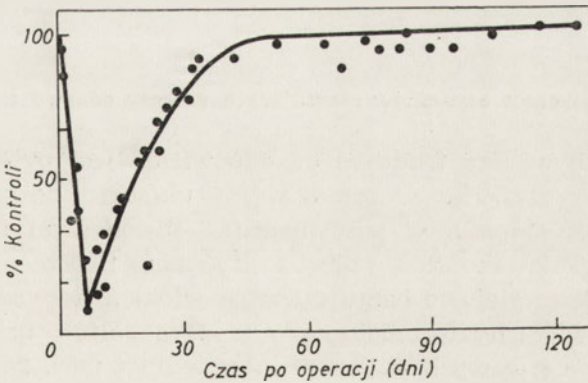
Czas po operacji (dni)	Warstwy	ChAc % kontroli	AChE % kontroli
4	M	98 ± 12	125 ± 8
	G	94 ± 10	117 ± 13
8	M	159 ± 9	—
	G	93 ± 6	—
16	M	152 ± 13	160 ± 12
	G	103 ± 10	88 ± 7
24	M	167 ± 20	164 ± 17
	G	95 ± 21	99 ± 16
93	M _o	110 ± 15	—
	M _m	163 ± 15	—
	M _l	99 ± 8	—
	G	106 ± 4	—

Aktywność enzymów podano w % wartości kontrolnej. Za 100% przyjęto aktywność enzymów po stronie nieoperowanej. Wyniki są średnimi z 4–6 oznaczeń ± s. Objaśnienia symboli warstw — jak w opisie pod ryciną 3 i 4.

Po dużych, przyśrodkowo-brzusznych uszkodzeniach przegrody obserwowano — po początkowym obniżeniu aktywności esterazy acetylocholinowej i transferazy acetylocholinowej — znaczny powrót aktywności enzymatycznej (197, 198). Zjawisko to może mieć związek z podwyższeniem się aktywności enzymów w nieuszkodzonych zakończeniach cholinergicznym podobnie jak to obserwowano w innych przypadkach uszkodzeń mózgu (277), może być też wynikiem pojawienia się enzymów w niecholinergicznym uprzednio neuronach (278). Wydaje się jednak, że podwyższenie się aktywności enzymatycznej wynika przede wszystkim z rozrostu nowych zakończeń cholinergicznym (197). Za przyjęciem tej hipotezy przemawia szereg podobieństw obserwowanego zjawiska do innych zmian interpretowanych przez różnych autorów jako wskaźnik procesu reinerwacji. Krzywe charakteryzujące wzrost aktywności enzymatycznej (Ryc. 11 A, B), mają podobny przebieg jak krzywe ilustrujące zależność zmian liczby zakończeń nerwowych od czasu w różnych strukturach po przerwaniu ich połączeń nerwowych z innymi częściami mózgu (240, 242, 279) (por. Ryc. 12). Po początkowym spadku, liczba zakończeń nerwowych intensywnie rośnie. Ponadto, opisane różnice w aktywności



Ryc. 11 A i B. Zmiany w aktywności esteraży acetylocholinowej (AChE) — A i acetylotransferazy cholinowej (ChAc) — B, w hipokampie w zależności od czasu, po dużych przyśrodkowo-brzusznym uszkodzeniach przegrody (por. Ryc. 6. (2)) (197).



Rys. 12. Liczba niezdegenerowanych synaps w przegrodzie w różnym czasie po przecięciu strzępka (zmodyfikowany 240). Za 100% przyjęto ogólną liczbę synaps w przegrodzie, sposób obliczeń ilości synaps por. (240).

enzymatycznej hipokampa pokrywają się w czasie z podwyższeniem się poziomu różnych składników w obrębie zarówno układu cholinergicznego (244, 246) jak adrenergicznego (243) po uszkodzeniach w różnych częściach mózgu. Degenerujące, cholinergiczne zakończenia, pochodzące ze zniszczonej przyśrodkowej części przegrody, są prawdopodobnie zastępowane przez kolateralne wypustki, pochodzące głównie z cholinergicznym dróg biegnących z grzbietowej części przegrody (197, 249) do hipokampa. Być może, ta niewielka w warunkach normalnych (196) droga nerwowa rozrasta się dopiero wówczas, gdy zniszczona zostaje główna projekcja. Opisywano już podobne sytuacje (280). Srebro i Mellgren (163) sugerują jednak, że po uszkodzeniach przegrody wykonanych w mózgu młodych szczurów, zachodzi w hipokampie wyrastanie bocznych wypustek z elementów cholinergicznym nie pochodzących z przegrody.

Zwiększenie się aktywności esteraży acetylocholinowej i acetylotransferazy cholinowej w hipokampie obserwowano również po jednostronnych uszkodzeniach przegrody (249) zarówno po stronie uszkodzonej jak i kontralateralnej. Nie wykluczone, że w przypadku kontralateralnych wzrostów aktywności enzymów odgrywają rolę cholinergiczne neurony, występujące w linii środkowej przegrody (ang. *intraseptal neurons*), których obecność wykryto ostatnio (281). Tym niemniej również i zjawisko kontralateralnych wzrostów aktywności enzymatycznej przypisuje się zjawisku reinerwacji (249) Wydaje się zatem, że boczne wypustki z cholinergicznym aksonów z przegrody, wyrastają tu na miejsce zdegenerowanych, niecholinergicznym zakończeń nerwowych kontralateralnych dróg biegnących przez przegrodę do hipokampa (90, 93, 282, 283). Po jednostronnym uszkodzeniu strzępka, które jednocześnie powodowało degenerację projekcji spoidłowej do przeciwległego hipokampa, nie obserwowano jednak podobnych efektów kontralateralnych w obrębie układu cholinergicznym (191). Jednakże i w wielu innych przypadkach (por. 28), gdy niszczone włókna spoidłowe hipokampa nie zachodziło zjawisko reinerwacji.

VI-3. Hipotezy dotyczące czynników regulujących procesy odnowy w mózgu

Bardzo ważnym lecz trudnym do odpowiedzi jest pytanie, dlaczego procesy odnowy zachodzą w ośrodkowym układzie nerwowym tylko w ograniczonym stopniu, w porównaniu z obwodowym układem nerwowym. Zaproponowano szereg hipotez. Być może tworzące się w trakcie uszkodzenia blizny glejowe hamują wzrost włókien nerwowych (27, 28). Po podaniu bowiem hyaluronidazy czy trypsyny, które usuwały blizny, wzrost włókien nerwowych zachodził intensywniej (259, 284). Po uszkodzeniach chemicznych — tj. po selektywnym zniszczeniu neuronów zawierających określony neuromediator, blizny glejowe nie tworzyły się i proces regeneracyjny zachodził szybciej niż po zniszczeniu mechanicz-

nym czy elektrolitycznym (27). Nie tylko blizny glejowe jednak, ale i degenerujące włókna mogą stanowić barierę trudną do pokonania przez włókna regenerujące (28). Intensywność procesu odnowy w znacznym stopniu zależy od stosunku włókien rosnących do włókien degenerujących w wyniku uszkodzenia (28).

Nie wiadomo dotąd jaki czynnik inicjuje czy wyzwała procesy odnowy w ośrodkowym układzie nerwowym. Według niektórych autorów (27, 240) bodźcem do wyrastania bocznych wypustek nerwowych jest samo zwolnienie miejsca uprzednio zajmowanego przez inne, następnie zdegenerowane, zakończenia nerwowe. Możliwe, że zachodzi też współzawodnictwo różnych systemów aferentnych o dostępne miejsca (285), co może tłumaczyć zachodzenie procesu odnowy tylko w niektórych aferentach.

Innym proponowanym mechanizmem inicjacji procesów odnowy, w szczególności kolateralnego wyrastania wypustek nerwowych, jest usunięcie substancji, które normalnie wydzielają nieuszkodzone włókna (28, 259). Inni z kolei sądzą, że degenerujące aksony wydzielają jakąś troficzną substancję, która inicjuje procesy regeneracyjne (28, 227, 286). Być może, iż substancje te mogą mieć takie działanie jak NGF — (*Nerve Growth Factor*) — białko stymulujące wzrost wypustek nerwowych (287, 288). NGF wstrzyknięty dokomorowo w momencie transplantacji obwodowej tkanki w obręb mózgu (268, 289—291) powoduje zwiększenie regeneracji włókien adrenergicznych do transplantatu. Sądzi się, że substancje neurotroficzne, pobudzające proces reinerwacji mogą być wydzielane przez pojawiającą się bezpośrednio przed rozpoczęciem tego procesu populację pewnych komórek glejowych (28, 260). Uważa się też (292, 293), że proces wyrastania bocznych wypustek nerwowych może być odbiciem procesów zachodzących w rozwijającym się mózgu. Hipoteza ta wydaje się jednak (28) mało prawdopodobna, gdyż zbyt wiele czynników różni obie te sytuacje. Nie wiadomo dotąd dlaczego wszystkie procesy odnowy zachodzą znacznie łatwiej i szybciej w mózgu organizmów młodych w porównaniu z organizmami dojrzałymi. Nie poznano również dotychczas mechanizmu procesu tzw. rozpoznawania (ang. *recognition*) (257), odpowiedzialnego za powstawanie właściwych połączeń synaptycznych zarówno w rozwoju jak i po uszkodzeniach. Niejasne jest także, czy procesy odnowy po uszkodzeniach prowadzą zawsze do powstania stałych, funkcjonalnych synaps (28, 256, 258, 294).

W kontekście hipotez o regulacji procesów odnowy w mózgu po uszkodzeniach, warto wspomnieć o interesujących sugestiach (293, 295), według których procesy degeneracji i reinerwacji zachodzą w mózgu w ciągu całego życia i dzięki nim obserwuje się między innymi zdolności adaptacyjne i zdolność do uczenia się. W takim ujęciu, uszkodzenia mózgu byłyby niejako czynnikiem potęgującym proces normalnie zachodzący w ośrodkowym układzie nerwowym.

VII. Uwagi końcowe

Rozpatrywane zmiany w obrębie układu cholinergicznego hipokampa są przykładem zmian jakim mogą podlegać układy neurotransmitterowe po uszkodzeniach mózgu. Nieodłącznie sprzężone są tu dwa aspekty: anatomiczny i biochemiczny.

Układ cholinergiczny hipokampa zależy ściśle od ciągłości połączeń hipokampa z przegrodą. Miejsce, wielkość uszkodzenia przegrody, stopień zniszczenia dróg nerwowych dochodzących do hipokampa, a także czas po uszkodzeniu mają zasadnicze znaczenie dla występowania i charakteru zmian składników układu cholinergicznego hipokampa. Należy też podkreślić, że system cholinergiczny hipokampa jest tylko jednym z układów neurotransmitterowych występujących w tej strukturze. Obserwowane po uszkodzeniach mózgu zaburzenia w ilości i metabolizmie składników cholinergicznym mogą być przeto wypadkową bezpośrednich zmian w obrębie układu cholinergicznego i jego interakcji z innymi układami neurotransmitterowymi hipokampa. Należy też pamiętać, że hipokamp jest jednym z ogniw w całym układzie cholinergicznym mózgu. Różnorodne zmiany w neuronach hipokampa, powstałe na skutek zmian w cholinergicznym zakończeniach nerwowych tej struktury po uszkodzeniach mózgu, odbijają się niewątpliwie na aktywności elektrycznej neuronów innych struktur cholinergicznym mózgu unerwianych przez hipokamp. Poznanie całokształtu wyżej wymienionych procesów jest niezwykle istotne dla zrozumienia mechanizmów zmian behawioralnych po uszkodzeniach systemu struktur przegroda-hipokamp.

Problemem, który zasługuje na specjalną uwagę jest opisana zdolność do odnowy w obrębie układu cholinergicznego hipokampa po niektórych uszkodzeniach mózgu. Dzięki modelowemu dla tego rodzaju badań charakterowi budowy hipokampa, uzyskano dane, które jednoznacznie wskazują na występowanie zjawiska plastyczności zakończeń nerwowych mózgu, co jeszcze do niedawna kwestionowano. Plastyczność ta może mieć związek z często notowanymi przejawami kompensacji pewnych objawów behawioralnych zaburzonych wskutek uszkodzeń mózgu (229, 230, 296—298). Poznanie mechanizmów kompensacyjnych a zwłaszcza mechanizmów działania różnych środków farmakologicznych, przyspieszających procesy odnowy w mózgu może mieć ważne znaczenie terapeutyczne.

Artykuł otrzymano 20.2.1977, po rewizji autorskiej przyjęto 30.5.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Konorski J., (1969), *Integracyjna Działalność Mózgu*, PWN, Warszawa.
2. Guth L., Windle W., (1973), *Exp. Neurol.*, **39**, 3—16.
3. Guth L., (1974), *Exp. Neurol.*, **45**, 606—654.

4. Harvey J., (1974), w *The Neuropsychology of Aggression*, red. Whalen R. E., str. 125—147, Plenum Press, New York.
5. Watson W. E., (1976), w *Cell Biology of Brain*, str. 201—272, Chapman and Hall, London.
6. (1972), *Basic Neurochemistry*, red. Albers R. W., Siegal G. J., Katzman R., Agranoff B. W., str. 67—77, Little, Brown and Company, Boston.
7. Moore K. E., (1971), w *An Introduction to Psychopharmacology*, red. Rech R. H., Moore K. E., str. 79—136, Raven Press, New York.
8. Snyder S. H., Young A. B., Bennett J. B., Mulder A. H., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 2039.
9. Margolis F. L., (1974), *Science*, **184**, 909—911.
10. Harvey J. A., Scholfield C. N., Graham L. T., Aprison M. H., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 445—449.
11. Aprison M. H., Daly E. C., Shank R. P., Mc Bride W. J., (1976), w *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission*, red. Berl S., Clark D. D., Schneider D., str. 37—63, Plenum Publishing Corporation, New York.
12. Anden N.-E., Bedard P., Fuxe K., Ungerstedt U., (1972), *Experientia*, (Basel) **28**, 300—301.
13. Sethy V. H., Kuhar M. J., Roth R. H., Van Woert M. H., Aghajanian G. K., (1973), *Brain Res.*, **55**, 481—484.
14. Anden N.-E., (1974), *Nanyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **283**, 419—424.
15. Lindbrink P., (1974), w *Dynamics of Degeneration and Growth in Neurons*, Wenner-Gren Center International Symposium Series, red. Fuxe K., Olson L., Zotterman Y., t. 22, str. 141—149, Pergamon Press, Oxford.
16. Potempska A., Grądkowska M., Oderfeld-Nowak B., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 787—789. •
17. Barbin G., Garbarg M., Schwartz J.-C., Storm-Mathisen J., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 259—263.
18. Moore R. Y., (1970), *Int. Rev. Neurobiol.*, **13**, 67—91.
19. Storm-Mathisen J., (1977), *Progress in Neurobiology*, **8**, 119—181.
20. Mc Geer E. G., Fibiger H. C., Mc Geer P. L., Brooke S., (1973), *Brain Res.* **52**, 289—300.
21. Reis D. J., Ross R. A., John T. H., (1974), w *Dynamics of Degeneration and Growth in Neurons*, Wenner-Gren Center International Symposium Series, red. Fuxe K., Olson L., Zotterman Y., t. 22, str. 108—125, Pergamon Press, Oxford.
22. Grafstein B., (1975), *Exp. Neurol.*, **48**, 32—51.
23. Cowan W. M., (1970), w *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, red. Nauta W. J. H., Ebesson S. O., str. 217—251, Springer-Verlag, Berlin.
24. Black J. B., Hendry J. A., Iversen L. L., (1972), *J. Physiol.*, **221**, 149—159.
25. Thoenen H., (1974), *Life Sci.* **14**, 223—235.
26. Hendry J. A., (1975), *Brain Res.*, **86**, 483—487.
27. Moore R. Y., (1974), w *Plasticity and Recovery of Function in the Central Nervous System*, red. Stein D., Rosen J., Butters N., str. 111—128, Academic Press, New York.
28. Lynch G., Cotman C., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 123—154, Plenum Press, New York.
29. Stenevi U. A., Björklund A., Moore R. Y., (1975), *Brain Behav. Evol.*, **8**, 110—134.
30. (1968), *Progr. Brain Res.* red. Bradley P. B., Fink M., t. 28, str. 1—184.
31. Weiss B., Heller A., (1969), *Fed. Proc.*, **28**, 135—146.

32. Aprison M. H., Hingtgen J. N., (1970), *Int. Rev. Neurobiol.*, **13**, 225—341.
33. Pradham S. N., Dutta S. N., (1971), *Int. Rev. Neurobiol.*, **14**, 173—231.
34. Aprison M. H., Hingtgen J. N., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 121—129.
35. (1972), *Progr. Brain Res.* red. Bradley P. B., Brimblecombe R. W., t. 36, str. 1—203.
36. (1975), *Fed. Proc.*, **34**, (9).
37. (1975), *Catecholamines and Behavior*, red. Friedhoff A. J., Plenum Press, New York.
38. Bignami G., (1976), *Acta Neurobiol., Exp.*, **36**, 5—90.
39. (1976), *GABA in Nervous System Function*, red. Roberts E., Chase T. N., Tower D. B., Raven Press, New York.
40. (1971), Symposium on „Functional Significance of Serotonin in Neuronal Systems” presented at the 55th Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Chicago Ill.
41. Hebb C. O., (1970), w *Ann. Rev. Physiol.*, red. Hall V. E., Giese A. C., Sonsenschein R. R., t. 32, str. 165—192.
42. (1970), *Drugs and Cholinergic Mechanisms in the CNS*, red. Heilbronn E., Winter A., Research Institute of National Defence, Stockholm.
43. Hebb C. O., (1972), *Pharmacol. Rev.*, **52**, 918—947.
44. Fonnum F., (1973), *Brain Res.*, **62**, 497—507.
45. (1975), *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., Raven Press, New York.
46. Wieraszkowski A., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 57—73.
47. Votava Z., (1967), *Ann. Rev. Pharmacol.*, **7**, 223—240.
48. Hrdina P. D., (1974), *Drug Metab. Rev.*, **3**, 89—129.
49. Phillis J. W., (1970), w *The Pharmacology of Synapses*, str. 149—185, Pergamon Press, London.
50. Whittaker V. P., (1969), *Progr. Brain Res.*, **31**, 211—222.
51. Katz B., (1971), *Science*, **173**, 123—126.
52. Hubbard J. I., (1970), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **21**, 33—124.
53. Dowdall M. J., Zimmermann H., (1974), *Brain Res.*, **71**, 160—166.
54. Fonnum F., (1975), w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 145—159, Raven Press, New York.
55. Marchbanks R. M., (1975), *Int. J. Biochem.*, **6**, 303—312.
56. Molenaar P. C., Polak R. L., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 95—99.
57. Silver A., (1974), w *The Biology of Cholinesterases*, str. 2, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
58. Lubińska L., (1974), *Int. Rev. Neurobiol.*, **17**, 241—296.
59. Freeman J. J., Jenden D. J., (1976), *Life Sci.*, **19**, 949—962.
60. Haga T., Noda H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 564—575.
61. Yamamura H. J., Snyder S. H., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 1355—1374.
62. Windlund L., Heilbronn E., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 991—998.
63. Guyenet P., Lefresne P., Rossier J., Beaujouon J. C., Glowinski J., (1973), *Brain Res.*, **62**, 523—529.
64. Guyenet P., Lefresne P., Rossier J., Beaujouon J. C., Glowinski J., (1973), *Mol. Pharmacol.*, **9**, 630—639.
65. Simon J. R., Mittag T. W., Kuhar M. J., (1975), *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1139—1142.
66. Schuberth J., Sollenberg J., Sundwall A., Sorbo B., (1965), *J. Neurochem.*, **12**, 451—454.
67. Barker L. A., Mittag T. W., (1975), *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **192**, 86—94.

68. Simon J. R., Atweh S., Kuhar M. J., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 909—922.
69. Kaita A. A., Goldberg A. M., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1185—1191.
70. Glover V. A., Potter L. T., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 571—580.
71. (1970), *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, red. Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H., str. 34—35, Oxford University Press, London.
72. Ilyutchenok P., Yeliseyeva A. G., (1972), *Int. J. Psychobiol.*, **2**, 177—192.
73. Leaton R. N., (1971), w *An Introduction to Psychopharmacology*, red. Rech R. M., Moore R. E., str. 138—174, Raven Press, New York.
74. Deutsch J. A., (1971), *Science*, **174**, 788—794.
75. Essman W., Essman S., (1971), *Physiol. Reports*, 987—993.
76. Deutsch J. A., (1973), w *The Physiological Basis of Memory*, red. Deutsch J. A., str. 59—76, Academic Press, New York.
77. Smythies J. R., (1970), *Brain Mechanisms and Behavior*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
78. Isaacson R. L., (1974), *The Limbic System*, Plenum Press, New York.
79. Powell E. M., Hines G., (1974), *Behav. Biol.*, **12**, 149—164.
80. Cajal Ramon Y. S., (1893), tłum. L. M., Kraft (1968), *The Structure of Ammon's Horn*, Thomas, Springfield, Ill.
81. Lorente de Nô R., (1934), *J. Psychol. Neurol.*, (Leipzig) **46**, 113—177.
82. Blackstad T. W., (1956), *J. Comp. Neurol.*, **205**, 417—537.
83. Raisman G., Cowan W. M., Powell T. P., (1965), *Brain*, **88**, 963—996.
84. Brodal A., (1969), *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*, 2 wyd. Oxford University Press, New York.
85. Andersen P., (1975), w *The Hippocampus* red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 155—176, Plenum Press, New York.
86. Chronister R. B., White L. E. Jr., (1975), w *The Hippocampus* red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 9—40, Plenum Press, New York.
87. Powell E. W., Hines G., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 41—60, Plenum Press, New York.
88. Stumpf C., (1965), *Int. Rev. Neurobiol.*, **8**, 77—137.
89. Siegal A., Tassoni J. P., (1971), *Brain, Behav. Evol.*, **4**, 201—219.
90. Ibata Y., Desiraju T., Pappas G. D., (1971), *Exp. Neurol.*, **33**, 103—122.
91. Brust-Carmona H., Alvarez-Leefmans F. J., Arditti L., (1973), *Exp. Neurol.*, **40**, 553—566.
92. Hjörth-Simonsen A., (1973), *J. Comp. Neurol.*, **147**, 215—232.
93. Mellgren S. J., Srebro B., (1973), *Brain Res.*, **52**, 19—36.
94. Mosko S., Lynch G., Cotman C., (1973), *J. Comp. Neurol.*, **152**, 163—174.
95. Rose A. M., Hattori T., Fibiger H. C., (1976), *Brain Res.*, **108**, 170—174.
96. Hjörth-Simonsen A., (1973), *J. Comp. Neurol.*, **147**, 145—162.
97. Hjörth-Simonsen A., Jeune B., (1972), *J. Comp. Neurol.*, **144**, 215—232.
98. Hjörth-Simonsen A., Zimmer J., (1975), *J. Comp. Neurol.*, **161**, 57—70.
99. Steward O., (1976), *J. Comp. Neurol.*, **167**, 285—314.
100. Ungerstedt U., (1971), *Acta Physiol. Scand.*, **82**, suppl. 367, 1—48.
101. Pickel V. M., Segal M., Bloom F. E., (1974), *J. Comp. Neurol.*, **155**, 15—42.

102. Segal M., Lándis S., (1974), *Brain Res.*, **78**, 1—15.
103. Storm-Mathisen J., Guldberg H. C., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 793—803.
104. Moore R. Y., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 215—234, Plenum Press, New York.
105. Moore R. Y., Halaris A. E., (1975), *J. Comp. Neurol.*, **164**, 171—183.
106. Gottlieb D. J., Cowan W. M., (1973), *J. Comp. Neurol.*, **149**, 393—422.
107. Blackstad T. W., Brink K., Hem J., Jeune B., (1970), *J. Comp. Neurol.*, **138**, 433—450.
108. Andersen P., Gross G. N., Lømo T., Sveen O., (1969), w *The Interneuron*, UCLA Forum in Medical Sciences, red. Bratzier M. A., t. 11, str. 415—465, University of California Press, Berkeley.
109. Raisman G., Cowan W. M., Powell T. P., (1966), *Brain*, **89**, 83—108.
110. Siegal A., Tassoni J. P., (1971), *Brain Behav. Evol.*, **4**, 185—200.
111. Douglas R. J., (1967), *Psychol. Bull.*, **67**, 416—442.
112. Meibach R. C., Siegal A., (1977), *Brain Res.*, **124**, 2, 197—224.
113. Green J. D., (1964), *Physiol. Rev.*, **44**, 561—608.
114. Izquierdo J., (1975), *Progr. Neurobiol.*, **5**, 39—67.
115. (1975), *The Hippocampus* red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1 i 2, Plenum Press, New York.
116. Butters N., Cermak L., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 2, str. 377—409, Plenum Press, New York.
117. Douglas R. J., (1975), w *The Hippocampus* red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 2, str. 327—361, Plenum Press, New York.
118. Serafetinides E. A., Walter R. D., Cherlow D. G., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 2, str. 363—375, Plenum Press, New York.
119. Weiskrantz L., Warrington E. K., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 2, str. 411—441, Plenum Press, New York.
120. Ursin H., (1976), *Acta Neurobiol. Exp.*, **36**, 91—115.
121. Mahut H., (1972), *Neuropsychologia*, **10**, 65—74.
122. Douglas R. J., Isaacson R. L., (1966), *Psychon. Sci.*, **4**, 283—284.
123. Carlton P. L., (1969), w *Reinforcement and Behavior*, red. Tapp J., str. 286—327, Acad. Press, New York.
124. Kelsey J. E., Grossman S. P., (1969), *Physiol. Behav.*, **4**, 837—845.
125. Warburton D. M., Russell R. W., (1969), *Life Sci.* II, **8**, 617—627.
126. Leaton R. N., Rech R. H., (1972), *Physiol. Behav.*, **8**, 539—541.
127. Warsham E., Hamilton L. W., (1973), *Physiol. Psychol.*, **1**, 219—226.
128. Overstreet D. H., Vasquez B. Y., Russell R. W., (1974), *Neuropharmacology*, **13**, 911—917.
129. Ross J. F., Grossman S. P., (1974), *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **86**, 590—600.
130. Williams J. M., Hamilton L. W., Carlton P. L., (1974), *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **87**, 724—732.
131. Whitehouse Y. M., (1966), *Psychopharmacologia*, **9**, 183—188.
132. Bignami G., Gatti G. L., (1967), w *Neurotoxicity of Drugs* red. Davey D. G., str. 93—106, Excerpta Medica (I. C. S. N. 118), Amsterdam.
133. Rech R. H., (1968), *Psychopharmacologia*, **12**, 371—383.
134. Bures J., Bohdanecky Z., Weiss T., (1962), *Psychopharmacologia*, **3**, 254—263.
135. Stumpf C., Petsche H., Gogolak G., (1962), *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **14**, 212—219.

136. Green E. G., Lomax P., (1970), *Brain Res.*, **18**, 355—359.
137. Bennett T. L., Nunn P., Inman D., (1971), *Physiol. Behav.*, **7**, 451.
138. Feigley D., Hamilton L. W., (1971), *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **76**, 496—504.
139. Sorensen J., Harvey J., (1971), *Physiol. Behav.*, **6**, 723—725.
140. Lewis D. J., Bregman N. J., (1972), *Physiol. Behav.*, **8**, 511.
141. Matthies H., Rauca Ch., Liebeman H., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 1109—1113.
142. Singh H. K., Ott T., Matthies H., (1974), *Psychopharmacologia*, **38**, 247—258.
143. White S. R., (1974), *Pharm. Biochem. Behav.*, **2**, 297—307.
144. Carlton P. L., (1963), *Psychol. Rev.*, **70**, 19—39.
145. Whitehouse J. M., (1966), *Psychopharmacologia*, **9**, 183—188.
146. Warburton D. M., (1972), w *Inhibition and Learning* red. Boakes R., Halliday M. S., str. 431—460, Academic Press, New York.
147. Fonnum F., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 465—472.
148. Goldberg A. M., Mc Caman R. E., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1—8.
149. Jenden D. J., (1973), *Adv. Biochem. Pharmacol.*, **7**, 69—81.
150. Stavinoha W. B., Weintraub S. T., (1974), *Anal. Chem.*, **46**, 757—760.
151. Fonnum F., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 407—409.
152. Longoni R., Mulas A., Pepeu G., (1974), *Brit. J. Pharmacol.*, **52**, 729—731.
153. Rommelspacher H., Goldberg A. M., Kuhar M. J., (1974), *Neuropharmacology*, **13**, 1015—1023.
154. Stavinoha W. B., Weintraub S. T., Modak A. T., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 885—886.
155. Oderfeld-Nowak B., Potempska A., (1977), *Acta Neurobiol. Exp.*, **37**, 137—149.
156. Storm-Mathisen J., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 739—750.
157. Kuhar M., Sethy V. H., Roth R. H., Aghajanian G. K., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 581—593.
158. Oderfeld-Nowak B., Narkiewicz O., Białowas J., Dąbrowska J., Wieraszko A., Grądkowska M., (1974), *Acta Neurobiol. Exp.*, **34**, 583—601.
159. Srebro B., Oderfeld-Nowak B., Kłodos J., Dąbrowska J., Narkiewicz O., (1973), *Life Sci.*, **12**, 261—270.
160. Storm-Mathisen J., Blackstad T. W., (1964), *Acta Anat.*, **56**, 216—253.
161. Lewis P. R. Shute C. C., (1967), *Brain*, **90**, 521—540.
162. Geneser-Jensen F. A., (1972), *Z. Zellforsch.*, **124**, 546—560.
163. Srebro B., Mellgren S. J., (1974), *Brain Res.*, **79**, 119—131.
164. Kultas K. N., Smolikhina T. J., Braznik E. S., Vinogradova O. S., (1974), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **216** (2), 462—465.
165. Fonnum F., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1029—1037.
166. Storm-Mathisen J., (1972), *Brain Res.*, **40**, 215—235.
167. Nadler J. V., Matthews D. A., Cotman C. W., Lynch G., (1974), *Develop. Biol.*, **36**, 142—154.
168. Yamamura H., Kuhar M. J., Snyder S. H., (1974), *Brain Res.*, **80**, 170—176.
169. Kuhar M. J., Yamamura H., (1975), *Nature*, **253**, 560—561.
170. Kuhar M. J., Yamamura H., (1976), *Brain Res.*, **110**, 229—244.

171. Poltz-Tejera G., Schmidt J., Karten H., (1975), *Nature*, **258**, 349—351.
172. Shute C. C., Lewis P. R., (1966), *Z. Zellforsch.*, **69**, 334—343.
173. Gottlieb D. J., Cowan M. H., (1972), *Z. Zellforsch.*, **129**, 413—419.
174. Biscoe T. J., Straugham D. W., (1966), *J. Physiol.*, **183**, 341—359.
175. Steiner F. A., (1968), *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **303**, 173—180.
176. Straugham D. W., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 239—268 Plenum Press, New York.
177. Fonnum F., (1970), w *Drugs and Cholinergic Mechanisms in the CNS*, red. Heilbronn E., Winter A., str. 83—96, Research Institute of National Defence, Stockholm.
178. Fonnum F., (1972), w *Studies of Neurotransmitters at the Synaptic Level*, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* red. Costa E., Iversen L. L., Paoletti R., t. 6, str. 75—88, Raven Press, New York.
179. Kuhar M. J., Rommelspacher H., (1974), *Brain Res.*, **77**, 85—96.
180. Nadler J. V., Cotman C., Lynch G., (1974), *Brain Res.*, **79**, 465—477.
181. Potempska A., (1976), *Praca doktorska*, Inst. Biol. Dośw. PAN, Warszawa.
182. Kuhar M. J., (1975), w *The Hippocampus*, red. Isaacson R. L., Pribram K. H., t. 1, str. 269—284, Plenum Press, New York.
183. Smith C. M., (1974), *Life Sci.*, **14**, 2159—2166.
184. Dudar J. D., (1975), *Brain Res.*, **83**, 123—133.
185. Mayer Ch., Stumpf C., (1958), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, **234**, 490—500.
186. Petsche H., Stumpf C., Gogolak G., (1962), *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **14**, 202—211.
187. Mellgren S. J., (1973), *Z. Zellforsch.*, **141**, 375—400.
188. Matthews D. E., Nadler J. V., Lynch G., Cotman C., (1974), *Develop. Biol.*, **36**, 130—141.
189. Chippendale T. J., Cotman C. W., Kozar M. D., Lynch G. S., (1974), *Brain Res.*, **81**, 485—496.
190. Lewis P. R., Shute C. C., Silver A., (1967), *J. Physiol.*, **191**, 215—224.
191. Storm-Mathisen J., Fonnum F., (1972), w *Progr. Brain Res.* red. Bradley P. B., Brimblecombe R. W., t. 36, str. 41—58, Elsevier, Amsterdam.
192. White L. E., (1959), *J. Comp. Neurol.*, **113**, 1—42.
193. Oderfeld-Nowak B., Narkiewicz O., Dąbrowska J., Wieraszko A., Grądkowska M., (1973), w *Central Nervous System—Studies on Metabolic Regulation and Function*, red. Genazzani E., Herken H., str. 158—163, Springer, Verlag, Berlin.
194. Herink J., Bajgar J., Patočka J., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 187—188.
195. Białowas J., Narkiewicz O., (1974), *Acta Neurobiol. Exp.*, **34**, 573—582.
196. Harkmark W., Mellgren S. J., Srebro B., (1975), *Brain Res.*, **95**, 281—289.
197. Oderfeld-Nowak B., Potempska A., Oderfeld J., (1977), *Neuroscience*, **2**, 641—648.
198. Oderfeld-Nowak B., Potempska A., Wieraszko A., (1975), w *Abstracts of Fifth Int. Meeting ISN, Barcelona*, str. 132.
199. Oderfeld-Nowak B., Skangiel-Kramaska J., (1976), *J. Neurochem.*, **27**, 1241—1245.
200. Wilson B., Schenkel J. L., Fry D. M., (1971), w *Cholinergic Ligand Interactions* red. Triggle D. J., Moran J. F., Barnard E. A., str. 137—174, Academic Press, New York.

201. Bajgar J., Parižek J., (1973), *Brain Res.*, **57**, 299—305.
202. Vijayan V. K., Brownson R. H., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 105—110.
203. Brzeski J., Oderfeld-Nowak B., (w przygotowaniu do druku).
204. Yamamura H. J., Snyder S. H., (1974), *Brain Res.*, **78**, 320—326.
205. Molenaar P., Polak R., (1970), *Brit. J. Pharmacol.*, **40**, 406—417.
206. Miledi R., Potter L. T., *Nature*, **233**, 599—603.
207. Bird S. J., Aghajanian G. K., (1975), *Brain Res.*, **100**, 355—370.
208. Pepeu G., Mulas A., Mulas M. L., (1973), *Brain Res.*, **57**, 153—164.
209. Sethy V. H., Roth R. H., Kuhar M. J., Van Woert M. H., (1973), *Neuropharmacology*, **12**, 819—823.
210. Oderfeld-Nowak B., Grądkowska M., Seyfried A., Narkiewicz O., (1974), *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci Biol.*, **22**, 153—157.
211. Rommelspacher H., Kuhar M. J., (1974), *Brain Res.*, **81**, 243—251.
212. Simon J. R., Kuhar M. J., (1975), *Nature*, **255**, 162—163.
213. Mulder A. H., Yamamura H. J., Kuhar M. J., Snyder S., (1974), *Brain Res.*, **70**, 372—376.
214. Atweh S., Simon J., Kuhar M. J., (1975), *Life Sci.*, **17**, 1535—1544.
215. Beani L., Megazzini P., Ballotti L., Bernardi G., (1969), *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1315—1324.
216. Potempska A., Oderfeld-Nowak B., (1975), w Abstracts Sixth Int. Congr. Pharmacol. Helsinki, str. 461.
217. Rommelspacher H., Kuhar M. J., (1975), w Abstracts Sixth Int. Congr. Pharmacol. Helsinki, str. 219.
218. Kuhar M. J., De Haven R. N., Yamamura H. J., Rommelspacher H., Simon J. R., (1975), *Brain Res.*, **97**, 265—275.
219. Rommelspacher H., Kuhar M. J., (1975), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **291**, 17—22.
220. Potempska A., Sosińska H., Oderfeld-Nowak B., (1977), w Abstracts Sixth Congr. ISN, Copenhagen str. 151.
221. Fuxe K., Hökfelt T., Ungerstedt U., (1970), *Int. Rev. Neurobiol.* **13**, 93—126.
222. Björklund A., Nobin A., Stenevi U., (1973), *Z. Zellforsch.*, **145**, 479—501.
223. Herr B. E., Roth R. H., (1976), *Brain Res.*, **110**, 189—193.
224. Carroll P. T., Buterbaugh G. G., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 917—924.
225. Krnjevič K., Silver A., (1965), *J. Anat. (Lond)*, **99**, 711—759.
226. Sosińska H., Kosmal H., Wieraszkowski A., Oderfeld-Nowak B., (1976), w Streszczeniach XIV Zjazdu Polskiego Tow. Biochem., Lublin, str. 164—165.
227. Cajal Ramon Y. S., (1928); tłum. R. M. May. Degeneration and Regeneration of the Nervous System, t. 2, Oxford University Press, London.
228. Cragg B. G., (1972), w Structure and Function of Nervous System, red. Bourne G. H., t. 4, str. 2—60.
229. Dawson R. G., (1973), *Behav. Biol.*, **8**, 439—461.
230. Eidelberg E., Stein D. G., (1974), *Neurosci. Res Prog. Bull.*, **12**, 190—303.
231. Moore R. Y., (1974), w Dynamics of Degeneration and Growth in Neurons, Wener-Gren Center International Symposium Series, red. Fuxe K., Olson L., Zotterman Y., t. 22, str. 379—388, Pergamon Press, Oxford.
232. (1974), Plasticity and Recovery of Function in the Central Nervous System, red. Stein D., Rosen J., Butters N., Academic Press, New York.
233. (1975), Growth and Regeneration in the Central Nervous System, *Exp. Neurol.*, **48**, (3).

234. Stenevi U. A., Björklund A., Moore R. Y., (1975), *Brain Behav. Evol.*, **8**, 110—134.
235. Liu C-N., Chambers W. W., (1958), *Arch. Neurol. Psychiat.* **79**, 48—61.
236. Raisman G., (1969), *Brain Res.*, **14**, 25—48.
237. Westrum L. E., Black R. G., (1971), *Brain Res.*, **25**, 265—288.
238. Crain B., Cotman C., Taylor D., Lynch G., (1973), *Brain Res.*, **63**, 195—204.
239. Lund R. D., Cunningham T. S., Lund J. S., (1973), *Brain Behav. Evol.*, **8**, 51—72.
240. Raisman G., Field P. H., (1973), *Brain Res.*, **50**, 241—264.
241. Matthews D. A., Cotman C., Lynch G., (1976), *Brain Res.*, **115**, 1—21.
242. Matthews D. A., Cotman C., Lynch G., (1976), *Brain Res.*, **115**, 23—41.
243. Moore R. Y., Björklund A., Stenevi U., (1971), *Brain Res.*, **33**, 13—35.
244. Lynch G., Matthews D. A., Mosko S., Parks T., Cotman C., (1972), *Brain Res.*, **42**, 311—318.
245. Nadler J. V., Cotman C., Lynch G., (1973), *Brain Res.*, **63**, 215—230.
246. Storm-Mathisen J., (1974), *Brain Res.*, **8**, 181—197.
247. Svendgaard N-N., Björklund A., Stenevi U., (1976), *Brain Res.*, **102**, 1—22.
248. Nadler J. V., Cotman C., (1974), *Exp. Neurol.*, **45**, 403—413.
249. Wieraszko A., Oderfeld-Nowak B., Narkiewicz O., (1977), *Neuroscience*, **2**, 649—654.
250. Björklund A., Stenevi U., (1971), *Brain Res.*, **31**, 1—20.
251. Pickel V. M., Krebs H., Bloom F. E., (1973), *Brain Res.*, **59**, 169—179.
252. Olson L., Malmfors T., (1970), *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, **348**, 1—112.
253. Baumgarten H. G., Lachenmayer L., Björklund A., Nobin A., Rosengren E., (1973), *Life Sci.*, **12**, 357—364.
254. Björklund A., Nobin A., Stenevi U., (1973), *Brain Res.*, **50**, 214—220.
255. Nobin A., Baumgarten H. G., Björklund A., Lachenmayer L., Stenevi U., (1973), *Brain Res.*, **56**, 1—24.
256. Lynch G., Deadwyler S., Cotman C., (1973), *Science*, **180**, 1364—1366.
257. Appel S. H., (1975), *Exp. Neurol.*, **48**, 52—74.
258. Björklund A., Johansson B., Stenevi U., Svendgaard N-A., (1975), *Nature*, **253**, 446—448.
259. Guth L., (1975), *Exp. Neurol.*, **48**, 3—15.
260. Rose G. G., Lynch G., Cotman C., (1976), *Brain Res. Bull.*, **1**, 87—92.
261. Rosner B. S., (1974), w *Plasticity and Recovery of Function in the Central Nervous System*, red. Stein D., Rosen J., Butters N., str. 1—29, Academic Press, New York.
262. Moore R. Y., Björklund A., Stenevi U., (1974), w *The Neurosciences: Third Study Program*, red. Schmitt F. O., Worden F. G., MIT Press, Cambridge, Mass.
263. Svendgaard N., Björklund A., Hardebo J., Stenevi U., (1975), *Nature*, **255**, 334—337.
264. Björklund A., Stenevi U., (1976), *Neuroscience Abstracts*, **2**, 2, 809.
265. Björklund A., Katzman R., Stenevi U., West K. A., (1971), *Brain Res.*, **31**, 21—33.

266. Katzman R., Björklund A., Owman Ch., Stenevi U., West K. A., (1971), *Brain Res.*, **25**, 579—596.
267. Stenevi U., Björklund A., Moore R. Y., (1972), *Exp. Neurol.*, **35**, 290—299.
268. Stenevi U., Bjerre B., Björklund A., Mobley W., (1974), *Brain Res.*, **69**, 217—234.
269. Cotman C., Matthews D. A., Taylor D., Lynch G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3473—3477.
270. Lynch G., Stanfield B., Cotman C., (1973), *Brain Res.*, **59**, 155—168.
271. Lynch G., Stanfield B., Parks T., Cotman C., (1974), *Brain Res.*, **69**, 1—11.
272. Goldowitz D., White W. F., Steward O., Lynch G., Cotman C., (1975), *Exp. Neurol.*, **47**, 433—441.
273. Lynch G., Gall C., Rose G., Cotman C., (1976), *Brain Res.*, **110**, 57—71.
274. Cotman C., Taylor D., Lynch G., (1973), *Brain Res.*, **63**, 205—214.
275. Oderfeld-Nowak B., Wieraszko A., Sosińska H., Kosmal A., (1976), *Acta Neurobiol. Exp.*, **36**, (Abstr), str. 719.
276. Sosińska H., Oderfeld-Nowak B., Wieraszko A., Heiler B., (w przygotowaniu do druku).
277. Agid Y., Jovoy F., Glowinski J., (1973), *Nature, New Biology*, **245**, 150—151.
278. Phillis J. W., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 691—698.
279. Lynch G., Gall Ch., Cotman C., (1977), *Exp. Neurol.*, **54**, 179—183.
280. Chung S. H., (1976), *Nature*, **261**, 190—191.
281. Chronister R. B., De France J. F., Sikes R. W., Srebro B., White L. E. Jr., (1976), *Exp. Neurol.*, **50**, 684—698.
282. Green R. H., Schwartzbaum J. S., (1968), *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **65**, 388—396.
283. Bartholini G., Stadler H., Gadea-Ciria M., Lloyd K. G., (1975), w *Abstracts Fifth Int. Meet. ISN, Barcelona*, str. 560.
284. Matinian L. A., Andreasian A. S., (1973), w *Akad. Nauk. Armen. SSR*, 1—94.
285. Zimmer J., (1974), *Brain Res.*, **72**, 137—142.
286. Hoffman H., Springell P. H., (1951), *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **29**, 417—424.
287. Levi-Montalcini R., Angeletti P., (1968), *Physiol. Rev.*, **48**, 534—569.
288. Varon S., (1975), *Exp. Neurol.*, **48**, 75—92.
289. Björklund A., Stenevi U., (1972), *Science*, **175**, 1251—1253.
290. Bjerre B., Björklund A., Stenevi U., (1973), *Brain Res.*, **60**, 161—176.
291. Bjerre B., Björklund A., Stenevi U., (1974), *Brain Res.*, **74**, 1—18.
292. Guillery R. W., (1972), *J. Comp. Neurol.*, **146**, 407—420.
293. Goodman D. C., Bagdasarian R. S., Horel J. A., (1973), *Brain Behav. Evol.*, **8**, 27—50.
294. West J. R., Deadwyler S., Cotman C., Lynch G., (1975), *Brain Res.*, **97**, 215—231.
295. Sotelo C., Palay S., (1971), *Lab. Invest.*, **25**, 653—671.
296. Luria A. R., Naydin V. L., Tsevetkova L. S., Vinaskaya E. N., (1969), w *Handbook of Clinical Neurology*, red. Vinken R. J., Bruyn G. W., t. 3, str. 368—433.

297. Meyer P., (1974), w *Plasticity and Recovery of Function in the Central Nervous System*, red. Stein D., Rosen T., Butters N., str. 217—235, Academic Press, New York.
298. Stein D. G., (1974), w *Plasticity and Recovery of Function in the Central Nervous System*, red. Stein D., Rosen T., Butters N., str. 373—427, Academic Press, New York.

POSTĘPY BIOCHEMII

December 1977

ARTICLES IN POLISH

Volume 23

Number 4

Dedication to Professor Włodzimierz Niemierko to honour the eightieth anniversary of his birth	493
E. N. Christiansen, L. Wojtczak — Regulation of Energy Metabolism in Brown Adipose Tissue Mitochondria (Institut for Ernaeringsforskning, Univ. Oslo, Dept Cellular Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	495
M. Michalak, M. G. Sarzała — Asymmetry of Biological Membranes (Dept Biochem. Nerv. Syst. and Muscle, M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	523
J. Zborowski — Exchange of Phospholipids between Biological Membranes (Dept Cellular Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	541
B. Grzelakowska-Sztabert — Metabolism of Aminoanalogues of Folate (Dept Cellular Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	559
B. Oderfeld-Nowak — Effect of Some Brain Lesions on Cholinergic Mechanisms of Hippocampus (Dept Biochem. Nerv. Syst. and Muscle, M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	579

UWAGA P.T. AUTORZY!
REDAKCJA POSTĘPÓW BIOCHEMII UPRZEJMIE PRZYPOMINA
O KONIECZNOŚCI OGRANICZANIA OBJĘTOŚCI PRAC PRZESY-
ŁANYCH DO REDAKCJI.

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

Piśmiennictwo: W artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki 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 autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, 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 egz. 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 zaznaczając, 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: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny 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.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

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

SPIS TREŚCI

Dedykacja w osiemdziesiątą rocznicę urodzin Prof. dr Włodzimierza Niemierko	493
E. N. Christiansen, L. Wojtczak—Regulacja metabolizmu energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej	495
M. Michalak, M. G. Sarzała—Asymetria błon biologicznych	523
J. Zborowski—Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi	541
B. Grzelakowska-Sztabert—Metabolizm aminoanalogów folianu	559
B. Oderfeld-Nowak—Wpływ niektórych uszkodzeń mózgu na mechanizmy cholinergiczne hipokampa	579