

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK



TOM IV

1958

ZESZYT 2

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik



TOM IV

1958

ZESZYT 2

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Józef Heller

Zastępcy red. nacz. — Irena Chmielewska i Jerzy Meduski

Sekretarz — Maria Piechowska

Adres Redakcji:

INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN

Warszawa, Krak. Przedmieście 26/28, tel. 613-66

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1958

Nakład 962 egz. (854 + 108)	Oddano do składania 3.II.58.
Ark. wyd. 10,25. Ark. druk. 8,75	Podpisano do druku 28.VII.58.
Papier druk. sat. kl. V, 70 g, 70×100	Druk ukończono w sierpniu 1958
Cena zł 20.—	Zam. 217c/58 A-12

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

J. SUPNIEWSKI i H. SUPNIEWSKA

Gibereliny

Fusarium moniliforme

Niektóre grzyby pasożytujące na roślinach tworzą związki o charakterze trucizn i antymetabolitów dla komórek i tkanek roślinnych. Związki te uszkadzają komórki roślinne, powodują ich nieprawidłowy wzrost i rozwój, bądź nawet je zabijają. Wspomniane związki są wytwarzane na przykład przez niektóre gatunki w rodzaju *Fusarium* (sierpik), pospolite pasożyty roślinne.

Sierpiki (*Fusarium*. Link. *Fungi imperfecti. Phragmosporae.*) opisano już w roku 1809, później wykazano, że są to uwstecznione grzyby workowe (*Ascomycetes*). Rozmnażają się one w dwójaki sposób, płciowo i bezpłciowo. Postać bezpłciowa *Fusarium* tworzy mikrokonidia (*Microconidia*) osadzone pod postacią łańcuszków lub główek na końcach grzybni (zwykle małe owalnego kształtu) oraz sierpowate duże makrokonidia (*Macroconidia*) również wyrastające na końcach grzybni. Grzyby te tworzą przetrwalniki odporne na działanie czynników zewnętrznych otoczone grubymi błonami komórkowymi pozwalające przetrwać przez niekorzystne okresy podczas zimy, suszy itd. Fusaria tworzą chlamidospory (*Chlamidosporae*) w środku lub na końcach grzybni, a nawet we wnętrzu makrokonidii, tworzą też kuliste lub jajowate zbite skupienia grubościennych grzybni zwane sklerocjami (*Sclerocium*).

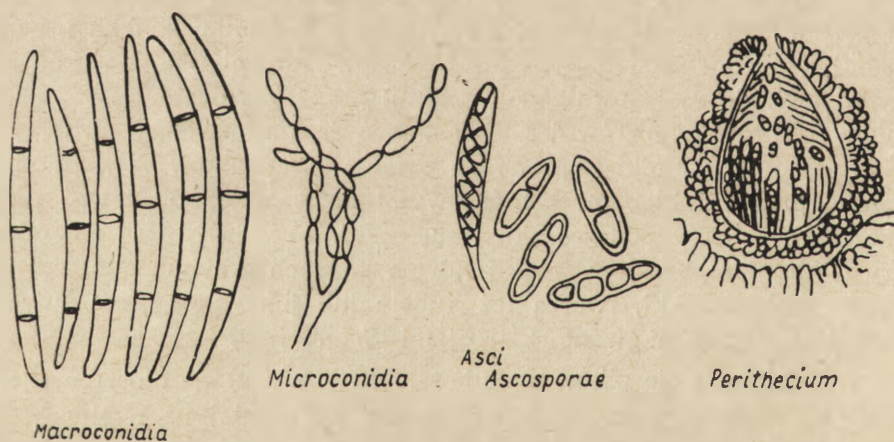
Formą płciową sierpików są giberelle (*Gibberella*) — otocznie (*Perithecia*) wytwarzane przez niektóre fusaria, najczęściej na roślinach. Są to zwykle okrągłe lub butelkowate twory o ciemnym zabarwieniu, wyrastające z grzybni strzępiastej. Składają się one z zewnętrznej pokrywy zbitej grzybni, wewnątrz której znajduje się przestrzeń, w którą wrastają maczugowate komórki grzybni zwane workami (*Asci*), które są wypełnione owalnymi zarodkami — askosporami (*Ascosporae*) lub płone. Worki dojrzałe pękają u góry i uwalniają askospory, które przez górny otwór peritecium wydostają się na zewnątrz.

Przenośnikami askospor i konidiów na zdrowe rośliny może być wiatr, owady i zwierzęta. Niekiedy rośliny są zakażane przez chlamidospory i sklerocia znajdujące się w glebie. *Fuzaria* często zakażają ziarna roślin, z których wyrastają zakażone rośliny. Po wykiełkowaniu zarodników w roślinie rozwija się grzybnia, która wnika do wnętrza komórek, rozwija się w przestrzeniach międzykomórkowych i wrasta do wnętrza naczyń, czopując je, a tym samym uniemożliwiając doprowadzanie materiałów odżywczych, powodując zamieranie rośliny.

Częstym pasożytem wielu roślin, w pierwszym rzędzie jednoliściennych strefy podzwrotnikowej jest *Fusarium moniliforme*, *Sheld* z grupy *Liseola*, tworząc na roślinach fioletowe *perithecia*, zwane *Gibberella Fujikuroi* (*Saw.*) *Wr.*

Fusarium moniliforme rozwija się w roślinach przy ciepłocie gleby około 35° tak, że prawie nie spotykamy go poza krajami ciepłymi. Grzyb ten dobrze rośnie na pożywkach stałych i płynnych. Do wyosobnienia go i identyfikacji służy agar z wyciągiem z ziemniaków i gotowany ryż, na którym tworzy obficie konidia i fioletowy barwnik. Pasożyt ten najlepiej rośnie w temperaturze 26°, wzrost jest hamowany w temperaturach niżej 2—8° i wyżej 35—40°.

Tworzy on gęstą, poplątaną, gałęziastą grzybnę, zwykle złożoną z długich, wielkomórkowych strzępeków, najpierw bezbarwnych, potem two-



Rys. 1. *Gibberella Fujikuroi*

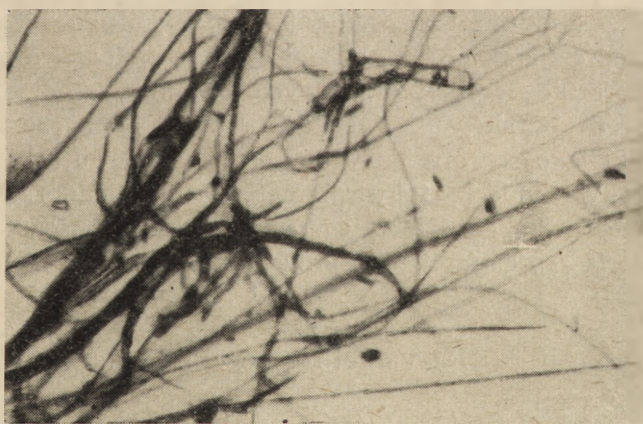
zących barwik, który powoduje różowienie, czerwienienie lub fioletowienie grzybni. W strzępkach grzybni znajduje się dużo kropelek tłuszczu. Na grzybni powietrznej wyrastają łańcuszki małych, owalnych, jednokomórkowych mikrokoniidii, a rzadko sztyłkowate i sierpowate duże makrokonidia, które zwykle mają trzy przegródki.

Makrokonidia wyrastają zwykle z końców grzybni powietrznej lub z jej skupień zwanych pionatami (*Pionnata*), pseudopionatami (*Pseudopionnata*) i sporodochiami (*Sporodochia*). Oprócz tego z grzybni tworzą się chlamidospory i sklerocja, a niekiedy też okrągławe, butelkowate,



Rys. 2. *Gibberella Fujikuroi* pow. 800 \times , grzybnia z chlamydosporami

ciemno-niebieskie perytecja (*Gibberellae*) zawierające worki (*Asci*) z 6—8 wydłużonymi eliptycznymi, bezbarwnymi askosporami (*Ascosporae*) posiadającymi po jednej przegrodce.



Rys. 3. *Gibberella Fujikuroi* pow. 800 \times , grzybnia i mikrokonidia

Fusarium moniliforme występuje w paru odmianach o różnej barwie grzybni: białej, blado-różowej, szaro-liliowej lub fioletowej.

Fusarium moniliforme subspecies *majus* wyróżnia się większymi makrokonidiami, które posiadają po pięć przegródek. *Fusarium moniliforme*

varietas laeticolor ma szersze makrokonidia. *Fusarium neoceras varietas subglutinans* Wr. Rg. zwane też *Fusarium moniliforme varietas subglutinans* tworzy mikrokonidia zebrane w główki, a nie w łańcuszki oraz duże słabo zgięte lub proste makrokonidia, tworzy ono peritecia *Gibberella Fujikuroi* var. *subglutinans* Saw. Wr. Podobne cechy wykazuje *Fusarium neoceras* Wr. Rg.

Hoze w roku 1898 opisał chorobę ryżu zwaną w Japonii „bakanae” wywoływaną przez pasożyt *Gibberella Fujikuroi* (27, 28). Grzyb ten charakterystycznie zmienia wzrost młodych siewek ryżu. Rośliny silnie wydłużają się, tworząc cienkie, wiotkie łodygi i długie, żółto-zielone (*Chlorosis*) liście. Młode rośliny często szybko giną. Niekiedy powstają z nich rośliny dojrzałe nie tworzące kłosów, lub źle się kłoszące. Grzyb ten ma duże znaczenie ekonomiczne dla krajów produkujących ryż, jest bowiem przyczyną znacznego obniżenia plonów.

Gibberella Fujikuroi wywołuje też schorzenie kukurydzy, suche gnicie jej kolb, uszkodzenia ziaren, pękanie ich i rozpadanie w mączystą masę. Po wykiełkowaniu z zakażonych ziaren kukurydzy, nawet pozornie nieuszkodzonych, wyrastają słabe roślinki szybko ginące. Zwykle ziarna te źle kiełkują lub nie kiełkują w ogóle. Choroba trzciny cukrowej zwana na Jawie „pokka beng” wywołana jest również przez *Gibberella Fujikuroi*. Młode siewki zakażonych roślin są zahamowane w rozwoju, cierpią na chlorozę, na liściach ich tworzą się ciemno fioletowe plamy grzybni, liście są rozszczepione u podstawy, wierzchołki wzrostu często giną.

Grzyb ten powoduje też brunatnienie i schnięcie kłosów sorgum (*Sorghum vulgare Pers*), prosa, rzadziej żyta, jęczmienia, owsa, włośnicy (*Setaria*), schorzenie torebek owocowych bawełny, schorzenia cebulek czosnku, korzeni buraków fig, *Celosia cristata*, *Sesuvium zeylanica* (6,59,63), rośnie jako saprofit na wielu zerwanych owocach i jarzynach. Znalezione go w dyniach, tykwach, cytrynach, pomidorach, rzodkiewce, bananach, owocach kakao, figach, gruszkach, niekiedy pasożytuje na owadach (*Nemaderis septemfasciata*, *Pyrausta nubilis*).

Otrzymanie giberelin

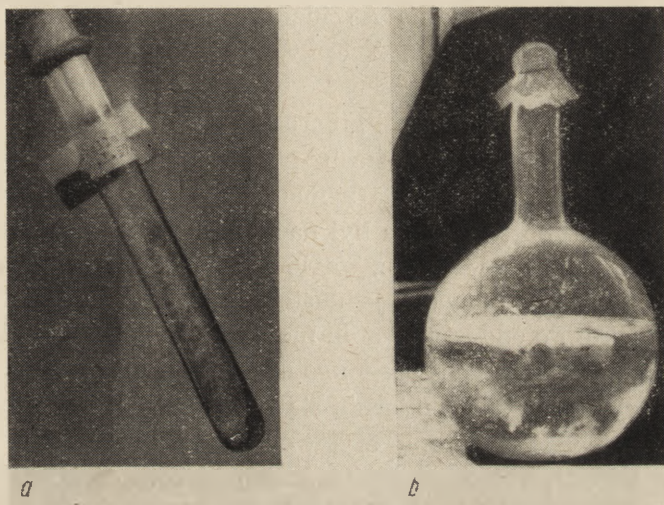
Gibberella Fujikuroi dobrze rośnie na pożywkach płynnych zawierających obok wody glikozę, sacharozę lub glicerol jako źródła węgla i wodoru, sole amonowe jako źródła azotu oraz potrzebne sole mineralne jak fosforan potasowy i siarczan magnezowy obok śladów niezbędnych mikroelementów znajdujących się w zwykłej wodzie.

Grzybnia rośnie na powierzchni pożywki jako gęsty dość zbity kożuch, zwolna obrastając całą powierzchnię płynu, najszybciej w temperaturach

24—26°. Grzybnia jest początkowo biała, w miejscach wygórowanych zaczyna później różowieć, fioletowieć lub niebieszczyć się.

W 1938 roku Hemmi i Seto, wykazali, że *Gibberella Fujikuroi* wydziela do pożywki płynnej składniki powodujące u siewek ryżu zmiany analogiczne do zmian obserwowanych u ryżu chorego na „bakanae” (bujanie wiotkiej łodygi, bujanie liści, chloroza, Yabuta 1938).

Prawie wyłącznie tylko szczepy *Gibberella Fujikuroi* wyhodowane z ryżu tworzą gibereliny; szczepy wyhodowane z innych roślin zwykle nie tworzą tych związków.



Rys. 4. Hodowle *Gibberella Fujikuroi*
a) na agarze ziemniaczanym, b) w pożywce płynnej

Ciała czynne biologicznie wytwarzane są tylko przez ten jeden gatunek fuzarium, gatunki pokrewne nie tworzą ich, jak również inne gatunki grzybów pokrewne sierpikom (Curtis).

Yabuta i Hoyashi w roku 1939 wyosobnili z hodowli *Gibberella Fujikuroi* krystaliczne ciało chemiczne nazwane gibereliną (*Gibberellin*), które w bardzo dużych rozcieńczeniach wywoływało typowe objawy „bakanae” u siewek ryżu. Yabuta i Sumiki (68, 76, 83) z współpracownikami otrzymali z hodowli tych giberelinę na większą skalę, z 180 litrów pożywki 2,67—3,3 g (33,34).

Yabuta, Sumiki, Aso z współpracownikami (75,78) giberelinę tą rozdzielili na dwa krystaliczne związki: giberelinę A nierozpuszczalną w benzenie i działającą silniej biologicznie na siewki ryżu od rozpuszczalnej w gorącym benzenie gibereliny B. Giberelina B, która powstaje z gibereliny A przez ogrzanie tej do 50—70° z rozcieńczonym kwasem

solnym jest więc produktem rozpadu wytworzonym podczas przeróbek chemicznych pożywki.

Takahashi i Kitamura (65) z współpracownikami rozdzielili ester metylowy gibereliny A na estry trzech ciał chemicznych, giberelin A₁, A₂, i A₃ (kwas giberelowy) stosując chromatografię na żelu krzemionkowym.

Giberelina A jest więc mieszaniną trzech ciał chemicznych o zbliżonych własnościach, tak że nawet metodami chromatografii i ekstrakcji przeciwprądowej nie dają się same rozdzielić. Różne szczepy *Gibberella Fujikuroi* tworzą te trzy ciała w różnych stosunkach ilościowych. Niektóre z nich tworzą tylko giberelinę A₃ identyczną z kwasem giberelowym (Curtis, Cross) i gibereliną X (Stodola), inne nie tworzą jej zupełnie.

Badacze japońscy otrzymywali gibereliny z powierzchniowych hodowli *Gibberella Fajikuroi* na pożywkach płynnych zawierających chlorek amonowy, glikozę lub glicerynę, trzymanyh przez 30—34 dni w temperaturze 25°. Sposób postępowania był następujący: po odsączeniu grzybni pożywkę zakwaszano i mieszano z węglem adsorpcyjnym, który wówczas pochłania gibereliny. Eluowano je następnie z węgla metanolem w roztworze amoniaku. Po oddestylowaniu metanolu w pozostałości wytrącano gibereliny zakwaszając płyn kwasem solnym i wyciągano je octanem etylowym, w którym związki te miernie się rozpuszczają. Pozostałość po oddestylowaniu z wyciągu octanu etylowego krystalizowano z tegoż rozpuszczalnika (68, 76, 83). Średnio badacze japońscy otrzymywali 10 mg krystalicznej gibereliny A z litra pożywki.

Stodola, Raper z współpracownikami (64) wyosobnili gibereliny w większych ilościach, prowadząc fermentację pożywek w dużych tankach zaopatrzonych w mieszkadła elektryczne. Pożywki zawierały 1,25—1,5 % glikozy, 0,3 % chlorku amonowego, fosforan jednopotasowy i siarczan magnezowy, pH pożywek wynosiło 5—6. Fermentacja trwała zwykle 65 godzin w temperaturze 25°. Podczas fermentacji płyn mieszano i przepuszczano przez niego żywy prąd powietrza. Po fermentacji odsączoną grzybnę ekstrahowano metanolem w roztworze amoniaku. Z wyciągów oddestylowywano metanol, pozostałość zakwaszano i ekstrahowano gibereliny octanem etylowym. Po oczyszczeniu wyciągów odparowywano z nich rozpuszczalnik, a pozostałość krystalizowano z mieszaniny octanu etylowego i benzenu. Obok gibereliny A uzyskano też giberelinę X identyczną z kwasem giberelowym. Z 154 galonów pożywki otrzymuje się w ten sposób 11—14 g giberelin, a z ługów po giberelinach 15—16 g kwasu fuzarynowego.

Curtis i Cross (21) hodowali *Gibberella Fujikuroi* w pożywce Raulin-Thoma z dodatkiem sacharozy w temperaturze 25° przy ciągłym mieszaniu.

Po zakończonej fermentacji odsączano grzybnię, przesącz zakwaszano do pH 4 i adsorbowano gibereliny na węglu aktywnym, z którego eluowano je uwodnionym acetonem. Po oddestylowaniu acetonu z wodnej pozostałości wyciągano giberelinę octanem etylowym. Z wyciągu tego ekstrahowano je buforem fosforanowym o pH 6,3; wyciąg wodny zakwaszano kwasem solnym do pH 3,6 i ekstrahowano z niego gibereliny octanem etylowym. Po odparowaniu tego wyciągu otrzymywano do 180 mg krystalicznych giberelin z litra pożywki. W wyniku frakcjonowanej krystalizacji z tej mieszaniny uzyskano czysty kwas giberelowy.

Borrow, Brian i współpracownicy (7) prowadzili fermentację na dużą skalę w tankach 80 litrowych z pożywką Roulin Thoma zawierającą 4% glikozy i winian amonowy. Fermentację prowadzono w 25° mieszając pożywkę i przepuszczając przez nią powietrze (0,3—0,5 litra powietrza na minutę na każdy litr pożywki). Pożywka miała pH 5,5. Fermentacja trwała 18 dni po czym otrzymywano do 200 mg kwasu giberelowego z litra pożywki, wówczas gdy w tychże samych warunkach hodowle powierzchniowe dawały do 40 mg kwasu giberelowego z litra pożywki.

W hodowlach głębinowych przez pierwsze 90 godzin po posiewie grzyba nie obserwuje się szybkiego wzrostu. W ciągu następnych 20 godzin rośnie on szybko, pożywka zakwasza się i zmniejsza się w niej zawartość glikozy, soli amonowych i fosforanów. Po następnych 10—30 godzinach waga grzybni nieco obniża się i pH zwolna wzrasta. Nie obserwuje się jednak wtedy morfologicznych objawów autolizy grzybni.

Po zakończonym wzroście grzyba pożywka zawiera względnie niewielką ilość giberelin, która wzrasta przez następne dni osiągając maksimum w 18 dniu fermentacji. Poziom giberelin w pożywce obniża się następnie po 20—25 dniach od zaszczepienia. Kwas giberelowy otrzymywano z przesączów pożywki metodą Curtisa i Crossa.

Yabuta, Sumiki, Tamura, Murayama i Suzuki (80) zbadał skład chemiczny grzybni *Gibberella Fujikuroi*. Wysuszona grzybnia zawiera 8,84% wody, 13,94% surowych włókien, 1,94% popiołu, 40,25% białek, 6,07% tłuszczów, 0,57% węglowodanów, 2,14% azotu aminowego.

Z suchej grzybni 4,9—7,3% przechodzi do wyciągu eterowego, wyekstrahowane substancje zawierają 15,2—20,3% części niezmydlającej się, złożonej głównie z ergosterolu, fungisterolu (?) i nienasyconego węglowodoru $C_{22}H_{36}$ o t.t. 66°. Sucha grzybnia zawiera ponadto 0,05% czerwonego barwnika nierozpuszczalnego w wodzie i eterze, rozpuszczalnego w metanolu.

W wyciągach z grzybni stwierdzono obecność kwasów organicznych, z których zidentyfikowano kwas szczawiowy, oraz związków aminowych; (około 0,01% adeniny i 0,011% betainy). Grzybnia zawiera też śluz rozpuszczalny w wodzie, nierozpuszczalny w etanolu, w skład którego wchodzi ketogalaktoza, pentoza i kwas uronowy.

W 1948 r. badacze japońscy (66) wyosobnili z *Gibberella Fujikuroi* kwas fuzarynowy (kwas 5-butylopiwikolinowy o t. t. 106—7°) otrzymany następnie przez Amerykanów (Stodola, Raper i inni, 64). Związek ten działa hamująco na wzrost roślin, a więc w sposób antagonistyczny do działania giberelin.

Niektóre odmiany *Gibberelli Fujikuroi* ($M = 1$) tworzą kożuch złożony z długich gałęzistych nitek, w innych wyrastają strzępki grzybni krótkie i nierozgałęziające się silnie ($M = 2$). Odmiany te tworzą mało mikrokoniidii. Grzybnie ich łatwo dają się odsączać, wskutek tego dobrze nadają się one do wyrobu giberelin.

Inne odmiany grzyba ($C = 1$, $C = 2$) tworzą krótkie, mało rozgałęziające się strzępki grzybni, zato dużo jajowatych lub cylindrycznych mikrokoniidii. Niekiedy powstaje ich tak dużo, że kożuch grzybni przypomina wyglądem mikroskopowym hodowlę drożdży. Odmiany te źle sączą się, przeto nie są odpowiednie do wyrobu giberelin.

Własności i budowa chemiczna giberelin

Pierwsze badania chemiczne nad giberelinami wprowadzili Japończycy. Do badań używali gibereliny A, a więc mieszaniny giberelin A_1 , A_2 i kwasu giberelowego, wyniki ich doświadczeń należy więc przyjmować z zastrzeżeniami, jako prowadzone nad niejednorodnym związkiem chemicznym.

Mimo zastrzeżeń, dały jednak one podwalinę dla następnych prac badaczy brytyjskich, które doprowadziły do wyjaśnienia budowy kwasu giberelowego.

Giberelina A jest związkiem bezbarwnym, krystalicznym, topiącym się z rozkładem w 242—4°, skręcającym płaszczyznę światła spolaryzowanego na prawo $[\alpha]_D^{20} + 36,1^\circ$, nie posiadającym swobodnego widma absorpcyjnego w nadfiolecie. Nie rozpuszcza się ona w wodzie, rozpuszcza się dobrze w roztworach wodorotlenków potasowców, amoniaku, acetonie, alkoholach, trudno rozpuszcza się w większości rozpuszczalników organicznych, nie rozpuszcza się w benzynie i eterze naftowym.

Niekiedy w stężonym kwasie siarkowym, tworzy krwisto-czerwone roztwory o niebieskiej fluorescencji (reakcja kwasu giberelowego). Giberelina A już w roztworze 0,0000125% pobudza wzrost siewek ryżu.

Yabuata i współpracownicy podali dla gibereliny A wzór sumaryczny $C_{22}H_{26}O_7$. (68,75) Wykazali, że zawiera jedną grupę karboksylową i jedną grupę alkoholową. Otrzymali jej ester jednoetylowy o t. t. 220—1°, ester jedno-para-bromofenacylowy o t. t. 188—90°, jednooctan o t. t. 233—8° i eter jednometylowy o t. t. 185—7°.

Giberelina po uwodorowaniu katalitycznym wobec platyny dała pochodną bogatszą o 2 atomy wodoru $C_{22}H_{28}O_7$ o t. t. 270—1° (z rozkładem) słabo działającą biologicznie.

Po stapianiu gibereliny A z wodorotlenkiem potasowym otrzymano kwas propionowy.

Giberelina A jest związkiem wrażliwym na działanie rozcieńczonych kwasów i zasad, nawet w temperaturze pokojowej (68,75).

Ogrzaną z rozcieńczonym kwasem solnym do 50—70° zamienia się w giberelinę B o wzorze $C_{19}H_{22}O_3$ t. t. 197—9° $[\alpha]_D^{20} + 83,3^\circ$ tworzącą bezbarwne kryształy rozpuszczalne w gorącym benzenie i alkoholach. Giberelina B pobudza wzrost siewek ryżu w roztworze 0,0002%, nie barwi się z stężonym kwasem siarkowym i nie daje się redukować katalitycznie.

Giberelina A gotowana z rozcieńczonym kwasem solnym daje trzy związki krystaliczne. Powstaje wtedy giberelina C o wzorze $C_{22}H_{28}O_8$ topiąca się w 251—2° o $[\alpha]_D^{20} + 49,5^\circ$ nie dająca się redukować katalitycznie, działająca słabo biologicznie na siewki ryżu.

Dwa dalsze produkty rozpadu gibereliny A: kwasy giberowy i izogiberowy są nieczynne biologicznie. Kwas giberowy $C_{19}H_{22}O_3$ o t. t. 153—4°, nie skręcający płaszczyzny światła spolaryzowanego, zawiera grupę ketonową bowiem tworzy oksym (o t. t. 225—30°) oraz ester jednometylowy o t. t. 116—17°. Kwas ten nie daje się acetylować, benzoilować i redukować katalitycznie. Krystalizacja jego z rozcieńczonego kwasu solnego zamienia go w izomeryczny kwas izogiberowy.

Kwas izogiberowy $C_{19}H_{22}O_3$ o t. t. 173—4°, nie skręca płaszczyzny światła spolaryzowanego, krystalizowany z rozpuszczalników organicznych zawierających wodę zamienia się z powrotem na kwas giberowy. Kwas giberowy i izogiberowy posiadają w nadfiolecie widmo absorbcyjne dwufenylometanu.

Gibereliny A, B, C, kwasy giberowy i izogiberowy poddane suchej destylacji z selenem zamieniają się najpierw w bezbarwny keton giberon $C_{18}H_{16}O$ o t. t. 127—8° tworzący oksym o t. t. 139—43°. Giberon destylowany dalej z selenem przechodzi w węglowodór giberen $C_{16}H_{16}$ o t. t. 98°. Giberon i giberen nie pobudzają wzrostu siewek ryżu a ich widma absorbcyjne w nadfiolecie są zbliżone do widma fluorenu. Mulholland i Ward (53) wykazali, że giberen jest 1,7-dwumetylofluorenem i otrzymali go drogą syntetyczną.

Gilberen utleniany chromianem sodowym w roztworze kwasu octowego przechodzi w giberenon o t. t. 77—8° dający oksym o t. t. 184—5°. Giberenon jest żółtym, krystalicznym związkiem chemicznym i jak wykazali Mulholland i Ward ma budowę 1,7-dwumetylofluorenonu.

Stapianie giberenonu z wodorotlenkiem potasowym prowadzi do tworzenia się kwasu berenowego $C_{16}H_{16}O_2$ o t. t. 126—7° i kwasu giberenonojednokarbonowego $C_{16}H_{12}O_3$ o t. t. 312—13° (z rozkładem).

Kwas berenowy utleniany zasadowym roztworem nadmanganianu potasowego zamienia się w kwas dwufenylotrójkarboksylowy $C_{15}H_{10}O_6$ o t. t. 302—3° i kwas metyloldwufenylotrójkarboksylowy $C_{16}H_{12}O_6$ o t. t. 305—10°. Kwas dwufenylotrójkarboksylowy ogrzany z stężonym kwasem siarkowym cyklizuje się do kwasu fluoreno-4,5-dwukarboksylowego o t. t. 285°.

Takahashi, Kitamura i współpracownicy (65) rozdzielili za pomocą chromatografii ester metylowy gibereliny A na trzy związki ester metylowy: gibereliny A_1 — $C_{20}H_{26}O_6$ o t. t. 230—2° $[\alpha]_D^{20} + 35,1^\circ$, ester gibereliny A_2 — $C_{21}H_{30}O_6$ o t. t. 183—5° $[\alpha]_D^{20} + 28,1^\circ$ i ester gibereliny A_3 (kwasu giberelowego) $C_{20}H_{24}O_6$ o t. t. 202—4° $[\alpha]_D^{20} + 67,0^\circ$. Chromatograficzny rozdział samych giberelin A_1 , A_2 , A_3 , nie jest możliwy. Giberelina A_1 topi się w 232—5°, giberelina A_2 — 235—7°, giberelina A_3 — 230—2° (33). Gibereliny A otrzymane z różnych szczepów *Gibberella Fujikuroi* zawierają zmienne ilości procentowe giberelin A_1 , A_2 i A_3 , niekiedy nie zawierają gibereliny A_3 , niekiedy znów składają się tylko z gibereliny A_3 .

Giberelina A_3 została w czystej postaci otrzymana przez Curtisa i Crossa (21) oraz niezależnie od nich przez Stodola, Rapera (64). Przez badaczy brytyjskich nazwana została kwasem giberelowym. Ma wzór sumaryczny $C_{19}H_{22}O_3$. Jest bezbarwnym, krystalicznym związkiem o temperaturze 233—5°, przy czym podczas stapiania ulega rozkładowi z wydzieleniem dwutlenku węgla. Skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego na prawo $[\alpha]_D^{20} + 82^\circ$.

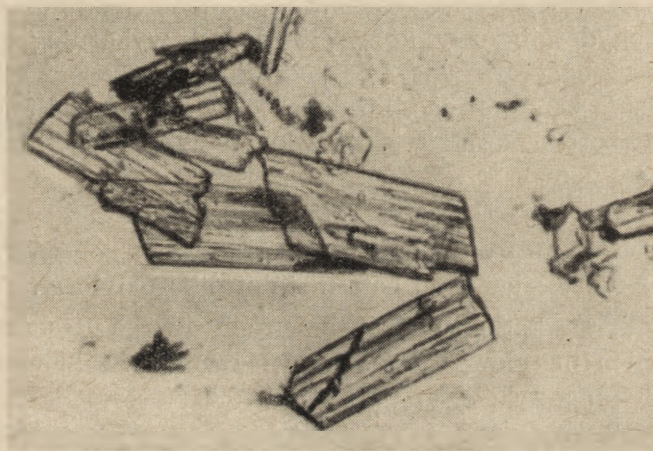
Kwas giberelowy pobudza do wzrostu siewki ryżu równie silnie jak giberelina A.

Jest to kwas jednozasadowy posiadający grupę hydroksylową; otrzymuje się ester jednometylowy o t. t. 207—9°, ester jedno-para-bromofenacylowy o t. t. 218—19°, pochodną jednoacetylową o t. t. 233—34° (z rozkładem) i ester jednometylowy tej pochodnej o t. t. 180—81°.

Kwas giberelowy prawie nie rozpuszcza się w wodzie, benzenie, chloroformie, czterochlorku węgla, nie rozpuszcza się w eterze naftowym, miernie rozpuszcza się w octanie etylowym, dobrze w etanolu, metanolu, butanolu i acetonie zawierającym wodę. Sole sodowa, amonowa, potasowa

są rozpuszczalne w wodzie. Kwas giberelowy adsorbuje się na węglu skąd może być eluowany acetonem zawierającym wodę lub metanolem w roztworze amoniaku; octan etylowy, benzen lub chloroform nie wyciągają go, aceton bezwodny bardzo wolno.

Kwas ten w odróżnieniu od gibereliny A_1 barwi na czerwono stężony kwas siarkowy. Ogrzany z stężonym kwasem solnym wydziela cząsteczkę dwutlenku węgla i zamienia się w kwas giberowy i kwas allogeniberowy. Sucha destylacja kwasu giberelowego z selenem daje giberon i giberen.



Rys. 5. Kryształy kwasu giberelowego pow. 100 \times

Kwas giberelowy jest wrażliwy na działanie rozcieńczonych kwasów i zasad; jest kwasem jednozasadowym, łączy więc jeden atom sodu, gdy miareczkujemy go roztworem wodorotlenku sodowego. Daje też estry: metylowy i para-bromofenacetylowy. W cieplecie pokojowej zostawiony z nadmiarem roztworu wodorotlenku sodowego z wolna łączy drugi atom sodu tworząc sól dwusodową, posiada więc grupę laktonową z wolna hydrolizującą się przy nadmiarze zasad. Silne pasmo absorpcyjne przy 1780 cm^{-1} w podczerwieni wskazuje na obecność ugrupowania gamma-laktonowego. Tworzy on pochodną jednoacetylową, jednobenzoilową i eter metylowy, zawiera więc czynną grupę alkoholową.

Kwas giberelowy poddany suchej destylacji z selenem tworzy giberen-1,7-dwumetylofluoren, nie wykazuje jednak w nadfiolecie charakterystycznego widma absorpcyjnego związków fluorenowych, musi więc zawierać ten pierścień uwodorowany. Kwas giberelowy uwodorowany katalitycznie łączy cztery atomy wodoru, zawiera więc dwa wiązania podwójne.

Kwas solny 1-n już w temperaturze pokojowej odczepia od kwasu giberelowego cząsteczkę dwutlenku węgla i wody — powstaje kwas allo-

giberowy — jednozasadowy hydroksykwask, wykazujący w nadfiolecie widmo absorbcyjne charakterystyczne dla pierścienia benzenowego i związków fluorenowych.

Gotowany z rozcieńczonym kwasem solnym kwas allogiberowy izomerizuje się do kwasu giberowego—jednozasadowego ketonokwasu, tworzącego oksym. Utlenianie dwutlenkiem selenu prowadzi do kwasu giberdionowego — dwuketokwasu jednozasadowego. Związek ten po utlenieniu zasadowym roztworem dwutleniku wodoru przechodzi w kwas czterohydrodwymetylofluorenotrójkarbonowy.

Z kwasu giberowego po utlenieniu nadmanganianem potasowym powstaje kwas dehydrogiberowy, który posiada, jak wykazuje jego absorpcja w nadfiolecie, dodatkowe wiązanie podwójne sprzężone z tymże wiązaniem pierścienia benzenowego. Po dekarboksylizacji kwas ten przechodzi w keton — giberon, powstający też z kwasu giberowego podczas suchej destylacji z selenem.

Z giberonu po utlenieniu kwasem chromowym powstaje kwas indanonokarboksylowy, który utleniany nadmanganianem potasowym zamienia się w kwas 3-metyloflatowy i beta-metylotrójkarbalyowy.

Położenie grupy karboksylowej kwasu giberowego ustalono odwadniając giberdionian metylowy do kwasu 1,7-dwumetylo-fluoreno-9-karboksylowego, otrzymanego też drogą syntetyczną.

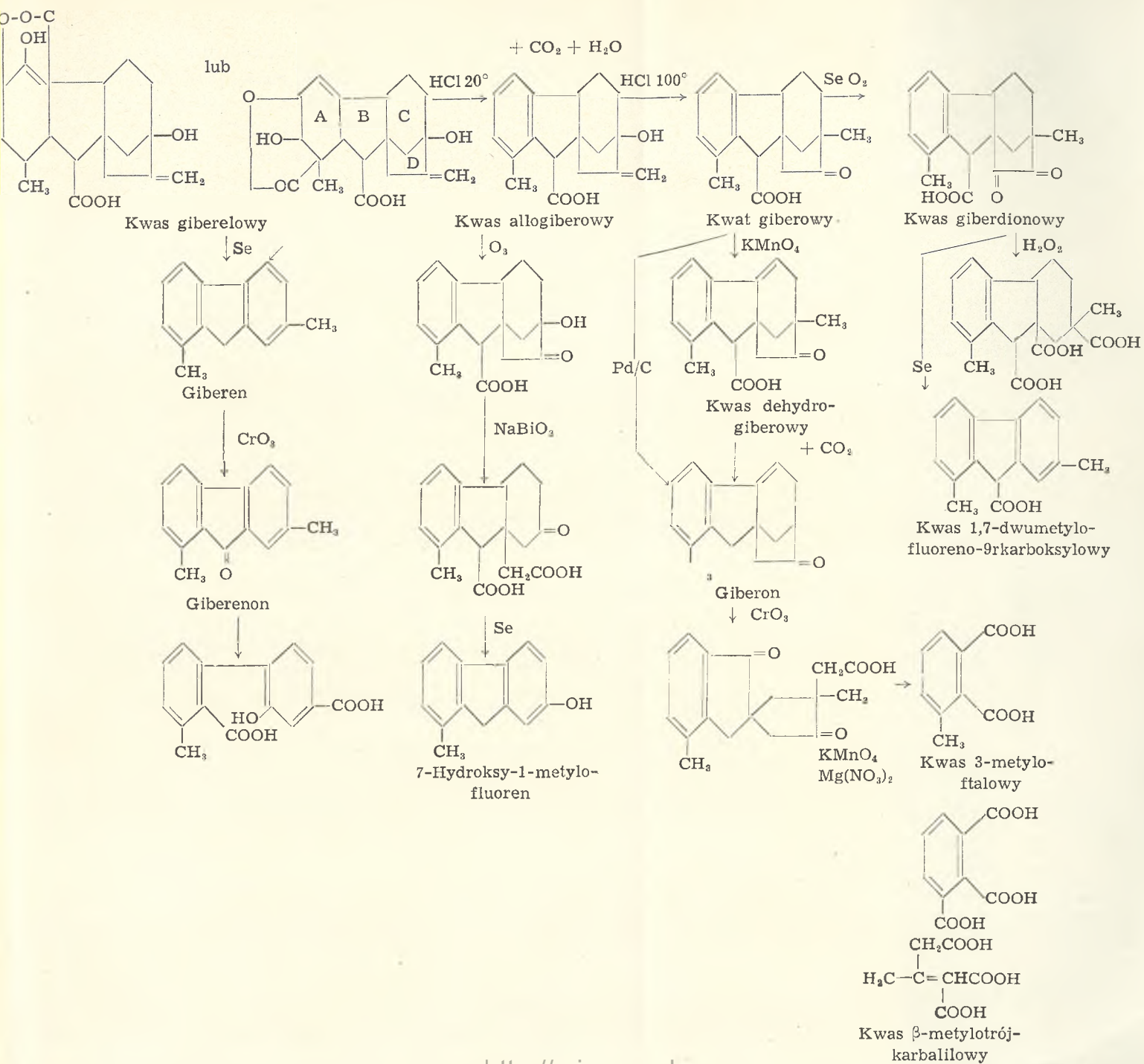
Kwas allogiberowy posiada pierścień benzenowy i końcową grupę metylenową oraz trzeciorzędową grupę alkoholową trudną do zacetylowania, która nie daje się utlenić do grupy ketonowej. Podczas ozonolizy kwasu allogiberowego uzyskuje się aldehyd mrówkowy i pięcioczłonowy α -ketol, który po utlenieniu bizmutanem sodowym zamienia się w kwas dwukarboksylowy. Odwodorowanie selenem tego kwasu prowadzi do 7-hydroksy-1-metylofluorenu otrzymanego również drogą syntetyczną.

Otrzymane wyniki pozwalają na ustalenie budowy kwasu giberowego i kwasu allogiberowego. Dla kwasu giberelowego zaproponowano dwa wzory różniące się rozmieszczeniem podstawników w pierścieniu A. Jest on więc czteropierścieniowym kwasem jednokarboksylowym o grupie γ -laktonowej, zawiera drugorzędową grupę alkoholową, którą można acetylować lub benzoilować i trzeciorzędową grupę alkoholową odporną na acylację. W skład jego cząsteczki wchodzi: końcowa grupa metylenowa, grupa metylowa oraz jedno wiązanie podwójne w uwodorowanym pierścieniu fluorenowym. (18, 19, 53, 54).

Kwas giberelowy należy zaliczyć więc do grupy związków pokrewnych wieloterpenom.

Budowa chemiczna giberelin A_1 i A_2 jest nadal nieustalona.

Degradacja chemiczna kwasu giberelewego



Biologiczne działanie giberelin

Kurasawa (36) w r. 1926 wykrył, że przesące hodowli *Gibberella Fujikuroi* na pożywkach płynnych wzmagają i przyspieszają wzrost siewek ryżu hodowanych na pożywce Knopa. Zaobserwowany odczyn biologiczny służył następnie badaczom japońskim (Yabuta, Sumikii i in.) w badaniu nad giberelinami, do wykrywania ich drogą biologiczną.

Przesące z hodowli *Gibberella Fujikuroi* powodują u siewek ryżu wszystkie objawy choroby bakanae. Siewki bujają wskutek szybkiego rozrostu międzywęźli łodyg, (Hemmi, Seto 26) które stają się długie i cienkie. Również szybciej rosną liście i są dłuższe niż normalnie.

Rozrost korzeni nie postępuje w parze z wzrostem nadziemnych części siewek tak, że przy prawidłowym składzie pożywki Knopa rośliny są niedożywiane, bo układ korzeniowy nie dostarcza im dostatecznie szybko związków azotowych i niezbędnych składników mineralnych. Rozwój chloroplastów nie idzie w parze z wzrostem tkanek, rośliny cierpią na chlorozę, liście ich i łodygi zawierają mało chloroplastów, są więc barwy jasno żółto-zielonej. Objawy te znikają lub zmniejszają się przy bardziej intensywnym dostarczaniu roślinom składników mineralnych to, jest przy stosowaniu bardziej skoncentrowanych płynów odżywczych (69). Gibereliny A_1 , A_2 , B, C i kwas giberelowy wywierają na siewki ryżu podobne działanie nawet, gdy stosujemy je w płynach odżywczych w bardzo małych stężeniach.

Gibereliny A_1 , A_2 i kwas giberelowy działają na siewki ryżu zarówno wówczas, gdy są wchłaniane przez układ korzeniowy w hodowlach wodnych, piaskowych i ziemnych, jak również po wkraplaniu ich roztworów na szczytowe stożki wzrostu (metoda mikrokropelkowa) lub po podaniu na nie pod postacią maści lanolinowych, po opryskaniu roślin roztworami giberelin lub opylaniu ich mieszaninami giberelin z obojętnymi proszkami.

W pewnych granicach stężeń wzrost roślin jest proporcjonalny do logarytmów podanych dawek giberelin. Jednorazowe zastosowanie dawki gibereliny na stożek wzrostu, powoduje szybki wzrost rośliny przez parę następnych dni, potem wzrost zmniejsza się i wraca do stanu prawidłowego.

Dłuższe podawanie giberelin w równych niezbyt długich odstępach czasu, powoduje ciągły, stały, szybki wzrost roślin, które osiągają wysokość nawet dwa razy wyższą od roślin kontrolnych. Wzrost roślin oczywiście jest ograniczony ich cyklem rozwojowym. Krzewienie się, to jest tworzenie pędów bocznych, jest mniejsze niż u roślin kontrolnych.

Nadmierny wzrost siewek ryżu występuje już w roztworze gibereliny A o stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$, i jest najsilniejszy przy stężeniu 1,0 — 10,0 $\mu\text{g/ml}$.

Przy opryskiwaniu ryż rośnie najszybciej, gdy stosowany roztwór zawiera w mililitrze 100 μg gibereliny A.

Duże dawki giberelin uszkodzają rośliny: siewki nie rosną, brunatnieją i zamierają.

Auksyna-kwas β -indolooctowy działa synergistycznie z giberelinami, Yabuta, Sumiki, Tamari (80) z współpracownikami obserwowali najsilniejsze pobudzenie wzrostu siewek ryżu w roztworze 0,0005 % gibereliny A i 0,00001 % kwasu β -indolooctowego.

Wzrost ryżu i innych roślin spowodowany jest głównie zwiększeniem rozmiarów komórek międzywęzła łodygi, które silnie wydłużają się w osi łodygi, nie jest wywołany wzmożeniem podziałów komórkowych (14).

Gibereliny w podobny sposób pobudzają wzrost pszenicy w hodowlach wodnych (9, 10, 31). Rośliny wówczas rosną szybko wzdłuż. Łodygi ich są cienkie i długie, liście wydłużone barwy jasno żółto-zielonej. Chloroza znika przy zastosowaniu płynów bardziej zasobnych w składniki mineralne Brian, Elson (11). Gibereliny podobnie wzmagają wzrost siewek jęczmienia (Yabuta).

Wkraplanie roztworów giberelin na szczytowy stożek wzrostu siewek kukurydzy lub podanie do pożywek Knopa podczas hodowli wodnych zwiększa wzrost roślin o 50—75% (Curtis). Najsilniej działaniu temu ulegają karłowate odmiany kukurydzy, osiągając

wysokość zwykłych odmian (Phinney 57, 85). Pobudzanie wzrostu kukurydzy występuje już po dawce 0,01 μg gibereliny A.

Gibereliny wzmagają wzrost trawy (10, 29). *Digitaria sanguinea* opylana roztworami 10—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gibereliny A rośnie silniej od roślin kontrolnych. Po ścięciu trawa ta odrasta dwukrotnie szybciej niż rośliny kontrolne. Liście jej są zielone, wówczas, gdy u roślin kontrolnych mają barwę czerwoną (Leben, Barton 39).

Poa pratensis opylana gibereliną A lub kwasem giberelowym rośnie szybko nawet w okresach jej fizjologicznego zahamowania wzrostu, a więc późnym latem, jesienią lub w zimie. Gibereliny wzmagają wzrost liści traw (Brian)



Rys. 6. Siewki pszenicy
a) w pożywce Knopa, b) w pożywce Knopa z 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kwasu giberelowego

Gibereliny pobudzają również wzrost roślin dwuliściennych, nie wszystkich jednak w jednakowym stopniu. Na niektóre gatunki w ogóle nie działają, na inne działają słabo. Na ogół silnie wzmagają wzrost odmian karłowatych i krzewiastych, które pod ich wpływem szybko rosną wzwyż, dając pędy wijące się lub płożące, za to krzewienie się roślin jest hamowane.

Rośliny dwuletnie tworzące, wskutek zahamowania wzrostu pędu głównego, rozetkę liści w pierwszym roku wegetacji, po zadziałaniu giberelin wypuszczają długie pędy łodygowe, kwitną i owocują już w ciągu pierwszego roku.



Rys. 7. Hodowle grochu w pożywce Knopa (od strony lewej do prawej) 1, 2 — kontrole, 3 — w pożywce Knopa z 0,01 $\mu\text{g/ml}$ kwasu giberelowego. W następnych naczyniach stężenia kwasu rosną w dwójnasób w stosunku do poprzedniego. W ostatnim naczyniu dawka 10 $\mu\text{g/ml}$

Gibereliny silnie pobudzają wzrost łodyg i szypułek liściowych karłowatych odmian grochu ogrodowego *Pisum sativum* (14). Łodygi stają się dwa do czterech razy dłuższe od łodyg roślin kontrolnych. W granicach dawek 0,01—0,1 μg giberelin na roślinę, wzrost grochu jest proporcjonalny do logarytmu podanej dawki, i najszybciej następuje czwartego dnia po jej zastosowaniu (10, 12). Wzrost wywołany jest rozrostem międzywęźli łodygowych, których liczba jest ta sama co u roślin kontrolnych (8). Powierzchnia liścia grochu nie zwiększa się po stosowaniu giberelin (Lockhard 41).

Wzrost karłowatych odmian wonnego groszku (*Lathyrus odoratus*) jest silnie pobudzany przez te czynniki wzrostowe. Karłowaty pachnący groszek tworzy krzaczaste gałęziste rośliny o krótkich głównych łodygach. Po zastosowaniu gibereliny A w ilości 1 mg na roślinę oś główna szybko wyrasta, jest wiotka wijąca się i parokrotnie dłuższa od osi roślin pra-

widłowych. Wytwarzanie się pędów bocznych do pewnego stopnia jest hamowane.

Liście roślin są chlorotyczne, blado-zielone, lancetowate, wówczas gdy rośliny prawidłowe mają liście owalne i ciemno-zielone. Powierzchnia liści u roślin poddanych działaniu gibereliny wzrasta dwukrotnie.

Na zwykle wijące się odmiany groszku wonnego gibereliny działają względnie słabo.

Kwas giberelowy wzmacnia wzrost karłowatych odmian fasoli (*Phaseolus vulgaris* (Brian, 15).



Rys. 8. Karłowaty pachnący groszek — hodowle doniczkowe

W doniczkach prawych rośliny kontrolne, w doniczkach lewych na szczytowy stożek wzrostu wkraplano po 1 μ g kwasu giberelowego. Od strony prawej do lewej po czterech tygodniach A i B, po siedmiu tygodniach C

Giberelina A w roztworze 0,001% pobudza kiełkowanie nasion soi i wzmacnia wzrost jej siewek (Yabuta, Sumiki 77). Siewki zawierają te same ilości kwasu askorbinowego i asparaginy, co siewki prawidłowe.

Roztwory 1,5 — 20 p. p. m. gibereliny A powodują silne wydłużanie się łodyg trzydniowych siewek białego łubinu (*Lupinus albus*) Bartossi, Cifferi (5) Najszybciej rosną wówczas hypokotyle.

Wzrost tytoniu jest silnie pobudzany przez giberelinę A. Siewki tytoniu są wysokie i wiotkie, zawierają nieco mniej nikotyny niż siewki kontrolne (Yabuta, Sumiki, Takahashi 74, 79).

Opylanie krzewów herbaty gibereliną A nie zwiększa rozmiarów ich liści i nie zwiększa w nich zawartości kofeiny i innych składników chemicznych (Yabuta, Sumiki 82).

U *Paulownia tomentosa* giberelina powoduje wydłużenie łodygi o 25—93% i zwiększa jej grubość o 0—32% (Yabuta, Sumiki, 72).

Stosowanie po 0,05 ml roztworu 100 $\mu\text{g/ml}$ gibereliny na szczyt wzrostu endywii (przez sześć dni) powoduje szybki wzrost łodygi i szybkie kwitnięcie (Harrington, Rappaport, Hood, 22).

Giberelina u dwuletnich roślin rozetkowych już w pierwszym roku wegetacji powoduje wzrost łodygi, tworzenie pączków kwiatowych, kwitnięcie i owocowanie. Pobudza ona już w pierwszym roku rozrost międzywęźli w krótkiej łodydze rozetki; z rozetki liści wyrasta więc wysoka łodyga zwykle zakończona kwiatami. Działanie to obserwowano u buraków, marchwi, pietruszki, kapusty. Krótkotrwałe działanie niskich temperatur (zimna) na rozetkowe rośliny dwuletnie wywiera podobne działanie. Tworzenie się łodyg i kwitnięcie roślin rozetkowych często zależy od stopnia ich naświetlania w ciągu doby, jest więc zależne od długości dnia.

Lulek czarny (*Hyoscyamus niger*) jest rośliną dnia długiego, dwuletnią, tworzącą w pierwszym roku rozetkę liści, kwitnącą w drugim roku tylko podczas długich dni w krajach położonych w średnich szerokościach geograficznych.

Już w pierwszym roku wegetacji tej rośliny, podanie dawek 60—300 μg giberelin na szczyt wzrostu rozetki liściowej powoduje wyrastanie z niej wysokiej łodygi. Rośliny, którym podano dawkę 60 μg giberelin nie kwitną, gdy zaś są wystawione na światło po 8—9 godzin dziennie, kwitną gdy naświetlamy je dłużej. Po dawce 300 μg giberelin kwitną i owocują nawet, gdy naświetlane są przez krótki okres w ciągu doby (Lang, 37, 38, 60).

Dłuższe naświetlanie roślin zwiększa asymilację i tworzenie się związków organicznych, co ułatwia szybszy rozrost po stosowaniu giberelin u większości roślin. U kąkola (*Agrostemma githago*) jednak giberelina silniej wzmacnia wzrost, gdy naświetla się go krótko w ciągu doby (35).

Bryophyllum crenulatum tworzy odmiany rosnące lepiej w ciągu bądź krótkiego lub długiego dnia. Wkraplanie kwasu giberelowego (50 mg/l) na stożki wzrostu rozetek liściowych tych roślin i naświetlanie ich przez 9 godzin na dobę powodują u roślin krótkiego dnia szybki wzrost łodygi i obfite tworzenie się kwiataów. Działanie to występuje słabiej u odmian dnia długiego (Bünsow, Herder, 16).



Rys. 9. *Bryophyllum crenulatum*

A, B, C, D — rośliny, którym wkrapiano codziennie po kropli 50 $\mu\text{g/ml}$ roztworu giberelin przez 17 dni i następnie naświetlano je przez różne okresy czasu po 9 godzin dziennie. Inne rośliny w doniczkach — kontrole

Marth i współpracownicy (48, 49, 50) badali wpływ opryskiwania roztworami giberelin (10—100 p. p. m.) wielu roślin oraz działanie maści lanolinowych zawierających giberelin (0,1—1%) na ich szczytowe stożki wzrostu. Większość roślin reagowała na gibereliny szybkim wzrostem łodygi i liści. Rośliny prędzej kwitły i owocowały, owoce były liczniejsze i bardziej obfite. Zwiększała się też wilgotna i sucha waga roślin. Pomidory owocowały 2-3 tygodnie wcześniej. Obserwowano też wzmożenie wzrostu słonecznika, roślin kwiatowych, drzew owocowych i iglastych.

Brian i Henning (13, 14) zauważyli mierne działanie pobudzające małych stężeń giberelin na wzrost korzeni roślin. Duże dawki hamowały wzrost.

Gibereliny pobudzają kiełkowanie nasion wielu roślin na przykład: jęczmienia, pszenicy i ryżu (Hayashi 24, 25). Zawartość amylazy w tych nasionach wzrasta.

Nasiona salaty źle kiełkują w ciemności, dobrze w świetle czerwonym, który pobudza ich zdolność kiełkowania. Przy stosowaniu gibereliny kiełkują nawet w ciemności. Gibereliny zastępują w tym wypadku działanie biologiczne czerwonych promieni świetlnych (Kahn, Gross, Smith 30).

Nasiona *Lactuca scariola varietas silvestris* kiełkujące tylko wobec światła i długości fali 6600 Å; kiełkują w ciemności nasyczone 0,0001% roztworem giberelin (Lona, 42). Młode siewki *Perilla onocymoides* rosnące tylko w świetle o długości fal 6600—8000 Å, wobec giberelin rosną też w ciemności (Lona, 43).

Niekiedy u pomidorów zjawia się tak zwany letni sen owoców. Zapłodnione zalążki kwiatów nie rozrastają się, tworzą się z nich tylko małe owoce, których dalszy wzrost jest zahamowany. Opryskiwanie tych owoców roztworami 25—250 µg/l giberelin (pięć opryskiwań) pobudza wzrost i powoduje prawidłowy rozwój do postaci dojrzałych (Liverman 40).

Gibereliny podane na oczkach bulw ziemniaków budzą je ze snu zimowego i powodują szybkie wyrastanie z nich długich łodyg — łętów (Brian 14, Lona 44). Działanie to występuje też u innych roślin bulwiastych.

Odcinki koleoptyli etiolowanych siewek pszenicy i owsa w płynach odżywczych nie są pobudzane do silniejszego wzrostu przez gibereliny, w odróżnieniu od auksyn, które silnie wzmagają ich wzrost. Wydłużenie się koleoptyli wywołane jest rozrostem i wydłużeniem się komórek i tylko w małym stopniu jest spowodowane wzmożeniem podziałów komórkowych (4).

Podobne działanie wywierają auksyny na odcinki międzywęźli łodygi grochu, natomiast gibereliny nie wykonują żadnego działania.

Gibereliny wzmagają wzrost całych roślin, a nie wyosobnionych z nich narządów i tkanek, w odróżnieniu od auksyn, które wywołują silny rozrost narządów i tkanek roślinnych, lecz słabo działają na wzrost całych roślin.

Gibereliny i auksyny stosowane razem na odcinki koleoptyli i łodyg działają synergistycznie. Obecność auksyn jest niezbędna dla pobudzenia przez gibereliny wzrostu tkanek roślinnych.

Bez auksyn gibereliny nie działają na rośliny. Auksyny (4) powstają podczas procesów biosyntezy w liściach roślin i układem naczyniowym są rozprowadzane do innych narządów. Działając na całe rośliny gibereliny znajdują w tkankach dostateczne ilości auksyn umożliwiających im działanie biologiczne.

Synteza auksyn nie odbywa się w odcinkach koleoptyli lub łodyg, występuje więc w nich niedobór auksyn wywołując niemożność działania giberelin na tkanki tych części roślin.

Gibereliny podobnie jak auksyny dają rozrost i zwiększanie rozmiarów komórek roślinnych i wywierają słabe tylko działanie na podział komórkowy. W dużych stężeniach ciała te uszkodzają komórki roślinne.

Roztwory 10—20 mg/l giberelin w pożywce Whita wzmagają wydłużanie się odcinków korzeni niektórych odmian kukurydzy. Podobnie działają na odcinki korzeni pszenicy (W h a l e y, K e p h a r t 86).

W 0,03 molarnym roztworze buforu fosforanowego o pH 7,0 gibereliny wzmagają wzrost i powodują wydłużanie się odcinków międzywęźli grochu, gromadzenie się w nich wody oraz silnie zwiększają ich oddychanie (K a t o, 32).

Wzmagają również wzrost krążków z etiolowanych liści fasoli, przechowywanych w ciemności w płynie odżywczym (S c o t t 61). Czerwone promienie świetlne, które same pobudzają wzrost krążków liści, działają synergistycznie z giberelinami.

Działanie auksyn i giberelin na rośliny jest różne, lecz dopełniające się; auksyny pobudzają tworzenie korzeni w sadzonkach roślin, gibereliny tego nie czynią. Po odcięciu roślinom szczytowego stożka wzrostu, wkraplanie roztworów giberelin na odcięte miejsce wzmagają wzrost gałęzi bocznych, powodując większe krzewienie się roślin. Auksyny nie wywierają tego działania. Auksyny hamują odpadanie liści z łodyg, gibereliny nie wykazują czynności w tej próbie biologicznej. Auksyny wywołują guzowate bujanie tkanek roślinnych, czego nie obserwuje się po wprowadzeniu giberelin. Gibereliny wzmagają kiełkowanie nasion roślin i przerywają sen zimowy ich bulw, natomiast auksyny nie wykazują działania w tych procesach.

M i t c h e l l, S k a g g s, A n d e r s o n (51) wykryli w wyciągach z siewek grochu i fasoli (85) związki zachowujące się chromatograficznie po-

dobnie jak kwas giberelowy (58). Związki te wzmagają wzrost siewek karłowatego grochu i karłowatej kukurydzy. Nie jest wykluczone, że w roślinach tworzą się ciała hormonalne o działaniu giberelin, a być może są nawet z nimi chemicznie spokrewnione. Mogą pobudzać one wzrost łodyg wzwyż, przyspieszać kwitnienie i owocowanie, wzmacniać kiełkowanie nasion i tworzenie się pędów z bulw.

Karłowate odmiany roślin, otrzymane drogą selekcji i mutacji, być może utraciły pewne geny i wskutek tego nie tworzą tych hormonów wzrostowych w dostatecznej ilości potrzebnej do prawidłowego ich wzrostu.

Gibereliny nie działają pobudzająco na wzrost niższych roślin. Nie działają na drożdże. Po podaniu ich wzrost drożdży w pożywce, jak również fermentacja nie są wzmożone. Pod wpływem tych ciał drożdże nie zmieniają swych rozmiarów (23). Gibereliny nie działają pobudzająco na wzrost *Chlorelli*, *Protothecium*, *Candida*, *Actinomyces*, *Rhizopus* i *Aspergilli* (Cifferi, Bertossoli 17) oraz nie pobudzają wzrostu bakterii. Liczne bakterie rozkładają i niszczą gibereliny w roztworach wodnych.

Gibereliny nie działają pobudzająco na wzrost tkanek zwierzęcych na przykład na hodowle tkanki serca embriona kurzego (Yabuta, Sumiki 71).

Próby praktycznego zastosowania giberelin

W latach 1956, 1957 zaczęto na małą skalę doświadczenia polne nad wpływem giberelin na rośliny uprawowe, stosując na przykład opryskiwanie ich 1—50 p. p. m. roztworami wodnymi tych związków przez 3-4 tygodnie.

Ostatnio firmy amerykańskie wypuściły na rynek preparaty zawierające nieoczyszczone gibereliny pod nazwami Plant Shoot, Spurt, Mira-Cell, Rio-O-gen, Gibelin przeznaczone dla ogrodnictwa i warzywnictwa (1, 2, 3, 10, 47). W doświadczeniach prowadzonych na większą skalę pod wpływem stosowania tych preparatów obserwowano wzmożenie wzrostu szeregu roślin i przyspieszenie ich kwitnienia o 1 od 17 tygodni, niekiedy przeciwnie obserwowano opóźnienie kwitnienia. Pomidory tworzyły owoce o 2-3 tygodnie wcześniej i ilość ich na pojedynczych krzewach była większa niż normalnie.

Gibereliny u roślin dwuletnich już w pierwszym roku wywoływały tworzenie się łodygi kwiatowej, kwitnienie i tworzenie nasion. U ziemniaków ciała te przerywały sen zimowy bulw i wzmacniały ich wegetację.

Morgan i Mees (52) prowadzili doświadczenia na dużą skalę, opryskując pola roślin uprawnych roztworami giberelin, używając ich po 2 uncje (w 100 galonach wody) na akr pola.

Badane rośliny były wyższe od kontrolnych, miały większe liście, ale zbiór ich z hektara w większości przypadków nie był wyższy od zbioru roślin kontrolnych nieopryskiwanych giberelinami.

Obserwowano to u pomidorów, grochu, fasoli, czarnych porzeczek. Pszenica po giberelinach wyrastała wysoka, nie dawała jednak wyższych plonów ziarna z hektara. Rośliny okopowe po giberelinach dawały niższe zbiory korzeni.

Łąki opryskiwane lub opylane giberelinami dają większe zbiory traw. Wzrasta wydajność wilgotnej i suchej masy traw z hektara. Zawartość azotu i białka w sianie była jednak o 20% niższa niż u traw nieopryskiwanych giberelinami. Po skoszeniu, odrastanie łąk poddanych działaniu giberelin było wolniejsze niż łąk kontrolnych.

W doświadczeniach tych nie uwzględniono jednak dostatecznie nawożenia pól i łąk. Szybki wzrost roślin pod wpływem giberelin wyjąława gleby zabierając z nich do tkanek roślinnych dużo związków azotowych, fosforowych i potasowych. Niedostatek azotu, fosforu i potasu działa hamująco na rozrost korzeni, nie pobudzany przez gibereliny. Wskutek niedostatku składników mineralnych w glebie i niedostatecznego rozwoju układu korzeniowego, wzrost roślin pobudzany przez gibereliny jest hamowany. Odpowiednie silniejsze nawożenie gleb pod rośliny poddane działaniu giberelin, daje lepszy rozrost korzeni, lepsze odżywianie i silniejszy wzrost.

Lona i Bocchi (45) badali wpływ giberelin na wzrost konopi. Po giberelinach rośliny wyrastały wyższe i łodygi ich miały dłuższe i lepsze włókna. Stosowanie giberelin u roślin włókienniczych może dać więc lepszy surowiec przędzalniczy i być może większe jego zbiory z hektara.

Stosowanie giberelin na nasiona i bulwy może umożliwić ich wcześniejszą wegetację zimą lub wczesną wiosną i wcześniejsze zbiory.

LITERATURA

1. Agr. Food Chem. 4, 907, 1956 (Editorial).
2. Agr. Food Chem. 5, 81, 1957 (Editorial).
3. Ang. Chem. 68, 301, 1955 (Editorial).
4. Audus L. J. — Endeavour, 14, 205, 1955.
5. Bertossi F., Cifferi O., — Boll. ital. di Biol. Sper. 32, 1488, 1957.
6. Boleźni Restenii. Inostran. Literat. Moskwa, 306, 361, 370, 464, 501, 1956.
7. Borrow A., Brian P. W., Chester V. E., Curtis P. J., Hemming H. G., Henohan C., Jefferys E. G., Lloyd B. B., Nixon I. S., Norris G. L. F., Radley M. — Jour. Sci. Food. Agr., 6, 340, 1955.
8. Brian P. W., — Symp. Soc. exp. Biol., II, 1957.
9. Brian P. W., Grove J. F., — Endeavour, 14, 161, 1957.

10. Brian P. W., Elson G. W., Hemming H. G., Radley M., — *Jour. Sci. Food. Agr.*, 5, 602, 1954.
11. Brian P. W., Elson G. W., Hemming G. H., Radley M., — *Jour. Sci. Food. Agr.*, 6, 340, 1955.
12. Brian P. W., Hemming H. G., — *Physiol. Plant.*, 8, 669, 1955.
13. Brian P. W., Hemming H. G., — *Nature*, 179, 417, 1957.
14. Brian P. W., Hemming H. G., Radley M., — *Physiol. Plant.* 8, 899, 1955.
15. Bukorac M. J., Wittner S. H., — *Quart. Bull. Michigan Agr. Exp. Stat.* 39, 307, 1956.
16. Bunsow R., Harder R., — *Naturwiss.* 43, 479, 1956.
17. Cifferi O., Bertossi F., — *Bull. Soc. ital. Biol. Sper.* 33, 114, 1957.
18. Cross B. E., — *Jour. chem. Soc.* 4670, 1954.
19. Cross B. E., Grove J. F., MacMillan J., Mulholland T. P. C., — *Chem. and Ind.* 1954, 1956.
20. Curtis R. W., — *Science* 125, 646, 1957.
21. Curtis P. J., Cross B. E., — *Chem. and Ind.* 1066, 1954.
22. Harrington J. F., Rappaport L., Hood K. J., — *Science* 125, 601, 1957.
23. Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 16, 386, 1940.
24. Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 16, 511, 1940.
25. Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 16, 531, 1940.
26. Hemmi T., Seto F., — *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 4, 181, 1928.
27. Hore S., — *Najishikenjyo Seiseki*, 2, 10, 1898.
28. Hore S., — *Najishikenjye Hokuku*, nr. 43, 1907.
29. *Imp. Chem. Industr. Austr. Pat.*, 10190, 1955.
30. Kahn A., Gross J. A., Smith D. E., — *Science* 125, 645, 1957.
31. Kato J., — *Mem. Coll. Sci. Kyoto. Ser. B.*, 20, 189, 1953.
32. Kato J., — *Science* 123, 1132, 1956.
33. Kawarada A., Kitamura H., Seta Y., Takahashi N., Takai M., Tamura S., Sumiki Y., — *Bull. agr. chem. Soc. Japon.* 19, 278, 1955.
34. Kitamura H., Kawarada A., Seta Y., Takahashi N., Otsuki T., Sumiki Y., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 27, 545, 1953.
35. Knapp R. Z., — *Naturforsch.*, 116, 698, 1956.
36. Kurosawa E., — *Trans. nat. Hist. Soc. Formosa*, 16, 213, 1926.
37. Lang A., — *Naturwiss.*, 43, 257, 1956.
38. Lang A., — *Naturwiss.*, 43, 284, 1956.
39. Leben C., Barton L. V., — *Science*, 125, 494, 1957.
40. Liverman J. L., Johnson S. P., — *Science*, 125, 1086, 1957.
41. Lockhad J. A., — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 42, 841, 1956.
42. Lona F., — *Ateneo Parmense*, 27, 641, 1956.
43. Lona F., — *Ateneo Parmense*, 27, 645, 1956.
44. Lona F., — *Giorn. Botan. Ital.*, 63, 61, 1956.
45. Lona F., Bocchi A., — *Riv. int. Agr.*, 7, 1956.
46. Mac Millan L., Cross B. E., Brove J. F., Mulholland T. P. C., — *Résumé des Communications XVI Congrès Inter. Chim. Pure et Appl. Paris II*, 265, 1957.
47. *Manufact. Chem.*, 209, 1957.
48. Marth P. C., Audia W. N., Mitchell J. W., — *Bot. Gaz*, 118/2/106, 1956.

49. Marth P. C. Audia W. N., Mitchell J. W., — *Plant. Phys. Supl.* 31 xlii, 1956.
50. Marth P. C., Audia W. N., Mitchell J. W., — *Gibberellic Acid a Plant Regulator*. U.S.A. Dpt. of Agr. Beltsville Maryland 1956.
51. Mitchell J. W., Skaggs D. P., Anderson W. P., — *Science* 114, 159, 1951.
52. Morgan D. G., Mees G. S., — *Nature*, 178, 1356, 1956.
53. Mulholland T. P. S., Ward G., — *Jour. chem. Soc.*, 4676, 1954.
54. Mulholland T. P. S., Ward G., *Jour. chem. Soc.*, 2415, 1956.
55. Ohrmund M. *A partial list of references on the gibberellins*. Indianapolis 1956.
56. Phinney B. O., — *Plant. Physiol. Supl.* 20, 1956.
57. Phinney B. O., — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 42, 185, 1956.
58. Radley M., — *Nature*, 178, 1070, 1956.
59. Raillo A. J., — *Griby roda fuzarii*. Gosud. Izdat. Sielskhoz. Liter., Moskwa 1950.
60. Sachs R. M., Lang A., — *Science* 125, 1144, 1957.
61. Scott R. A., Liverman J. L., — *Science*, 126, 122, 1957.
62. Seta Y., Sumiki Y., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 26, 508, 1952.
63. Sorauer P., — *Handbuch der Pflanzekrankheiten*. V. Aufl. Vol. III, Teil. II, 732, P. Parey, Berlin 1932.
64. Stodola F. H., Raper K. B., Fennell D. I., Conway H. P., Sohns W. E., Langford C. T., Jackson R. W., — *Arch. Biochem. Biophys.*, 54, 240, 1955.
65. Takahashi M., Kitamura H., Kawarada A., Seta Y., Takai M., Tamura S., Sumiki Y., — *Bull. agr. chem. Soc. Japan.*, 19, 267, 1955.
66. Tamari K., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 22, 16, 1948.
67. Yabuta T., Kombe K., Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 10, 1059, 1931.
68. Yabuta T., Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 15, 257, 1939.
69. Yabuta T., Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 15, 403, 1939.
70. Yabuta T., Sumiki Y., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 14, 1526, 1938.
71. Yabuta T., Sumiki Y., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 18, 207, 1942.
72. Yabuta T., Sumiki Y., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 20, 52, 1944.
73. Yabuta T., Sumiki Y., Aso K., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 25., 159, 1951.
74. Yabuta T., Sumiki Y. Aso K., Hayashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 17, 1001, 1941.
75. Yabuta T., Sumiki Y., Aso T., Tamura T., Igarashi H., Tamari K., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 17, 621, 721, 894, 975, 1941.
76. Yabuta T., Sumiki Y., Katayama E., Motoyama H., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 16, 1157, 1940.
77. Yabuta T., Sumiki Y., Marayama N., Suzuki K., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 17, 527, 1941.
78. Yabuta T., Sumiki Y., Azabu K., Tamura T., Marashi H., Tamari K., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 16, 975, 721, 894, 1940.
79. Yabuta T., Sumiki Y., Takahashi T., — *Jour. agr. chem. Soc. Japan.*, 19, 396, 1943.

80. Yabuta T., Sumiki Y., Tamari C., Koizumi C., — Jour. agr. chem. Soc. Japan., 19, 244, 1943.
81. Yabuta T., Sumiki Y., Tamura T., Marayama N., — Jour. agr. chem. Soc. Japan., 17, 637, 1941.
82. Yabuta T., Sumiki Y., Torii H., — Jour. agr. chem. Soc. Japan, 19, 396, 1943.
83. Yabuta T., Sumiki Y., Uno S., — Jour. agr. chem. Soc. Japan., 15, 1209, 1939.
84. Yatazawa Y., Sumiki Y., — Jour. agr. chem. Soc. Japan., 25, 503, 1952.
85. West C. A. Phinney B. O., — Plant. Physiol. Suppl., 31, 20, 1956.
86. Whaley W. G., Kephart J., — Science, 125, 234, 1957.

Addendum

W trakcie druku niniejszego artykułu zjawily się nowe prace wyjaśniające rolę biologiczną giberelin.

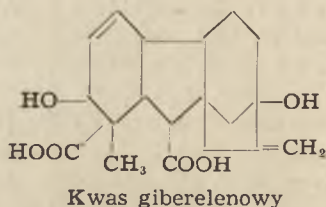
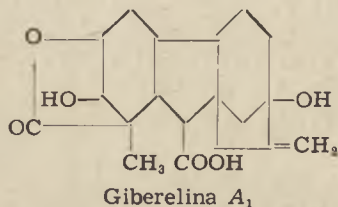
Gerzon, Bird, Woolf wyosobnili z płynów po hodowli *Gibberella Fujikuroi* obok kwasu giberelowego nowy związek kwas giberelenowy o t.t. 185° (z wydzielaniem gazu) posiadający silne widmo absorpcyjne w nadfiolecie (253 mμ ε = 19,2). Związek ten tworzy krystaliczny kompleks z kwasem giberelowym rozpadający się już po gotowaniu z chloroformem. Ciało to nie działa biologicznie na rośliny. Związek ten powstaje z kwasu giberelowego w temperaturze pokojowej pod wpływem działania 0,1—1,0 N kwasu solnego (6 godzin w 20°) jest więc artefaktem powstającym podczas otrzymywania kwasu giberelowego. Kwas ten pozwolił na ustalenie wzoru gibereliny A₁ jako kwasu dwuhydrogiberelowego.

Mac Millan, Suter doszli do podobnych wniosków w ustaleniu wzoru gibereliny A₁; wzór giberelin A₂—C₁₉H₂₆O₈ (ostatnio ustalony sumarycznie) nie jest jeszcze znany.

Mac Millan wyosobnił ostatnio giberelinę A₁ z nasion niedojrzałej fasoli (*Phaseolus multiflorus*) zdaje się być rzeczą pewną, że ta giberelina (a być może też kwas giberelowy) jest stałym składnikiem tkanek roślin kwiatowych spełniając w nich rolę hormonu wzorstowego.

Gerzon K., Bird H. L., Woolf D. O., Experientia 13, 489, 1957.

Mac Millan J., Suter P. J., Naturwiss. 45, 46, 1958.



D. SHUGAR i K. L. WIERZCHOWSKI

Fotochemia kwasów nukleinowych i ich elementów składowych

Celem badań nad fotochemicznym zachowaniem się kwasów nukleinowych jest poznanie związku, jaki zachodzi między ich przemianami fotochemicznymi a efektami biologicznymi, wywołanymi działaniem promieniowania ultrafioletowego na żywą komórkę. Ze związek ten ma miejsce wskazują zarówno istotne funkcje jakie kwasy te spełniają w komórce, jak i fakt, że spośród wszystkich składników komórkowych one mają najwyższą absorpcję w tym właśnie zakresie spektralnym, który jest czynny fotochemicznie.

Zadaniem niniejszego artykułu jest przegląd dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie fotochemii kwasów nukleinowych i ich składników, przede wszystkim z punktu widzenia fizyko-chemii zachodzących przemian.

Technika doświadczalna

Trudno jest nieraz porównywać dane różnych autorów, dotyczące działania ultrafioletowego promieniowania na kwasy nukleinowe i ich składniki, ponieważ wiązka promieniowania stosowanego do naświetlania często jest niewystarczająco scharakteryzowana. Zwłaszcza we wcześniejszych pracach poza typem lampy, oraz jej odległością od naświetlanego obiektu nic więcej nie jest podane.

Niejednokrotnie stosowano dawki promieniowania ultrafioletowego o wiele wyższe niż w studiach *in vivo* i można wobec tego wątpić, czy z biologicznego punktu widzenia wyniki takich doświadczeń mają znaczenie.

Jako źródło promieniowania w doświadczeniach wymagających niewielkich dawek promieniowania ultrafioletowego najbardziej są wskazane monochromatory, jednak nie są one powszechnie dostępne.

Nisko-ciśnieniowy łuk rtęciowy zamknięty w kwarcu, emitujący głównie promieniowanie 2537 Å (powyżej 90%), stanowi również bardzo od-

powiednie źródło promieniowania do celów fotochemicznych. Wskazane jest jednak przy tego typu lampach rezonansowych stosować filtry obcinając krótkie promieniowanie, głównie 1849 Å, które nawet przy śladowej intensywności może wpływać na przebieg reakcji fotochemicznej.

W ciągu ostatnich paru lat weszły w powszechne użycie tzw. lampy sterylizacyjne, w których nisko ciśnieniowy łuk rtęciowy zamknięty jest w specjalnym szkłe, przepuszczającym ultrafioletowe promieniowanie. Lampy te są fabrycznie standaryzowane, tak że dla szeregu celów dawka promieniowania pochłonięta przez napromienioną próbkę może być obliczona z danych fabrycznych.

Jeżeli chodzi o pomiar dawki promieniowania ultrafioletowego, to chemiczna aktynometria jest nie tylko prostsza od metod fizycznych, lecz również mniej zależna od geometrii układu.

W ostatnich latach opracowano szereg czułych i wygodnych w pracy aktynometrów. M. inn. dobrze znany aktynometr zawierający szczawian uranylu został udoskonalony przez wprowadzenie spektrofotometrycznego oznaczenia kwasu szczawiowego przy pomocy Ce^{+++} metodą różnicową. Dzięki temu stał się on czulszym od aktynometrów opartych o leukocyjane zieleni malachitowej, jak i szczawian żelazowy z fenantroliną.

Puryny, nukleozydy i nukleotydy purynowe

Fotochemia tej grupy związków jest dotychczas mało zbadana. Wiadomo, że są one odporniejsze na działanie ultrafioletu niż pirymidyny. Wydajność kwantowa fotolizy (2537 Å) w przypadku adeniny i guaniny jest o ok. dwa rzędy niższa niż dla uracylu i cytozyny w tych samych warunkach. Hypoksantyna, ksantyna i ksantozyna są podatniejsze na działanie ultrafioletu od naturalnie występujących puryn. Zanik charakterystycznej absorpcji w widmie ultrafioletowym pod wpływem naświetlania wskazuje na zniszczenie pierścienia heterocyklicznego. Wśród produktów fotolizy różnych pochodnych purynowych znaleziono mocznik i amoniak. W produktach fotolizy kwasu moczowego m. inn. znaleziono triuret.

Badano też fotochemiczne zachowanie się ADP i ATP. Dawka wystarczająca do pełnej inaktywacji obu związków powoduje tylko nieznaczny spadek absorpcji w widmie ultrafioletowym. Rozerwaniu ulegają wiązania estrowe i nukleozydowe, w wyniku czego powstaje szereg fotoproduktów; pierścienie adeniny, amidu kwasu nikotynowego, jak i rybozy ulegają częściowemu zniszczeniu, głównie ryboza. Głównym produktem w przypadku ADP jest dwufosforan adenozyne, a w roztworach ATP 2'-fosforan-5'-pyrofosforan adenozyne.

Pirymidyny, nukleozydy i nukleotydy pirymidyn

Związki te są o wiele lepiej zbadane z fotochemicznego punktu widzenia niż puryny i ich pochodne.

Okazało się, że istotny wpływ na wynik reakcji fotochemicznej mają z jednej strony długość fali czynnego fotochemicznie promieniowania, jak i wielkość dawki tego promieniowania, a z drugiej strony rozkład gęstości elektronowej w pierścieniu pirymidynowym, oraz brak lub obecność podstawników w pozycjach 5 bądź 6.

I tak, promieniowanie krótsze od 2300 Å, a także duże dawki promieniowania 2537 Å prowadzą do zniszczenia pierścienia pirymidynowego we wszystkich badanych związkach tej grupy, przy czym powszechnie występują jako produkty fotolizy mocznik i amoniak. Mechanizm tej reakcji nie jest znany, dyskutuje się nad ewentualnymi drogami jej przebiegu. Małe dawki promieniowania 2537 Å w roztworach wodnych uracylu i cytozyny, oraz ich nukleozydów, nukleotydów jak i niektórych N- i O-alkilowanych pochodnych indukują reakcję fotochemiczną polegającą na przyłączeniu cząsteczki wody do podwójnego wiązania 5,6 w pierścieniu piramidynowym. Reakcja ta jest odwracalna, posiada wysoki współczynnik temperatury i jest katalizowana przez kwasy i zasady.

Wykazano, że fotoproduktem w przypadku 1,3-dwumetylouracylu jest 1,3-dwumetylo-6-hydroksy-dwuhydrouracyl.

Zestawienie wydajności kwantowych odwracalnej reakcji fotochemicznej ze zmianami zachodzącymi w widmach absorpcyjnych w ultrafiolecie doprowadziło do wysunięcia hipotezy o istnieniu w grupie pochodnych cytozyny w roztworach wodnych nukleotydów i nukleozydów silnego wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, umieszczonego pomiędzy grupą karbonylową w pierścieniu cytozyny a grupami hydroksylowymi cukru. Możliwe są trzy takie wiązania o malejącej energii: $O^2 : (OH)_5$, $O^2 : (OH)_2$, $(OH)_3$. Wiązanie to, zmieniając rozkład gęstości elektronowej w pierścieniu cytozyny, ma istotny wpływ ilościowy na przebieg reakcji fotochemicznej, podwyższając jej wydajność kwantową o jeden rząd w porównaniu z cytozyną i 1-metylocytozyną.

W pochodnych pirymidynowych podstawionych w pozycji 5 lub 6, a więc m. inn. w tyminie, 5-metylocytozynie, kwasie orotowym jak i ich nukleotydach, niezależnie od warunków naświetlania, nie obserwujemy fotochemicznie indukowanego przyłączania cząsteczki wody. Następuje tu fotoliza, prowadząca do zniszczenia pierścienia pirymidynowego. Wydajność kwantowa (2537 Å) reakcji fotochemicznej przyłączenia wody jest w przybliżeniu o jeden rząd wyższa od wydajności kwantowej reakcji fotolizy zachodzącej u pochodnych podstawionych w pozycjach 5 lub 6.

Istnieją przesłanki, że w roztworach alkoholowych niektórych omawianych tu związków zachodzi fotochemicznie indukowane przyłączenie cząsteczki alkoholu do podwójnego wiązania w pierścieniu pirymidynowym.

Cukry w nukleozydach i nukleotydach

Brak jest systematycznych badań nad działaniem promieniowania ultrafioletowego na cukier związany glukozydowo w nukleozydach i nukleotydach purynowych i pirymidynowych. Zarówno proste cukry jak i glukozydowo związane posiadają w ultrafiolecie jedynie słabą absorpcję końcową rozpoczynającą się około 2300 Å. Nie mogą więc ulegać bezpośredniej reakcji fotochemicznej pod wpływem promieniowania dłuższego od 2300 Å.

Wysoki stopień odwracalności (95—100%) reakcji fotochemicznej w przypadku nukleozydów i nukleotydów uracylu i cytozyny wskazuje, że warunki w których prowadzimy reakcję odwracalną nie prowadzą do rozrywania wiązania nukleozydowego.

Wydaje się, że znane w literaturze fakty zniszczenia działaniem promieniowania ultrafioletowego tak rybozy związanej nukleozydowo jak i wolnej należy przypisać działaniu rodników indukowanych przez to promieniowanie, zwłaszcza krótsze od 2300 Å.

Wpływ promieniowania ultrafioletowego na zasadowe (pH 12) roztwory cukru tłumaczy się najprawdopodobniej przyspieszeniem zmian zachodzących już pod wpływem wysokiego stężenia jonów OH⁻. Promieniowanie γ działa w podobny sposób już w roztworach obojętnych. Zatem zmiany te, które można śledzić jako przyrost absorpcji między 2500 a 2700 Å należy uważać za przejaw wtórnej, lecz nie pierwotnej reakcji fotochemicznej.

W adenozynie ryboza nie ulega zniszczeniu w alkalicznym (pH 12) roztworze przy małej dawce promieniowania 2537 Å.

Kwasy nukleinowe

Można powiedzieć w przybliżeniu, że kwasy nukleinowe zachowują się, z jakościowego punktu widzenia, w doświadczeniach fotochemicznych tak jak tego można oczekiwać na podstawie fotochemicznego zachowania się ich elementów składowych-nukleotydów. Oczywiście należy przy tym uwzględnić wpływ ich wielkocząsteczkowego charakteru.

Roztwory wodne DNA i RNA naświetlane promieniowaniem ultrafioletowym badano różnymi metodami fizyko-chemicznymi i fizycznymi. Zgodnie z większą podatnością pirymidyn niż puryn na działanie tego

promieniowania, stwierdzono w hydrolizacie z naświetlonego DNA zniszczenie 30% pirymidyn przy czym zawartość puryn była praktycznie nie zmieniona.

Naświetlaniu roztworów DNA towarzyszy spadek ich lepkości i dwójłomności przepływowowej.

Krzywe miareczkowania fotolizowanych roztworów DNA i RNA pokazują, że małe dawki promieniowania wywołują zmiany tylko w pierścieniach puryn i pirymidyn. W miarę wzrostu dawki, z chwilą gdy absorpcja w ultrafiolecie spada o $\frac{1}{6}$ do $\frac{1}{3}$, następuje rozrywanie wiązań między-nukleotydowych, a w końcu około $\frac{1}{3}$ ogólnego fosforu przechodzi do roztworu jako fosfor nieorganiczny.

Długotrwałe naświetlanie DNA prowadzi do pojawienia się w roztworze 10—15% produktów podlegających dializie, jednak ruchliwość elektroforetyczna pozostałego DNA nie ulega zmianie.

Porównanie wyników naświetlania DNA *in vitro* i *in vivo* prowadzi do wniosku, że *in vivo* DNA jest przynajmniej tak samo podatny na działanie promieniowania ultrafioletowego, jeżeli nie bardziej, niż *in vitro*. W przypadku RNA otrzymano większą wydajność preparatyki z naświetlonych komórek drożdży niż z nienaświetlonych.

Istniejące dane przemawiają za tym, że na fotochemiczne zachowanie się DNA nie ma większego wpływu jego związania z białkiem w kompleks nukleoproteidowy.

Fotochemiczna przemiana DNA w środowisku obojętnym obniża jego zdolność do barwienia się metodą Kurnicka.

Stwierdzono mianowicie, że spadek tej zdolności wynosi około 30% w roztworze 0.3% naświetlonym do momentu, w którym jego wyjściowa lepkość została zredukowana do 26%.

Analogiczny efekt znaleziono w doświadczeniach *in situ* przy czym spadek powinowactwa do barwnika był w przybliżeniu logarytmiczny w odniesieniu do dawki promieniowania.

Znane są dotychczas jedynie dwa doświadczenia, w których badano korelację w kwasach nukleinowych pomiędzy zmianami fizykochemicznymi a biologicznymi. Pełnej inaktywacji infekcyjnego RNA z wirusa mozaiki tytoniowej towarzyszy jedynie 0,7% spadek absorpcji przy 2600 Å, a nie obserwuje się żadnych zmian w lepkości roztworu. Dawka wywołująca obserwowaną zmianę w lepkości roztworu DNA posiadającego zdolności transformacji jest 500-krotnie większa od niezbędnej do redukcji zdolności transformacyjnej do 10%. Oba doświadczenia wykazują, że dawki ultrafioletowego promieniowania wywołujące efekty biologiczne w kwasach nukleinowych są znacznie mniejsze od dawek powodujących degradację łańcucha polinukleotydowego.

Odwracalna reakcja fotochemiczna w kwasach nukleinowych

Puryny jak wiemy wykazują dużą odporność na działanie promieniowania ultrafioletowego w porównaniu z pirymidynami z pośród których uracyl i cytozyna ulegają z najwyższą wydajnością kwantową odwracalnej reakcji fotochemicznej. Wydaje się zatem całkowicie zrozumiałym, że fotochemiczna przemiana kwasu nukleinowego pod wpływem niewielkiej dawki promieniowania może sprowadzać się do zaatakowania w pierwszym rzędzie tych właśnie pierścieni pirymidynowych, dla których przemiana ta jest odwracalna.

Odwracalna przemiana fotochemiczna nukleotydów pirymidynowych związana jest z podstawieniem 5 i 6 atomu węgla w pierścieniu pirymidynowym. Atomy te nie są zaangażowane w łańcuchu polinukleotydowym w wiązania międzynukleotydowe. Zatem można przypuszczać, że efekt podstawienia tłumaczy fotochemiczną „inaktywację” kwasów nukleinowych.

Tą odwracalną „inaktywacją” można z kolei tłumaczyć inaktywację fotochemiczną mikroorganizmów jak i ich reaktywację pod wpływem promieniowania widzialnego i temperatury.

Ponieważ kwasy nukleinowe nie absorbują widzialnego promieniowania, zatem energia aktywacji niezbędna do odszczepienia cząsteczki wody od pierścieni cytozyny i uracylu i reaktywacji przez to mikroorganizmu musiałaby być przenoszona od składników komórkowych absorbujących to promieniowanie do łańcucha polinukleotydowego kwasu nukleinowego. Ostatnio, na przykład, wykazano, że inaktywowany promieniowaniem ultrafioletowym DPN odzyskuje wyjściową aktywność pod wpływem promieniowania widzialnego i w obecności odpowiedniego fotosensybilizatora.

Doświadczenia autorów tego przeglądu nad fotochemiczną przemianą RNA i APA w wodnych, obojętnych roztworach, popierają w szeregu punktach powyższe rozważania.

Mianowicie udało się pokazać, że spadek absorpcji roztworów tych kwasów wywołany niewielką dawką promieniowania 2537 Å jest w dużym stopniu odwracalny pod wpływem podwyższonej temperatury. Z rosnącą dawką promieniowania odwracalność ta maleje i wreszcie zanika z chwilą gdy absorpcja spadnie poniżej 50% początkowej wartości. A zatem fotochemiczna przemiana RNA i APA jest odwracalna, a przebieg jej obserwowany spektrofotometrycznie daje się jakościowo wytłumaczyć fotochemiczną reakcją nukleotydów cytozyny i uracylu. Ilościowa interpretacja wymaga dalszych badań, przede wszystkim nad polinukleotydami o różnej liczbie polimeryzacji.

Badano też fotochemiczne zachowanie się polinukleotydów otrzymanych z RNA i APA poprzez zastąpienie w nich cytozyny uracylem drogą dezaminacji. Wbrew oczekiwaniom, w obu przypadkach reakcja fotochemiczna była jednak nieodwracalna.

Akceptory promieniowania w żywych organizmach

Kwasy nukleinowe stanowią główne i bezpośrednie akceptory promieniowania ultrafioletowego w żywym organizmie. Większości danych przemawiających za tym dostarczają badania nad efektywnością działania na te organizmy promieniowania niejonizującego w funkcji długości fali, czyli badania trw. widm działania.

Interpretacja widm działania wymaga dużej ostrożności. Często spotyka się niesłuszną tendencję do przyjmowania milcząco założenia, że kwasy nukleinowe są jedynymi akceptorami promieniowania wywołującego jakiś efekt biologiczny, jeżeli tylko widmo działania ma maksimum położone około 2600 Å. Ostrożność przy interpretacji tych widm jest szczególnie wskazana, gdy pomiary sprowadzają się jedynie do porównania skuteczności danej dawki promieniowania o różnej długości fali. Na przykład, gdy mamy do czynienia z wirusami lub bakteriami widma działania ze względu na bardzo wysoką absorpcję kwasów nukleinowych, w porównaniu z białkiem, pokrywają się z widmem kwasów nukleinowych. Jeżeli w takim przypadku promieniowanie absorbowane przez białka wywołuje efekt nawet tego samego rzędu co i odpowiednia ilość promieniowania absorbowanego przez kwas nukleinowy, to widmo działania może tego nie pokazać.

Bardziej godne zaufania są widma działania oparte o pomiary wydajności kwantowej. Niestety otrzymać je można tylko dla niektórych prostszych układów, takich jak wirusy. Konieczna jest przy tym znajomość zależności wydajności kwantowej od długości promieniowania czynnego fotochemicznie. Zależność ta dla kwasów nukleinowych jest jednak bardzo mało zbadana.

Dodatkowych danych przemawiających za tym, że kwasy nukleinowe pełnią rolę głównych i bezpośrednich akceptorów promieniowania dostarczają badania nad zjawiskiem fotoreaktywacji bakterii, wirusów, komórek drożdży. Okazuje się mianowicie, że siedliskiem zmian odwracalnych jest jądro komórki a więc prawdopodobnie kwasy nukleinowe.

Białka w szeregu przypadkach również spełniają rolę bezpośrednich akceptorów promieniowania czynnego fotobiologicznie. Na przykład, widma działania dla inaktywacji wirusów i bakterii odpowiadają widmu nukleoproteidów.

Wolne nukleotydy w układach biologicznych też mogą być akceptorami promieniowania ultrafioletowego. Wykazano to hamując w roślinach syntezę sacharozy działaniem promieniowania 2537 Å. Biorąca udział w tej syntezie glukoza estryfikowana dwufosforanem urydyny ulegając przemianie fotochemicznej zatrzymywała cały proces.

Kinetyka inaktywacji

Fotochemiczna inaktywacja związków, czy też układów wykazujących aktywność biologiczną jest na ogół procesem pierwszorzędowym w odniesieniu do czasu lub dawki promieniowania. Na tej podstawie ogólnie przyjmuje się, że inaktywacja jest w takich przypadkach wywołana absorpcją jednego fotonu czynnego fotochemicznie promieniowania, jakkolwiek nie każdy taki zaobserwowany foton musi spowodować inaktywację.

Niejednokrotnie przebieg inaktywacji nie odpowiada jednak procesowi pierwszorzędowemu, np. krzywe przeżycia mają charakter sigmoidalny. Interpretuje się to w ten sposób, że inaktywacja danej cząsteczki lub układu wymaga jednoczesnego fotochemicznego działania szeregu fotonów.

O ile w przypadku promieniowania jonizującego istnieje szereg dowodów potwierdzających interpretację pierwszorzędowego przebiegu reakcji inaktywacji jako wyniku inaktywacji pojedynczej cząsteczki przez jeden foton lub cząstką elementarną, to jednak w przypadku promieniowania ultrafioletowego interpretacja taka w świetle wielu faktów doświadczalnych nie wydaje się słuszną. Jednym z najpoważniejszych kontrargumentów jest znany fakt, że enzymy i wirusy częściowo inaktywowane promieniowaniem ultrafioletowym stają się podatniejsze na inaktywujące działanie innych czynników, np. temperatury.

Interpretacja pojęcia wydajności kwantowej w przypadku układów makromolekularnych nastrocza trudności nie tylko, gdy przebieg procesu fotochemicznego charakteryzuje się krzywą sigmoidalną, lecz również, gdy ma on charakter logarytmiczny. Nie ma bowiem pewności, czy mierzona zmiana wielkości jakiejś własności fizycznej lub biologicznej danego układu jest wynikiem pierwotnej fotochemicznej reakcji wywołanej działaniem pojedynczego fotonu.

Przenoszenie się energii a przemiana fotochemiczna

Jeżeli przyjmiemy, że nukleoproteidy stanowią bezpośrednie akceptory promieniowania ultrafioletowego, to otwarte pozostaje jeszcze zagadnienie, czy efekty wywołane w układach biologicznych absorbowanym przez nie promieniowaniem spowodowane są przemianą fotochemiczną obu składni-

ków kompleksu nukleoproteidowego, czy też tylko jednego z nich. Być może też, że przekazują one tylko zaabsorbowaną energię do innych składników żywej komórki.

Jakkolwiek nie wiele prac ukazało się dotychczas z tego zakresu, warto jednak pokazać w jakim kierunku rozwijają się badania.

Znamy szeregi przykładów przenoszenia się energii elektronowej w białkach wzdłuż łańcucha polipeptydowego. Że przenoszenie to ma miejsce świadczą efekty fotochemiczne, które obserwujemy w miejscach cząsteczki odległych od miejsca absorpcji fotonów danego promieniowania.

Podobny mechanizm inicjowania reakcji fotochemicznej stwierdzono w przypadku dehydrogenazy aldehydu 1,3-dwufosforoglicerynowego. W enzymie tym energia elektronowa przenoszona jest od koenzymu (DPN) do białka wywołując redukcję grupy $-S-S-$ do $-SH$.

Studia modelowe nad przenoszeniem się energii w układach białko-barwnik i kwas nukleinowy — barwnik drogą badania wydajności fluorescencji związanego barwnika w stosunku do promieniowania zaabsorbowanego przez białko lub kwas nukleinowy wykazały, że w przypadku białka przenoszenie to ma miejsce, lecz nie w układzie kwas nukleinowy-barwnik.

Badania nad wydajnością fluorescencji TMV jak i jego składnika białkowego sugerują, że do 25% energii absorbowanej przez kwas nukleinowy ulega przeniesieniu do białka, lecz nie na odwrót.

Ostatnio pojawiło się szereg prac omawiających zjawisko przenoszenia się energii w układach biologicznych z teoretycznego punktu widzenia, w oparciu o metodę mechaniki kwantowej.

Wirusy

Wirusy, będące w praktyce nukleoproteidami wykazującymi aktywnością biologiczną zależną od ich struktury, stanowią względnie proste układy biologiczne. Dzięki temu nadają się znakomicie do studiów fotochemicznych, zwłaszcza że ich fotochemiczna inaktywacja znalazła praktyczne zastosowanie w produkcji szczepionek i surowic.

W większości przypadków fotochemiczna inaktywacja wirusów jest reakcją 1-szorzędową lub bliską tego rzędu. Dla kilku wirusów znane są wydajności kwantowe inaktywacji.

W oparciu o analizę widm działania wirusów wywnioskowano, że wprawdzie kwasy nukleinowe są głównymi receptorami promieniowania wywołującego inaktywację, lecz również białko odgrywa tutaj pewną rolę.

Podatność wirusów na działanie promieniowania ultrafioletowego nie jest bezpośrednio zależna od zawartości kwasu nukleinowego. Np. wirus X pomidora jak i różne szczepy wirusa mozaiki tytoniowej mając tę samą zawartość kwasu nukleinowego różnią się swoją podatnością na promieniowanie. Przyczyną tego miałyby być różna podatność na promieniowanie kwasów nukleinowych zależna od ich struktury.

Szereg obserwacji wskazuje, że dawki promieniowania wystarczające do pełnej inaktywacji wirusa wywołują jedynie minimalne zmiany w ich fizycznych i fizykochemicznych właściwościach. Np. nie stwierdzona u w pełni inaktywowanego wirusa mozaiki tytoniowej żadnych zmian w widmie rentgenowskim, optycznej rotacji, wartości punktu izoelektrycznego jak i w zdolności do krystalizacji.

Sugeruje się, że wirusy w trakcie inaktywacji, która nie jest w pełni odwracalna, mogą ulegać zarówno zmianom odwracalnym pod działaniem światła widzialnego jak i nieodwracalnym, oraz że istnieje korelacja pomiędzy zdolnością do fotoreaktywacji a zawartością kwasu nukleinowego.

Szczepionki produkowane fotochemicznie

Wirusy można inaktywować fotochemicznie nie zmieniając w większym stopniu ich własności serologicznych. W celu osiągnięcia tego konieczna jest drobiazgowa kontrola warunków inaktywacji.

Korzystając z powyższego faktu rozwinięto metody otrzymywania szczepionek, m. inn. przeciwko wściekliznie, wirusowi zapalenia mózgu St. Louis, *choriomeningitis lymphocytica*, wirusom krowianki i *poliomyelitis*.

Ostatnio nawet autorzy amerykańscy donieśli o otrzymaniu szczepionki przeciwko *poliomyelitis* jakoby lepszej od otrzymanej metodą formaldehydowej inaktywacji wirusa.

Pośrednie działanie promieniowania ultrafioletowego

W układach biologicznych przemiany fotochemiczne, m. inn. kwasów nukleinowych mogą być wywołane nie tylko bezpośrednio działaniem promieniowania ultrafioletowego lub indukowane przenoszeniem się energii w układzie, lecz również mogą być one skutkiem przebiegu szeregu wtórnych reakcji fotochemicznych. Tymi wtórnymi reakcjami są reakcje z udziałem wolnych rodników jak też fotodynamiczne utlenienie w obecności odpowiednich sensybilizatorów na promieniowanie widzialne.

Widzialne promieniowanie w obecności takich fotodynamicznie czynnych substancji, jak barwniki i związki rakotwórcze wywołuje w roz-

tworach DNA spadek lepkości, podobnie jak bezpośrednie działanie ultrafioletowego promieniowania. Jednak wydajność kwantowa tego procesu jest bardzo niewielka. DNA ulega też fotodynamicznemu utlenieniu.

Działanie fotochemicznie produkowanych rodników hydroksylowych (z H_2O_2) na DNA pokrywa się ilościowo z działaniem promieniowania X. Rodniki te wywołują szereg reakcji takich jak rozrywanie wiązań nukleotydowych, dezaminacja i dehydroksylacja puryn i pirymidyn, zniszczenie ich pierścienia czy też utlenienie dezoksyrybozy.

Nie stwierdzono natomiast zaatakowania fagów przez rodniki OH:

Znacznie więcej uwagi poświęca się fotosensybilizowanej aktywacji wirusów. Zgodnie z wynikami dotychczasowych badań, mechanizm tej reakcji zarówno *in vivo* jak *in vitro* polega na fotodynamicznym utlenianiu w obecności takich barwników jak m. inn. tiazyna, oksazyna, akrydyna, akryflawina, błękit metylenowy.

Istotnym czynnikiem decydującym o aktywności fotosensybilizatora jest tutaj powinowactwo jego do wirusa wyrażające się w zdolności do wiązania się z nim na drodze adsorpcji.

Preparatyka fotochemiczna

Dotychczasowe wyniki badań nad fotochemiczną reakcją pirymidyn sugerują możliwość wykorzystania odwracalnej reakcji fotochemicznej uracylu i cytozyny do otrzymania szeregu nowych pochodnych tych związków.

I tak, w trakcie badań nad mechanizmem tej reakcji udało się otrzymać z bardzo dobrą wydajnością 1,3-dwumetylo-6-hydroksy-5,6-dwuhydrouracyl. Autorzy niniejszego artykułu pracują obecnie nad izolacją i identyfikacją fotoproduktów 2-alkoksy pochodnych uracylu i cytozyny.

Jednoznaczny przebieg reakcji addycji cząsteczki wody do pierścienia pirymidynowego wskazuje na możliwość wykorzystania jej do specyficznego znaczenia deuterem węgla w pozycji 5.

Obszerniejsza wersja niniejszego artykułu w języku angielskim wraz z pełnym piśmiennictwem poruszonych zagadnień znajduje się w specjalnym dodatku do tego numeru „Postępów Biochemii”.

T. W. SZCZEPKOWSKI

System oksydazy bursztynianowej

Zespół enzymatyczny katalizujący utlenianie bursztynianu do fumaranu zajmuje w biochemii specjalnie ważną pozycję zarówno ze względu na rolę w metabolizmie, jak i na zagadnienia dotyczące jego budowy i mechanizmu działania. Badania tego kompleksu biokatalizatorów są historycznie związane z powstawaniem kwasu bursztynowego w niektórych procesach biologicznych i usiłowaniami wyjaśnienia tego faktu. Pierwszy Ludwik Pasteur (37) przypisywał kwasowi bursztynowemu doniosłą rolę pośredniego metabolitu w fermentacji alkoholowej. O ile jednak potrafiono wykazywać powstawanie kwasu bursztynowego w czasie działalności życiowej mikroorganizmów, to badacze w ubiegłym stuleciu nie mogli stwierdzić jego obecności w świeżych tkankach zwierzęcych (43, 8, 33). Pogląd z końca XIX w. na rolę kwasu bursztynowego można scharakteryzować słowami Blumenthala (8): „Kwas bursztynowy... nie jest więc produktem przemiany materii komórek zwierzęcych, ale mikroorganizmów”. Niemniej zdolność organizmu człowieka do przetwarzania kwasu bursztynowego wykazał już w 1877 r. baron von Longo, dr medycyny z Klagenfurtu. Longo nie wykrył kwasu bursztynowego w moczu ani po spożyciu kilograma główek szparagów, które popił winem, ani po zażyciu 8 i 13 gramów bursztynianu sodu (32).

Nowe zagadnienia dotyczące biologicznej roli kwasu bursztynowego i enzymów katalizujących jego przemianę odstąpiła praca Thorstena Thunberga z Lundu ogłoszona w 1909 r. (61).

Thunberg posługując się mikrorespirometrem badał wpływ różnych substancji na szybkość zużywania tlenu przez mięsień żaby. Przy tej sposobności stwierdził, że zużycie tlenu zostaje wzmożone przez kwasy bursztynowy, fumarowy, jabłkowy i cytrynowy, natomiast zostaje hamowane przez kwas malonowy i szczawiowy. Utlenianie kwasu bursztynowego, a więc związku dotychczas nie branego pod uwagę w rozważaniach biochemii zwierząt, było tego rodzaju niespodzianką, że jak to w wiele lat później, bo w czasie II-wojny światowej Thunberg opowiadał profesorowi Skarżyńskiemu, badacz szwedzki przez dłuższy czas nie chciał

wierzyć w realność obserwowanego zjawiska. Niemniej na kongresie fizjologów w Wiedniu w 1910 r. wypowiedział pogląd, że mieszanina wyżej wymienionych kwasów wzmagających zużycie tlenu reprezentuje to co w owym czasie niektórzy fizjologowie nazywali pneiną tzn. część układu oddechowego złożoną ze składników rozpuszczalnych w wodzie odróżnianą od części nierozpuszczalnej w wodzie, ściśle związanej ze strukturą komórkową, nazywanej układem fundamentalnym.

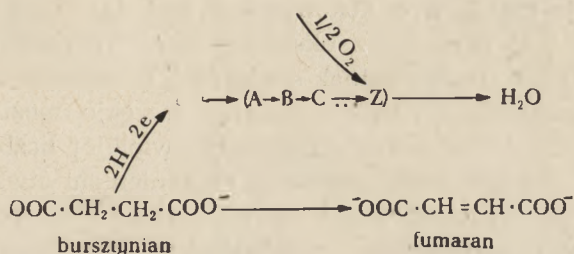
W tym okresie wzrosło zainteresowanie kwasem bursztynowym i w wielu ośrodkach przeprowadzono badania nad biologicznym utlenianiem tej substancji. Jako najważniejsze należy wymienić prace Batteliego i Stern (7), którzy wykazywali, że w toku utleniania, z kwasu bursztynowego powstaje kwas jabłkowy, oraz Eibecka w Berlinie (17), który stwierdził, że nie kwas jabłkowy ale fumarowy jest bezpośrednim produktem utleniania kwasu bursztynowego, przyczym wykazał występowanie fumaranu w mięśniach.

Jakkolwiek więc utlenianie kwasu bursztynowego przez tkanki zwierzęce zostało zaliczone do pospolitych procesów metabolicznych, to rola tej reakcji w całości przemian pozostawała zagadkowa. Pierwszym, który usiłował powiązać przemiany bursztynianu z całością procesów utleniania tkankowego był Szent Gyorgyi (58) upatrując w bursztynianie zasadniczy katalizator prosesu oddechowego. Niemniej również Szent Gyorgyi nie uważał bursztynianu za produkt pośredni w zasadniczych przemianach ustrojowych, doszukując się jego genezy w tkankach zwierzęcych bądź w pobieranych pokarmach bądź w ubocznych reakcjach. Na nowe tory pchnęły to zagadnienie badania Krebsa w latach 1936—38 stwierdzające, że kwas bursztynowy jest integralnym ogniwem w sformułowanym przez niego cyklu kwasu cytrynowego (29). Krebs wykazał, że bursztynian jest ważnym metabolitem w przemianie cukrowców, a dzisiaj wiemy, że również w przemianie tłuszczowców i aminokwasów. Olbrzymia większość związków węgla przekształcanych w toku przemian ustrojowych musi przechodzić poprzez stadium kwasu bursztynowego a tym samym związek ten wysuwa się na czoło listy substratów biologicznego utleniania.

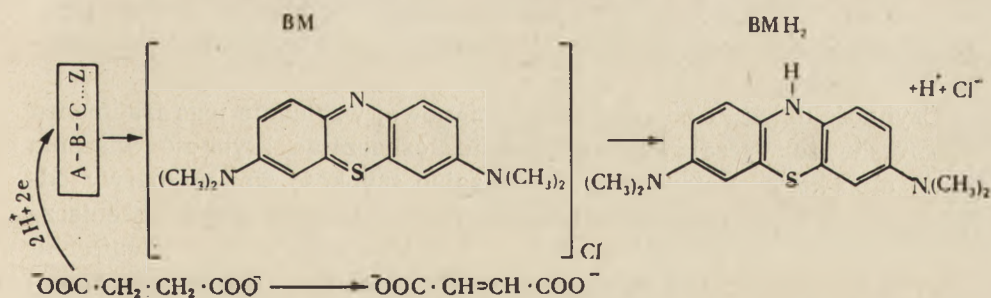
Oczywiste jest, że rozwój badań nad biologicznym utlenianiem bursztynianu pociągnął za sobą wzrost dociekań zmierzających do bliższego scharakteryzowania enzymów biorących udział w tym procesie. Łatwość otrzymania surowych preparatów enzymu uczyniła z niego ponętny obiekt badań, jednak liczne prace wykazały złożoność problemu, który dziś dopiero zaczyna się nieco wyjaśniać i dlatego pomijając omówienie dawniejszego piśmiennictwa przejdziemy do przedstawienia stanu obecnego.

Definicja oksydazy i dehydrogenazy bursztynianowej

Mianem oksydazy bursztynianowej określamy nie jeden enzym, ale rozległy system enzymatyczny katalizujący utlenianie bursztynianu do fumaranu dzięki równoczesnej redukcji tlenu na wodę. Określenie-oksydaza bursztynianowa — jest tylko o tyle słuszne, że składowe elementy oksydazy są ze sobą mocno związane, stanowiąc zwarty fragment strukturalny komórek, nie jest ono jednak poprawne gdyż oksydazami nazywamy zwykle pojedyncze enzymy. Działanie oksydazy schematycznie można następująco przedstawić symbolizując wielkimi literami poszczególne człony systemu:



Natomiast dehydrogenaza bursztynianowa jest — w ścisłym znaczeniu -enzymem, który aktywuje wodory bursztynianu i jest pierwszym akceptorem dla jego elektronów. W takim to ścisłym znaczeniu pojęcie dehydrogenazy będzie używane w tym przeglądzie, częstokroć jednak, a do niedawna nawet zawsze, nazwą tą określany bywał ten fragment systemu oksydazy, który katalizuje redukcję błękitu metylenowego (BM), lub 2,3-dwuchlorofenolindofenolu (DCF), bursztynianem w warunkach beztlenowych jak to przedstawia poniższy schemat



Podkreślić również trzeba, że w piśmiennictwie spotykamy badania i wyniki mówiące o dehydrogenazie a w rzeczywistości dotyczące całego systemu oksydazy, względnie złożonego również jej fragmentu pośredniczącego w redukcji barwników w warunkach beztlenowych.

Ogólne metody badawcze

Więź spajająca poszczególne elementy systemu oksydazy lub może nawet natura tych elementów jest tego rodzaju, że nie pozwala na ich pełne rozdzielenie i uzyskanie ich wszystkich w postaci rozpuszczalnej. Najczystsze preparaty uzyskane przez frakcjonowanie homogenizatów komórkowych otrzymanych sposobem mechanicznym (26), czy też homogenizatów uzyskanych działaniem ultradźwięków (18) nigdy nie były właściwymi roztworami poszczególnych enzymów lecz tylko zawiesinami drobnych elementów strukturalnych komórek. Okoliczność ta sprawia, że badania własności enzymów wchodzących w skład kompleksu oksydazy bursztynianowej muszą być dokonywane metodami pośrednimi. Niektóre z tych metod uczyniły z oksydazy bursztynianowej prawdziwie szkolny obiekt badań, trzeba jednak stwierdzić, że interpretacja wyników uzyskanych metodami pośrednimi stwarza szerokie możliwości nieporozumień i dowolności, wskutek czego mimo wielkiej liczby prac, własności i budowa oksydazy stale jeszcze są zagadnieniem otwartym.

Ogólnie biorąc, metodyka badań oparta jest na wybiórczym eliminowaniu aktywności poszczególnych członów systemu (oznaczonych we wzorze ogólnym przez A, B, C, ...); pozwala to wnioskować o naturze tych członów i stwarza możliwość zbadania pozostałych fragmentów. Do eliminowania aktywności poszczególnych komponent stosuje się wybiórcze inhibitory względnie czynniki niszczące poszczególne elementy układu; można również dobrać specyficzne akceptory i donatory elektronów czyli utleniacze i reduktory reagujące tylko z odpowiednimi członami układu. Wybiórczo działający oksydator może być w określonych warunkach odbiorcą elektronów i wodorów przekazywanych z bursztynianu przez niepełny uproszczony system enzymatyczny, umożliwiając określenie własności i czynności tego uproszczonego układu. Wybiórczo działający reduktor może znów dostarczyć elektronów i wodorów dla określonego fragmentu systemu oksydazy.

Czynność układu oksydazy bursztynianowej względnie jego fragmentu mierzy się zazwyczaj manometrycznie, oznaczając szybkość wiązania tlenu, albo kolorymetrycznie, wyznaczając szybkość zmiany barwy odpowiedniego oksydatora. Jeżeli używa się żelazocyjanku jako utleniacza można manometrycznie oznaczać szybkość wywiązywania dwutlenku węgla z wodorowęglanu w wyniku redukcji żelazi — do żelazocyjanku. Niektóre człony systemu oksydazy posiadają charakterystyczne widmo absorpcyjne różne dla postaci utlenionej i zredukowanej, co pozwala na zastosowanie pomiarów spektrofotometrycznych do oznaczenia przynależności tych składników do systemu oraz do określenia ich roli i stanu czynnościowego.

Preparatyka oksydazy bursztynianowej

Brak dotychczas metody otrzymywania czystej oksydazy bursztynianowej, jednakże możliwe jest uzyskiwanie preparatów oczyszczonych i w tym celu najczęściej stosowany jest sposób postępowania podany przez Keilina i Hartreego (26). Materiałem wyjściowym jest mięsień sercowy, który zostaje zmielony, zmieszany z wodą i zebrany na muślinie. Przemywanie takie powtarza się szereg razy dopóki wyciśnięta przez muślin woda nie stanie się bezbarwna. Przemyty mięsień rozciera się następnie przez 2 godziny z piaskiem w 0,02 M buforze fosforanowym o pH 7,3. Gęstą zawiesinę rozcieńcza się tym samym buforem i wiruje przez 20 minut z szybkością 2000 obr/min. Płyn z nad osadu oziębia się do 0° —5° i zakwasza 1 n kwasem octowym do pH 5,7, po czym natychmiast odwirowuje się wytrącony osad w chłodzonej wirówce (2000 obr/min, 15 min.). Po zdekantowaniu płynu osad zawiesza się w równej objętości 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,3. Inne sposoby postępowania podali (39, 44, 20).

Aktywność oksydazy bursztynianowej utrzymuje się w zamrożonym mięśniu sercowym w ciągu tygodni. Zmiany zachodzące w czasie przechowywania opisał Slater (52a). Oczyszczony preparat oksydazy zachowuje swoją aktywność po liofilizacji.

Trzeba podkreślić, że aktywność preparatu oksydazy zależy nie tylko od integralności systemu, ale również od struktury koloidowej podtrzymującej ten system. Wymownym świadectwem wpływu warunków fizykochemicznych są badania Keilina i Hartreego (27) i przytoczone w nich wyniki liczbowe. Np. jeżeli oznaczmy aktywność preparatu przez 100 to dodatek 2% zdenaturowanej globiny wzmacnia aktywność do 285, dodatek 2% żelatyny do 200, a CaCl_2 i AlCl_3 (każdy w stężeniu $4 \times 10^{-4}\text{M}$) do 165. Ten wybitny wpływ charakteru koloidowego środowiska, w którym znajduje się oksydaza, na jej aktywność był przyczyną wielu sprzeczności w literaturze dotyczącej problemu aktywności oksydazy.

System oksydazy bursztynianowej

Cytochromy

Badania Keilina nad cytochromami wskazały, że te przenośniki elektronów wraz z oksydazą cytochromową, identyfikowaną obecnie z cytochromem a_3 , wchodzi w skład systemu oksydazy bursztynianowej (24). Wymownie świadczyły o tym proste doświadczenia. Jeżeli do preparatu oksydazy bursztynianowej dodano bursztynianu, a więc dawcy elektronów, i cyjanku, a więc czynnika hamującego oksydazę cytochromową, to bardzo szybko w widmie pojawiają się smugi absorpcyjne zreduko-

wanych cytochromów. W powyższych warunkach utlenianie cytochromów jest niemożliwe, gdyż cyjanek inaktywuje oksydazę cytochromową. Udział cytochromu c można wykazać bezpośrednio, gdyż związek ten jako łatwo rozpuszczalny częściowo dyfunduje z cząstek preparatu do roztworu, co pociąga za sobą zmniejszenie aktywności układu. Pierwotną aktywność można przywrócić przez dodatek cytochromu c do roztworu. Brak dotychczas publikacji przemawiających przeciwko udziałowi cytochromów a_3 , a oraz c w układzie oksydazy bursztynionowej, natomiast wątpliwości nasuwają się w związku z rolą cytochromu b. Niektórzy autorowie identyfikowali ten cytochrom z właściwą dehydrogenazą bursztynianową (3,5,38), co w świetle dzisiejszych badań okazuje się całkowicie niesłuszne, gdyż rozpuszczalną dehydrogenazę uzyskano w postaci wolnej od cytochromu b. Slater (52) twierdzi, że cyt. b jest jednym z ważnych członów systemu i że w układzie beztlenowym jest on przekąźnikiem elektronów bursztynianu na błękit metylenowy, (patrz schemat). Slater opiera swój pogląd na tym, że gdy w warunkach beztlenowych preparat oksydazy zostaje zredukowany bursztynianem, to po dodaniu BM smugi zredukowanych cytochromów a_3 , a oraz c są nadal widoczne, natomiast cyt. b ulega szybko utlenieniu. Trafność poglądu Slatera zachwiały badania B. Chance'a (12). Chance posługując się bardzo subtelną metodą pozwalającą precyzyjnie określić zdolność układu oksydacyjno-redukcyjnego do przenoszenia elektronów wykazał, że cyt. b w układzie oksydazy bursztynianowej reaguje zaledwie z 2% elektronów przenoszonych przez układ w jednostce czasu. Na tej podstawie badacz ten wyraża wątpliwości co do udziału cytochromu b w układzie oksydazy bursztynianowej. Sprawa ta wymaga dalszych badań, które by wyjaśniły sprzeczność między poglądami Slatera i Chance'a.

Czynnik redukujący cytochrom c

Oksydaza cytochromowa, cytochromy i dehydrogenaza bursztynianowa nie reprezentują jeszcze wszystkich członów łańcucha składników systemu oksydazy. Szereg spostrzeżeń świadczył o tym, że musi istnieć czynnik pośredniczący w przenoszeniu elektronów na cytochrom c. Prace zmierzające do wyjaśnienia tego problemu można podzielić na 2 grupy. Jedne z nich oparte były na badaniu preparatu oksydazy bursztynianowej, otrzymanego przez działanie soli kwasów żółciowych. Tak otrzymany preparat wykazuje aktywność oksydazy cytochromowej i równocześnie redukuje BM, ale nie katalizuje utleniania bursztynianu tlenem atmosferycznym. Straub (55) stwierdził, że aktywność oksydazy bursztynianowej w takim preparacie powracała, gdy dodano doń inny preparat oksydazy bursztynianowej otrzymany bez użycia cholanu, ogrzany

uprzednio w roztworze o pH 9 przez 15 min. w 55°, a więc poddany działaniu warunków, które niszczą całkowicie oksydazę bursztynianową. Zawarty w tak ogrzonym preparacie czynnik aktywujący Straub nazwał czynnikiem „SC”. Preparat o podobnych własnościach opisał też Stoppani (54). Z nowszych prac w tym kierunku trzeba wymienić dwie, ogłoszone przez Clarka i i. (14) oraz Widmera i i. (65). Autorzy dochodzą do wniosku, że rolę czynnika SC może pełnić cytochrom *e* lub *c*₁, opisany uprzednio przez Keilina (28). Nie wchodząc w zasadniczą ocenę tych prac trzeba stwierdzić, że mogą one budzić pewne wątpliwości, zwłaszcza skutek szkodliwego działania cholanu na cały system oksydazy. Wnioski Strauba zakwestionował m.in. Slater (52a), dowodząc, że czynnik SC nie jest aktywatorem specyficznym.

Druga grupa badaczy posługiwała się odpowiednimi inhibitorami, które dodane do preparatu oksydazy bursztynianowej hamowały ją, ale w małym tylko stopniu lub nawet wcale nie wpływały na aktywność oksydazy cytochromowej oraz cytochromu *c* i na zdolność do redukcji błękitu metylowego. Spośród takich inhibitorów wymienić trzeba 2,3-dwumerkaptopropanol (BAL) (51), antymycynę A (36), fosforan alfa-tokoferolu (42,21), pochodne alkilonaftochinonów (5), dwuhydroksystilben (11) i lecytynazę A (35). Dowody zawarte w tych pracach są zupełnie wystarczające, żeby przyjąć za udowodnione istnienie czynnika pośredniczącego w redukcji cytochromu *c*. Czynnik ten ze względu na jego rolę reduktora cytochromu *c*, najśluszniej byłoby nazywać czynnikiem RC, dopóki istota jego nie zostanie bliżej wyjaśniona.

Zastosowanie chlorku 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowego (TTC) jako odbiorcy elektronów dostarczanych przez bursztynian, przyniosło dalsze dowody istnienia czynnika RC (30). Antymycyna A hamuje redukcję TTC przez kwas bursztynowy w obecności preparatów oksydazy bursztynianowej, nie wywierając żadnego wpływu na redukcję błękitu metylowego i na redukcję tlenu przez układ: reduktor — cytochrom *c* — oksydaza cytochromowa. Świadczy to o egzystencji czynnika pośredniczącego w redukcji TTC zbędnego jednak podczas redukcji BM.

Dehydrogenaza bursztynianowa

O otrzymaniu rozpuszczalnej dehydrogenazy bursztynianowej pierwszy doniósł Hogeboom (19), który uzyskał ją ekstrahując odpowiednim buforem suchy proszek acetonowy otrzymany z wątroby. Wyciąg katalizował redukcję żelazicyjanku wobec bursztynianu. Morton (34) uzyskał podobny wynik ekstrahując tkankę wątroby *n*-butanolem. Niestety dalszy postęp w tej dziedzinie był utrudniony wobec braku kry-

terium pozwalającego ocenić w jakim stopniu otrzymana dehydrogenaza bursztynianowa była wolna od domieszek innych komponent układu. Singer, Kearney i i. zastosowali również ekstrakcję tkanek wysuszonych acetonem (45,46,47,49,22,23) oraz mitochondrii serc wołowych, uzyskując preparat dehydrogenazy zachowujący się jednorodnie w ultrawirówce (49). Badacze ci stwierdzili, że oczyszczony enzym jest flawinoproteidem o ciężarze cząsteczkowym 200.000, zawierającym 4 lub 2 atomy żelaza niehematynowego i jedną cząsteczkę flawiny. Dehydrogenaza Singera nie katalizuje redukcji błękitu metylenowego w obecności bursztynianu, natomiast katalizuje redukcję żelazicyjanku oraz siarczanu metylofenazoniowego, będącego w tym przypadku najlepszym akceptorem elektronów. Zaznaczyć należy, że preparat Singera nie jest jeszcze zupełnie czystą dehydrogenazą bursztynianową, co pozostaje w pewnej mierze w związku z trudnościami jakie nasuwa preparatyka tego enzymu. Aktywność enzymu jest zależna od wielu czynników wchodzących w rachubę podczas jego otrzymywania, np. od stanu mitochondrii, a sam enzym w roztworze jest bardzo nietrwały. Stosując wielokrotnie tę metodę mogłem przekonać się jak jest kapryśna i jak mało daje gwarancji otrzymania preparatu o powtarzalnej aktywności właściwej. Istnieje również pewna rozbieżność w charakterystyce aktywności enzymu, np. preparat Singera wykazuje w stosunku do żelazicyjanku 39% aktywności, gdy przyjmiemy za 100 aktywność wobec siarczanu metylofenazoniowego (SMF), natomiast podobny preparat otrzymany przez Basforda i i. (6) wykazuje wobec żelazicyjanku 70% aktywności względem SMF.

Preparat dehydrogenazy bursztynianowej otrzymany przez Singera nie ulega zahamowaniu przez BAL lub antymycynę A, natomiast jest bardzo wrażliwy na działanie czynników blokujących grupy sulhydrylowe.

Szczególnym zagadnieniem jest rola i charakter flawiny w dehydrogenazie bursztynianowej. Według Singera i i. układ flawinowy jest tak silnie związany z komponentą białkową, że może zostać odszczepiony dopiero po strawieniu trypsyną. Postępując w ten sposób autorowie amerykańscy otrzymali jednak szereg związków flawinowych, co uniemożliwiło ich identyfikację. Szczepkowski i Yagi w pracowni Theorella w Sztokholmie stwierdzili, że w pewnych warunkach komponenta flawinowa daje się oddzielić od białka bez zastosowania trypsyny i że jest ona dwunukleotydem flawinoadenilowym (57).

Zaznaczyć należy, że już dawniej znano fakty przemawiające za udziałem flawin w układzie oksydazy bursztynianowej. Keilin i Hartree (25) obserwowali w swoich preparatach widmo flawiny, która ulegała

redukcji po dodaniu bursztynianu; Adler, Euler, i Skarżyński (1) opisali hamowanie dehydrogenazy przez znany inhibitor enzymów flavinowych — adenozyne; Ball i Cooper stwierdzali flawinę w ich preparatach (4); Axelrod i i. zaobserwowali obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej u szczurów odżywianych dietą ubogą w ryboflawinę. Wymienione powyżej prace Singera i współpracowników oraz Yagi i Szczepkowskiego są dalszym dowodem udziału flawiny w dehydrogenazie, a w każdym razie w najczystszych z uzyskanych dotąd jej preparatów za jaki można uważać preparat Singera.

Dehydrogenaza bursztynianowa opisana przez Singera wydaje się być tym pierwszym ogniwem w łańcuchu skadników układu przenoszącego elektrony z bursztynianu na tlen atmosferyczny, którego istnienie wynikało z dawniej jeszcze przeprowadzonych doświadczeń z α - α -dwudeuterobursztynianem. Związek ten dodany do preparatu enzymu w nieobecności akceptora elektronów wykazuje wymianę deuteru z wodorami wody, przyczym szybkość wymiany odpowiada szybkości utleniania bursztynianu przez preparat enzymu w obecności akceptorów elektronów (64). Ta wymiana deuteru przemawia za tym, że istnieje enzym właściwa dehydrogenaza bursztynianowa, która łączy się z jonami substratu i katalizuje wytworzenie jonu wodorowego z atomu wodoru związanego w bursztynianie, a więc musi ona być enzymem, który jest pierwszym akceptorem elektronów.

Wiele faktów doświadczalnie stwierdzonych przemawia za tym, że w pełnym układzie oksydazy bursztynianowej elektrony dehydrogenazy zostają przenoszone na cytochrom *b* (jeżeli przyjmiemy koncepcję Slater'a) a następnie za pośrednictwem czynnika RC na cytochrom *c* i na cytochrom *a* oraz *a₃*. W warunkach doświadczalnych odbiorcą elektronów z dehydrogenazy może być SMF lub żelazicyjanek, z cytochromu *b* — błękit metylenowy lub 2,6-dwuchlorofenolindofenol, a z czynnika RC chlorrek 2, 3, 5-trójfenyloctetrazoliowy. Z tych wszystkich danych można skonstruować schemat układu oksydazy bursztynianowej uwzględniający kolejność jej poszczególnych ogniw.

Reduktory

bursztynian

$2H^+ + 2e^-$

dehydrogenaza

SMF
 $K_3Fe(CN)_6$

Utleniacze

aksoorbinian

e^- cysteina

p-fenglenodwuamina

cyt *b*

BM

DCF

TTC

RC

cyt *c*

cyt *a* + *a₃*

(oksydaza) $\rightarrow O_2$

Jak już o tym była mowa, badania *Chance'a* nasuwają wątpliwości co do słuszności umieszczenia cytochromu *b* w tym systemie.

Inhibitory

Omówiono już wyżej, że wyjaśnienie struktury oksydazy bursztynianowej stało się możliwe dzięki zastosowaniu poszczególnych inhibitorów hamujących określone człony układu. Inhibitory te reprezentują bardzo różnorodne typy związków chemicznych i różnoraki sposób hamowania reakcji.

Najdawniej znany czynnik hamujący biologiczne utlenianie kwasu bursztynowego — kwas malonowy — jest klasycznym przykładem czynnika hamującego aktywność enzymu przez współzawodnictwo ze substratem (60,41). Punktem zaczepienia tego inhibitora jest dehydrogenaza bursztynianowa. Kompetetywnymi inhibitorami są również szczawiooctan (15, 36) i pirofosforan (31, 63). Dehydrogenaza hamowana jest również przez odczynniki blokujące grupy tiolowe, ale oczywiście istota zahamowania jest w tych przypadkach odmienna od zahamowania np. przez malonian. Cytochrom *b* jest hamowany przez narkotyki takie jak fenylouretan. Świadczą o tym wyniki badań *Stoppaniego* (53a), który wykazał, że narkotyki hamują redukcję błękitu metylenowego przez bursztynian a nie hamują redukcji żelazicyjanku. Czynnik *RC* jest hamowany przez *BAL*, antymycynę *A*, naftochinony i lecytynazę *A*. Cytochrom *c* nie jest swoiście hamowany przez żaden dotychczas znany związek. Oksydazę cytochromową hamują dobrze znane związki, takie jak cyjanki, azydki i *CO*. Zahamowanie przez tlenek węgla jest nieco skomplikowane dzięki możliwości utleniania go do *CO*₂ (13, 56). Niemniej zahamowanie występuje już wobec małych ilości *CO*. Ciekawe i niewyjaśnione dotąd jest hamowanie przez fluorki, które występuje tylko w obecności fosforanu (9,53).

Działanie inhibitorów można przedstawić poniższym schematem:

Enzym	Inhibitor
DEHYDROGENAZA	malonian, szczawiooctan, pirofosforan, odczynniki sulfhydrylowe
CYTOCHROM <i>b</i>	narkotyki, uretan
CZYNNIK <i>RC</i>	antymycyna <i>A</i> , <i>BAL</i> , naftochinony, lecytynaza <i>A</i>
CYTOCHROM <i>c</i>	
OKSYDAZA CYTOCHROMOWA	cyjanki, azydki, <i>CO</i>

Wykazanie przez *Keilina* i *Hartreego* faktu, że aktywność oksydazy bursztynianowej zależy od czynników wpływających na stan

fizykochemiczny układu zmusza do ponownego przedyskutowania działania hamującego wielu substancji opisanych jako inhibitory. Niewątpliwie na zmianie stanu fizykochemicznego, a zwłaszcza powinowactwa do rozpuszczalnika, polega działanie hamujące emulgatorów. Do tego samego typu hamowania wywołanego zmianą warunków fizycznych trzeba również zapewne odnieść ciekawą obserwację Szent Gyorgyiego o zmianie aktywności oksydazy bursztynianowej zależnie od stanu mięśnia. (59). Stwierdził on, że oksydaza bursztynianowa czynna jest w mięśniu skurczonym, natomiast nieaktywna w rozkurczonym. Rozkurczony mięsień wykazuje jednak aktywność względem błękitu metylowego i ma czynną oksydazę cytochromową; hamowaniu więc ulega zapewne czynnik RC.

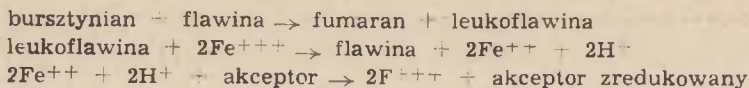
Oksydaza bursztynianowa jako zespół wieloenzymowy

Wieloskładnikowy układ enzymatyczny ujmowany nazwą oksydazy bursztynianowej stanowi klasyczny przykład nadrzędnej struktury biochemicznej — zespołu biokatalizatorów, zwanego przez Dixona (16) zespołem wieloenzymowym. Najprostszą metodą określenia składu tego systemu byłoby rozłożenie na poszczególne jednostniki enzymatyczne czy też chemiczne i zbadanie ich własności. Rozkład taki jak dotychczas nie został osiągnięty i nawet w tych przypadkach, gdy pewien składnik systemu został oddzielony od zespołu, to wykazuje on w stanie wolnym inne własności niż te, które posiadał jako człon systemu. Cytochrom c wydzielony z układu oksydazy bursztynianowej posiada 1/100 aktywności pierwotnej (53a, 62). Dehydrogenaza bursztynianowa otrzymana przez Singera (48) w roztworze jest wybitnie nietrwałym enzymem, w odróżnieniu od zdecydowanej trwałości wykazywanej przez nią w kompleksie.

Rozmieszczenie przestrzenne enzymów w zespole wykazuje z pewnością specyficzną strukturę, warunkującą w znacznym stopniu ich aktywność. Prawdopodobnie rekonstrukcja całego systemu z pojedynczych czystych składników będzie nielatwa. Istota zespołu jest wyrazem najściślejszego powiązania własności biologicznych, umożliwiających nie tylko reakcje czysto chemiczne oparte na zderzeniach cząsteczkowych, ale i przemiany fizyczne, np. takie jakie obserwujemy w półprzewodnikach (10).

Mechanizm działania dehydrogenazy bursztynianowej

Według Singera (50) utlenienie bursztynianu przebiega z udziałem flawiny i żelaza dehydrogenazy w następującej kolejności:



W pełnym układzie oksydazy akceptorem elektronów od dehydrogenazy jest cytochrom b, natomiast — jak o tym była już mowa — dla wyosobnionej dehydrogenazy funkcje akceptora może spełniać żelazocyjanek lub też SMF.

Powyżej podany przez Singera mechanizm działania dehydrogenazy nie uwzględnia jednak udziału grup sulfhydrylowych w procesie odwodorowania bursztynianu oraz nie wyjaśnia swoistości takich akceptorów jak właśnie żelazocyjanek i SMF. Gdyby zdolność tych akceptorów do zastępowania cytochromu b wynikała z ich potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, to nie zrozumiałym byłoby, dlaczego dehydrogenaza bursztynianowa nie reaguje z 2,6-dwuchlorofenolindofenolem, którego $E_h = 0,217$ V (pH = 7) jest przecież wyższe od $E_h = 0,08$ V właściwe dla SMF.

Jak więc z powyższego wynika schemat Singera należy traktować jako tymczasową hipotezę, która przypuszczalnie zostanie uzupełniona wówczas, gdy poznamy istotę udziału grup -SH w mechanizmie procesu katalizowanego przez dehydrogenazę bursztynianową. Istnieją pewne dane pozwalające przypuszczać, że proces utleniania bursztynianu w obecności swoistej dehydrogenazy nie jest reakcją dwuelektronową, jak to przypuszcza Singer, ale jest reakcją jednoelektronową przebiegającą z udziałem powstających pośrednio wolnych rodników i semichnonów. Sprawa jednak jest zbyt zawiła i pozbawiona jak na razie podstaw doświadczalnych.

LITERATURA

1. Adler E., Euler von H. i Skarżyński B. — Arkiv. Kemi Mineral. Geol. **17** A, 2, 1943.
2. Axelrod A. E., Swingle K. F., Elvehjem C. A. — J. Biol. Chem. **145**, 297, 1942.
3. Bach G. J., Dixon M. i Zerfas L. S. — Biochem. J. **40**, 229, 1946.
4. Ball E. G. i Cooper O. — J. Biol. Chem. **180**, 113, 1949.
5. Ball E. G., Anfinson C. B. i Cooper O. — J. Biol. Chem. **168**, 257, 1947.
6. Basford R. E., Tisdale H. D. i Green D. E. — Biochem et Bioph. Acta **24**, 290, 1957.
7. Batteli F. i Stern L. — Biochem. Z. **30**, 172, 1910.
8. Blumethal L. — Virchows Archiv. **139**, 539, 1894.
9. Bonner W. D. — Biochem. J. **56**, 274, 1954.
10. Bucher T. — Adv. in Enzymology **14**, 1, 1953.
11. Case E. M. i Dickens F. — Biochem. J. **43**, 481, 1948.

12. Chance B. — Enzyme Mechanisms in Living Cells w The Mechanism of Enzyme Action Ed. McElroy W. D. i Glass B.: str. 399, Baltimore, Johns Hopkins Press (1954)
13. Clark R. T., Stannard J. N. i Fenn W. O. — Science **109**, 615, 1949
14. Clark H. W., Neufeld H. A., Widmer C. i Stotz E. — J. Biol. Chem. **210**, 851, 1954.
15. Das N. B. — Biochem. J. **31**, 1124, 1937.
16. Dixon M. — Multi-Enzyme Systems, Cambridge At The University Press 1951,
17. Einbeck H. — Z. f. physiol. Chem. **90**, 301, 1914.
19. Hogeboom G. — J. Biol. Chem. **162**, 739, 1946.
19. Hageboom G. — J. Biol. Chem. **162**, 739, 1946.
20. Hoff-Jorgensen E. i Lehmann J. — Skand. Arch. Physiol. **81**, 269, 1939.
21. Jacobi H. P., Rosenblatt S., Chappell J. W. i Margulis S. — Arch. Biochem. **27**, 9, 1950.
22. Kearney E. B. i Singer T. P. — Biochem. et Bioph. Acta **17**, 154, 7954.
23. Kearney E. B. i Singer T. P. — J. Biol. Chem. **219**, 936. 1956.
24. Keilin D. i Hartree E. F. — Proc. Roy. Soc. B, **98**, 312, 1925.
25. Keilin D. i Hartree E. F. — Proc. Roy. Soc. B, **129**, 277, 1940.
26. Keilin D. i Hartree E. F. — Biochem. J. **41**, 500, 1947.
27. Keilin D. i Hartree E. F. — Biochem. J. **44**, 205, 1949.
28. Keilin D. — Nature **164**, 254, 1949.
29. Krebs H. A. i Johnson W. A. — Enzymologia **4**, 148 1937; Pierwsze sformułowanie cyklu kwasu cytrynowego.
30. Kuo-Huang Ling, Tian-Chuwan, Su, Ta-Cheng Tung — Archiv. of Biochem et Bioph. **71**, 126, 1957.
31. Leloir L. F. i Dixon M. — Enzymologia **2**, 81, 1937.
32. Longo V. — Z. f. physiol. Chem. **1**, 213, 1877.
33. MacLeod J. J. R. — Z. f. physiol. Chem. **28**, 557, 1899.
34. Morton R. K. — Nature **166**, 1092, 1950.
35. Nyggard A. P. i Sumner J. B. — Biol. Chem. **200**, 723, 1953.
36. Pardee A. B. i Potter V. R. — J. Biol. Chem. **176**, 1085, 1948.
37. Pasteur L. — Compt. rend. **46**, 179, 1858; Compt. rend **47**, 224, 1858; Compt. rend. **48**. 1149, 1859; Annal. Chem. Phys. **58**, 323, 1860.
38. Poppenheimer A. M. i Hendel E. D. — J. Biol. Chem. **180**, 597, 1949.
39. Potter V. R. i Elvhjem C. A. — J. Biol. Chem. **114**, 495, 1936.
40. Potter V. R. i Reif A. E. — J. Biol. Chem. **194**, 287, 1952.
41. Quastel J. H. i Woolridge W. R. — Biochem. J. **22**, 689, 1928.
42. Rabinowitz M. i Boyer P. D. — J. Biol. Chem. **183**, 111 1950.
43. Salkowski E. — Z. f. klin. Mediz., Suppl. zum Bd. **17**, 77ff, 1890.
44. Schneider W. C. i Potter V. R. — J. Biol. Chem. **149**, 217, 1943.
45. Singer T. P., Kearney E. B. i Zastrow N. — Biochem. et Bioph. Acta **17**, 154, 1954.
46. Singer T. P., Kearney E. B. i Massey V. — Arch. Biochem. **60**, 225, 1956.
47. Singer T. P., Massey V. i Kearney E. B. — Biochem. et Bioph. Acta **19**, 200, 1956.
48. Singer T. P., Kearney E. B. i Bernath P. — J. Biol. Chem. **223**, 599, 1956.

49. Singer T. P., Kearney E. B. i Masey V. — w Symposium — Enzymes — Units of Biological Structure and Function. New York str. 417, 1956.
50. Singer T. P., Kearney E. B. i Massey V. — l. c., str. 430.
51. Slater E. C. — Biochem. J. 45, 14, 1949.
52. Slater E. C. — Biochem. J. 45, 1, 1949.
- 52a. Slater E. C. — Biochem. J. 45, 9, 1949.
53. Slater E. C. — Biochem. J. 58, 1, 1954.
- 53a. Slater E. C. — Biochem. J. 44, 305, 1949.
54. Stoppani A. O. M. — Nature 160, 52, 1947; Enzymologia 13, 165, 1949.
55. Straub F. B. — Z. f. physiol. Chem. 272, 219, 1942.
56. Stannard J. N. — Am. J. Physiol. 129, 195, 1940.
57. Szczepkowski T. i Yagi K., w przygotowaniu.
58. Szent — Gyorgyi A. — Harvey Lectures 34, 265, 1939; Studies on Biological Oxidation and some of its catalysts, Budapest, 1937.
59. Szent — Gyorgyi A. — Nature of Life, Academic Press N—Y, 1948.
60. Thorn M. B. — Biochem. J. 54, 540, 1953; Biochem. J. 53, 1, 1953.
61. Thunberg T. — Skand. Arch. Physiol. 22, 430, 1908.
62. Tsou C. L. — Biochem. J. 49, 493, 1951.
63. Tsou C. L. — Biochem. J. 49, 512, 1951.
64. Weinmann E. O., Morehouse M. G. i Winzer H. — J. Biol. Chem. 168, 717, 1947.
65. Widmer C., Clark H., Neufeld H. A. i Stotz E. — J. Biol. Chem. 210, 861, 1954.

ZOFIA OPARA

Badania nad warunkami wymian genetycznych u *E.coli*

Na podstawie licznych prac Lederberga (13, 14), Lederberga i Cavalli (15), Lederberga i Tatum (12) wiadomo, że szczep *E. coli* jest zróżnicowany pod względem zdolności przekazywania swego materiału dziedzicznego (DNA genetycznie czynnego) na osobniki posiadające i nieposiadające tej cechy. Komórki obdarzone zdolnością przekazywania części swego materiału genetycznego innym osobnikom nazywano komórkami F^+ , lub donorami, natomiast komórki zdolne do przyjęcia tego materiału nazywano komórkami F^- lub receptorami. Symbol F pochodzi od słowa fertility = plenność.

Wymiana materiału genetycznego między komórkami F^+ i F^- następuje w czasie procesu koniugacji, podczas którego tworzą się pary bakteryjne złożone z F^+ i F^- komórek. Liczne obrazy w mikroskopie elektronowym wskazują na występowanie mostków plazmatycznych między koniugantami, przez które materiał dziedziczny komórki F^+ zostaje przekazany komórce biorcy.

Komórka F^- z przekazaną jej częścią materiału genetycznego osobnika F^+ stanowi tzw. zygotę niepełną — m e r o z y g o t ę i jest zdolna do wytwarzania nowego charakteru (fenotypu).

Stwierdzono, że wraz z zespołem cech fermentacyjnych, oporności na fagi, lub zdolności wzrastania w obecności inhibitorów metabolicznych komórce F^- zostaje zawsze przekazywana cecha F^+ i dzięki temu nabiera ona własności donora.

Krzyżówki między komórkami F^- ($F^- \times F^-$) są zawsze sterylne. Mechanizm nabywania nowego charakteru na drodze koniugacji płciowych jest niedostatecznie poznany. Prawdopodobnie w czasie tego procesu następuje rekombinacja między materiałem genetycznym komórki biorcy i materiałem genetycznym komórki dawcy.

Wyniki rekombinacji otrzymane na drodze koniugacji płciowych u *E. coli* podawane są najczęściej jako współczynnik rekombinacji. Jest to stosunek ilości otrzymanych prototrofów do ilości F^- komórek. Stosunek ten jest przeważnie rzędu 10^{-4} — 10^{-5} .

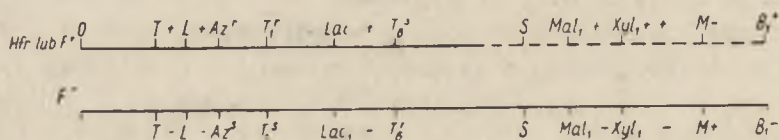
Stwierdzono (1), że współczynnik ten nie zawsze jest proporcjonalny do ilości utworzonych par bakteryjnych w czasie koniugacji, tzn., że nie każda para bakteryjna daje rekombinanty.

Niektórym autorom udało się wyizolować z pośród komórek F^+ mutanty dające wymiany genetyczne ze stu procentową częstotliwością. Mutanty te nazwano HFr = high frequency recombination (Cavalli 1950) (2), (Hayes 1953) (8).

Wstępne studia nad kinetyką rekombinacji płciowych u *E. coli* były wykonane przez Nelsona w 1951 roku (22), a następnie przez Hayes 1952 (7), Wollman, Jacob 1956 (27) Andersona 1957 (1) i innych.

Na podstawie danych otrzymanych przez tych autorów wiadomo, że materiał genetyczny komórki F^+ jest przekazywany komórce F^- w określonej i powtarzającej się kolejności, co przemawia za linearnym rozmieszczeniem cech w obrębie struktur genetycznych komórki bakteryjnej. Prześledzenie kinetyki przekazywania cech komórce F^- przez komórkę F^+ umożliwiło wykreślenie mapy chromosomowej bakterii.

Mapa taka według Cavalli i Jinks'a 1956 (4) przedstawia się dla *E. coli* K-12 następująco:



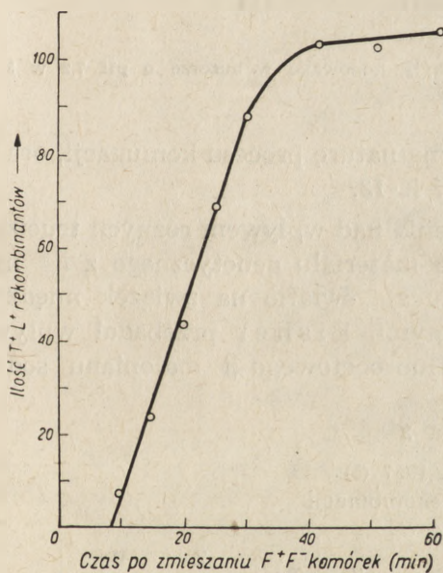
Rys. 1. Schemat przedstawiający rozmieszczenie równych cech w chromozomie *E. coli* K-12
 T — synteza treoniny, L — synteza leucyny, M — synteza metioniny, M₁ — synteza witaminy B₁,
 Lac — fermentacja laktozy, Mal — fermentacja maltozy, Xyl — fermentacja ksyllozy, Az^r —
 oporność na azydek sodu, S — oporność na streptomycynę, T_r¹ — oporność na faga T₁,
 T₆⁺ — wrażliwość na faga T₆

Punkt O na rysunku 1 przedstawia początek chromozomu. Część chromozomu HFr oznaczona przerywaną linią nie zostaje przekazywana komórce F^- na drodze koniugacji płciowych

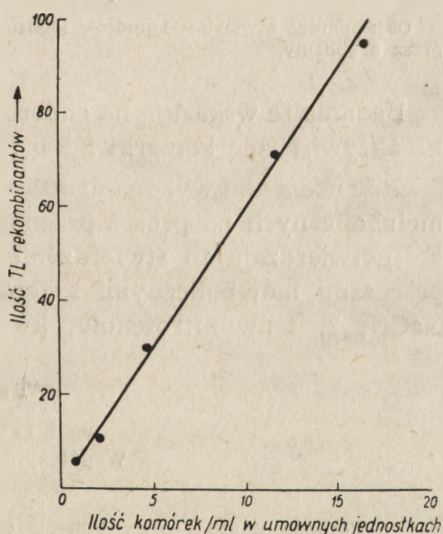
Technika doświadczeń kinetycznych nad rekombinacjami płciowymi u *E. coli* K-12 polega na sporządzaniu mieszanej zawiesiny komórek F^+ i F^- (par bakteryjnych) i po różnych okresach czasu na przerywaniu tego kontaktu w homogenizatorze, lub przy zastosowaniu faga, na którego wrażliwa jest komórka F^+ . W ten sposób stwierdzono, że po 7 minutach kontaktu komórka receptorowa otrzymuje cechę kontrolującą syntezę treoniny, po 9 min. cechę kontrolującą syntezę leucynę, a po 10 min. cechę wrażliwości na azydki. Następnie po 11-ej minucie komórka nabywa oporność na wirus T₁ i po 18 min. cechę warunkującą fermentację laktozy, oraz cechę wrażliwości na faga T₆. Po przekazaniu tego zespołu cech koniugujące partnery rozdzielają się. Kinetykę narastania rekombinantów T⁺ L⁺ ilustruje Rys. 2. wg Hayes 1957 (10).

Zauważono, że ilość rekombinantów pojawiających się po procesie koniugacji jest wprost proporcjonalna do ilości komórek rodzicielskich w jednostce objętości. Zależność tę przedstawia Rys. 3 wg Hayes 1957 (10).

Badania nad rekombinacjami płciowymi u *E. coli* mają kilka aspektów. Pierwszy aspekt genetyczny dotyczy zagadnień związanych z zależnością między genotypem i fenotypem komórki lokalizacją cech, stopniem sprzężenia i możliwościami ich przegrupowań. Drugim podstawowym zagadnieniem jest poznanie dokładne dróg i sposobów reprodukcji nowych elementów genetycznie aktywnych. Trzecim bardzo istotnym zagadnieniem jest poznanie stanu fizjologicznego komórki podlegającej wymianom genetycznym, przebadanie zależności między jej aktywnością metaboliczną i aktywnością genetyczną, oraz poznanie źródeł energii potrzebnej do procesu wymiany genetycznej. Dotychczasowe wiadomości dotyczące wspomnianych zagadnień są bardzo niekompletne.



Rys. 2



Rys. 3

W 1952 roku Hayes (7) zaobserwował, że 2,4-dwunitrofenol hamuje w komórce F⁺ zdolność przekazywania materiału genetycznego komórce receptorowej, natomiast nie wpływa zupełnie na zdolność pobierania tego materiału przez komórkę F⁻.

Obserwacja ta wskazuje na istnienie funkcjonalnego zróżnicowania między komórką F⁺ i F⁻ z ich aktywnością genetyczną. Zagadnieniem tym zajął się następnie Fisher (5, 6). Wnioski wpływające z jego badań potwierdziły całkowicie obserwacje Hayes.

Autor ten wykonał szereg badań nad wpływem głodzenia obu partnerów na wynik rekombinacji genetycznych przebiegających w czasie koniugacji i stwierdził, że w wypadku głodzenia komórek donorowych ilość rekombinantów znacznie się zmniejsza, podczas gdy głodzenie komórek receptorowych nie wpływa na wynik rekombinacji.

Tabela 1
wg Fishera 1957 (6)

Krzyżówki	Ilość T ⁺ L ⁺ rekombinantów w objętości 0,01 ml hodowli
Hfr głodzone × F ⁻ głodzone	6
Hfr głodzone × F ⁻ niegłodzone	7
Hfr niegłodzone × F ⁻ głodzone	110
Hfr niegłodzone × F ⁻ niegłodzone	114

Objaśnienie: zawiesiny komórek głodzonych były hodowane w buforze o pH 7,2 w 37° przez 2 godziny.

Badania te wskazują na endergoniczną naturę procesu koniugacji, oraz na aktywną rolę komórki F⁺ u *E. coli* K-12.

Równocześnie wykonane doświadczenia nad wpływem różnych trucizn metabolicznych na proces przenoszenia materiału genetycznego z F⁺ na F⁻ potwierdzają to stwierdzenie i rzucają światło na związek między procesami metabolicznymi i genetycznymi. Fisher przebadiał wpływ NaCN, 2, 4-dwunitrofenolu, kwasu fluorooctowego i malonianu sodu

Tabela 2
wg Fishera 1957 (5).
Współczynniki rekombinacji

Podłoża użyte do wykonania krzyżówek	Z NaCN	Bez NaCN	Z DNP	Bez DNP	Z Fluoreoct.	Bez Fluoreoct.
Bufor	0	0,5	0	0,5	0,12	0,79
Bufor + glukoza	—	1,5	0,07	1,5	0,31	1,0
Bufor + gluk. + asparaginan	0,9	7,4	0,31	7,2	2,9	6,4
Bufor + gluk. + bursztynian	0,5	3,2	0,14	3,2	3,4	6,4
Bufor + gluk. + fumaran	0,2	3,0	0,17	3,0	2,8	6,0
Bufor + gluk. + jabłczan	0,3	3,5	0,17	3,5	2,1	6,1

Objaśnienie: Koncentracja NaCN w podłożu wynosiła 1/500 M Koncentracja 2,4 DPN w podłożu wynosiła 10⁻⁶ M Koncentracja amonofluorooctanu sodu — 10⁻³ M

na rekombinacje i stwierdził, że wyżej wymienione substancje hamują prawie całkowicie przenoszenie cech z F^+ do F^- . Wyniki przedstawia tabela 2.

Wpływ malonianu sodu na współczynnik rekombinacji przedstawia tabela 3.

Tabela 3
wg. Fishera 1957 (5)

Podłoże użyte do krzyżówek	Bez malonianu	Z malonianem
	Współczynnik rekombinacji	
Bufor	0,36	0,0
Bufor + glukoza	1,0	0,12
Bufor + glukoza + asparaginian	7,1	3,0
Bufor + glukoza + bursztynian	3,0	0,36
Bufor + glukoza + fumaran	2,5	0,59
Bufor + glukoza + jabłczan	2,8	0,65

Objaśnienie: Ilość malonianu sodu w podłożu wynosiła ilość równoważną 6,5 mg kwasu malonowego w 1 ml

Jak wynika z wyżej wymienionych tablic wartość współczynnika rekombinacji (współczynnik ten jest przeliczony na każde 100 komórek F^-) zmniejsza się w obecności inhibitorów metabolicznych. Między innymi Fisher (5) przebadiał również wpływ warunków tlenowych i beztleno-

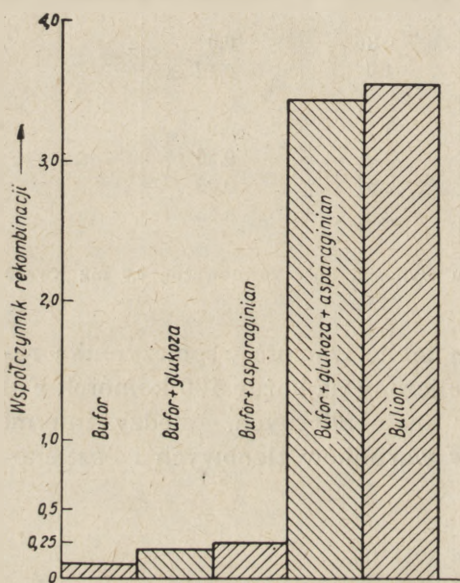
Tabela 4
wg Fishera 1957 (5)

Podłoże użyte do koniugacji	Współczynnik rekombinacji	
	Warunki tlenowe	Warunki beztlenowe
Bufor + glukoza	0,25	0,00
Bufor + glukoza + asparaginian	5,7	0,04
Bufor + glukoza + bursztynian	3,7	0,07
Bufor + glukoza + fumaran	3,7	0,04
Bufor + glukoza + jabłczan	3,4	0,14
Bufor + glukoza + glutaminian	6,0	0,22

wych na przebieg rekombinacji u *E. coli*. Wyniki hodowania zawiesiny organizmów rodzicielskich w atmosferze azotu przed koniugacją przedstawia tabela 4.

Wyniki przytoczone w tabeli wskazują, że w warunkach beztlenowych nie następuje przekazanie materiału chromozomowego z komórki dawcy do komórki biorcy. Prawdopodobnie więc reakcja ta jest związana z normalnym funkcjonowaniem cyklu kwasów trójkarboksylowych i zahamowanie procesu utleniania, odbija się w widoczny sposób na współczynniku rekombinacji. Badania nad wpływem jakości podłoża na koniugację potwierdzają te wyniki.

Z przedstawionych tutaj tablic wynika, że wartość współczynnika rekombinacji jest różna w zależności od użytego podłoża. Jeżeli bakterie koniugujące zawiesić w buforze, praktycznie nie stwierdza się żadnych



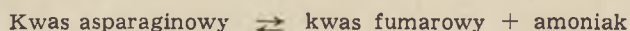
Rys. 4. Zawiesiny rodzicielskie — po uprzednim hodowaniu w bulionie przemyto 3 × buforem pH 7,2 i mieszano w uwzględnionych na rysunku podłożach. Stężenie glukozy w podłożu wynosiło 20 $\mu\text{g/ml}$, a L-asparagininanu sodu — 200 $\mu\text{g/ml}$.

rekombinacji. W buforze wzbogaconym glukozą, współczynnik nieznacznie się podwyższa, natomiast osiąga on wartość optymalną równą współczynnikowi otrzymanemu przy użyciu podłoża bulionowego, po dodaniu jednoczesnym glukozy i kwasu asparaginowego, lub asparaginy, Rysunek 4 wg Fishera (5).

Użycie bursztynianu, fumaranu, jabłczanu i kwasu glutaminowego zamiast asparagininu daje w efekcie podwyższenie współczynnika rekombinacji w porównaniu z kontrolą ujemną, ale znacznie mniejsze (patrz tabele 2, 3, 4.).

Zdaniem Fishera kwas asparaginowy lub asparaginin może odgrywać rolę:

- jako kofaktor ułatwiający kontakt między F^+ i F^- komórkami;
- może być pośrednim intermediantem w drodze przemian metabolicznych. (Ta druga możliwość tłumaczy jego współdziałanie z glukozą patrz rys. 4);
- związki te mogą stanowić źródło azotu organicznego dla komórki. Ta ostatnia możliwość jest związana z obserwacjami Quastela i Wolfa (23), którzy wykazali u *E. coli* istnienie odwracalnej reakcji:



Reakcja ta jest związana u tych organizmów z występowaniem enzymu glutamino-aspragino-transaminazy (Lichstein, Cohen 1944) (18) i z możliwością wcielania jonów NH_4 do azotu organicznego komórki. Możliwość ta zdaje się być mało prawdopodobna w świetle doświadczeń wykonanych przez Fishera (5) nad wpływem jonów NH_4 na koniugację. Na podstawie tych doświadczeń stwierdził on, że jony te dodane do podłoża w ilości $50 \mu\text{g NH}_3$ — N/ml nie stymulują procesu tworzenia się zygot.

Najprawdopodobniej więc kwas asparaginowy odgrywa rolę stymulatora przy formacji zygot działając jako pośredni metabolit w cyklu Krebsa.

Przedstawione tutaj wyniki prac Fishera nad warunkami koniugacji u *E. coli* wskazują, że proces ten jest natury endergonicznej i uzależniony jest od aktywności metabolicznej komórek dawców (F^+).

Należy jeszcze dodać, że zostały wykonane badania nad wpływem zahamowania syntezy białka i kwasów nukleinowych na współczynnik rekombinacji podczas wymian płciowych (5). Do podłoża, w którym formowały się zygoty dodawano chloromycetynę w ilości $10 \mu\text{g/ml}$ i $200 \mu\text{g/ml}$ 8-azaguaniny.

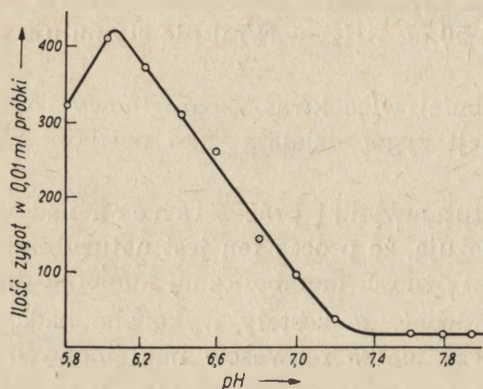
Jak wiadomo bowiem chloromycetyna hamuje syntezę białka (Wiseman 1954) (25), a 8-azaguanina hamuje syntezę kwasów nukleinowych (Skipper i współprac. 1951) (23a). Wyniki otrzymane wskazują, że zablokowanie syntezy białka i kwasów nukleinowych w czasie formacji zygot nie wpływa zupełnie na współczynnik rekombinacji. Prawdopodobnie potraktowanie uprzednio komórek tymi inhibitorami miałoby widomy wpływ na rekombinację.

Omawiając warunki tworzenia się zygot w zawiesinie komórek F^+ i F^- należy również wziąć pod uwagę własności powierzchni komórek, które są niewątpliwie związane z procesem koniugacji.

Stwierdzono, że istnieją różnice w ładunku elektrycznym na powierzchni partnerów F^+ i F^- (Maccacare i współprac. 1955, 1956) (19, 20, 21).

Zauważono, że komórki F^- są strącane z jednolitej zawiesiny w pH niższym niż komórki F^+ , niezależnie od typu gładkiego czy szorskiego. Poza tym stwierdzono, że komórki F^- posiadają wyższą stabilność w podłożach płynnych niż komórki F^+ , które często spontanicznie aglutynują, oraz charakteryzują się różnym powinowactwem do barwników. Mianowicie komórki receptorowe mają większe powinowactwo do barwników zasadowych niż komórki donory. (20, 21). Wymienione tu różnice we właściwościach błony komórkowej u obu rodziców decydują prawdopodobnie o tworzeniu się par między organizmami o przeciwnych znakach.

W związku z własnościami elektrostatycznymi powierzchni komórek F^+ i F^- należy wspomnieć o wpływie pH na koniugacje płciowe *E. coli* co przebadał Fisher. Autor ten znalazł optimum pH dla podłoża składającego się z buforu fosforanowego 0,05M, 0,4% NaCl i 0,02% $Mg\ SO_4 \cdot 7H_2O$. Wynik przedstawiony jest na rys. 5.



Rys. 5

Jak wynika z krzywej-optimum pH dla tego podłoża wynosi około 6,2. Zauważył on, że optimum pH nie jest jednakowe dla wszystkich podłoży. Wiąże się to z niejednakowymi możliwościami dyfuzji różnych związków z podłoża do komórki bakteryjnej. Jako przykład można przytoczyć fakt, że glukoza może być zastąpiona przez octan sodu w pH 6,5 (dla glukozy pH wynosi około 7).

Efekt więc wartości pH na współczynnik rekombinacji wiąże się nie tylko z ładunkiem na powierzchni komórek F^+ i F^- , lecz również z penetracją różnych substancji odżywczych do komórek.

Reasumując ten krótki przegląd badań nad warunkami wymian genetycznych u *E. coli* należy podkreślić, że procesy przekazywania cech wymagają dostarczenia energii. Producentem tej energii jest komórka F^+ . Poza tym stwierdzono również, że tworzenie się par bakteryjnych jest związane z różnicami występującymi w błonach komórkowych komórek F^+ i F^- .

LITERATURA

1. Anderson T. P., Wollman E. L., Jacob F. — Amn. Inst. Past, 93, 450, 1957.
2. Cavalli L. L. — Boll. Inst. Sieroter Milano, 29, 1, 1950.
3. Cavalli L. L., Lederberg J., Lederberg E. M. — J. Gen. Microbiol. 8, 89, 1953.

4. Cavalli — Sforza L., Jinks T. L. — *J. Genet.* **54**, 87, 1956.
5. Fisher K. W. — *J. Gen. Microbiol.* **16**, 120, 1957.
6. Fisher K. W. — *J. Gen. Microbiol.* **16**, 136, 1957.
7. Hayes W. — *Nature* **169**, 118, 1952.
8. Hayes W. — *Nature* **169**, 118, 1952.
9. Hayes W. — *J. Gen. Microbiol.* **8**, 72, 1953.
10. Hayes W. — *J. Gen. Microbiol.* **16**, 97, 1957.
11. Jacob F., Wollman E. — *C. R. Acad. Sci.* **240**, 2566, 1955.
12. Lederberg J., Tatum H. L. — *Cold. Spring. Habor Symp. Quant. Biol.* **11**, 113, 1956.
13. Lederberg J. — *Genetics* **32**, 505, 1947.
14. Lederberg J. — *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **35**, 178, 1949.
15. Lederberg J., Cavalli L. L., Lederberg E. M. — *Genetics* **37**, 720, 1952.
16. Lederberg J. — *J. Bact.* **71**, 497, 1956.
17. Lederberg J. — *Science* **122**, 920, 1955.
18. Lichstein H. C., Cohen P. P. — *J. Biol. Chem.* **157**, 85, 1944.
19. Maccacaro G. A. — *Nature* **176**, 125, 1955.
20. Maccacaro G. A., Comolli R. — *J. Gen. Microb.* **15**, 121, 1956.
21. Maccacaro G. A., Colombo C. — *Nature* **178**, 421, 1956.
22. Nelson T. C. — *Genetics* **36**, 162, 1951.
23. Quastel J. H., Woolf E. — *Biochem. J.* **20**, 545, 1926.
- 23a Sikipper H. E., Mitchell J. H., Benneet L. L., Newton M. A., Simpson E., Ledison M. — *Cancer Res.* **11**, 145, 1947.
24. Tatum E. L., Lederberg J. — *J. Bact.* **53**, 673, 1947.
25. Wisseman C. L., Smadel J. E., Hahn F. E., Hopps H. E. — *J. Bact.* **67**, 662, 1954.
26. Wollman E., Jacob F. — *C. R. Acad. Sci.* **240**, 2449, 1955.
27. Wollman E., Jacob F. — *Cold. Spring. Habor Symp. Quant. Biol.* **21**, 1956.

XIX Konferencja Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC)

XIX Konferencja Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) odbyła się w Paryżu w dniach 15—25 lipca 1957 roku. Jedną z sześciu Sekcji IUPAC jest Sekcja Chemii Biologicznej. W myśl porozumienia z 1955 r. w pracach tej Sekcji biorą udział przedstawiciele Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB).

W czasie Konferencji odbyły się obrady Komitetu Sekcji Chemii Biologicznej, Komisji białek standardowych, Komisji nomenklatury biochemicznej (wspólnie z komisją nomenklatury chemii organicznej), komisji enzymów IUB oraz Komitetu koordynującego prace IUB i IUPAC. Postanowiono organizować wspólne kolokwia na tematy interesujące zarówno IUB jak i IUPAC. Takim było kolokwium o budowie białek, które odbyło się bezpośrednio po XVI Międzynarodowym Konkursie Chemii Czystej i Stosowanej w Paryżu w dniach 25—29 lipca 1957 r. Wybrano specjalny Komitet pod przewodnictwem prof. M. Florina, który zajmuje się organizowaniem tych kolokwiów. Ustalono, że Komitet koordynacyjny zbierze się następnie w Wiedniu w 1958 r. w czasie IV Międzynarodowego Kongresu Biochemii.

Na posiedzeniu Rady IUPAC w dniu 25 lipca podsumowano wyniki obrad na wszystkich Sekcjach. Zaakceptowano projekt odbycia XX Konferencji IUPAC i XVII Kongresu w Monachium w dniach 31.VIII—6.IX.1957 r. Kongres ten poświęcony zostanie zagadnieniom biochemii, chemii nieorganicznej i określönemu tematowi chemii stosowanej, którym będzie prawdopodobnie zwalczanie szkodników roślin.

Irena Chmielewska

XVI Międzynarodowy Kongres Chemii Czystej i Stosowanej

Tegoroczny — XVI Międzynarodowy Kongres Chemii Czystej i Stosowanej odbył się w Paryżu w dniach 18—24 lipca. Tuż przed rozpoczęciem Kongresu (16—17 lipca) obchodzono uroczystości 100-letnią rocznicę założenia Francuskiego Towarzystwa Chemicznego. Kongres poświęcony był zagadnieniom chemii fizycznej, chemii nieorganicznej i chemii organicznej. Brało w nim udział ponad 2000 uczestników z 30 państw. Liczba komunikatów wynosiła 900, z czego 60% przypadło na chemię organiczną. Z Polski zgłoszono 27 komunikatów, przybyła też liczna (20-to osobowa) delegacja.

Mimo ścisłego sprecyzowania tematyki w każdym z trzech działów chemii do czterech podstawowych tematów ze względu na dużą liczbę komunikatów obradowało równocześnie 15 sekcji, co uniemożliwiało uczestnikom Kongresu wysłuchanie znacznej ilości interesujących ich komunikatów.

W dziale chemii organicznej omawiano następujące zagadnienia:

1. Mechanizm reakcji i przekształcenia wewnątrzcząsteczkowe (2 sekcje),
2. Związki organometaliczne i organometaloidowe (1 sekcja),
3. Budowa przestrzenna i stereochemia (1 sekcja),
4. Budowa i synteza związków naturalnych (2 sekcje),
5. Komunikaty różne (1 sekcja).

Mimo, że w tegorocznym Kongresie nie uwzględniono działu chemii biologicznej z tego powodu, że w roku przyszłym odbędzie się Międzynarodowy Kongres Biochemii, w obradach zaznaczyły się wyraźnie zagadnienia biochemiczne.

Do takich zaliczyć należy ujęcie tematyczne końcowego referatu plenarnego wygłoszonego przez prof. E. Terenina (ZSRR) „Elektronowe fotoreakcje barwników organicznych”. Prelegent podał nową metodykę pomiarów potencjału i przewodnictwa, przeprowadzanych podczas odwracalnej fotoredukcji w roztworze barwników typu chlorofilu i jej zastosowanie do badania mechanizmu i kinetyki reakcji fotochemicznych, a przede wszystkim zmian fotochemicznych chlorofilu w procesie fotosyntezy.

Typowo biochemiczną problematykę poruszył prof. W. Lautsch — Niemcy — w komunikacie „Nowe badania nad modelami enzymów”. Omówił metodę otrzymywania badanych przez niego modeli enzymów polegającą na dołączeniu łańcucha peptycznego do grupy czynnej, oraz aktywację i specyficzność substratową tych połączeń. Prof. I. D. Spencer — Anglia — mówił o biosyntezie alkaloidu harmaliny, prof. K. Freudenberg — Niemcy — o możliwościach biosyntezy garbników katechinowych i powiązaniu biogenetycznym związków grupy $C_6-C_3-C_6$, prof. F. F. Nord — Stany Zjednoczone — o mechanizmie lignifikacji. W przeważającej liczbie komunikatów tematu 4 omawiane były zagadnienia wyodrębniania i ustalania budowy związków roślinnych: alkaloidów, flawonoidów, bezbarwnych polienów i poliinów, terpenów i steroidów oraz barwników mikro-organizmów.

Dyskusja po komunikatach była często bardzo ożywiona, lecz ze względu na ograniczoną ilość czasu — krótka. Właściwa dyskusja odbywała się poza obradami sekcji, przy czym w obrębie każdej sekcji nawiązywała się między jej uczestnikami żywa wymiana poglądów na tematy szersze niż treść komunikatów.

Kolokwium o budowie białek

Międzynarodowe kolokwium poświęcone strukturze białek odbyło się w dniach 25—29 lipca 1957 r. Zgodnie z założeniami Komisji Białkowej Sekcji Chemii Biologicznej IUPAC głównym celem kolokwium było zebranie wyników badań przydatnych do uruchomienia produkcji standardowych preparatów białkowych dostępnych dla każdego badacza. Możliwość kupienia takich preparatów pozwoli na pracę na jednakowym materiale, a tym samym ułatwi dyskusję i koordynację wyników otrzymanych w różnych pracowniach. Pierwszym takim preparatem wprowadzonym dzięki pracy Komisji do sprzedaży w marcu 1957 jest krystaliczna insulina produkcji British Drug Houses Ltd. Produkt ten został scharakteryzowany przez dr Lymana, C. Craiga i dr R. R. Portera. Obecnie projektuje się produkcję standardowej krystalicznej rybonukleazy i chymotrypsynogenu.

Na otwarcie kolokwium przemawiali prof. J. Roche — Francja — jako gospodarz i prof. A. Neuberger — Anglia — jako przewodniczący Komisji Białkowej Sekcji Chemii Biologicznej IUPAC.

Wygłoszono 19 trzydziestominutowych komunikatów — referentami byli najwybitniejsi badacze struktury białek. Liczba uczestników wynosiła 150 osób. Ze względu na to, że wśród referentów przeważali Anglosasi dominował język angielski bez względu na narodowość przemawiającego zarówno w referatach jak i w dyskusji.

Omawiane zagadnienia można podzielić na trzy grupy:

- I — metodyka pracy,
- II — budowa i aktywność biologiczna,
- III — podobieństwo i różnice w budowie określonych białek u różnych gatunków.

W grupie I zajmowano się następującymi zagadnieniami:

1. Nowe osiągnięcia w elektroforezie strefowej i chromatografii białek — A. Tiselius — Szwecja.
2. Ilościowa chromatografia bibułowa aminokwasów przy zastosowaniu metody rozcieńczania izotopowego — F. Turba — Niemcy.
3. Charakterystyka białek o małej masie cząsteczkowej przy zastosowaniu dializy — C. Craig — Stany Zjednoczone.
4. Badania krystalograficzne mioglobiny — J. C. Kendrew — Anglia.

W referatach i dyskusji omawiano szczegółowo typy stosowanej aparatury — zmiany i ulepszenia, sposób przeprowadzania oznaczeń i dokładność pomiarów.

W grupie II wygłoszono największą liczbę komunikatów:

1. Czynniki wpływające na budowę hemoglobiny i innych białek — L. Pauling — Stany Zjednoczone.
2. Badanie budowy wtórnej białka metodą wymiany deuteru — K. Linderström-Lang — Dania.
3. Zmiany konfiguracji białek zachodzące w czasie ich miareczkowania — C. Tanford — Stany Zjednoczone.
4. Budowa rybonukleazy — C. H. W. Hirs, W. H. Stein i S. Moore — Stany Zjednoczone.
5. Zależność aktywności enzymatycznej i własności fizycznych rybonukleazy od jej budowy — C. B. Anfinsen — Stany Zjednoczone.
6. Budowa lizozymu białka jaja kurzego — P. Jollès, J. Thaureaux i Cl. Fromageot — Francja.
7. Budowa i aktywność papainy — E. I. Smith — Stany Zjednoczone.
8. Budowa i aktywacja tryptynogenu i chymotrypsynogenu — H. Neurath — Stany Zjednoczone.
9. Działanie enzymów proteolitycznych na chymotrypsynogen i chymotrypsynę — P. Desnuelle — Francja.
10. Budowa białek wirusa mozaiki tytoniowej — H. Fraenkel-Conrat — Stany Zjednoczone.
11. Niektóre badania dotyczące budowy białek wirusa mozaiki tytoniowej — G. Schramm — Niemcy.
12. Otrzymywanie i własności fragmentu albuminy osocza wołu zachowującego zdolność łączenia się z przeciwciałem osocza królika — R. R. Porter — Anglia.

Szczególnie dokładnie omówiono metody wyodrębniania i ustalania budowy oraz uzyskane wyniki w pracach nad rybonukleazą i chymotrypsynogenem.

W grupie III wygłoszono trzy referaty:

1. Badania porównawcze mikrostruktury białek — F. Š o r m — Czechosłowacja.
2. Specyficzność gatunkowa struktury białkowej — H. T u p p y — Austria.
3. Zmiany w budowie niektórych hormonów przysadki w zależności od gatunku — C. H. L i — Stany Zjednoczone.

W komunikacie 1 podano wyniki poszukiwań wspólnych fragmentów peptydowych chymotrypsynogenu, trypsynogenu i hemoglobiny różnych gatunków zwierząt.

W komunikacie 2 omówiono różnice w układzie aminokwasów insuliny u ssaków i cytochromu c w odległych od siebie grupach systematycznych: kręgowce, stawonogi, drożdże.

W komunikacie 3 podano różnice w sekwencji aminokwasów tych samych hormonów wydzielonych z przysadki zwierząt różnych gatunków i identyczność fragmentów łańcucha różnych hormonów, jak melanotropiny i kortikotropiny.

Treść komunikatów i dyskusji będzie opublikowana w formie monografii wydanej przez J. Viley and Sons, Londyn, która ma ukazać się w lutym 1958 roku.

Irena Chmielewska

Biochemia Francuska

(Sprawozdanie z podróży do Francji)

W czasie naszego kilkumiesięcznego pobytu we Francji mieliśmy możliwość poznać kilkanaście ośrodków biochemicznych w Paryżu, Lille, Marsylii i Strasburgu.

Główne centra biochemii francuskiej wiążą się z wyższymi uczelniami uniwersyteckimi, w szczególności z wydziałami lekarskim, farmaceutycznym i przyrodniczym.

Ponadto, biochemię reprezentuje jeszcze szereg instytutów, głównie w Paryżu, jak np. Instytut Pasteura, Instytut Biologii Fizyko-Chemicznej, Instytut Radowy, Instytuty CNRS (Centre National des Recherches Scientifiques) i Instytut Badań Nowotworowych w Lille. Pracownicy nauki rekrutują się spośród absolwentów wydziałów przyrodniczego (biologicznego i chemicznego), farmaceutycznego i lekarskiego. Wśród profesorów biochemii panuje zgodna opinia, że najlepsze przygotowanie do prac naukowych otrzymują absolwenci wydziałów farmaceutycznych. Świadczy to o wysokim poziomie studiów farmaceutycznych i o dobrym przygotowaniu w czasie studiów. Trzeba podkreślić, że wprawdzie mimo braku egzaminów wstępnych na wyższe uczelnie, kandydaci na studentów mają wysoki poziom wykształcenia ogólnego w szkole średniej oraz ostrą selekcję maturalną. W odniesieniu do kandydatów na I rok studiów lekarskich i farmaceutycznych obowiązuje ukończenie roku przygotowawczego w zakresie nauk chemicznych. W większości uczelni studenci medycyny kończą studia chemiczne i biochemiczne na niższych latach. Jedynie tylko i to w niektórych ośrodkach są katedry Patologii Chemicznej, które realizują na wyższych latach programy biochemii stosowanej.

W zakresie rozwoju naukowego obowiązują dwa stopnie, pierwszy odpowiadający naszemu doktoratowi w danej specjalności, oraz drugi i ostatni — doktorat nauk przyrodniczych odpowiadający stopniowi docenta. Dla uzyskania stopnia doktora nauk trzeba wykonać oryginalną pracę doświadczalną w szerokim zakresie, publi-

kowaną w formie tezy doktorskiej. Wymagania w odniesieniu tezy doktorskiej są bardzo wysokie i przygotowanie jej wymaga wielu lat pracy. W zakresie tytułów naukowych rozróżnia się tytuły uniwersyteckie i tytuły związane z pracą na etatach CNRS.

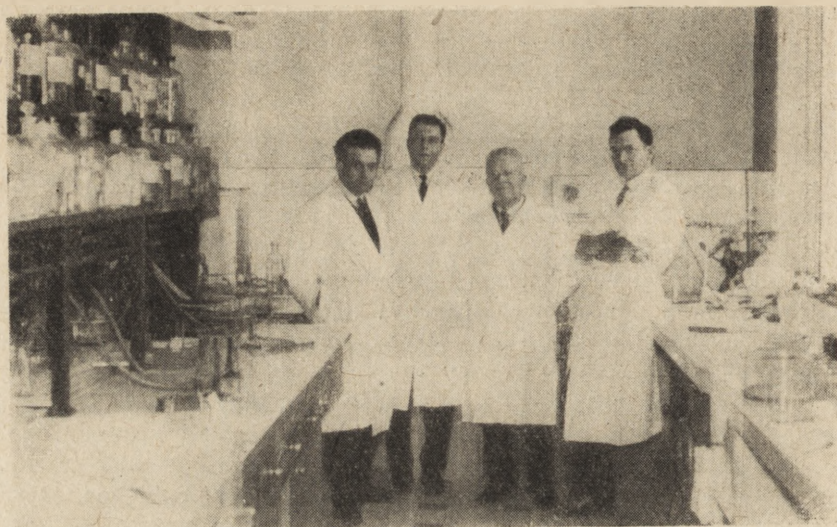
Pracownicy CNRS zajmują się wyłącznie nauką. CNRS zatrudnia pracowników naukowych nie tylko we własnych placówkach naukowych ale przydziela też etaty do poszczególnych zakładów naukowych, uniwersyteckich. Dlatego też w uniwersyteckich zakładach naukowych ilość zatrudnionych pracowników jest dość pokaźna. Wielką pomocą w pracach dydaktycznych i naukowych są liczne laborantki, które wprawdzie w większości wypadków nie mają ukończonych specjalnych szkół laboratoryjnych, jednakowoż wykazują bardzo wysoki poziom przygotowania do prac laboratoryjnych. Szkoły laboranckie w większych ośrodkach naukowych czynne są już od kilku lat.

Pracowników na etatach uniwersyteckich obowiązuje oprócz pracy naukowej praca dydaktyczna ze studentami (wykłady i zajęcia praktyczne). Pracami dydaktycznymi ze studentami kieruje jeden z starszych pomocniczych pracowników nauki, który otrzymuje tytuł „Chef des Travaux”.

Tytuł profesora jest ściśle związany z daną katedrą. Przy większości katedr obok profesora są jeszcze samodzielni pracownicy naukowci z stopniem doktora nauk otrzymujący tytuł profesorów przy katedrach. We Francji obowiązuje wiek prekluzyjny, po ukończeniu którego profesor przechodzi zwykle na emeryturę, co nie znaczy, aby w dalszym ciągu nie mógł pracować naukowo w swoim dotychczasowym zakładzie zachowując swoje laboratorium, i dotychczasowe warunki pracy. Tylko wykłady i administrację zakładu prowadzą nowo kreowani profesorowie. Wykłady rozdziela profesor między siebie i docentów. W ośrodkach prowincjonalnych często w jednym zakładzie skupia się biochemia dla dwu lub trzech wydziałów.

Lokale zakładów biochemicznych są bardzo różnorodne. Obok nowoczesnych, obszernych o doskonałym wyposażeniu w aparaturę podstawową i urządzenia laboratoryjne, są lokale mniej nowoczesne, w których jednak kwitnie praca naukowa prowadzona nowoczesnymi metodami. Trzeba jednak przyznać, że opieka Państwa nad rozwojem i unowocześnieniem zakładów naukowych jest szczególnie wydatna. Wiele nowych instytutów i zakładów naukowych zbudowano i ukończono w okresie ostatniego dziesięciolecia. Wiele zakładów i pracowni stanowi najwyższą klasę pod względem nowoczesnych urządzeń. Natomiast te zakłady, które znajdują się w złych warunkach mają w perspektywie najbliższych kilku lat możliwości uzyskania nowych lepszych lokali. Mimo skromnych nieraz warunków lokalowych większość zakładów biochemicznych ma nowoczesny sprzęt laboratoryjny, aparaturę podstawową i precyzyjną. Nie spotkaliśmy prawie ani jednego zakładu, lub samodzielnej pracowni, któryby nie miał jednego lub kilku spektrofotometrów, doskonałych fotokolorymetrów, rejestratorów dla elektroforetogramów i chromatogramów, wirówek wysokoobrotowych z zamrażaniem, pomieszczeń chłodni i termostatów. Wśród aparatury naukowej obok aparatów importowanych z NRF, USA, Szwajcarii, Anglii i Szwecji znajduje się dużo aparatów doskonałych produkcji francuskiej jak np. spektrofotometry wysokiej klasy samorejestrujące „Jobin”.

Zakłady nie mają większych trudności ze sprowadzaniem kosztownej w stosunku do wartości franka francuskiego aparatury z importu. Ultrawirówki „Spinco” produkcji amerykańskiej spotyka się w każdym laboratorium. Automatyczne kolektory



Fot. 1. Prof dr P. Boulanger, kierownik Zakładu Biochemii Wydz. Lek. Uniwersytetu w Lille wraz z docentami



Fot. 2. Laboratorium w Zakładzie Biochemii Wydz. Lek. Uniwersytetu w Lille

frakcji produkcji francuskiej funkcjonują bez zarzutu i jest ich zwykle kilka w każdym zakładzie.

W nowszych laboratoriach spotyka się wiele sprzętu laboratoryjnego z materiału plastycznego tak wygodnego w codziennym użytkowaniu jak np. węże do wody i gazu, zlewki, tryskawki, flaszki na odczynniki i inne. Nie spotyka się na ogół większych magazynów podręcznych na szkło, chemikalia przy poszczególnych laboratoriach, ponieważ każdorazowe nabycie ich i zakupienie z bieżącego budżetu nie przedstawia większych trudności. Również sprowadzenie chemikaliów i preparatów wzorcowych z importu nie jest kłopotliwe ani długotrwałe. Zakłady nie są obciążone drobiazgowym planowaniem odczynników jakże często fikcyjnym i sprawozdawczością związaną z rozchodowaniem.

Biblioteki zakładów i instytutów są dobrze i wszechstronnie zaopatrzone w bieżące czasopisma i książki. W każdej niemal bibliotece widzieliśmy między innymi i niektóre nasze wydawnictwa a w szczególności *Acta Biochimica Polonica*, które jednak nie budzą większych zainteresowań ze względu na niezrozumiały dla Francuzów język polski. W rozmowach prywatnych, indywidualnych powtarzała się ogólna opinia o potrzebie publikowania w językach ogólnie znanych, przede wszystkim angielskim, względnie francuskim. Zachęcano nas również do publikowania niektórych naszych prac w międzynarodowych pismach biochemicznych, jak *Biochimica et Biophysica Acta*, *Clinica Chimica Acta*, *Journal of Chromatography*.

Niezwykle miłe wrażenie sprawiła na nas atmosfera panująca w poszczególnych zakładach, a serdeczny stosunek do Polaków wyrażał się nie tylko w konwencjonalnej, koleżeńskej uprzejmości, ale prawdziwej chęci udzielenia nam pomocy w jak najszerszym wykorzystaniu naukowym pobytu zagranicznego.

Dla rozwiązywania poszczególnych zagadnień stosuje się wiele nowoczesnych metod, spośród których chromatografia i elektroforeza wraz z licznymi odmianami i modyfikacjami odgrywają poważną rolę.

Nasze dotychczasowe prace w zakresie metodyki chromatograficznej, jak również i wydana w 1957 roku monografia z chromatografii, pozwoliły nam nawiązać bliższy kontakt z tymi laboratoriami, które stosowały powyższe metody. Bezspornie najlepsze wrażenia zachowaliśmy ze zwiedzenia ośrodka biochemicznego w Lille. Biochemię w Lille reprezentują głównie dwa ośrodki, jeden to Laboratoire de Chimie Biologique na Faculté de Médecine et Pharmacie, a drugi „Service de Chimie”, „Institut de Recherches sur le cancer”. Kierownikiem naukowym obu tych ośrodków jest prof. Boulanger. W problematyce naukowej przeważa kierunek analityczny. Badania struktur białek złożonych gliko i nukleoproteidów zarówno części białkowej (ustalenie sekwencji aminokwasowej) w cząsteczkach białek, grup końcowych jak i analiza struktury grup prostetycznych interesują większość pracowników. W dziedzinie badań glikoproteidów opracowano praktyczną metodę chromatograficznej analizy hydrolizatów oligosacharydów przy pomocy której rozwiązywane są zagadnienia struktury glicydów i glikoproteidów biologicznych. W zakresie analizy kwasów nukleinowych w tkankach zdrowych i nowotworowych stosowana jest radiochromatografia dla wykrycia poszczególnych składników i ilościowego oznaczania. Ponadto przeprowadzane są prace nad ustalaniem składu aminokwasowego czystych frakcji białkowych (histon z grasicy), niektórych antybiotyków (polymyxin B) i cytochromów.

W ramach współpracy z klinikami analiza aminoacidurii przy zastosowaniu kombinowanej techniki chromatografii i elektroforezy doprowadziła do uzyskania wnioskowej oceny zmian zachodzących w składzie moczu. Ponadto badania nad wpływem

kolimycyny na metabolizm bakteryjny pozwoliły przez opracowanie nowej techniki analizy chromatograficznej lotnych i nielotnych kwasów organicznych ustalić blok metaboliczny z wykryciem głównych kwasów z cyklu Krebsa. Pięknie urządzony zakład, bogactwo problematyki naukowej, życzliwość koleżeńska promieniująca ze strony Kierownika na cały zespół, niezwykła w stosunku do nas serdeczność całego zespołu naukowego, wszystko to razem pozostawiło nam niezatarte wrażenia naszego pobytu w Lille.

Ilość ośrodków biochemicznych w Paryżu jest tak wielka, że tylko niektóre z nich mogliśmy odwiedzić. W zasadzie większe laboratoria biochemiczne skupiają się przy wyższych uczelniach. Ponadto niemal każdy instytut z zakresu nauk biologicznych posiada własne laboratorium biochemiczne.

Osobną pozycję zajmuje Instytut Biologii Fizyko-Chemicznej, którego problematyka naukowa ma charakter biochemiczny.

Na wydziale lekarskim Uniwersytetu zakład biochemii mieści się w nowo wybudowanym gmachu projektowanym przez długoletniego kierownika tego zakładu, czołowego przedstawiciela biochemii francuskiej zmarłego przed kilku laty Michała Polonowskiego. Sam lokal, urządzenia i wyposażenie mogą służyć jako przykład dobrze i nowocześnie urządzonego laboratorium biochemicznego. Obecnie, kierownikiem Zakładu jest profesor Yeyle współpracujący z dwoma jeszcze profesorami przy katedrze z prof. Polonowskim, synem wielkiego Polonowskiego i prof. Schapirą. Pomimo dużego obciążenia dydaktycznego zakład reprezentuje wysoki poziom naukowy i rozwiązuje szereg ciekawych problemów. Główny kierunek prac naukowych jest analityczny. Otrzymywanie, oczyszczanie i analiza niektórych frakcji białkowych surowicy (haptoglobina) przeprowadzane jest przy zastosowaniu wielu ciekawych metod, jak np. elektroforeza na żelu skrobiowym, immunoelektroforeza, frakcjonowanie w ultrawirówce Spinco i tym podobne. Zakład ten jest jednym z niewielu ośrodków, który zajmuje się gruntownie badaniem struktury związków steroidowych ich biosyntezą i analizą przemian patologicznych. Badania te są prowadzone głównie w oparciu o metody chromatograficzne.

Poważne zadania dydaktyczne spełnia również zakład biochemii na wydziale farmaceutycznym, którego kierownikiem jest profesor Courtois. Obszerny program z biochemii ogólnej i lekarskiej jest realizowany dopiero na wyższych latach studiów w przeciwstawieniu do wydziału lekarskiego. Ponadto zakład prowadzi specjalizację farmaceutów w zakresie chemii biologicznej. Znaczny procent studentów farmacji wybiera tę właśnie specjalizację. I to tłumaczy dlaczego właśnie farmaceutyci mają tak świetną opinię jako pracownicy naukowcy w zakładach biochemicznych.

Również na wydziale przyrodniczym uniwersytetu poważną pozycję zajmuje biochemia, która reprezentowana jest przez zakład pozostający do niedawna pod kierunkiem prof. Fromageot. Zakład prowadzi zajęcia dla studentów zarówno w czasie studiów jak i w okresie specjalizacji biochemicznej. Program specjalizacji jest bardzo obszerny i obejmuje obok nowoczesnych metod analitycznych wiele ciekawych eksperymentów biochemicznych. Problematyka naukowa tego niezwykle interesującego zakładu dotyczy w dużym stopniu zagadnień z biochemii porównawczej. Metabolizm aminokwasów siarkowych, procesy dekarboksylacji w mózgu, struktura cząsteczek białkowych różnych lipoproteidów, porównywanie metodą spektrograficzną widma układu cytochromowego w różnych warunkach doświadczalnych stanowią główny kierunek prac naukowych zakładu. Wiele trudu, energii, własnego entuzjazmu w prowadzeniu tylu tematów wykazywał prof. Fromageot,

z którym w czasie rozmów i dyskusji mieliśmy możliwość bliżej się zapoznać. Z wielkim żalem i przykrością dowiedzieliśmy się o jego śmierci, która nastąpiła nagle w pierwszych dniach stycznia 1958 roku.

W Instytucie Biologii Fizyko-Chemicznej, w którym jeden z działów prowadzony jest przez prof. E. Lederera autora znanego nam podręcznika z chromatografii, doskonalenie metod chromatograficznych stanowi jeden z głównych problemów badawczych. W szczególności metoda chromatografii gazowej jest stosowana i doskonalona w analizie wielu związków. Ponadto chromatografia niektórych związków aromatycznych oraz badania nad strukturą lipidów otrzymywanych z prątków kwasoodpornych rozszerzają problematykę naukową tego działu.

W innym czasie tegoż instytutu prowadzi się szeroko zakrojone prace nad izolacją i oczyszczaniem enzymu syntetyzującego polinukleotydy. Analiza produktów syntezy realizowana jest przy pomocy radioizotopów, i metodyki chromatograficznej. Ta pracownia pozostająca pod kierunkiem dr M. Grunberg-Manago jest szczególnie chętnie odwiedzana przez stypendystów z Polski.

Ciekawe prace z zakresu analityki chromatograficznej prowadzi M. Lederer w jednym z działów Instytutu Radowego. Szczególnie metody rozdzielania rzadkich pierwiastków i badania teoretyczne nad fizykochemicznymi procesami w chromatografii stanowią główną problematykę tego działu.

Na uwagę zasługuje wzmianka, że dr M. Lederer jest redaktorem nowego pisma międzynarodowego *Journal of Chromatography*, którego pierwszy numer ukazał się w styczniu bieżącego roku.

Wielką placówką naukową jaką jest Instytut Pasteura posiada również kilka działów biochemicznych.

Dział chemii bakteryjnej pod kierunkiem prof. Grabara prowadzi prace w zakresie immunochemii. Prof. Grabar jest autorem nowej metody w analizie elektroforetycznej znanej obecnie pod nazwą immunoelektroforezy. W dziale tym prowadzone jest szkolenie w zakresie nowej metodyki dla pracowników naukowych pochodzących nieraz z bardzo odległych ośrodków badawczych.

Drugim bardzo interesującym działem tego Instytutu jest „Service de Chimie Cellulaire” pozostający pod kierunkiem prof. Monod. W dziale tym prowadzi się prace głównie o charakterze metabolicznym. Adaptacja enzymetyczna i biosynteza β -galaktozydazy u bakterii stanowią główny problem ich badań naukowych.

Analiza aminokwasów białek enzymatycznych, w których znajdują się znaczone radioaktywnie analogony aminokwasowe w połączeniu z badaniem funkcji enzymatycznej przedstawia ciekawą metodykę badawczą. Szczególniej interesujące są badania nad przepuszczalnością błony komórkowej. W wyniku tych badań ustalono obecność i niektóre funkcje biologiczne czynnika „permease” odpowiedzialnego za selektywne gromadzenie składników środowiska wewnątrz komórki. W dziale produkcji anatoksyn prowadzi się różne prace badawcze dotyczące analizy ich składu aminokwasowego. Dla tych celów opracowano pewne ciekawe modyfikacje kombinowanej techniki elektroforezo-chromatograficznej.

Wiele nowopowstałych placówek naukowych pracuje już w nowoczesnych laboratoriach mieszczących się pod Paryżem, a inne są w trakcie przenoszenia. I tak w małej miejscowości Gif sur Yvette znajduje się laboratorium Fizjologii Genetycznej CNRS, gdzie kierownikiem Działu Biochemii jest nasz rodak dr Piotr Słonimski. Badania enzymów adaptacyjnych w drożdżach oraz synteza nukleotydów z punktu widzenia genetycznego stanowią główną tematykę tego działu.

W większości klinik i szpitali urządzone są laboratoria biochemiczne. Niektóre z nich zajmują się wyłącznie problematyką naukową bez obciążeń bieżącą pracą usługową. I tak przy wielkim szpitalu chorób dzieci znajduje się laboratorium badawcze prowadzone przez prof. Schapirę.

Analiza funkcji enzymatycznych mięśnia w stanach fizjologicznych i patologicznych skurczów jest głównym tematem badawczym. Obok tego prowadzone są prace nad transaminazami we krwi. Przy wielkim szpitalu położniczym prowadzi się badania specjalne nad ketosterydami we krwi w różnych okresach fizjologicznych kobiet.

Ścisłejsze powiązanie z pracami badawczymi klinik ma Laboratorium Terapeutyczne na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Paryskiego, którego jednym z problemów są studia nad metabolizmem miedzi w warunkach fizjologicznych i patologicznych.

W Marsylii podobnie jak i w innych ośrodkach badania biochemiczne prowadzi się głównie w laboratoriach uniwersyteckich na wydziałach lekarskim i przyrodniczym. Zarówno jedno jak i drugie laboratorium uzyskuje w chwili obecnej wspałałe nowoczesne pomieszczenia. Kierownikiem katedry na wydziale lekarskim jest prof. Derrien, który prowadzi elektroforetyczne badania nad charakterystyką różnych hemoglobin.

Szeroko zakrojone badania nad metabolizmem aminokwasów jodowych prowadzone są przez prof. przy katedrze Lissickiego. Stosowanie radioizotopów oraz nowoczesne rozwiązania techniczne w radiochromatografii są szczególnie interesujące. Ponadto prowadzi się badania nad strukturą niektórych nukleoproteidów oraz toksyn. Bogate nowoczesne wyposażenie w zakresie badań przy użyciu izotopów radioaktywnych posiada laboratorium biochemiczne przy szpitalu chorób nowotworowych.

Kierownikiem katedry biochemii na wydziale przyrodniczym jest prof. Desnuelle. Badania enzymologiczne stanowią główną tematykę tego zakładu. Kinetyka lipazy trzustkowej, oraz funkcje enzymatyczne i aktywacja trypsynogenu interesuje od wielu lat zespół naukowy tego zakładu.

W końcu kilka słów na temat problematyki naukowej dwóch oglądanych laboratoriów biochemicznych w Strasburgu. Instytut Biochemii Wydziału Lekarskiego kierowany jest przez prof. Mandla.

Badania nad wpływem hormonów na syntezę nukleoproteidów oraz struktura tych ostatnich w licznych tkankach zwierzęcych, stanowią główne tematy prac naukowych Zakładu. Niezależnie od wyżej wymienionych tematów opracowuje się ponadto przemianę pośrednią w soczewce szczególnie odnośnie związków fosforowych, skład nukleoproteidowy mózgu szczura w czasie wzrostu.

W Zakładzie Chemii Ogólnej Wydziału Farmaceutycznego, prof. Ebel opracowuje tematy dotyczące zagadnienia polifosforanów, ich struktury, energetyki i funkcji biologicznych. W świecie naukowym prof. Ebel wyróżnia się jako jeden z najlepszych specjalistów w tej dziedzinie badań.

Zywą działalność prowadzi Francuskie Towarzystwo Biochemiczne, którego Zarząd mieści się w Paryżu. W czasie naszej bytności w Paryżu mieliśmy sposobność uczestniczyć w 4 wykładach zorganizowanych przez Towarzystwo w jednym tylko miesiącu. Na każdym takim posiedzeniu oprócz omawiania spraw bieżących, przedstawiany był zgromadzeniu jeden ze znanych biochemików zagranicznych, który wygłaszał referat poglądowy z dziedziny swoich badań.

Prelegentami byli:

- prof. Heidelberg (USA) — „Zależności między specyficznością immunologiczną a strukturą chemiczną”,
prof. Kalckar (USA) — „Galaktozemia wrodzona”,
prof. Oriechowicz (ZSRR) — „Białka soczewki”,
prof. Kuhn (NRF) — „Struktura oligosacharydów”.

Ponadto Tow. Biochemiczne organizuje sympozja w wybranych zagadnieniach z Biochemii w poszczególnych ośrodkach naukowych, w których biorą udział biochemicy z innych krajów szczególnie z Włoch i Belgii.

Zwiedzanie i zapoznanie się z problematyką naukową kilkunastu wyżej wymienionych laboratoriów nie upoważnia nas bynajmniej do wyprowadzania ogólnych wniosków na temat biochemii francuskiej. Niemniej jednak daje wystarczającą podstawę dla wysokiej oceny wartości prac biochemicznych prowadzonych we Francji.

J. Opieńska-Blauth, T. Borkowski

RECENZJA

Państwowe Wydawnictwo Naukowe wydało, z inicjatywy i pod opieką Komitetu Biochemii PAN, w 1957 r. tłumaczenie z języka angielskiego książki *Analiza gleby i roślin* (tytuł oryginału *Soil and Plant Analysis — A Laboratory Manual of Methods for the Examination of Soils and the Determination of the Inorganic Constituents of Plants*). Autorem podanego podręcznika jest C. S. Piper.

Treść tłumaczonego podręcznika znajduje się na 407 str. druku i obejmuje przedmowę, wstęp oraz w dwu częściach treść właściwą wydawnictwa.

Część I podręcznika poświęcona jest metodom analizy gleby i składa się z następujących 14 rozdziałów:

- I — Pobieranie i przygotowanie próbek gleby,
- II — Stężenie jonów wodorowych, przewodnictwo i sole rozpuszczalne w wodzie,
- III — Analiza mechaniczna,
- IV — Pojedyncze wskaźniki liczbowe gleby,
- V — Barwa gleby,
- VI — Roztwory mianowane i wskaźniki,
- VII — Węglan wapnia,
- VIII — Analiza ekstraktu uzyskanego kwasem solnym,
- IX — Jony wymienne i pojemność wymienna,
- X — Azot,
- XI — Azotany, azotyny i amoniak,
- XII — Substancje organiczne,
- XIII — Wolny tlenek żelaza,
- XIV — Oddzielanie i analiza frakcji glinu.

Część II książki obejmuje zbiór metod analizy roślin. Ta część podręcznika ujęta jest w następujących rozdziałach:

- I — Zbieranie i przygotowywanie próbek roślin,
- II — Metody spalania materiału roślinnego,

III — Oznaczenie bardziej pospolitych składników nieorganicznych w roślinach,
IV — Oznaczenie pierwiastków śladowych.

Inicjatywę Komitetu Biochemii PAN udostępnienia omawianego podręcznika w języku polskim należy ocenić jako celową i ze wszelkich miar pożyteczną. W literaturze naszej odczuwa się brak tego rodzaju pomocy laboratoryjnej.

W podręczniku *Analiza gleby i roślin* znajdują się przede wszystkim metody bardziej uniwersalne, bądź przyjęte przez Międzynarodowe Towarzystwa Gleboznawcze.

Metody podane przez Piper'a zostały wypróbowane w laboratoriach badawczych instytutów rolniczych w Australii, przedyskutowane ze specjalistami i częstokroć dostosowane dla warunków i gleb australijskich.

Najbardziej uniwersalne metody znajdują się w części książki omawiającej metody badania roślin.

W podręczniku szczególnie cenne są krytyczne uwagi przeprowadzone przez autora nad stosowanymi metodami. Ważne są wskazania na często popełniane przez analityków błędy przy badaniu gleb lub roślin.

Podręcznik Piper'a *Analiza gleby i roślin* będzie wykorzystany z wielkim pożytkiem w laboratoriach gleboznawczych, chemii rolnej, melioracyjnych, uprawy roli i roślin, łaskarstwa itp. Omawiane tłumaczenie jest przyjęte ze szczególnym zadowoleniem przez magistrów, pomocniczych pracowników nauki i techniczny personel naukowy.

„*Analiza gleby i roślin*” znajdzie szczególne zastosowanie w stacjach chemiczno-rolniczych i laboratoriach melioracyjno-gleboznawczych.

Omawiane tłumaczenie przyczyni się niewątpliwie do wprowadzenia metod analitycznych dotychczas u nas nie rozpowszechnionych. Należy przypuszczać, że tłumaczenie książki *Analiza gleby i roślin* znajdzie licznych odbiorców i wydany nakład 2000 egzemplarzy w najbliższym czasie będzie wyczerpany.

Słabiej wypadło opracowanie rozdziału III traktującego o analizach mechanicznych gleby. W rozdziale tym podano mało metod i nie znajdują się w nim ważniejsze i bardziej rozpowszechnione w Polsce metody badania mechanicznego składu gleby.

Szkoda również, że autor nie podaje i nie omawia krytycznie sposobów oznaczania pierwiastków śladowych (mikroelementów) w glebie, których oznaczenie napotyka na większe trudności, niż określenie tych składników w roślinach.

Na zakończenie chciałbym podkreślić jako zaletę omawianej książki prawidłowe przeprowadzenie przekładu, tak pod względem merytorycznym jak również językowym. Wśród nielicznych usterek można wymienić użycie określenia „próbka złożona” — zamiast używanego w naszej literaturze „mieszana” lub „zbiorowa”; „roztłukiwanie” (mowa o próbkach gleby) — zamiast „rozniatanie”; „ekstrakt z gleby” — zamiast stosowanego w tym znaczeniu „wyciąg z gleby”.

B. Dobrzański

Dr Daniel Bovet, laureat nagrody Nobla za rok 1957

Nie wiem spośród jakiej przeciętnej liczby kandydatów Karolinska Institutet w Sztokholmie wybiera rokrocznie każdorazowego laureata nagrody Nobla za najwybitniejsze osiągnięcia w dziedzinie medycyny sędzę jednak, że w tym roku w szranki szlachetnej rywalizacji w oczach aeropagu uczonych stanęło szczególnie wielu badaczy. Podawana przez prasę liczba 80 jest istotnie ogromna. Niestety zgodnie z dobrymi obyczajami nie ujawniane są nazwiska kandydatów którzy odpadli. Tylko jedno z nich przedostało się do wiadomości opinii publicznej — Jonasa Salka, twórcy obecnie szeroko stosowanej szczepionki przeciwko chorobie Heinego i Medina.

Laureat nagrody dr Daniel Bovet jest z pochodzenia szwajcarem, urodził się on w Neuchâtel przed 50 laty i w tym też mieście ukończył studia wyższe. Jest on przyrodnikiem i jeszcze jednym więcej laureatem nagrody Nobla w dziedzinie medycyny nie będącym lekarzem. Jako zupełnie młody człowiek rozpoczął Bovet pracę w laboratorium chemii terapeutycznej Instytutu Pasteura w Paryżu i tu poszukując preparatów o działaniu adrenergicznym i adrenolitycznym dosyć przypadkowo natrafił na silne działanie przeciwhistaminowe niektórych pochodnych, co zaciekało go tak dalece, że na szereg lat poświęcił się badaniom tej grupy leków. Badane związki należały ogólnie biorąc do fenyloeterowych pochodnych amionoalkoholi. Już w roku 1910 preparatami tego typu zainteresował się słynny chemik Ernest Fourneau, szef Bovet z lat trzydziestych. Obserwowane przezeń zaburzenia czynności układu krążenia łączył on z toksycznym wpływem badanych połączeń na serce.

Na przełomie drugiego i trzeciego dziesięciolecia dwaj japończycy Ana i Okasaki zwrócili uwagę na adrenolityczne właściwości jednego z tych eterów, mianowicie tymoksyfenylo-dwumetyloaminy. W dalszych pracach Bovet wspólnie z Fourneau badali tymoksyetylo-dwuetyloaminę czyli 2-izopropyl-5-metylo-fenoksyetylo-dwuetyloaminę i chcąc skontrolować siłę uważanego przez siebie za działanie uboczne ewentualnego działania przeciwhistaminowego stwierdzili, że występuje ono w znacznym natężeniu. Preparat ten otrzymał kolejny numer 929F i historycznie rzecz biorąc uważany jest za pierwszego przedstawiciela ogromnie dziś rozwiniętej grupy konkurencyjnych antagonistów histaminy. Preparat 929F jako zbyt toksyczny nie znalazł zastosowania w lecznictwie i dopiero opracowane przez grupę Halperna inne związki okazały się przydatne klinicznie. Mimo, że sam Bovet jest twórcą tylko jednego rynkowego leku przeciwhistaminowego znanego pod nazwą Neo-Antergan to jednak przypada mu niewątpliwa zasługa odkrycia tej tak ważnej i nowej grupy ciał czynnych.

W początkowym okresie ery sulfonamidowej również i ta grupa preparatów była przedmiotem zainteresowania Bovet. Był on współtwórcą sulfanilamidopirydyny

znanej pod nazwą handlową Dagenan. Jest to pierwszy lek skuteczny w zakażeniu pneumokokowym, dziś zresztą ze względu na znaczną toksyczność już nie stosowany.

Dziedzina, która na wiele lat przykuła zainteresowania Bovet to kurara i związki kuraropodobne. Badania jego można śmiało nazwać ukoronowaniem wielowiekowych dociekań czym jest kurara i jak działa. Pierwsze wzmianki o tajemniczym jadzie używanym przez polujących w dorzeczu Amazonki i Orinoko indian znaleźć można już w niewiele lat po odkryciu Ameryki. Wspomina o niej Peter Martyr d'Anghera w swej książce *De orbe novo Decades* wydanej w 1516. Niemal od pierwszej chwili, a w miarę upływu lat w coraz to większym stopniu elektryzowała kurara wybitne umysły uczonych, pisarzy i podróżników. Wspomina o niej Humboldt i Claude Bernard, Vulpian i Wieland, Lapique i Dale. Pierwsze doświadczenia z kurarą wykonał de la Condamine w połowie XVIII wieku, prawdziwe jednak podwaliny pod znajomość mechanizmu działania tego jadu zawdzięczamy Claude Bernard. Wykazał on obwodowy punkt uchwytu kurary i zwrócił uwagę na kolejność w jakiej poszczególne grupy mięśni ulegają porażeniu. Najważniejszym jednak było spostrzeżenie, że mięsień drażniony bezpośrednio prądem elektrycznym reaguje skurczem, a jedynie w przypadku drażnienia pośredniego poprzez odpowiedni nerw reakcja nie występuje. Dalsze badania Kuhnego, ucznia Claude Bernarda zlokalizowały bliżej punkt uchwytu działania kurary w tzw. płycie motorycznej, tj. zakończeniu nerwu ruchowego w mięśniu prążkowym. Nie będziemy oczywiście śledzić szczegółów dalszych postępów w tej dziedzinie, a jedynie wspomnimy, że rozwijały się one w dwu kierunkach. Mechanizmu działania i wyosobnienia ciała czynnego. W roku 1935 King opublikował wzór najczynniejszego alkaloidu kurary, d-tubokuraryny. W rok później Dale wraz z współpracownikami ogłaszają wyniki swych prac wyjaśniających rolę acetylocholino w przewodnictwie nerwowo-mięśniowym i zaliczają kurarę do jądów atakujących ten mechanizm. W latach 1937—1941 Carneiro i Wieland uzyskują z różnych roślin gatunku *strychnos* drobne ilości alkaloidów identycznych z kurarą indyjską. Dalszym etapem było ściśle ustalenie gatunków, z których King wyosobnił d-tubokurarynę. W ślad za tym uzyskanie z *Chondrodendron tomentosum* większych ilości czystego alkaloidu (Wintersteiner 1943). Z tą dopiero chwilą powstaje naukowo uzasadniona możliwość zastosowania kurary w medycynie. Pierwsze próby w tym kierunku podejmuje amerykańanie Griffith i Cullen w 1943. Stosują oni d-tubokurarynę jako czynnik znoszący napięcie mięśniowe w zabiegach chirurgicznych.

Należy może wyjaśnić, dlaczego próby kliniczne zostały rozpoczęte dopiero tak późno. Otóż działanie całej kurary było bardzo toksyczne i niejednakowe. Nie jest to dziwne ze względu na wielką mnogość substancji, które się w niej znajdują. Również trwałość kurary jako całości pozostawiała wiele do życzenia. Jak zwykle bywa w farmakologii z chwilą odkrycia nowego preparatu o cennych właściwościach liczne rzesze badaczy poddają jego działanie analizie zmierzającej do ustalenia jaka część cząsteczki jest za nie odpowiedzialna i co za tym idzie zsyntetyzowania związków prostszych. Pierwsze udane próby w tym kierunku przeprowadził Bovet wraz z współpracownikami w 1946. Były to czwartorzędowe pochodne amoniowe o dwu pierścieniach chinolinowych połączonych łańcuchem z reszt metylenowych. Niewątpliwą zasługą Bovet jest odkrycie roli czwartorzędowych atomów azotu oraz nadanie im przez odpowiednią liczbę reszt metylenowych tej samej wzajemnej odległości jaka istnieje w naturalnym alkaloidzie. Drugą grupę związków o tym samym działaniu stanowiły pochodne aminofenolu, trzecią etery polifenoli, a czwartą

związki alifatyczne typu sukcyntylocholiny. Wiele spośród preparatów opisanych przez Boveť stosowanych jest w lecznictwie. Z farmakologicznego punktu widzenia związki o działaniu kuraryzującym dzielą się na dwie grupy. Te których działanie połączone jest z depolaryzacją komórki mięśnia jak np. sukcyntylocholina i decamethonium oraz niedepolaryzujące np. d-tubokuraryna. Pierwsza grupa jest bliską acetylocholinie, która z kolei wywołuje skurcz depolaryzacyjny. Preparaty obu grup cechuje wzajemny antagonizm.

Związki o działaniu kurary znalazły szerokie zastosowanie w medycynie. Główną oczywiście dziedziną stanowi chirurgia, w której dziś nie dokonuje się żadnego otwarcia klatki piersiowej bez kuraryzacji. W nieco mniejszym zakresie dotyczy to również laparotomii. Dzięki zastosowaniu leków usuwających napięcia mięśni dawki narkotyków można ograniczyć jedynie do znoszących świadomość i czucie bólu. Pozwala to znacznie ograniczyć występowanie objawów ubocznych. W przypadku pełnej kuraryzacji chory oddycha oczywiście za pomocą specjalnej pompy. Drugim obok chirurgii zastosowaniem preparatów tego typu są zatrucia połączone z atakami drgawek, np. strychniną, zakażenie tężcem, *eclampsia*. Całkowite porażenie mięśni prowadzone jest w przypadku uporczywych ataków tężca nawet przez wiele tygodni, oczywiście w sztucznym oddychaniu. Ta metoda leczenia uratowała życie licznych chorych, u których nawet wielkie dawki surowicy nie powodowały poprawy.

Wszędzie tam, gdzie pożądana jest bardziej długotrwała kuraryzacja stosuje się d-turbokurarynę, lub obecnie coraz częściej związki syntetyczne typu decamethonium. W zabiegach krótkotrwałych, w których pożądane jest jedynie kilkunastosekundowe porażenie mięśni jak np. dla intubacji używa się sukcyntylocholiny lub preparatów pokrewnych. Działanie ich ustępuje niemal natychmiast po wstrzyknięciu, naskutek rozkładu przez esterazy.

Mimo, że najlepsze leki przeciwhistaminowe i liczne związki o działaniu kurary wykryte zostały nie przez Boveť, lecz przez innych uczonych Karolińska Instytut przyznając dr Boveť nagrodę Nobla uczciła to co w nauce jest najwartościowsze, mianowicie wskazanie nowych i nieznanych dotąd dróg postępu nauki.

Jan Venulet

MATERIAŁY DO ROZWOJU BIOCHEMII POLSKIEJ W OKRESIE OD 1951 R.

(UZUPEŁNIENIA)*

B. INSTYTUTY NAUKOWE

Pracownia Biochemiczna Oddziału Paszoznawstwa Instytutu Zootechniki w Puławach

Kierownik: Prof. Dr Zenon Wierchowski

Pracownia biochemiczna powstała w lipcu r. 1950 w związku z organizacją samodzielnego Instytutu Zootechniki po zlikwidowaniu dawnego Państwowego Instytutu Naukowego Gosp. Wiejskiego w Puławach.

Tematyka badań pracowni jest dostosowana do potrzeb rolnictwa w zakresie żywienia zwierząt i wobec skromnego wyposażenia etatowego i aparaturowego ogranicza się do zagadnień poznania dokładnego składników roślin pastewnych.

W okresie ubiegłym zajmowano się przede wszystkim zagadnieniem występowania alkaloidów w łubinach pastewnych, dokładniejszym poznaniem ich własności i opracowaniem metod ilościowego ich oznaczania. Z tej dziedziny wykonano 2 prace naukowe ogłoszone drukiem w latach 1952—1954 oraz opublikowano 2 prace referatowe.

Druga dziedzina badań obejmuje zagadnienia występowania witamin w paszach roślinnych i produktach rolnych. Przede wszystkim zajęto się witaminą A jako najważniejszą przy żywieniu zwierząt gospodarskich. A więc badano występowanie karotenów jako prowitamin A w roślinach pastewnych podczas ich okresu wegetacji oraz ich zachowanie się pod wpływem czynników zewnętrznych przy suszeniu i zakiszeniu materiału roślinnego. Na te tematy wykonano 4 prace naukowe (dwie opublikowane, dwie przygotowane do druku).

Prace o charakterze usługowym:

Współpraca z zakładami doświadczalnymi Instytutów Rolniczych w kraju oraz stacjami rolniczo-chemicznymi polegająca na urządzeniu kursów szkolenia analityków oraz bezpośredniej pomocy analitycznej przy hodowli roślin i produkcji nasion.

* Zgodnie z zapowiedzią Redakcja „Postępów Biochemii” publikuje uzupełnienia i kontynuację „Materiałów do rozwoju biochemii polskiej” (patrz „Postępy Biochemii”, tom III, zeszyt 2, 1957). Redakcja prosi o dalsze nadsyłanie uzupełnień i kontynuację materiałów.

WYKAZ PUBLIKACJI ZA OKRES OD 1951 ROKU

(UZUPEŁNIENIA)

Rok 1951

1. Korzybski T. — *Bibułowa chromatografia penicylin za pomocą najprostszych urządzeń*, Med. Dośw. i Mikr. 3, 16, 1951.
2. Korzybski T. — *Antybiotyki i Antybioza*. Głos w dyskusji w książce: Materiały konferencji agrobiologów, biologów i medyków w Kuźnicach, 2, 72, 1951.

Rok 1952

1. Borensztajn D., Gawenda-Dzierżyńska I., Korzybski T., Kowszyk Z., Kuryłowicz W., Niedźwiecka-Trzaskowska I., Piechowska M., Woźnicka W. — *Właściwości bezpostaciowej penicyliny wytwarzanej w kraju*, Pol. Tyg. Lek. 7, 174, 1952.
2. Korzybski T., Kuryłowicz W., Kuźniecowa A., Wolf J. — *Wstępne wyniki badań nad przeciwpłatkowymi właściwościami hydrazidu kwasu izonikotynowego*, Pol. Tyg. Lek. 7, 562, 1952.
3. Wierzechowski Z., Obuchowska I. — *O nowych metodach oznaczania alkaloidów w łubinach pastewnych Cz. I* Roczniki Nauk Roln. 61, 159, 1952.
4. Wierzechowski Z., — *O toksyczności łubinów pastewnych*. Postępy Wiedzy Rolniczej 4, zeszyt 3, 1952.

Rok 1953

1. Korzybski T., Kowszyk Z. — *Oczyszczanie penicyliny. II. Usuwanie penicyliny heptylowej i substancji barwnych strącaniem w pH od 3,3 do 4,2* Farmacja Polska, 9, 246, 1943.
2. Pękacka B., Kowszyk Z., Korzybski T. — *Oczyszczanie penicyliny. III. Strącanie penicyliny za pomocą rozpuszczalników organicznych* Farmacja Polska, 9, 244, 1953.
3. Korzybski T., Kuryłowicz W. — *Badania nad mechanizmem działania streptomycyny. I. Rola kwasów nukleinowych*, Med. Dośw. i Mikr. 5, 378, 1953.
4. Korzybski T., Kowszyk Z. — *Metoda otrzymywania aureomycyny w skali laboratoryjnej i ćwierćtechnicznej*, Med. Dośw. i Mikr. 5, 378, 1953.

Rok 1954

1. Korzybski T. — *Oczyszczanie penicyliny. I. Ekstrakcja penicyliny octanem amylovym w oddziaływaniu kwaśnym*, Acta Pol. Pharm. 11, 29, 1954.
2. Korzybski T., Kowszyk Z. — *Badania nad właściwościami, etapami izolowania, oraz nad otrzymywaniem aureomycyny z płynów fermentacyjnych*, Med. Dośw. i Mikr. 6, 63, 1954.
3. Korzybski T., Kowszyk Z. — *Badania nad absorpcją, elucją i strącaniem streptomycyny oraz nad uzyskiwaniem streptomycyny z brzeczki fermentacyjnej za pomocą kationowego wymiennicza Amberlit IRC-50*, Med. Dośw. i Mikr. 6, 13, 1954.

4. Kuryłowicz W., Woźnicka W., Korzybski T., Kowszyk Z., Borensztajn D., Niedźwiecka I. — *Metoda otrzymywania streptomycyny*, PZWL, Warszawa 1954.
5. Kuryłowicz W., Korzybski T., Niedźwiecka I., Kowszyk Z., Borensztajn D., Woźnicka W. — *Metoda otrzymywania aureomycyny*, PZWL, Warszawa, 1954.
6. Korzybski T., Kowszyk Z. — Wyniki zastosowania wymiennicy jonowych do uzyskiwania streptomycyny i chlorotetracykliny (aureomycyny) z brzoetek fermentacyjnych, Doniesienie przesłane na Kolokwium Poświęcone Chromatografii, Polskie Towarzystwo Chemiczne, Kraków 1954.
7. Korzybski T. — Azaseryna, antybiotyk przeciwnowotworowy, *Wiadomości Chemicz.* 8, 412, 1954.
8. Wierzchowski Z. — O nowych metodach oznaczania alkaloidów w łubinach pastewnych. Cz. II, *Roczniki Nauk Roln.* 67, 389, 1954.

Rok 1955

1. Kowszyk Z., Korzybski T. — Otrzymywanie aureomycyny z płynów fermentacyjnych. Metoda ekstrakcji butanolem i metoda strącania w oddziaływaniu alkalicznym, *Med. Dośw. i Mikr.* 7, 105, 1955.
2. Korzybski T. — Biogeneza antybiotyków, *Śłużba Zdrowia*, 7, 2, 1955.
3. Korzybski T. — Biogeneza antybiotyków, *Postępy Biochemii*, 7, 253, 1955.
4. Wierzchowski Z. — Wpływ temperatury, tlenu i światła na zawartość karotenów w zielonkach roślin pastewnych w czasie suszenia. *Roczniki Nauk Roln.* 69, 163, 1955.
5. Wierzchowski Z. — Przebieg gromadzenia się karotenów w roślinach pastewnych. *Roczniki Nauk Roln.* 67, 303, 1955.

Rok 1956

1. Korzybski T. — Rozwój nauki o antybiotykach, *Med. Dośw. i Mikr.* 8, 129, 1956.
2. Korzybski T. — Biogeneza antybiotyków, *Materiały z Międzynarodowego Sympozjum na Temat Antybiotyków: Najnowsze Problemy z Dziedziny Antybiotyków*, PZWL Warszawa, 53, 1956.
3. Korzybski T., Kowszyk Z. — Badania nad sposobami izolowania chlorotetracykliny z płynów fermentacyjnych, *Materiały z Międzynarodowego Sympozjum na Temat Antybiotyków, Najnowsze Problemy z Dziedziny Antybiotyków*, PZWL Warszawa, 241, 1956.
4. Korzybski T. *Biogeneza antybiotyków, Trudy Międzynarodowego Sympoziuma po Antibiotikam, Sowremiennyye Problemy Antibiotikow*, Gosud. Izdat. Med. Lit., Warszawa, 1956.
5. Korzybski T., Kowszyk Z. — Izoczenie metodowy wydelenija chlortetracyklina iz kulturalnych zhidkostiej, *Trudy Międzynarodowego Sympoziuma po Antibiotikam, Sowremiennyye Problemy Antibiotikow Gosud. Izdat. Med. Lit.*, Warszawa, 1946.
6. Korzybski T. — Budowa i właściwości niektórych antybiotyków polipepty-

dowych i grzybobójczych antybiotyków o charakterze związków nienasyconych, *Postępy Biochemii* 2, 435, 1956.

Rok 1957

1. Korzybski T. — Odbudowanie rozłożonego wirusa (tłumaczenie artykułu H. Fraenkel-Conrat: *Rebuilding a virus*), *Postępy Biochemii* 3, 39, 1957.
2. Korzybski T. — Synoptyczny sposób przedstawienia wiadomości strukturalnych biochemii, *Acta Biochim. Pol.* 4, 49, 1957.
3. Korzybski T. — Aktynomycyny, własności i budowa, *Postępy Biochemii* 3, 121, 1957.
4. Korzybski T. — Synteza penicyliny fenoksymetylowej i badania poprzedzające ją, *Postępy Biochemii* 1, 143, 1958.
5. Wierzchowski Z. — Zasadnicze toksyczności pasz łubinowych — hodowla roślin, aklimatyzacja i nasiennictwo, T. 1 z. 3, 1957.
6. Wierzchowski Z. — Zmiany zawartości karotenów w roślinach pastewnych w okresie ich wegetacji — *Roczniki Nauk Roln.* 71, 565, 1957.

Monografie

1. Korzybski T., Kuryłowicz W. — *Antybiotyki. Pochodzenie, rodzaje, właściwości*, PZWL Warszawa, 1955.

SPIS TREŚCI

Str.

J. Supniewski i H. Supniewska — Gibereliny	163
D. Shugar i K. L. Wierzchowski — Fotochemia kwasów nukleino- wych i ich elementów składowych	187
T. W. Szczepkowski — System oksydazy bursztynianowej	199
Z. Opara — Badania nad warunkami wymian genetycznych u <i>E. coli</i>	213

SPRAWOZDANIA I RECENZJE

XIX Konferencja Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) (I. Chmielewska)	223
XVI Międzynarodowy Kongres Chemii Czystej i Stosowanej (I. Chmielewska)	223
Biochemia francuska (J. Opieńska — Blauth i T. Borkowski	226
C. S. Piper — Soil and Plant Analysis (B. Dobrzański)	233

KRONIKA

Dr Daniel Bovet, laureat Nagrody Nobla za rok 1957 (J. Venulet)	235
Materiały do rozwoju biochemii polskiej w okresie od 1951 r. (uzupełnienie)	239

SUPLEMENT

D. Shugar & K. L. Wierzchowski — Photochemistry of Nucleic Acid, Nucleic Acid Derivatives and Related Compounds	243
--	-----

INFORMACJE I WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

1. Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w „Postęпах Biochemii” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach.

2. Prace należy przysyłać do redakcji w 3 egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie z podwójną interlinią, z marginesem około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej, oraz numeracją stron. W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem. Po tytułach nie należy stawiać kropek.

3. Przesłane do redakcji maszynopisy powinny być w postaci gotowej do druku, ilość poprawek nie może przekraczać pięciu na jednej stronie.

Prace nie odpowiadające wymaganiom zostaną przepisane na koszt autora, a odpowiednia kwota zostanie potrącona z honorarium autorskiego.

4. Wszelkie rysunki, wykresy i fotografie należy złożyć razem z maszynopisem na oddzielnych kartkach, w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Rysunki, wykresy i fotografie powinny być ponumerowane, a w tekście maszynopisu należy wskazać na marginesie miejsca i rozmiary poszczególnych klisz. U dołu rysunku, a przy fotografiach na odwrocie należy czytelnie podać odpowiedni napis oraz tytuł pracy i nazwisko autora. Ostateczne wykonanie rysunków jest obowiązkiem redakcji. Nadmierna ilość rysunków może być wykonana wyłącznie na koszt autora.

5. Wzory lub części wzorów i oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, powinny być napisane ręcznie atramentem, bardzo wyraźnie.

6. Tablice powinny mieć nagłówek opisujący ich treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu pracy.

7. Cytowaną literaturę należy wypisać na oddzielnej karcie, wymieniając pozycję w alfabetycznej kolejności autorów. W wykazie podać kolejno liczbę porządkową, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopisma, tom (rocznik), stronę i rok wydania. Np. 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793, 1953. Jeżeli cytowany artykuł ma kilku autorów, należy w wykazie literatury podać nazwiska i początkowe litery wszystkich autorów. Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać także tytuł książki, nazwisko nakładcy, miejsc oraz rok wydania dzieła. Np. Przylecki S. J., Podręcznik Chemii Fizjologicznej, Lemański, Łódź, 1947. Wykaz używanych czasopism podają Rocznik Chemii 26, 497, 1952. Powoływanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie. Np. (10).

8. Autora obowiązuje korekta autorska, którą należy zwracać redakcji w ciągu 3 dni. Korektę należy wykonać kolorowym ołówkiem (nie czerwonym). Koszty spowodowane zmianą tekstu w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor. Autorzy wydrukowanych artykułów otrzymują honorarium i 25 bezpłatnych odbitek pracy. Żądanie większej ilości odbitek należy zgłosić piśmiennie przy zwrocie korekty autorskiej. Koszt tych odbitek ponosi autor.

9. Redakcja nie przeprowadza jakichkolwiek zmian w pracy bez zgody autora. Dla dokonania zmian uważanych przez redakcję za celowe dwa egzemplarze pracy odsyła się autorowi, trzeci pozostaje w aktach redakcji.

Cena w prenumeracie: półroczna zł 40.—; rocznie zł 80.—

Zamówienia i wpłaty przyjmują: 1) Centrala Kolportażu Prasy i Książki „Ruch”, Warszawa, ul. Srebrna 12, konto PKO nr 1-6-100.020; 2) urzędy pocztowe.

Prenumerata za zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100.024.

Bieżące numery do nabycia w Księgarniach Naukowych Domu Książki i we Wzorcowni PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Informacji w sprawie egzemplarzy z poprzednich lat udziela Centrala Kolportażu „Ruch”, Sprzedaż Prasy Zdezaktualizowanej, Warszawa, ul. Srebrna 12, oraz Wzorcownia PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.