

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

Albani

1966
tom 12
nr 3

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej sens powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu a każda rubryka powinna być zaopatrzona w odpowiedni tytuł.

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1966
tom XII
zeszyt 3

KWARTALNIK

P A Ń S T W O W E W Y D A W N I C T W O N A U K O W E

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), J. Trojanowski
(Lublin).

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa 12, ul. Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 508

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1966

Nakład 1390 (1249 + 141)	Oddano do składania 20.IV.66 r.
Ark. wyd. 10,5. Ark. druk. 9,25	Podpisano do druku w sierpniu 66
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w sierpniu 66
Cena zł 20.—	Zam. nr 641/66. M-78

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA.

RENATA DĄBROWSKA * i BOGDAN SZUKALSKI **

Metabolizm hormonów sterydowych

The Metabolism of Steroid Hormones

The biosynthesis and catabolism of steroid hormones are reviewed.

Fizjologiczna rola hormonów sterydowych oraz ich ciągle wzrastające zastosowanie w klinice sprawiają, że od szeregu lat prowadzone są badania nad ich biosyntezą i katabolizmem. Zasadnicze metody stosowane w tym celu to perfuzja gruczołu lub innego narządu metabolitami i analiza powstałych produktów, inkubowanie metabolitów ze skrawkami lub homogenatami tkanki gruczołowej (nadnerczy, jąder, jajników, łożyska) oraz analiza krwi odpływającej z gruczołu, krwi obwodowej i moczu. Zastosowanie związków znakowanych przyspieszyło znacznie postęp w tej dziedzinie i przyniosło wiele nowych informacji pozwalających stworzyć dość pełny obraz metabolizmu hormonów sterydowych.

Podział hormonów sterydowych opiera się na ich czynności fizjologicznej uwarunkowanej budową chemiczną. Wszystkie hormony sterydowe można wyprowadzić z trzech syntetycznych węglowodorów: pregnanu zbudowanego z 21 atomów węgla, androstanu — z 19 atomów i estranu — z 18 atomów.

W żywym ustroju związkiem pośrednim w procesie powstawania wszystkich hormonów sterydowych jest cholesterol. Jego pełna biosynteza była tematem obszernych opracowań Supniewskiego (158), a ostatnio Claytona (29). My zajmiemy się przemianami cholesterolu prowadzącymi do hormonów sterydowych: gestagenów, kortykosterydów, androgenów i estrogenów oraz katabolizmem tych hormonów.

* Mgr inż., st. asystent Zakładu Chemii Ogólnej A. M. w Warszawie.

** Dr med., mgr chemii, adiunkt Zakładu Chemii Ogólnej A. M. i II Oddz. Wewn. Szpitala Bielańskiego w Warszawie.

Wykaz używanych skrótów: DHA — dehydroepiandrosteron, androstendion — 4-androsten-3,17-dion, ACTH — hormon adrenokortykotropowy.

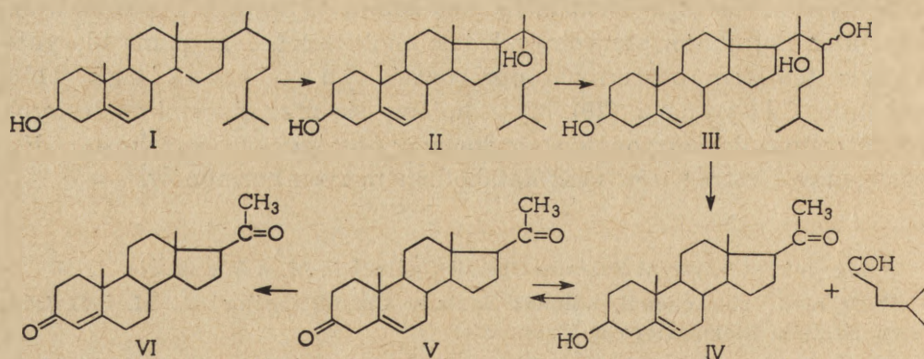
I. Drogi biosyntezy hormonów sterydowych

1. Gestageny

Pierwszy etap biosyntezy hormonów ciążyowych, przebiegającej w ciałku żółtym, nadnerczach, jądrach, jajnikach i łożysku, polega na degradacji łańcucha bocznego cholesterolu. Solomon i wsp. (156) stwierdzili, że homogenaty nadnerczy krwi wytwarzają z cholesterolu (I) 20- β -hydroksycholesterol (II). Następnym etapem przemian cholesterolu po 20- β -hydroksylacji jest hydroksylacja w pozycji 22 z utworzeniem 20 β , 22 ϵ -dwohydroksycholesterolu (III) (145), który pod działaniem 20,22-desmolazy przechodzi w pregnenolon (IV), z odłączeniem łańcucha bocznego w postaci aldehydu izokapronowego (143, 144, 163). Z innych utlenionych pochodnych cholesterolu 22-hydroksycholesterol jest lepszym substratem dla enzymów rozszczepiających niż sam cholesterol, a 22-ketocholesterol nie ulega w tych warunkach rozszczepieniu. 20 β -hydroksy-20-ketocholesterol nie jest wrażliwy na działanie desmolazy (30), nie może być zatem uważany za pośredni produkt przemiany cholesterolu w gestageny.

W pregnenolonie pod wpływem znalezionej w mikrosomach nadnerczy dehydrogenazy zachodzi odwracalna przemiana grupy hydroksylowej w ketonową w pozycji 3 z wytworzeniem Δ^5 -pregnen-3,20-dionu (V), a następnie pod działaniem obecnej w cytoplazmie Δ^5 -3-ketoizomerazy — przesunięcie podwójnego wiązania w położenie sprzężone w stosunku do nowo utworzonej grupy ketonowej. Produktem tych przemian jest hormon ciążyowy — progesteron (VI) (Schemat 1). Cykliczne ciało żółte produkuje w ciągu doby około 20 mg progesteronu, natomiast w korze nadnerczy powstaje go w ciągu doby około 250 mg (14, 78). Z progesteronu pod działaniem dehydrogenaz mogą powstawać: 20 α -hydroksy- Δ^4 -pregnenon-3 i jego izomer 20 β - a z pregnenolonu — 20 α -hydroksy- Δ^5 -pregnenol-3.

Izomerazę Δ^5 -3-ketosterydów, uczestniczącą w powstawaniu progesteronu, otrzymał w postaci krystalicznej Talalay i wsp. (161, 176) z *Pseudomonas testosteroni*. Wykazuje ona optymalną aktywność między



Schemat 1. Biosynteza gestagenów

pH 6 i 8 jest kompetycyjnie hamowana przez niewielkie stężenie 17β -estra-
diolu, 19 -nortestosteronu i 17 -dwuhydroekwileny (67). Spośród tkanek
zwierzęcych enzym ten występuje najobficiej w nadnerczach (43, 44). Na
odwracalność reakcji izomeryzacji wskazują badania Warda i Engela (177), którzy donieśli, że ekstrakty proszku acetonowego z nadnerczy
owcy powodują przemianę androstendionu w 3β -hydroksy- Δ^5 -andros-
ten- 17 -on.

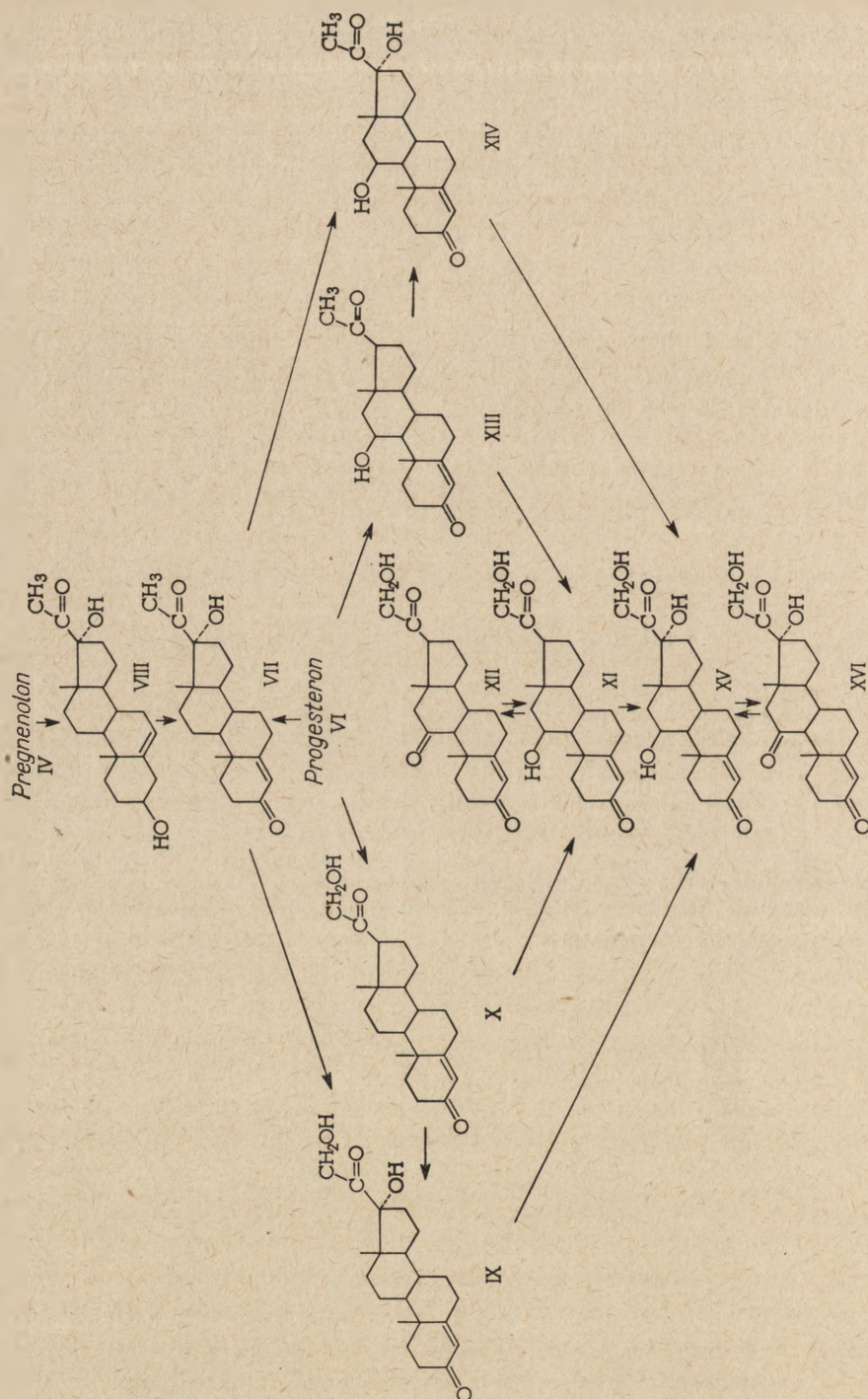
2. Kortykosterydy

Spośród ponad 70 sterydów wyosobnionych z kory nadnerczy (182),
tylko 7 wykazuje w mniejszym lub większym stopniu zdolność usuwania
zaburzeń powstających po usunięciu kory. Są to: kortyzol (XV), korty-
zon (XVI), kortykosteron (XI), 11 -dehydrokortykosteron (XII), kortek-
son (X), korteksolon (IX) i aldosteron (XXII). Ich nazwy systema-
tyczne i używane synonimy zestawiono w tabelicy 1.

Tablica 1
Nazwy systematyczne i używane synonimy podstawowych kortykosterydów

Nazwa potoczna	Używane synonimy	Nazwa systematyczna
Kortyzol	Hydrokortyzol; 17 -hydroksykortykosteron; substancja „F” Kendalla; substancja „M” Reichsteina	Δ^4 -pregnen- 11β , 17α , 21 -triol- $3,20$ -dion
Kortyzon	17 -hydroksy- 11 -dehydrokortykosteron; substancja „E” Kendalla; substancja „F” Reichsteina;	— Δ^4 -pregnen- $17\alpha,21$ -diol- $3,11,21$ -trion
Kortykosteron	Substancja „B” Kendalla, substancja „H” Reichsteina;	Δ^4 -pregnen- $11\beta,21$ -diol- $3,20$ -dion
11 -dehydrokortykosteron	Substancja „A” Kendalla	Δ^4 -pregnen- 21 -ol- $3,11,20$ -trion
Kortekson	11 -deoksokortykosteron; DOC; 21 -hydroksyprogesteron; substancja „Q” Reichsteina	Δ^4 -pregnen- 21 -ol- $3,20$ -dion
Korteksolon	17α -hydroksykortekson; 17 -hydroksy- 11 -deoksokortykosteron; 11 -deoksokortyzol; substancja „S” Reichsteina	Δ^4 -pregnen- $17\alpha,21$ -diol- $3,20$ -dion
Aldosteron		Δ^4 -pregnen- $11\beta,21$ -diol- $3,20$ -dion- 18α l;

Z nadnerczy oprócz właściwych hormonów kory o cząsteczkach zbudowanych z 21 atomów węgla, wydzielono też połączenia o 18 atomach węgla w cząsteczce, należące do żeńskich hormonów płciowych oraz związki o własnościach androgennych zawierające 19 atomów węgla (180, 181).



Schemat 2. Biosynteza glikokortykosterydów

Główna droga biosyntezy glukokortykosterydów polega na hydroksylacjach progesteronu (VI) w porządku 17 α , 21, 11 β . Podstawnik obecny w cząsteczce utrudnia wprowadzenie grupy -OH w pozycję poprzedzającą go w podanym szeregu. Synteza kortyzolu (XV) wymagająca trzech hydroksylacji, biegnie więc głównie przez progesteron, 17 α -hydroksyprogesteron (VII) i korteksolon (IX). Natomiast kortykosteron (XI) powstaje w wyniku 11 β -hydroksylacji korteksolonu (X). Dzięki badaniom S h a r m y i wsp. (151, 152, 153), którzy otrzymali stosunkowo trwałe preparaty 11 β -hydroksylazy wiadomo, że reakcja ta jest kompetycyjnie hamowana przez testosteron, androstendion i DHA. Oba podstawowe glukokortykosterydy — kortyzol i kortykosteron mogą łatwo ulegać utlenianiu przy C-11 β , tworząc kortyzon (XVI) i 11-dehydrokortykosteron (XII). Możliwa jest także bezpośrednia hydroksylacja progesteronu w pozycji C-11 β , na co wskazuje wyizolowanie z nadnerczy wieprza 11 β -hydroksyprogesteronu (XIII) (100) i przeprowadzenie go w kortykosteron i kortyzol, a także wykrycie w nich 21-dezoksykortyzolu (XIV) (101). Jednakże procentowy udział bezpośredniej 11 β -hydroksylacji w przemianie progesteronu świadczy, że są to zapasowe drogi syntezy glukokortykosterydów (41).

Istnieje także droga biosyntezy kortykosterydów biegnąca z pominięciem progesteronu a mianowicie: z pregnonolonu (IV) poprzez 17 α -hydroksypregnenolon (VIII), 17 α -hydroksyprogesteron (VII), korteksolon (IX) do kortyzolu (2, 179). Przemawia za tym doświadczenie E n g e l a (178), który inkubował (4-¹⁴C) progesteron i (7 α -³H) 17 α -hydroksypregnenolon z homogenatami tkanki nowotworowej nadnerczy i stwierdził, że obydwie substancje ulegały przemianie w kortyzol przy czym progesteron z 17% wydajnością a 17 α -hydroksypregnenolon z 63% wydajnością. Istnienie drogi biosyntezy kortyzolu z pregnonolonu z pominięciem progesteronu i kortykosteronu tłumaczy zaobserwowane uprzednio przez E i c h h o r n a i wsp. (42) nierównomierne wbudowywanie izotopu ¹⁴C w kortykosteron i kortyzol po podaniu znaczonego cholesterolu i progesteronu.

Badania lat ostatnich wykazują istnienie jeszcze innych możliwości przemian pregnonolonu. W moczu pacjentów leczonych ACTH D o b r i n e r i L i e b e r m a n (37) wykryli 21-hydroksypregnenolon a P a s q u a l i n i i J a y l e (109) — 3,21-dwusiarczan tego związku. Po podaniu 21-jednooctanu 17 α ,21-dwuhydroksypregnenolonu część podanego połączenia wykryto w moczu w postaci 3-jednosiarczanu, a część w postaci zmetabolizowanej jako allo-czterohydrokorteksolon (116, 117). B e r l i n e r i wsp. (9) udowodnili przemianę 21-hydroksypregnenolonu w korteksolon w homogenatach nadnerczy wołu. Ostatnio P a s q u a l i n i i wsp. (110) badali przemiany znakowanych trytem 21-hydroksypregnenolonu i 17 α ,21-dwuhydroksypregnenolonu w skrawkach hiperplastycznych nadnerczy ludzkich. Stwierdzono, że 44% podanego 21-hydroksypregnenolonu uległo przemianie w korteksolon, a 12% — w kortykosteron, natomiast 17 α ,21-dwuhydroksypregnenolon w 9,6% ulegał przemianie w korteksolon

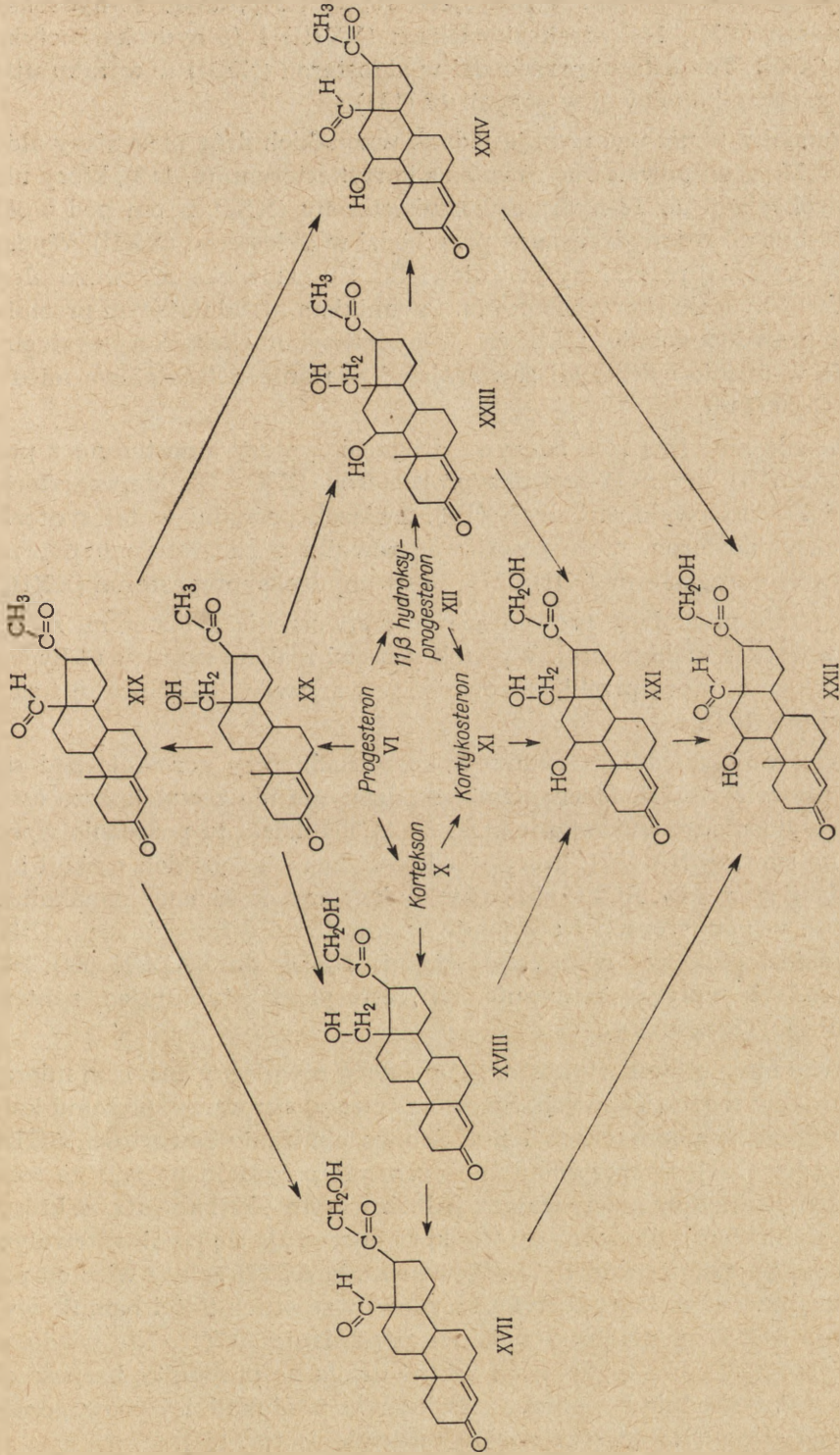
a w 7,5% w kortyzol. Widać z tego, że pregnenolon przed przemianą ugrupowania Δ^5 -3-hydroksy w Δ^4 -3-keto może ulec hydroksylacji nie tylko w pozycjach 17 α i 11 β , ale również przy węglu 21 i że 17 α ,21-dwuhydroksypregnenolon jest metabolitem pośrednim w biosyntezie kortyzolu.

Lokalizacja układów enzymatycznych uczestniczących w biosyntezie hormonów kory nadnerczy była dokładnie opisana w artykule Krawczyńskiego (73). Warstwy najgłębsze kory, siatkowata i częściowo pasmowata, zawierają w mikrosomach 17 α -hydroksylazę i wytwarzają kortyzol, natomiast jedynie najbardziej oddalona od rdzenia warstwa kłębkowata zawiera 18-oksygenazę i może produkować aldosteron. Inne enzymy hydroksylujące, zwłaszcza 11 β -hydroksylaza z mitochondriów i 21-hydroksylaza z mikrosomów, występują w całej korze a więc kortykosteron jest produkowany we wszystkich warstwach, w największych jednak ilościach w warstwie pasmowatej.

Nadnercza mogą produkować również związki sterydowe hydroksylowane w pozycjach nietypowych np. 2,6 α , 6 β , 7 i 16 α , z których na szczególną uwagę zasługuje 16 α -hydroksypregnenolon. Po raz pierwszy wykrył go Bongiovanni (16) w moczu dzieci wykazujących niedobór dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidów. Związek ten znaleziono także w moczu dzieci zdrowych i dzieci z deficytem 21-hydroksylazy. *In vitro* powstaje on z pregnenolonu inkubowanego z korą nadnerczy płodu, noworodka lub korą hiperplastyczną (173, 174). W roku 1964 wykryto 16 α -hydroksypregnenolon we krwi pępowinowej (40). Obecność tego związku w moczu w początkowym okresie życia jest prawdopodobnie wynikiem typowej dla niedojrzalej kory nadnerczy słabej aktywności 3 β -hydroksydehydrogenazy i wysokiej aktywności 16 α -hydroksylazy (172). Znaczenie fizjologiczne 16 α -hydroksypregnenolonu nie jest dotąd znane, wiadomo tylko, że nie wywiera on żadnego wpływu na gospodarkę wodną i mineralną (164).

W celu poznania prekursorów aldosteronu inkubowano nadnercza z różnymi związkami sterydowymi uczestniczącymi w biosyntezie innych hormonów kory. Spośród nich kortekson znacznie wzmagał wytwarzanie aldosteronu. Zastosowanie korteksonu znakowanego ^{14}C w pozycji 21 doprowadziło do wytworzenia promieniotwórczego aldosteronu, który zawierał 48% radioaktywności substratu. Wyizolowanie przez Kahnta i wsp. (63) krystalicznego 18-hydroksykorteksonu z nadnerczy dowodzi, że kortekson ulega w nich utlenieniu w pozycji 18, a wykrycie w ekstraktach nadnerczy odpowiedniego hydroksylaktonu (C-18 \rightarrow C-20) (157) wskazuje, że nadnercza zdolne są do utleniania I-rzędowego alkoholu do grupy karboksylowej. Tak więc główna droga biosyntezy aldosteronu biegnie z korteksonu (X) przez 18-hydroksykortekson (XVIII) i 18-aldokortekson (XVII) (Schemat 3).

Dorfman i wsp. (132) w oparciu o wyniki doświadczeń przeprowadzonych na izolowanych nadnerczach wołu wysunęli koncepcję innej drogi biosyntezy aldosteronu. Prowadzi ona z progesteronu (VI), który ulega



Schemat 3. Biosynteza aldosteronu

kolejnym hydroksylacjom w pozycjach 18, 21 i 11 β , dając 18-hydroksyprogesteron (XX), 18-hydroksykortekson (XVIII) i 18-hydroksykortykosteron (XXI). Ten ostatni przechodzi w aldosteron (XXII) w wyniku utlenienia grupy alkoholowej w pozycji 18 (141).

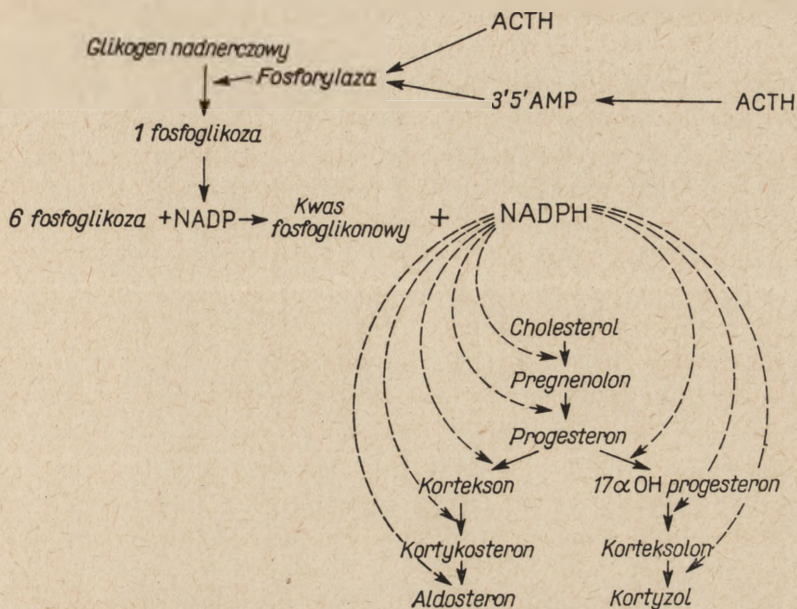
Przemiany te nie wyczerpują jednak wszystkich dróg biosyntezy aldosteronu. Może on powstawać również z kortykosteronu (6, 119), który ulega hydroksylacji do 18-hydroksykortykosteronu (XXI), a ten pod wpływem 18-hydroksydehydrogenazy przechodzi w aldosteron (XXII). Wydajność tej ostatniej przemiany jest niewielka i u człowieka zdrowego ulega jej 10% 18-hydroksykortykosteronu. Czynnikiem utrudniającą przemianę jest prawdopodobnie fakt, że 18-hydroksykortykosteron występuje głównie w formie cyklicznej zawierającej wiązanie półacetalowe między C-18 i C-20 (146).

Znacznie mniejszą rolę odgrywa droga biosyntezy aldosteronu z progesteronu (VI) przez 18-hydroksyprogesteron (XX), 18-aldoprogesteron (XIX) i 21-dezoksyaldosteron (XXIV). Związek pośredni w tej syntezie, 21-dezoksyaldosteron, może powstawać również z progesteronu poprzez 11 β -hydroksyprogesteron (XII) i 11 β , 18-dwuhydroksyprogesteron (XXIII).

Wszystkie przemiany prowadzące do wytworzenia aldosteronu zachodzą w warstwie kłębkowatej. Wyjątek stanowi reakcja syntezy 18-hydroksykorteksonu, która przebiega również w warstwach pasmowatej i siatkowatej (85, 154).

Powstawanie kortykosterydów w korze nadnerczy pozostaje pod silnym wpływem ACTH. Mechanizm tego działania nie został jeszcze ostatecznie wyjaśniony, wiadomo jednak, że ACTH działa tu pośrednio wpływając na syntezę NADPH, który jest koenzymem wszystkich reakcji hydroksylacji sterydów. ACTH aktywuje fosforylasy, co wzmaga metabolizm glikogenu w nadnerczach i powoduje wzrost ilości 6-fosfoglukozy. Utlenianiu 6-fosfoglukozy towarzyszy redukcja NADP do NADPH (84). Ponadto ACTH wpływa pośrednio na fosforylasy stymulując syntezę 3'5'AMP (55) (Schemat 4).

Wytwarzanie glukokortykosterydów zależy również w znacznej mierze od czynników środowiskowych. Stressom towarzyszy wzrost poziomu kortykosterydów w nadnerczach i przejściowe obniżenie zawartości ACTH w przysadce (131). Eksperymentalne usunięcie przysadki pociąga za sobą zanik kory nadnerczy oszczędzający jednak warstwę kłębkowatą, w której powstaje aldosteron. Podobną atrofię kory obserwuje się po długotrwałym podawaniu kortykosterydów (13). Wytwarzanie ACTH zależy więc od poziomu krążących we krwi kortykosterydów: wzrost ich ilości hamuje wytwarzanie ACTH, a spadek — zwiększa uwalnianie ACTH. Nie wiadomo jednak czy to ujemne sprzężenie zwrotne działa na przysadkę bezpośrednio, czy też pośrednio — poprzez zwiększenie produkcji jej podwzgórzowego regulatora CRF (*corticotrophin releasing factor*) (54).



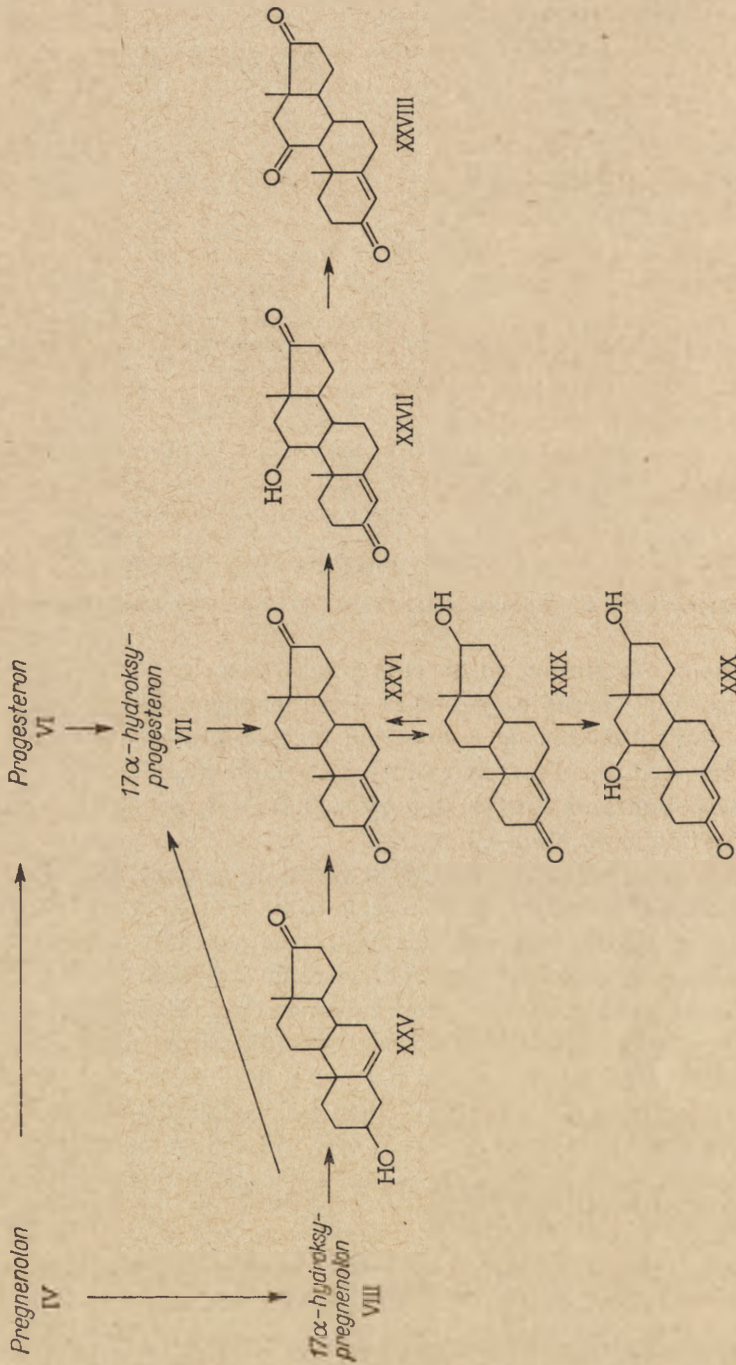
Schemat 4. Postulowany mechanizm działania ACTH na biosyntezę kortykosterydów

Jeśli idzie o aldosteron, to obecnie przyjmuje się, że ACTH pobudza również jego wytwarzanie, jednakże ilość endogennej lub egzogennej kortykotropiny niezbędna do wywołania tego efektu jest znacznie większa od ilości powodującej maksymalne wydzielanie glukokortykosterydów.

Zdolność pobudzania kortykogenezy wykazuje również kwas glutaminowy i glutation oraz aminy biogenne — adrenalina, serotonina i histamina. Ostatnio M a k o f f i wsp. (86) stwierdzili, że dodanie małych ilości surowicy lub osocza szczura do homogenatu nadnerczy szczurów (0,05 ml na 30 mg kory nadnerczy) wzmaga wyraźnie powstawanie korteksonu i kortykosteronu z progesteronu. Jednocześnie 11β -hydroksylacja progesteronu ulegała prawie całkowitemu zahamowaniu. Badania elektroforetyczne wyjaśniły, że zawarty w osoczu czynnik pobudzający kortykogenezę w nadnerczach związany jest z frakcją β -globulin. Aktywność zniknęła po ogrzaniu osocza do 56°C w ciągu pół godziny. Ponieważ wymienione wyżej związki nie wykazywały w tym układzie pobudzającego wpływu na korę nadnerczy wydaje się więc, że chodzi tu o jakiś nowy, dotąd nieznan, stymulator kortykogenezy.

3. Androgeny

Organizm ludzki wytwarza sześć substancji o działaniu androgennym: testosteron (XXIX), dehydroepiandrosteron (XXV), androstendion (XXVI), 11β -hydroksyandrostendion (XXVII), adrenosteron (XXVIII) i 11β -hydroksytestosteron (XXX).



Schemat 5. Biosynteza androgenów

Jak widać ze schematu 5, który przedstawia przemiany prowadzące do wytworzenia tych substancji z pregnenolonu, prekursor testosteronu, androstendion (XXVI) może powstawać dwoma drogami: poprzez progesteron (VI) i 17α -hydroksypregnenolon (64, 102) oraz przez dehydroepiandrosteron (XXV) (51). Pierwsza z nich dominuje w gonadach, druga w nadnerczach. Natomiast przemiana androstendionu w testosteron zachodzi tylko w gonadach, gdyż w krwi żyłnej odpływającej z nadnerczy nie wykryto testosteronu (139, 183). Po hydroksylacji pregnenolonu i progesteronu w pozycji 17α , następuje degradacja łańcucha bocznego katalizowana przez $17,20$ -desmolazy. Następnie poprzez związki pośrednie tworzą się substancje androgenne — DHA (XXV) i androstendion (XXVI) oraz kwas octowy z łańcucha bocznego sterydu. W reakcji tej bierze udział tlen oraz NADPH jako koenzym. Przemiana pregnenolonu w progesteron, łącząca obie drogi biosyntezy androgenów, zachodzi pod wpływem 3β -hydroksydehydrogenazy a następnie izomerazy. Możliwa jest również przemiana 17α -hydroksypregnenolonu (VIII) w 17α -hydroksyprogesteron (VII) (schemat 5).

Ostatnio postulowana jest trzecia droga syntezy testosteronu z progesteronu, bez jego hydroksylacji w pozycji 17α . Za taką możliwością przemawia fakt, że po inkubacji $[7-^3\text{H}]$ progesteronu i $[4-^{14}\text{C}]17\alpha$ -hydroksyprogesteronu z homogenatami torbieli jajnika stosunek $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ w testosteronie jest wyższy niż w jednocześnie powstającym androstendionie (65). Dorfman uważa, że ta droga powstawania testosteronu ma szczególne znaczenie po osiągnięciu dojrzałości płciowej.

Doniesienia o możliwości bezpośredniej syntezy DHA z cholesterolu (23, 38) w reakcji analogicznej do tworzenia pregnenolonu wymagają jeszcze potwierdzenia. Wykazano jednak bezpośrednią przemianę siarczanu cholesterolu w siarczan DHA, kiedy perfundowano nadnercza podwójnie znakowanym siarczanem cholesterolu ($4-^{14}\text{C}$ i ^3S) (170).

4. Estrogeny

Grupę hormonów estrogennych stanowią trzy dawno już opisane połączenia sterydowe estron (XL) i estriol (XXXVIII) oraz wykazujący największą aktywność biologiczną 17β -estradiol (XLI). Jego grupa hydroksylowa w pozycji 17 ulega łatwo utlenieniu do grupy ketonowej pod wpływem 17β -dehydrogenazy. Powstający przy tym estron jest 10—12 razy mniej aktywny od estradiolu. Przechodzenie estradiolu w estron jest procesem odwracalnym regulującym ilość krążącego w organizmie 17β -estradiolu (46).

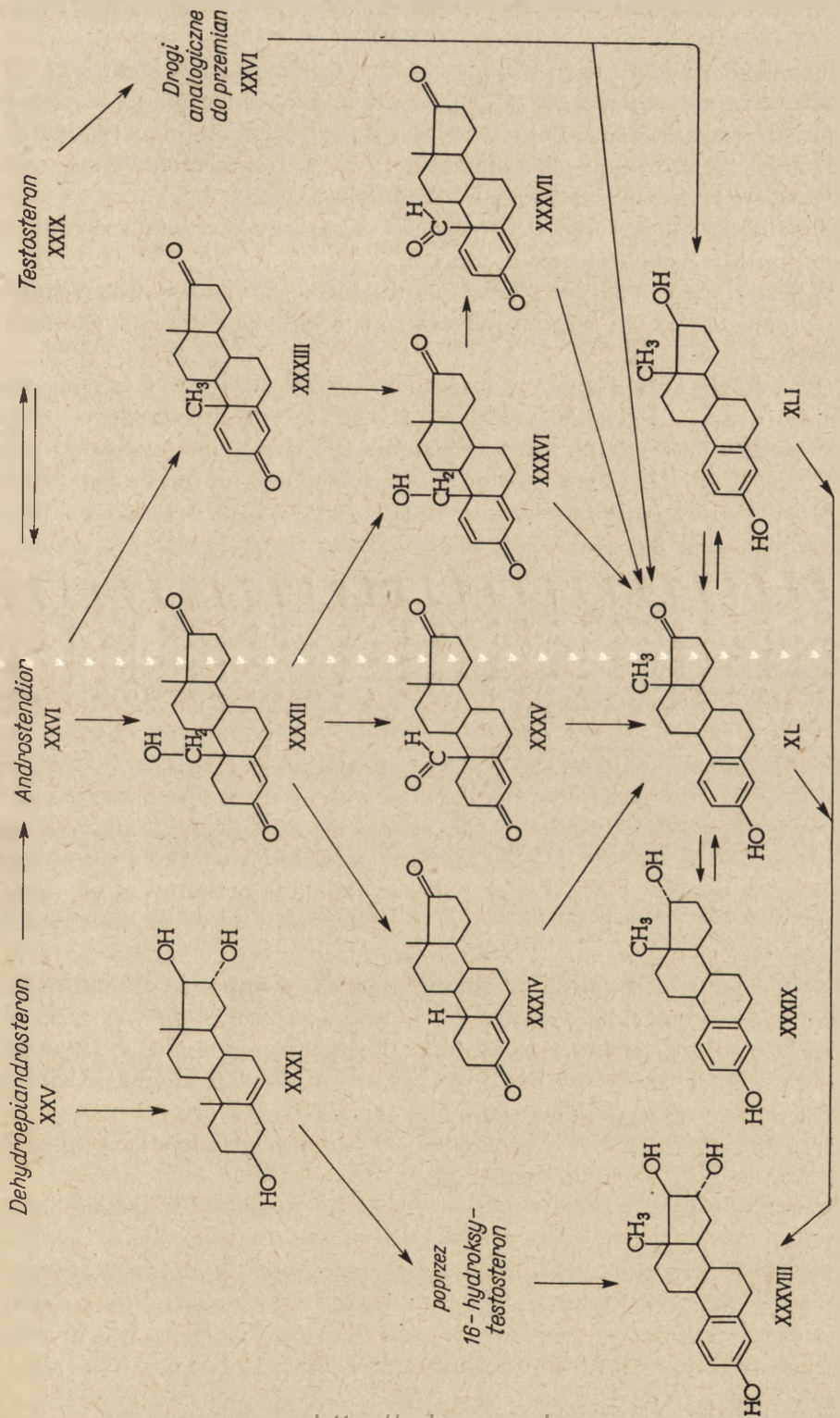
Głównym miejscem syntezy 17β -estradiolu i estronu u kobiet nieciężarnych są jajniki. Wykrywany w moczu estriol jest w znacznej części produktem metabolizmu 17β -estradiolu i estronu. U kobiet ciężarnych jest

on produkowany przez łożysko, które syntetyzuje również inne estrogeny (83).

Estron został po raz pierwszy otrzymany z materiału biologicznego (mocz kobiety ciężarnej) już w roku 1929, a jego pełną syntezę przeprowadzono w roku 1948. Mimo to biosynteza estrogenów dopiero w ciągu ostatnich lat doczekała się przekonywającego opracowania, chociaż nie wszystkie jej szczegóły zostały dotąd w pełni wyjaśnione. Pierwszą hipotezę na ten temat wysunął w roku 1956 D o r f m a n. Zakładała ona udział w biosyntezie, jako pośrednich metabolitów, ekwiliny i ekwileniny — sterydów o nienasyconym pierścieniu B, które przechodziłyby w estron w wyniku wysycenia wiązań podwójnych występujących w tym pierścieniu.

Jednakże wyniki innych autorów (84) przeczyły tej hipotezie i wskazywały na udział związków androgennych w biosyntezie estrogenów. I tak S a v a r d i wsp. (142) po wprowadzeniu 17β -dwohydroekwileniny znakowanej ^{14}C do krwi żebnej klaczy, wyizolowali z jej moczu promieniotwórczą ekwileninę, podczas gdy produkty redukcji pierścienia B — ekwilina i estron nie były promieniotwórcze. H e a r d i wsp. (56) podawali klaczy znakowany testosteron i w moczu wykryli promieniotwórczy estron, a B e s h i wsp. (11) zanotowali wyraźny wzrost wydalania estrogenów w moczu człowieka po podaniu związków androgennych. Dalsze potwierdzenie sugestii o roli androgenów jako pośredników metabolicznych w biosyntezie hormonów estrogenowych stanowiło stwierdzenie obecności DHA, androstendionu i testosteronu w skrawkach prawidłowego jajnika (65, 150, 187).

Przejście androgenów w estrogeny polega na usunięciu grupy metylowej przy C-10 oraz aromatyzacji pierścienia A z jednoczesną redukcją grupy karbonylowej przy C-3. Odkrycie przez M e y e r a (90) w homogenatach nadnerczy wołu 19-hydroksylazy zdolnej przeprowadzać androstendion i DHA w ich pochodne 19-hydroksylowe pozwoliło snuć pewne sugestie na temat mechanizmu eliminacji grupy metylowej. Ten sam autor wykazał (91), że 19-hydroksyandrostendion inkubowany z homogenatami nadnerczy, łożyska lub skrawkami jajnika ulega łatwiej przemianie w estron niż jego homolog niehydroksylowany w pozycji 19, chociaż wydajność tej reakcji była bardzo mała (2—6%). Doświadczenia M e y e r a podjął R y a n (133, 134) używając do badań tkankę łożyskową. Okazało się, że enzymy potrzebne do przemiany 19-hydroksyandrostendionu znajdują się we frakcji mikrosomalnej komórek łożyska i że działają one w obecności NADPH i tlenu atmosferycznego. Dzięki poznaniu tych faktów Ryan mógł zwiększyć procent przemiany 19-hydroksyandrostendionu w estron do 60—80%. Tak więc 19-hydroksylacja stanowi wstęp do eliminacji grupy metylowej a 19-hydroksyandrostendion jest ważnym metabolitem pośrednim na drodze do aromatyzacji pierścienia A. Może on ulegać następującym przemianom (Schemat 6):



Schemat 6. Biosynteza estrogenów

a) odwodorowaniu kąowego karbinolu do grupy aldehydowej z wytworzeniem 19-aldoandrostendionu (XXXV),

b) odwodorowaniu wiązania między C₁ i C₂, które prowadzi do 19-hydroksyandrostadiendionu (XXXVI), a dalej w wyniku utleniania pierwszorzędowej grupy alkoholowej — do 19-aldoandrostadiendionu (XXXVII),

c) odłączeniu całej grupy kąowej C-19 w postaci formaldehydu z wytworzeniem 19-norandrostendionu (XXXIV) (97, 157).

Te trzy metabolity ulegają przemianie w estron w wyniku odwodorowania lub odłączenia formaldehydu (20).

Możliwa jest również przemiana androstendionu w 19-hydroksyandrostadiendion (XXXVI) za pośrednictwem androstadiendionu (XXXIII) (schemat 6).

Okazało się, że połączenia 19-nor w czasie inkubacji łożyska znacznie trudniej ulegają przemianie w estrogeny niż sterydy posiadające grupę kąową C-19 (134). Z tablicy 2 przedstawiającej stopień przemiany różnych związków androgennych w estrogeny wynika, że pochodne 19-nor ulegają tej przemianie zaledwie w 5—10%, natomiast 19-hydroksyandrostendion — aż w 80%.

Tablica 2

Przemiana związków androgennych w estrogeny

Nazwa androgeny	% przemiany w estron
$\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,17-dion	35
Δ^4 -androstendion	60
Dehydroepiandrosteron	40
5 α - Δ^1 -androstendion	10
19-hydroksy- Δ^4 -androstendion	80
19 nor- Δ^4 -androstendion	5
19 nor-5 α Δ^1 -androstendion	10

Jednocześnie z badań D o r f m a n a i wsp. wynika, że 19-aldoandrostendion jest przekształcany w estron przez mikrosomy łożyska znacznie szybciej niż 19-hydroksyandrostendion. Ponieważ przemiana 19-norandrostendionu w estron przebiega bardzo powoli, wydaje się, że zasadnicze znaczenie dla syntezy estronu ma następujący szereg przemian:

Androstendion (XXVI) → 19-hydroksyandrostendion (XXXII) → 19-aldoandrostendion (XXXV) → estron (XL).

Boczna droga biosyntezy biegnie z DHA (poprzez Δ^5 -androgen-3 β , 16 α , 17 β -triol (XXXI)) i prawdopodobnie przez 16 α -hydroksytestosteron. Te dwie substancje były bowiem ze znaczną wydajnością przekształcane przez mikrosomy łożyska i NADPH w estriol (XXXVIII) oraz w 16 α -hydroksyestron (135). O tym, że 16-hydroksysterydy odgrywają dużą rolę w metabolizmie sterydów łożyska świadczą wyniki W e t t s t e i n a i wsp. (182),

k którzy donieśli, że 16 α -hydroksyttestosteron jest obok estriolu dominującym sterydem produkowanym przez łożysko.

Odwracalne przemiany estronu w 17 β (XLI) a u niektórych gatunków zwierząt także w 17 α -estradiol (XXXIX), katalizowane przez swoiste 17-dehydrogenazy, przebiegają nie tylko *in vivo* w tkankach wydzielających hormony, ale również *in vitro* w obecności tkanki wątrobowej, nerkowej i krwi (171).

II. Przemiany hormonów sterydowych w ustroju

Wytworzone przez gruczoły dializujące i hydrofobowe cząsteczki hormonów dostają się do krwiobiegu, gdzie stają się rozpuszczalne w wodzie i tracą zdolność dializy. Zmiany te dadzą się wyjaśnić tworzeniem połączeń sterydów z białkami: transkortyną, albuminami i β -globulinami. Ostatnio poznany został skład komponenty węglowodanowej transkortyny (35). Ta α_1 -globulina zawiera w przeliczeniu na suchą masę: 5,4% heksoz, 4,7% heksozoaminy, 3,2% kwasu sialowego i 0,8% fukozy. Dla powstawiania połączeń steryd-białko istotna jest obecność w cząsteczce sterydu grupy ketonowej w pozycji 3, podwójnego wiązania między węglami 4 i 5 oraz grupy hydroksylowej w pozycji 11 (16).

Czas przeżywania sterydów we krwi jest krótki. W wątrobie ulegają one różnym przeobrażeniom strukturalnym, na ogół nieodwracalnym, a powstające katabolity wykazują niską aktywność biologiczną lub są jej całkowicie pozbawione. Ostatecznie katabolity te ulegają sprzęgnięciu z kwasem glikuronowym lub siarkowym i u człowieka są wydalane głównie w moczu.

Pośród przemian jakim hormony sterydowe ulegają w organizmie, najbardziej istotne są procesy redukcyjne. Dotyczą one przede wszystkim pierścienia A, w którym wodór przyłącza się do trzeciego, czwartego i piątego atomu węgla. Wskutek wysycenia wiązania etylenowego tworzą się dwie różne dwuhydro pochodne, zależnie od orientacji przestrzennej, jaką przyjmie atom wodoru przy C-5. Wiąże się to ze swoistością hydrogenaz katalizujących tę reakcję: Δ^4 - 5α -hydrogenazy wyodrębnionej z frakcji mikrosomowej wątroby i Δ^4 - 5β -hydrogenazy otrzymanej z supernatan-
tu (49).

Po wysyceniu podwójnego wiązania następuje redukcja grupy ketonowej przy C-3, który staje się asymetryczny. Orientacja przestrzenna wytworzonej grupy hydroksylowej może być 3 α (*trans*) lub 3 β (*cis*). Tak więc z każdego sterydu ulegającego tym dwóm etapom redukcji mogą powstać cztery izomery: 3 α 5 α , 3 β 5 β , 3 α 5 β oraz 3 β 5 α . Katabolity te są zwykle nazywane czterohydro pochodnymi i oznaczane literami TH poprzedzającymi nazwę hormonu. W sterydach typu C₂₁, redukcji może ulegać również grupa ketonowa w pozycji 20. Powstają wówczas sześciohydro pochod-

ne w dwóch możliwych formach izomerycznych 20 α i 20 β . Trzeba podkreślić, że grupa ketonowa w pozycji 20 może ulec procesowi redukcji przed wysyceniem podwójnego wiązania i redukcją grupy ketonowej w C-3. Utworzone dwuhydropochodne zachowują wówczas podwójne wiązanie między węglami 4 i 5 i grupę ketonową w pozycji 3. W cząsteczkach sterydów szeregu pregnanu może zachodzić redukcja pierwszorzędowej grupy alkoholowej przy C-21, w wyniku czego powstają metabolity 21-dezoksy odgrywające ważną rolę w przemianach aldosteronu.

Oprócz redukcji sterydy mogą także ulegać utlenieniu. Obecność grupy hydroksylowej przy C-17, przyległej do α -ketolowego łańcucha bocznego, umożliwia odszczepianie tego łańcucha katalizowane przez 17,20-desmolazę występującą we frakcji mikrosomalnej; powstają wówczas 17-ketosterydy — związki typu C₁₉. W ten sposób ulega przemianie około 3—5% omawianych związków. Drogi katabolizmu estrogenów prowadzą głównie poprzez reakcje utlenienia. Katabolity hydroksylowane w pozycjach 2, 6, 7, 15, 16 wykazują bardzo małą czynność biologiczną lub nie wykazują jej w ogóle.

Sterydy przechodzą do moczu prawie wyłącznie w postaci połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym. I tak 95% kortykosterydów i ich katabolitów występuje w moczu w postaci glukozydouronianów, 4% w postaci estrów kwasu siarkowego, a tylko 1% w postaci wolnej (34). W przypadku 17-ketosterydów glukozydouroniany stanowią 65%, estry kwasu siarkowego 33%, a wolne 17-ketosterydy występują w moczu w ilościach śladowych (57).

Łączenie się sterydów z kwasem siarkowym i glukuronowym następuje w wątrobie (148). Sulfokinaza przenosi resztę kwasu siarkowego z 5'-fosfosiarczanu kwasu adenozy-3'-fosforowego na grupę hydroksylową sterydu (89, 104).

Glukozydouroniany tworzą się w wyniku reakcji sterydów z kwasem urydynodwufosfoglukuronowym. Enzym katalizujący tę reakcję występuje w mikrosomach wątroby (58).

Dzięki badaniom J a y l e'a i wsp. (106, 107, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 121) wyjaśniony został związek między strukturą sterydu a typem sprzęgania oraz lokalizacją reszty kwasu glukuronowego i siarkowego. Związki posiadające ugrupowanie Δ^4 -3-keto oraz grupę hydroksylową w pozycji 17 wydalane są w 75% jako glukozydouroniany, a tylko w 25% jako estry kwasu siarkowego. Natomiast kortykosterydy pozbawione grupy hydroksylowej w pozycji 17 są wydalane głównie w postaci siarczanów. Pochodne czterowodorowe przechodzą do moczu głównie w postaci glukozydouronianów, przy czym miejsce przyłączenia kwasu glukuronowego jest uwarunkowane budową sterydu: obecność w pozycji 11 grupy zawierającej tlen sprzyja powstawaniu 3-glukozydouronianów, a brak jej — tworzeniu 21-glukozydouronianów. 3 β -hydroksy-17-ketosterydy, do których należą DHA i epiandrosteron, są przede wszystkim estryfikowane

kwasm siarkowym, jednakże wykryto również glukozydouronian DHA (155). Natomiast 3α -hydroksy sterydy ulegają sprzęganiu głównie z kwasem glukuronowym.

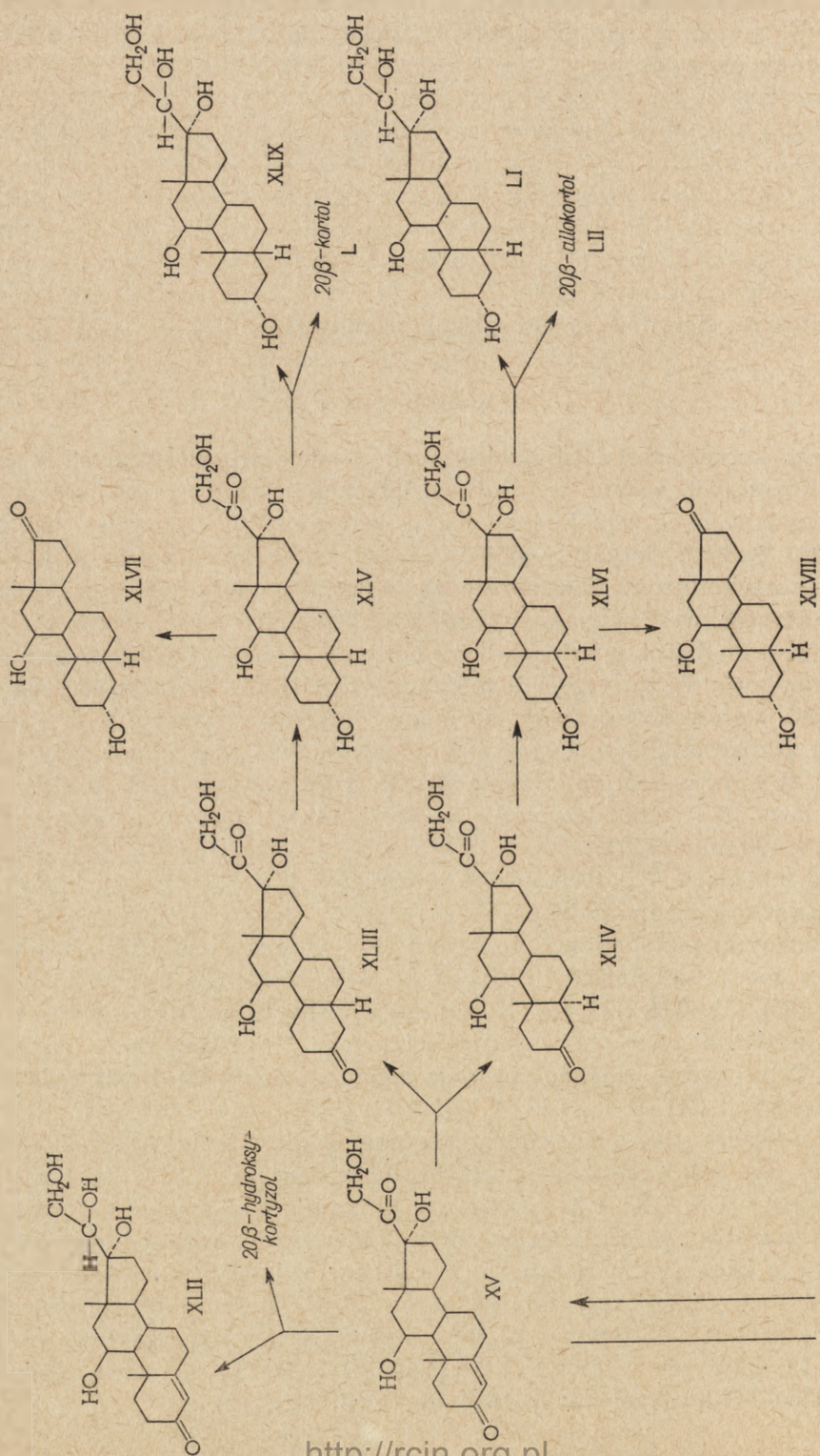
Estryfikacja kwasem siarkowym nie zawsze jest ostatnim etapem metabolizmu hormonów sterydowych. Okazało się, że prekursorzy niektórych hormonów również występują w postaci połączeń z kwasem siarkowym (24, 25, 130), a kora nadnerczy wytwarza nie tylko wolny DHA, ale także jego siarczan (8, 175). Początkowo siarczan DHA wykryto jedynie w nadnerczach patologicznych (7), potem jednak okazało się, że tworzą go również nadnercza zdrowe (160). Istnieją również dane wskazujące na to, że siarczany sterydów są biologicznie czynne (140).

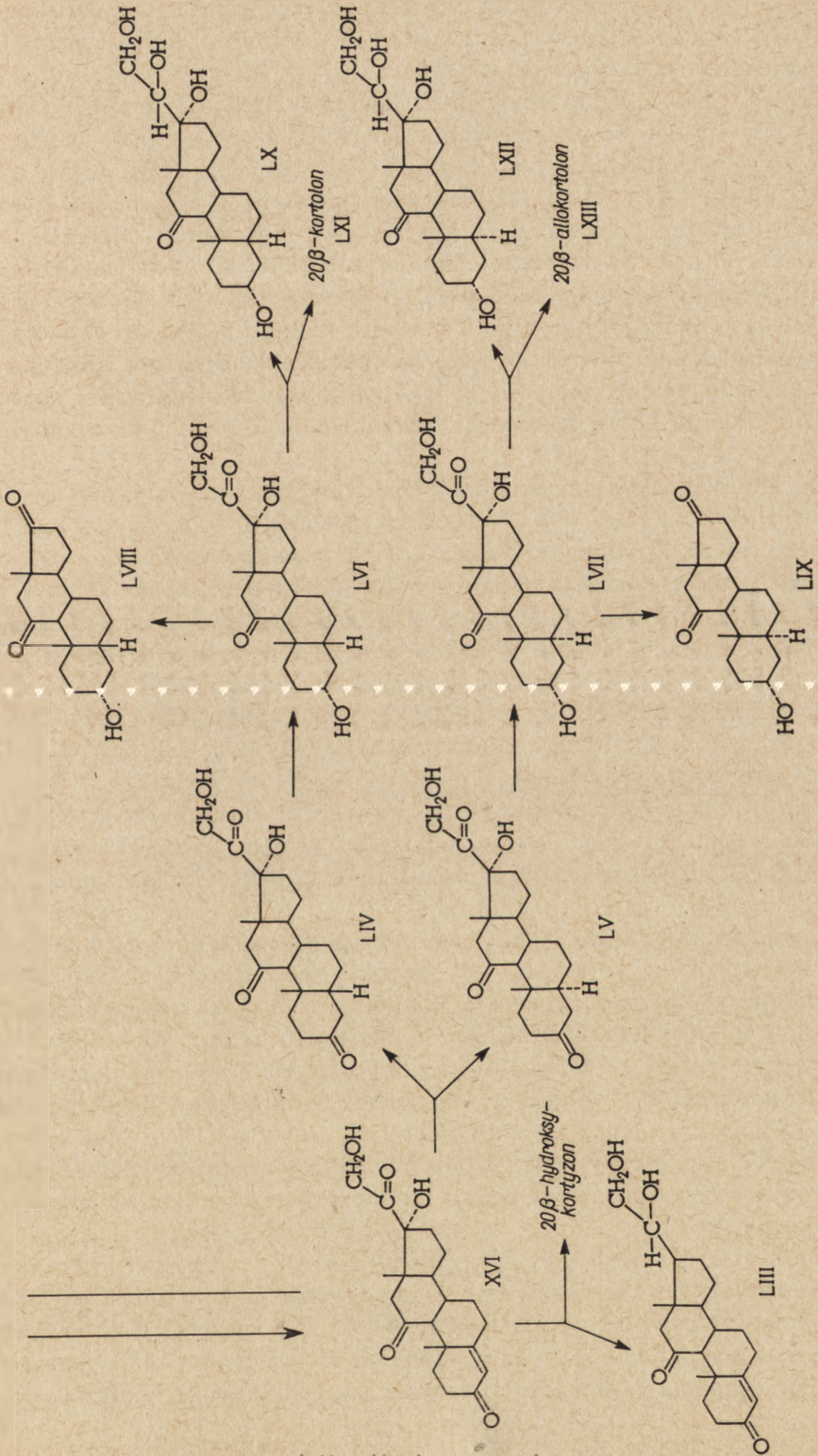
1. Kortykosterydy

Losy kortykosterydów endogennych a także wprowadzonych w celach leczniczych badano w ostatnich latach najczęściej za pomocą połączeń znakowanych promieniotwórczym izotopem ^{14}C w pozycji 4 (82, 92, 93, 124). Badania dotyczyły głównie dwóch naturalnych połączeń: kortyzolu i kortykosteronu. Okazało się, że 20 minut po dożylnym wprowadzeniu kortyzolu, we krwi pojawiają się połączenia sterydu z kwasem glukuronowym. Po dwóch godzinach ilości hormonu wolnego i związanego stają się jednakowe. W tym czasie do moczu przechodzi ok. 14%, a po 48 godz. — ok. 90% wprowadzonej dawki hormonu. Z kałem wydala się 4—5% (62). Miarą szybkości znikania sterydów z ustroju jest tzw. biologiczny półokres, tj. czas, w którym stężenie sterydu wprowadzonego do krwi spada do połowy pierwotnej wartości. Dla kortyzolu biologiczny półokres wynosi 80—90 minut (77).

Na schemacie 7 przedstawiono przemiany, jakim kortyzol i kortyzon ulegają w organizmie ludzkim.

Głównymi metabolitami kortyzolu (XV) i kortyzonu (XVI) wydalonymi w moczu są czterohdropochodne: TH-kortyzol (XLV), TH-kortyzon (LVI) (95), allo-TH-kortyzol (XLVI), allo-TH-kortyzon (LVII), przy czym istnieje zdecydowana przewaga pochodnych 5β w stosunku do 5α ($5\beta/5\alpha = 9$). Czterohdropochodne powstają poprzez etap dwuhdropochodnych: DH-kortyzoli (XLIII i XLIV) i DH-kortyzonów (LIV i LV), w których uwodorowaniu uległo wiązanie podwójne w pierścieniu A. Produktami dalszej redukcji czterohdropochodnych są kortole (XLIX, L, LI, LII) i kortolony (LX, LXI, LXII, LXIII), w których zredukowana jest również grupa ketonowa w łańcuchu bocznym. Także wśród kortoli i kortolonów dominują izomery 5β . Natomiast nie wykryto dotąd u człowieka wśród produktów redukcji kortyzolu izomerów 3β . Na stereospecyficzność czterohdropochodnych wpływa prawdopodobnie grupa hydroksylowa w pozycji 11, gdyż nie wykryto dotąd izomeru $3\alpha 5\alpha$ -TH-kortyzonu, podczas gdy $3\alpha 5\alpha$ -TH-kortyzol jest ważnym metabolitem (112).





Schemat 7. Katabolizm kortyzolu i kortyzonu

Znane są również pochodne: 20α -DH-kortyzol (XLII) i 20α -DH-kortyzon (LIII) oraz ich izomery 20β , powstające w wyniku redukcji grupy ketonowej w łańcuchu bocznym (82, 124).

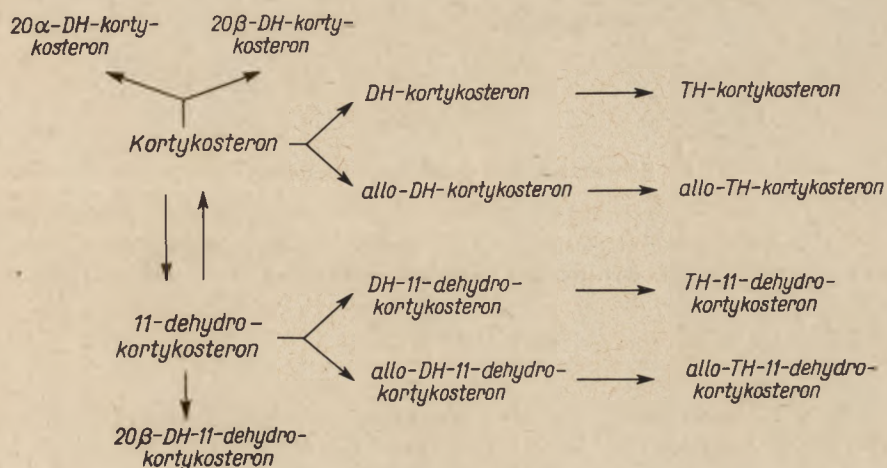
Czterohydropochodne kortyzolu i kortyzonu ulegają częściowo przemianie, która polega na oderwaniu łańcucha bocznego przy węglu 17 i prowadzi do powstania obojętnych 17-ketosterydów (tzw. frakcja 11-okso-17-ketosterydów). Z TH-kortyzolu powstaje w ten sposób 11β -hydroksyeticocholanolon (XLVII) i 11β -hydroksyandrosteron (XLVIII), a z TH-kortyzonu — 11-ketoeticocholanolon (LVIII) i 11-ketoandrosteron (LIX). Cechą odróżniającą tę frakcję 17-ketosterydów jest obecność w ich cząsteczkach tlenu w pozycji 11. Ponadto frakcja ta należy głównie do szeregu etiocholanu (wodór przy C-5 w położeniu *cis*) i tym różni się od 17-ketosterydów powstających z 11β -hydroksyandrostendionu i adreno-steronu, należących do szeregu androstanu (wodór przy C-5 w położeniu *trans*).

Do interesujących wniosków na temat katabolizmu kortyzolu prowadzą wyniki Graya i wsp. (52), którzy stwierdzili, że w ciągu 48 godzin po podaniu znakowanego kortyzolu 90% promieniotwórczości przeszło do moczu, chociaż frakcja chromogenów Silbera-Portera zawierała tylko 55% promieniotwórczości. Poziom 17-ketosterydów w moczu nie ulegał w tych warunkach zmianie, co dowodzi, że przemiana w 17-ketosterydy nie odgrywa większej roli w usuwaniu nadmiaru kortyzolu z organizmu. Prawdopodobnie więc powstają nietypowe metabolity, które przy ogólnej przyjętej ekstrakcji moczu chloroformem wymykają się spod kontroli eksperymentatora (59, 61, 98).

Takim metabolitem może być na przykład 6β -hydroksykortyzol, gdyż Katz i wsp. (66) zaobserwowali znaczny wzrost jego ilości w moczu u chorych z zespołem Cushinga oraz po podaniu ACTH. Podobnie u noworodków, których wątroba nie posiada jeszcze w pełni wykształconej zdolności sprzęgania sterydów z kwasem glukuronowym, wydalanie 6β -hydroksykortyzolu w moczu jest wysokie (66). Zdaniem Lipmana i wsp. (99) wyniki te są dowodem istnienia odrębnego toru metabolicznego, który w warunkach prawidłowych odgrywa znikomą rolę w porównaniu z przemianami prowadzącymi do TH-kortyzolu i jego glukozydourowianiu, natomiast w stanach patologicznej nadprodukcji hormonu staje się dodatkową drogą wydalania nadmiaru kortyzolu. Ci sami autorzy uważają, że 6β -hydroksykortyzol jest raczej produktem obwodowego metabolizmu endogennego kortyzolu a nie wynikiem przemian zachodzących w samym gruczole.

Nieco inaczej przedstawiają się losy trzeciego podstawowego hormonu kory nadnerczy — kortykosteronu. Przede wszystkim po dożylnym podaniu około 75% dawki przechodzi do moczu. Biologiczny półokres kortykosteronu wynosi 70—110 minut. Może on ulegać przemianie w odwodowaną pochodną: 11-dehydrokortykosteron, podobnie jak kortyzol w kor-

tyzon. W toku przemian ustrojowych w cząsteczkach kortykosteronu i 11-dehydrokortykosteronu, pierścień A ulega redukcji i powstają dwuhydropochodne a następnie czterohydropochodne (schemat 8).



Schemat 8. Metabolizm kortykosteronu i 11-dehydrokortykosteronu

Głównym metabolitem kortykosteronu jest allo-TH-kortykosteron, przy czym stosunek ilości izomeru $5\beta/5\alpha$ w moczu jest nieco niższy od 1. Poćólnie jak w przypadku kortyzonu, allo-TH-11-dehydrokortykosteron nie został zidentyfikowany (112).

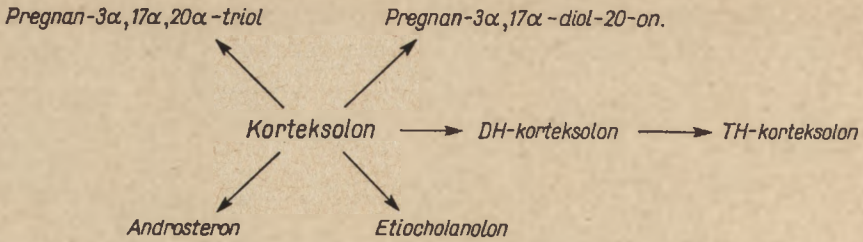
Trzeba podkreślić, że kortykosteron i 11-dehydrokortykosteron nie tworzą 17-ketosterydów, gdyż związki nie posiadające grupy hydroksylowej w pozycji 17 nie ulegają utlenieniu z utratą łańcucha bocznego.

Nadnercza ludzkie produkują również, choć w bardzo małych ilościach, korteksolon. Zasadnicza droga jego przemian w organizmie polega na redukcji prowadzącej do powstania czterohydropochodnych. Oprócz tego może zachodzić redukcja łańcucha bocznego z wytworzeniem pregnan- $3\alpha,17\alpha$ -diol, 20 -onu oraz pregnan- $3\alpha,17\alpha,20\alpha$ -triolu. Z uwagi na obecność grupy hydroksylowej w położeniu 17 może on także ulegać utlenieniu z oderwaniem łańcucha bocznego i wytworzeniem 17-ketosterydów pochodnych etiocholanolonu, które nie różnią się niczym od 17-ketosterydów powstających ze związków androgennych. Należy tylko dodać, że w tym przypadku w przeważającej ilości powstaje etiocholanolon (schemat 9).

Analogicznie przebiegają przemiany korteksolonu i uwodorowanie pierścienia A prowadzi do TH-korteksolonu. Przez częściową redukcję łańcucha bocznego może powstawać progesteron (76). Jednoczesna redukcja pierścienia A i łańcucha bocznego prowadzi do pregnandioli.

Spośród ponad trzydziestu metabolitów glukokortykosterydów wykrytych dotąd w moczu część została oznaczona ilościowo (105) (tablica 3).

Jest rzeczą interesującą, że u poszczególnych gatunków zwierząt drogi wydalania sterydów różnią się od obserwowanych u człowieka. Np.



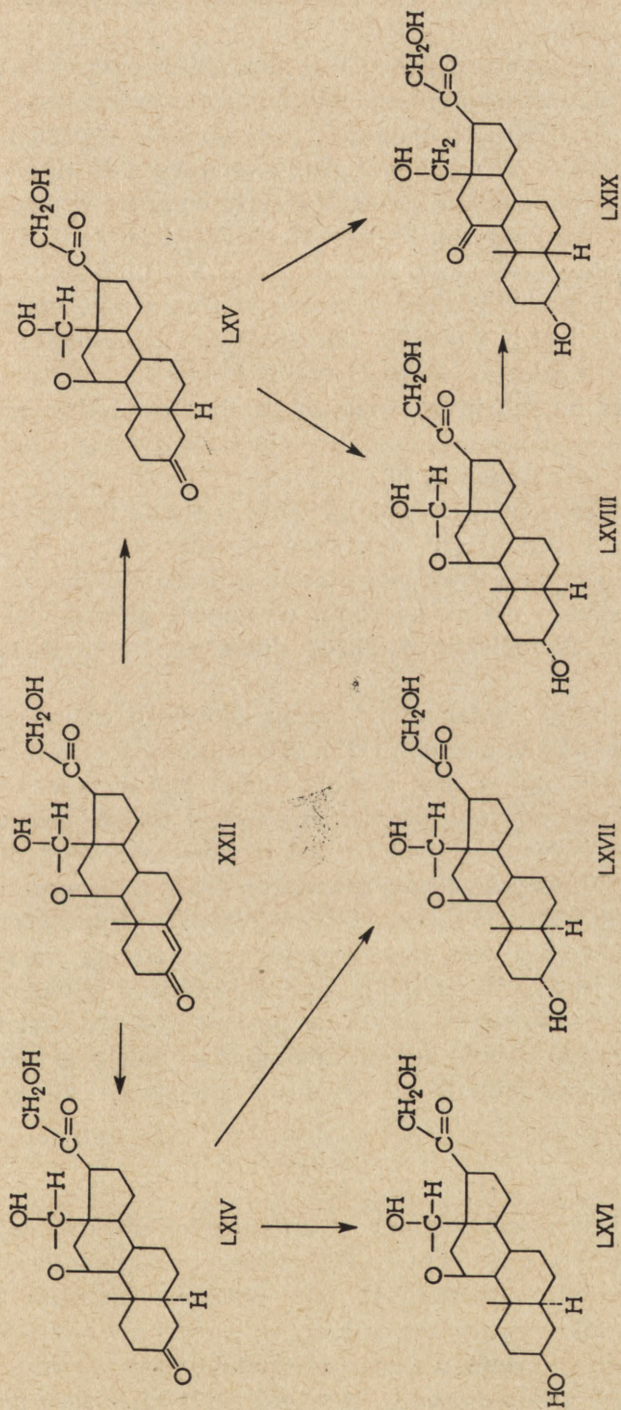
Schemat 9. Katabolizm korteksolonu

Tablica 3

Wydalenie glukokortykosteroidów i ich metabolitów w moczu w mg na dobę
(cyt. wg 105, za pozwoleniem autora)

	Mężczyźni	Kobiety
Kortyzol	0,47 (0,13—1,21)	0,27 (0 —0,88)
TH-kortyzol	2,19 (0,81—4,24)	1,19 (0,78—2,95)
Allo-TH-kortyzol	0,92 (0,39—1,58)	0,57 (0,33—1,20)
Kortyzon	0,33 (0,11—0,70)	0,22 (0,09—0,68)
TH-kortyzon	3,06 (1,14—5,70)	1,76 (0,78—5,03)
Kortykosteron	0,29 (0 —0,97)	0,09 (0 —0,24)
TH-kortykosteron	0,54 (0,10—0,99)	0,34 (0,13—0,60)
Allo-TH-kortykosteron	0,63 (0,19—1,50)	0,34 (0,10—0,56)
<i>11</i> -dehydrokortykosteron	0,26 (0 —0,83)	0,07 (0 —0,19)
TH- <i>11</i> -dehydrokortykoste- ron	0,49 (0,09—1,15)	0,30 (0,06—0,67)
Korteksolon	0,22 (0 —0,74)	0,07 (0 —0,27)
TH-korteksolon	0,02	brak

u szczura podany kortyzol wydalą się głównie przez jelito (185), gdyż 3 godziny po podskórnym wprowadzeniu hormonu 83% dawki wykryto w żółci. Ponieważ jednak w kale wydalano się tylko ok. 66% sterydu, musi zatem następować wtórna resorpcja kortyzolu z przewodu pokarmowego do krwi. U świnki morskiej 65% podanego sterydu przechodzi do żółci



Schemat 10. Katabolizm aldosteronu

i znaczna jego część również jest wchłaniana do krwi a następnie zostaje wydalona z moczem.

Aldosteron jest wydalany w moczu głównie w postaci C-18 glukozydouronianu (22, 120). Głównym metabolitem aldosteronu jest czterohydroaldosteron 5β , 3α (LXVIII), powstający w wyniku wysycenia wiązania podwójnego przy C-4 oraz redukcji grupy ketonowej do alkoholowej przy C-3 (166, 167). W mniejszych ilościach zostały wykryte w moczu inne izomeryczne czterohydroaldosterony: 5α , 3β (LXVI) i 5α , 3α (LXVII), a także dwuhydropochodne 5α -dwuhydroaldosteron (LXIV), 5β -dwuhydroaldosteron (LXV). Związki te posiadają często wiązanie półacetalowe między węglami w pozycji 11 i 18 (68, 70, 72). Niedawno doniesiono o wyizolowaniu z moczu ludzkiego $3\alpha, 18, 21$ -trójhydroksy- 5β -pregnan-11,20-dionu (LXIX), a także innych interesujących katabolitów aldosteronu, w których pierścieniowy półacetal $11 \rightarrow 18$ przechodzi w dwupierścieniowy acetal $11 \rightarrow 18 \leftarrow 20$ (69, 147) (Schemat 10).

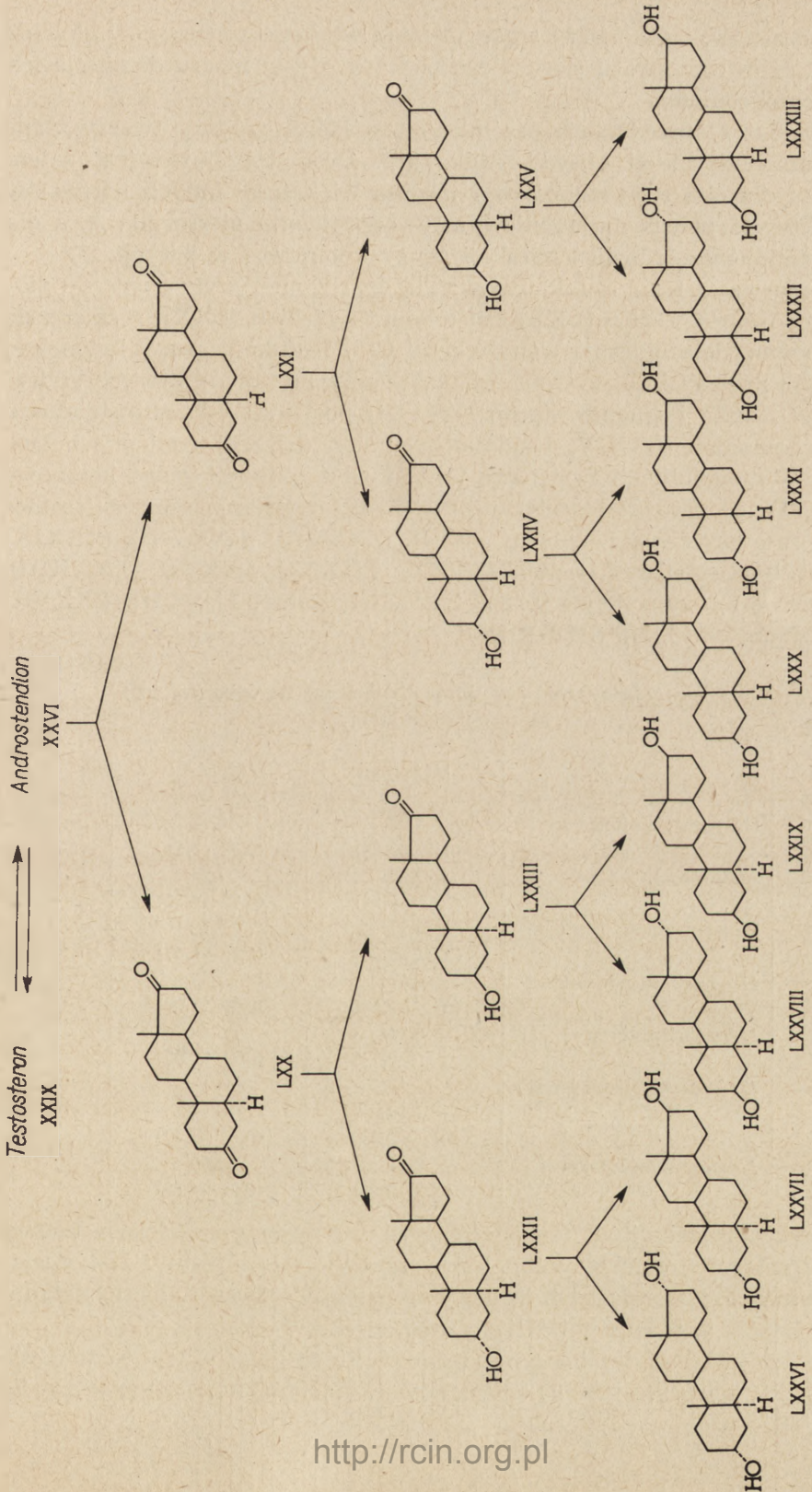
W osoczu aldosteron występuje głównie w stanie wolnym oraz w formie połączeń z białkami (32, 48). Jego stężenie wynosi 0,008—0,03 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Natomiast czterohydroaldosteron, którego stężenie w osoczu jest pięciokrotnie wyższe niż aldosteronu, występuje głównie jako glukozydouronian (118). Biologiczny półokres aldosteronu wynosi 18—25 minut (165).

Ilość aldosteronu wydalana w moczu zdrowego człowieka waha się w granicach 40—180 μg na dobę (122). Wzrasta ona znacznie przy niektórych schorzeniach, np. w tzw. zespole Conna (aldosteronizm pierwotny) i w marskości wątroby (aldosteronizm wtórny) itp. W moczu człowieka zdrowego wykryto również 18-hydroksykortykosteron, występujący w ilościach dwukrotnie większych niż aldosteron (168). Głównym metabolitem 18-hydroksykortykosteronu jest również jego czterohydropochodna.

Ostatnio Ulick i wsp. (169) wykryli nowy zespół, dla którego charakterystyczny jest bardzo niski poziom aldosteronu w moczu natomiast znacznie wyższy w stosunku do normy poziom 18-hydroksykortykosteronu. Jest to prawdopodobnie defekt metaboliczny polegający na braku enzymu katalizującego przemianę 18-hydroksykortykosteronu w aldosteron.

2. Androgeny

Badaniem losów testosteronu w organizmie ludzkim zajmowali się Sandberg i Slaunwhite (138), którzy posługiwali się metodą izotopową. Stwierdzili oni m.in., że 14% podanego ludziom testosteronu przechodzi do żółci, natomiast w kale wykrywa się tylko 6%. Tę rozbieżność można wyjaśnić wtórną resorpcją części sterydu z jelita do krwiobiegu. 90% podanej promieniotwórczości wydalą się z moczem, przy czym więcej niż połowa w postaci połączeń z kwasem siarkowym i glukuronowym. Clearance nerkowy glukozydouronianów jest znacznie wyższy



Schemat 11. Katabolizm testosteronu

niż siarczanów, co tłumaczy występowanie we krwi androgenów głównie w postaci estrów kwasu siarkowego podczas gdy w moczu dominują ich glukozydouroniany.

Schemat 11 przedstawia przemiany testosteronu, który tworzy z androstendionem układ oksydo-redukcyjny. Droga przemian jest zatem wspólna dla obu tych związków i jak dla większości innych hormonów sterydowych, polega na stopniowym uwodorowaniu pierścienia A, a dla androstendionu — również redukcji grupy ketonowej w pozycji 17.

W pierwszej fazie redukcji powstają dwa izomeryczne nasycone diony: androstan-3,17-dion (LXX) i etiocholan-3,17-dion (LXXI) różniące się przestrzenną konfiguracją wodoru przy C-5. Redukcja grupy ketonowej przy C-3 prowadzi do wytworzenia czterech izomerów, z których androsteron (LXXII) i epiandrosteron (LXXIII) pochodzą od androstandionu a etiocholanolon (LXXIV) i epietiocholanolon (LXXV) — od etiocholan-dionu. W metabolitach tych może także ulegać redukcji grupa ketonowa przy C-17, co stwarza teoretyczną możliwość powstania czterech izomerycznych androstan-3,17-dioli (LXXVI), (LXXVII), (LXXVIII), (LXXIX) i czterech etiocholan-3,17-dioli (LXXX, LXXXI, LXXXII, LXXXIII), z których w moczu wykryto jednak tylko dwa: izomer 3 α , 5 α , 17 β (LXXVII) oraz izomer 3 α , 5 β , 17 β (LXXXI).

Tablica 4

Wydalanie 17-ketosterydów w moczu ludzi w mg na dobę (wg 105)
za zezwoleniem autora

	Mężczyźni	Kobiety
Dehydroepiandrosteron	1,72 (0,43—3,84)	0,98 (0,37—3,51)
Androsteron	2,78 (1,68—5,54)	2,23 (0,82—6,52)
Etiocholanolon	3,77 (2,29—8,20)	3,10 (1,55—6,57)
11 β -hydroksyandrosteron	0,65 (0 —1,54)	0,65 (0,39—1,09)
11-ketoandrosteron	0,34 (0 —0,74)	0,68 (0 —2,07)
11 β -hydroksyetiocholanolon	1,10 (0 —2,99)	0,74 (0,34—1,37)
11-ketoetiocholanolon	0,89 (0,23—2,58)	1,00 (0,28—1,83)

Spośród metabolitów testosteronu w największych ilościach tworzy się androsteron i etiocholanolon, które stanowią blisko połowę 17-ketosterydów moczu. Natomiast ich izomery 3 β : epiandrosteron i epietiocholanolon są obecne w moczu w ilościach znikomych.

Oprócz testosteronu i androstendionu, które powstają w komórkach Leydiga w jądrach, niektóre androgeny powstają w korze nadnerczy. Są

to: adrenosteron, 11β -hydroksyandrostendion, androstendion i DHA (99). DHA jest częściowo wydalany w moczu w postaci nie zmienionej, a częściowo ulega przemianom, których produktami są: androsteron, etiocholanolon, androstendion a także powstający w bardzo małych ilościach Δ^4 -androsen- $3\beta,17\beta$ -diol. Wydalanie dobowe poszczególnych 17-ketosteroidów, będących jak wiadomo produktami przemian zarówno testosteronu jak i hormonów kory nadnerczy, przedstawia tablica 4.

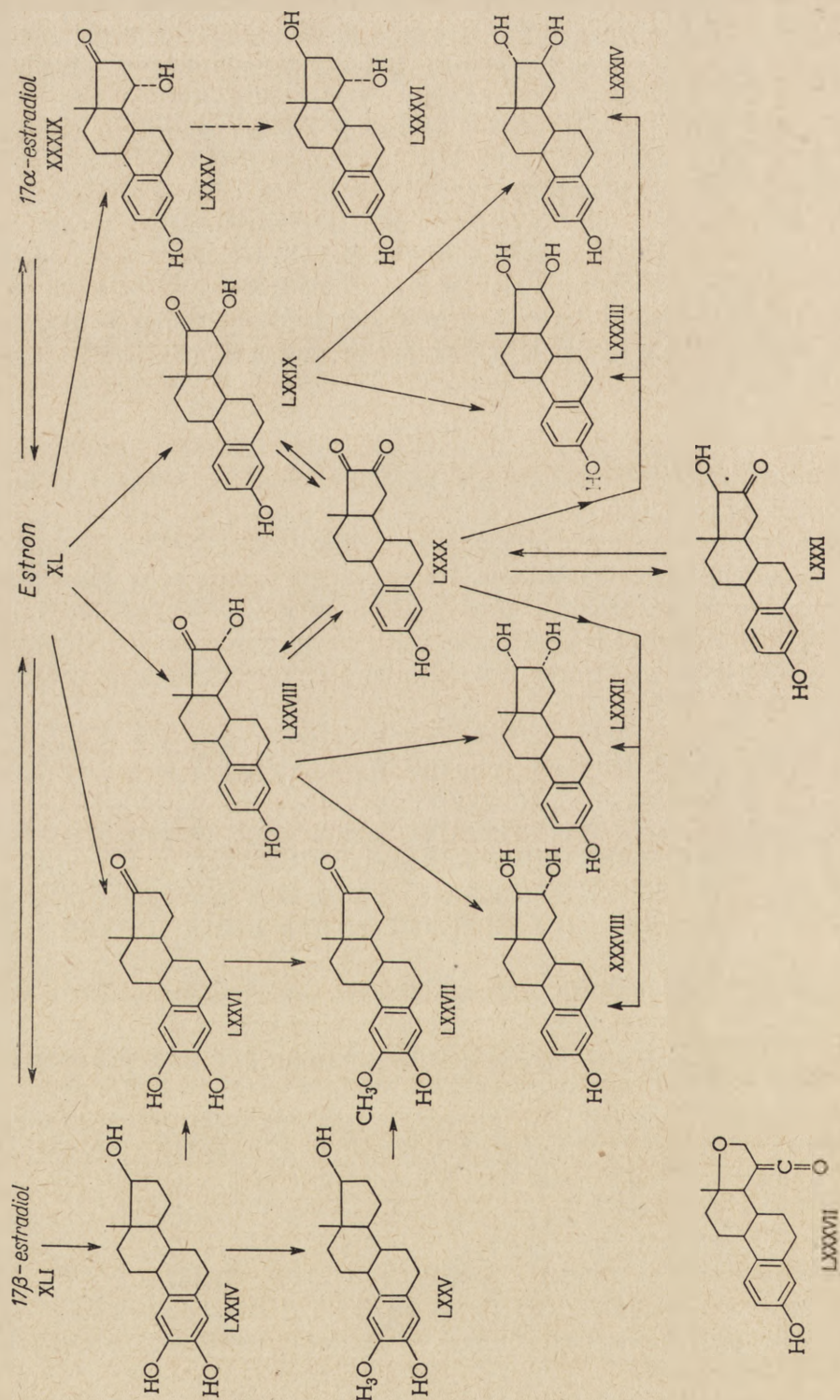
Najsilniejsze działanie androgenne ma testosteron. DHA wykazuje działanie około 15 razy słabsze, a główny metabolit testosteronu — androsteron — około sześciokrotnie słabsze (125). Inne katabolity testosteronu: etiocholanolon, epiandrosteron, androstendion i etiocholandion są jeszcze mniej aktywne lub w ogóle nie wykazują aktywności (10).

3. Estrogeny

Główne drogi metabolicznej inaktywacji estrogenów przebiegają poprzez reakcje utlenienia. Estron i 17β -estradiol ulegają wzajemnym przemianom *in vivo* dlatego trudno było ustalić, który z nich jest prekursorem bardziej utlenionych metabolitów. Na podstawie doświadczeń Fishmana i wsp. (45), którzy śledzili produkty przemiany podanych dożylnie [$6,7$ - ^3H] 17β -estradiolu i [16 - ^{14}C]estronu, jak również prac innych autorów (18, 75, 96) wiadomo, że estron jest głównym jeśli nie jedynym substratem hydroksylacji.

Estron u zwierząt może ulegać przemianie w 17α -estradiol (XXXIX); u człowieka związek ten nie występuje. W wyniku hydroksylacji estronu w pozycji 16 powstają dwa izomery: 16α -hydroksyestron (LXXVIII) i 16β -hydroksyestron (LXXIX). Związki te dalej ulegają bezpośrednio redukcji do estriolu (XXXVIII), 16 -epiestriolu (LXXXII), 17 -epiestriolu (LXXXIII) i $16,17$ -epiestriolu (LXXXIV) (87, 88, 103), lub poprzez związki pośrednie: 16 -ketoestron (LXXX) i 16 -keto- 17β -estradiol (LXXXI) (94, 136).

Inna równorzędna droga przemian estronu, przebiegająca podobnie do przemian katecholamin, prowadzi poprzez metoksylicację (4, 5, 47). Axelrod (5) zauważył, że podczas inkubacji estrogenów naturalnych i sztucznych ze skrawkami wątroby szczurów i królików zachodzi hydroksylacja tych związków w pozycji C-2. Dowody na istnienie tego procesu *in vivo* u ludzi przedstawił Fishman (47), który wyizolował [16 - ^{14}C]2-hydroksyestron z moczu ludzi po dożylniej iniekcji [16 - ^{14}C] 17β -estradiolu. Interesujące jest występowanie zarówno u zwierząt jak i u roślin, aktywności enzymatycznej katalizującej metoksylicację 2-hydroksyestronu (LXXVI) do 2-metoksyestronu (LXXVII) i 2-hydroksy- 17β -estradiolu (LXXIV) do 2-metoksy- 17β -estradiolu (LXXV). Axelrod i Goldzielher (4) stwierdzili również metoksylicację tych związków, oraz estriolu w różnych tkankach ludzkich.



Schemat 12. Katabolizm estrogenów

Estron może także ulegać przemianie w cztery razy mniej aktywny lakton (LXXXVII). Przemianę tę wykazano również *in vitro* pod wpływem H_2O_2 (33). Ostatnio wskazuje się na możliwość utleniania estronu również w innych pozycjach, jak C-6, C-7, C-11, C-18 (19, 21, 26, 80, 81).

Podczas badania metabolizmu estrogenów w płodzie ludzkim wykryto nowy, dotychczas nieznany, metabolit — 15α -hydroksyestron wykazujący zaledwie 0,001 aktywności estradiolu (149), oraz 15α -hydroksy- 17β -estradiol (186). Biologiczne znaczenie 15α -hydroksylacji nie jest wyjaśnione; przypuszcza się, że może ona chronić rozwijający się płód przed wysoką aktywnością 17β -estradiolu, a w życiu pozapłodowym może być jedną z ważnych przemian metabolicznych 17β -estradiolu (71).

Roberts i Szego (129, 159) wykazali, że estrogeny krążą we krwi głównie w postaci kompleksów z β -globulinami osocza a także jako glukozydouroniany. Istotną rolę w powstawaniu i wydalaniu tych połączeń odgrywają funkcje wątroby (3). Podane doustnie estrogeny dostają się do krwi, skąd część zostaje wydalona z moczem (tablica 5).

Tablica 5

Wydalanie estronu, 17β -estradiolu i estriolu w moczu w μg na dobę (wg 36)
za zezwoleniem autorów

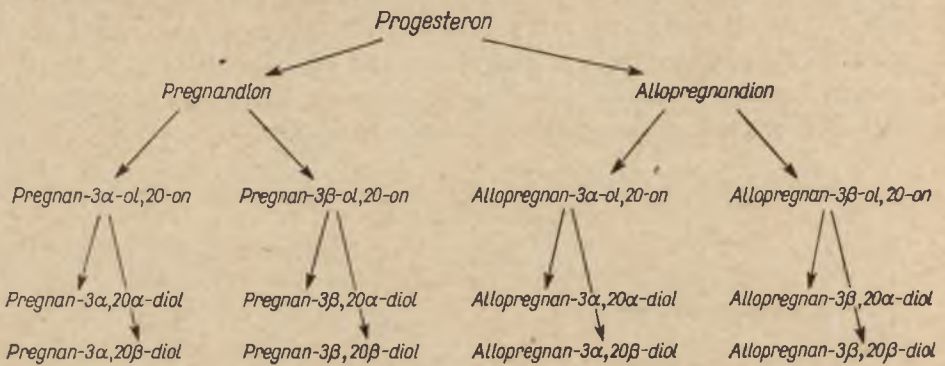
	Estron	17β -estradiol	Estriol
Kobiety z normalnym cyklem			
a) faza pomenstrualna	2,8 (0,2— 7,2)	0,7 (—)	4,2 (1,9— 11,4)
b) faza owulacyjna	20,1 (14,8—27,4)	7,9 (2,8—21,8)	30,9 (8,1—119,0)
c) faza lutealna	11,3 (5,1—25,0)	5,0 (2,1—10,6)	21,1 (5,0— 89,0)
Kobiety w okresie klimakterium	1,4	0,3	4,1
Mężczyźni	5,4 (3,0— 8,2)	1,5 (0 — 6,3)	3,5 (0,8— 11,0)

Część estrogenów z krwi przechodzi do żółci, z nią do przewodu pokarmowego, a stąd ulega wtórnej resorpcji do krwiobiegu. Pewna ilość estrogenów wydostaje się z tego obiegu jelitowo-wątrobowego i zostaje wydalona z kałem. U owiec wydalanie estrogenów z moczem nie przekracza 2% podanego 17β -estradiolu, podczas gdy wydalanie z kałem wynosi 35—45% (184).

Jak wynika z ostatnich doniesień (1), również tkanki niektórych męskich gruczołów mogą metabolizować estrogeny. W normalnych i patologicznych tkankach prostaty estron ulega redukcji do 17β -estradiolu (0,8—4,3%), 16 -hydroksylacji do estriolu (2%), utlenianiu i metoksylicacji do 2-hydroksyestronu (0,9—4,9%) i 2-metoksyestronu (1,1—14,9%).

4. Gestageny

W przeciwieństwie do innych hormonów sterydowych progesteron występuje w osoczu głównie w postaci wolnej (90%). Jego przemiany odbywają się przede wszystkim w wątrobie, przy czym są one analogiczne do przemian kortykosterydów, tj. zachodzi redukcja pierścienia A, a następnie grupy ketonowej w łańcuchu bocznym. Przyłączenie wodoru do atomów węgla w pozycjach 3, 5 i 20 stwarza teoretyczną możliwość powstania 8 izomerycznych pregnandioli, z których trzy wyodrębniono z moczu osób zdrowych (5β , 3α , 20α ; 5α , 3α , 20α ; 5α , 3β , 20α), a dwa z moczu osób z guzami nadnerczy (5β , 3β , 20β ; 5β , 3β , 20α). Pozostałych trzech izomerów dotychczas nie udało się wykryć w materiale biologicznym.



Schemat 13. Katabolizm progesteronu

Po podaniu znakowanego progesteronu kobietom ciężarnym promieniotwórczość dzieli się równo między mocz i kał. Pod tym względem progesteron zachowuje się zatem inaczej niż inne hormony sterydowe, których metabolity wydalane są głównie w moczu.

Ogólnie przyjętym wskaźnikiem oceny ilościowej powstającego w ustroju progesteronu jest poziom pregnandioli w moczu, chociaż związek ten jest również katabolitem korteksonu. Jednakże pregnandiol pochodzący z przemian korteksonu oraz progesteronu nadnerczowego stanowi zaledwie 1% ilości zawartej w moczu kobiety w okresie pełnego cyklu jajczkowania. Udział kory nadnerczy może znacznie wzrosnąć w warunkach chorobowych, np. 100—200-krotnie w nadczynności spowodowanej obecnością guzów nadnerczy.

III. Zmiany metabolizmu hormonów sterydowych w wyniku bloków enzymatycznych sterydogenezy

W ciągu ostatnich lat, dzięki rozwojowi metod biochemii klinicznej, stało się możliwe wykrywanie różnych anomalii biosyntezy hormonów sterydowych, będących przyczyną poważnych zespołów chorobowych.

W ten sposób wyjaśniona została istota wrodzonego zespołu nadnerczowo-płciowego, którego klasyfikacja jeszcze kilka lat temu miała charakter ściśle kliniczny i opierała się na różnym stopniu zmian wirylizacyjnych obserwowanych u chorych.

Obecnie klasyfikacja zespołu nadnerczowo-płciowego opiera się na podstawach biochemicznych i wyróżnia trzy główne postaci, uwarunkowane brakiem swoistych enzymów uczestniczących w biosyntezie hormonów kory nadnercza: 21-hydroksylazy, 11 β -hydroksylazy i dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidów (162). Tym genetycznie uwarunkowanym blokiem enzymatycznym odpowiadają charakterystyczne postaci kliniczne.

Częściowy blok 21-hydroksylazy jest przyczyną tzw. wirylizmu prostego — najczęstszej postaci zespołu nadnerczowo-płciowego. Całkowity blok tego enzymu powoduje wystąpienie objawów klinicznych określanych mianem wirylizmu z utratą soli. Blok 11 β -hydroksylazy daje postać wirylizmu z nadciśnieniem tętniczym, chociaż doniesiono również o przypadkach, kiedy zahamowanie 11 β -hydroksylacji było przyczyną wirylizmu bez nadciśnienia (15, 50). Ostatnią z poznanych dotychczas wrodzonych enzymopatii sterydogenezy jest blok dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidów. Całkowite wypadnięcie czynności tego enzymu prowadzi do śmierci chorego mimo stosowania substytucyjnego leczenia hormonalnego.

Bloki te są przyczyną poważnych zmian biochemicznych zarówno w składzie metabolitów pośrednich jak i ostatecznych produktów metabolizmu wydalanych z moczem. W częściowym bloku 21-hydroksylazy gromadzą się w ustroju nadmierne ilości czterech prekursorów kortyzolu: 17 α -hydroksyprogesteronu, 11 β ,17 α -dwuhydroksyprogesteronu oraz w mniejszym stopniu — progesteronu i 11 β -hydroksyprogesteronu (schemat 2). Spośród ponad 20 katabolitów tych związków, wyizolowanych z moczu chorych, w większych ilościach występują: pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol i pregnan-3 α ,17 α -diol-20-on — powstające z 17 α -hydroksyprogesteronu, pregnan-3 α ,20 α -diol — wywodzący się z progesteronu i pregnan-3 α ,20 α -diol-11-on, który tworzy się z 11 β -hydroksyprogesteronu (186).

Jak wynika ze schematu 5 wzrost ilości 17 α -hydroksyprogesteronu i 17 α -hydroksypregnenolonu musi wywołać zwiększenie produkcji androgenów nadnerczowych — androstendionu, 11 β -hydroksyandrostendionu i DHA, co prowadzi do wydalania w moczu zarówno wymienionych związków jak i produktów ich dalszego katabolizmu: androsteronu, etiocholanolonu, 11 β -hydroksyandrosteronu i 11-ketoetiocholanolonu (17, 60).

Przy całkowitym bloku 21-hydroksylazy, poza wymienionymi zmianami w składzie metabolitów moczowych, obserwuje się b. niski poziom lub nawet brak czterohydrokortyzolu, wywołany zahamowaniem produkcji kortyzolu w nadnerczach.

Przy deficycie 11 β -hydroksylazy, opisanym po raz pierwszy przez Eberleina i Bongiovanniego (39), dochodzi do gromadzenia się w ustroju znacznych ilości korteksonu i korteksolonu (schemat 2),

a moczu chorych obfituje w czterohydro pochodne tych związków (53). Ma również miejsce gromadzenie się progesteronu i 17α -hydroksyprogesteronu, jednakże w znacznie mniejszym stopniu niż przy bloku 21 -hydroksylazy. Natomiast 11 -hydroksypochodne, zgodnie z przewidywaniami, nie występują w ogóle w moczu. Podobnie androgen pochodzenia nadnerczowego — 11β -hydroksyandrostendion nie tworzy się wcale, podczas gdy androstendion i DHA powstają w znacznych ilościach. W moczu brak frakcji 11 -okso- 17 -ketosterydów.

Badania chromatograficzne połączeń szeregu kortykosteronu przyniosły również dowód bloku 11β -hydroksylacji: wykrycie w moczu czterohydrokorkteksonu, który normalnie w nim nie występuje. U chorych z tym typem bloku enzymatycznego nie badano, jak dotąd, wydalania aldosteronu, jednakże obecność w cząsteczce grupy hydroksylowej w pozycji 11 pozwala sądzić, że jego produkcja ulega obniżeniu.

Podjęmowano próby wyjaśnienia mechanizmu nadciśnienia tętniczego przy bloku 11β -hydroksylazy. Początkowe sugestie, że nadciśnienie wywołane jest przez korteksolon nie znalazły potwierdzenia, gdyż nawet długotrwałe podawanie tego związku pacjentom nie powodowało wzrostu nadciśnienia (12). Obecnie przyjmuje się, że substancją odpowiedzialną za nadciśnienie jest kortekson, którego działanie hipertensyjne znane jest zarówno z badań na zwierzętach jak i z obserwacji klinicznych. Hipoteza ta nie tłumaczy jednak wszystkich zaobserwowanych faktów. Trudno na przykład wyjaśnić spostrzeżenia Bongiovanniego (15) oraz Chaptala i wsp. (27), że niekiedy pacjenci, którzy wykazują zmiany biochemiczne typowe dla bloku 11β -hydroksylazy i wydają znaczne ilości korteksonu w moczu, nie mają nadciśnienia. Możliwe jednak, że nadciśnienie występuje dopiero po przekroczeniu pewnego progu korteksonu w krwi, co może nastąpić lub nie, w zależności od stopnia bloku, albo że odgrywa tu rolę niejednakowa wrażliwość osobnicza na działanie korteksonu. Możliwe również, że o wystąpieniu nadciśnienia decyduje względna ilość korteksonu w stosunku do kortyzolu. Małe ilości kortyzolu wytwarzane przez nadnercza przy niepełnym bloku kompensują, być może, presyjne działanie nieprawidłowego metabolitu.

Przy bloku dehydrogenazy 3β -hydroksysterydów, która katalizuje jeden z pierwszych etapów kortykogenezy — przemianę pregnenolonu w progesteron, następuje całkowite zahamowanie biosyntezy hormonów kory nadnercza i gromadzenie się dużych ilości pregnenolonu. Ponieważ jednak czynne są enzymy hydroksylujące powstaje cała seria pochodnych pregnenolonu hydroksylowanych w pozycjach 11β , 17α i 21 , a w mniejszym stopniu 16 , 20 i 6 (9). Jeśli idzie o androgeny — obserwuje się nadprodukcję DHA, który dominuje również w moczu.

Badania genetyczne Childsa i wsp. (28) oraz Pradera i wsp. (126) prowadzą do wniosku, że omawiane bloki enzymatyczne związane są z genem autosomalnym recesywnym, który wywołuje objawy kliniczne

jedynie u osobników homozygotycznych. Za każdą z trzech podstawowych enzymopatii odpowiedzialny jest inny gen. Natomiast wydaje się, że postać prosta wirylizmu i jego postać z utratą soli stanowią cechę przenoszoną przez ten sam gen i różnią się jedynie stopniem zablokowania 21-hydroksylacji.

Czytelnicy interesujący się szerzej zagadnieniami omawianymi w tym artykule znajdą wiele danych w wydanej ostatnio monografii „Metabolism of Steroid Hormones”, R. J. Dorfmana i F. Ungara, Academic Press, New York, 1965 (716 str.).

LITERATURA

1. Acevedo H. F., Goldzieher J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 571 (1965).
2. Adadevoh B. K., Lewis L., Engel L. L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 784 (1965).
3. Adlercreutz H., Lukkainen T., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 134 (1965).
4. Axelrod L. R., Goldzieher J., *Endocrinology* **70**, 943 (1962).
5. Axelrod L. R., *Science* **140**, 499 (1963).
6. Ayres P. J., Eichhorn J., Hechter O., Saba N., Tait J. F., Tait S. A., *Acta Endocrinol.* **33**, 27 (1960).
7. Baulieu E. E., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **251**, 1421 (1960).
8. Baulieu E. E., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 50 (1962).
9. Berliner D. L., Cezes D. M., Nabors C. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2478 (1962).
10. Bersin T., *Biochimija gormonow*, Moskwa 1964.
11. Besch P. K., Watson D. J., Vorys N., Barry R. D., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 417 (1963).
12. Birke G., Diezfalusy E., Plantin L., Robbe H., Westman A., *Acta Endocrinol.* **29**, 55 (1958).
13. Birmingham M. K., Kurlents E., Lane R., Muhlstock B., Traikoff H., *Canad. J. Biochem.* **38**, 1077 (1960).
14. Bongiovanni A. M., Eberlein W. R., *Anal. Chem.* **30**, 388 (1958).
15. Bongiovanni A. M., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 860 (1961).
16. Bongiovanni A. M., *J. Clin. Invest.* **41**, 2086 (1962).
17. Bradlow H. L., Gallagher T. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **19**, 1575 (1959).
18. Breuer H., *Arzneimittel-Forsch.* **9**, 667 (1959).
19. Breuer H., Nocke L., Pangels G., *Acta Endocrinol.* **34**, 359 (1960).
20. Breuer H., Grill P., *Z. Physiol. Chem.* **324**, 254 (1961).
21. Breuer H., Knuppen R., Pangels G., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 1 (1962).
22. Burnstein S., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 769 (1956).
23. Burnstein S., Dorfman R. I., *Acta Endocrinol.* **40**, 188 (1962).
24. Calvin H. I., Vande Wiele R. L., Lieberman S., *Biochemistry* **2**, 648 (1963).
25. Calvin H. I., Lieberman S., *Biochemistry* **3**, 259 (1964).
26. Chang E., Dao T. L., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 609 (1962).
27. Chaptal J., Jean R., Cristol P., Bonnet H., *Ann. Endocrinol.* **20**, 323 (1959).

28. Childs B., *Pediatrics* **25**, 565 (1960).
29. Clayton R. B., *Quart. Rev.* **19**, 168 (1965).
30. Constantopoulos G., Tchen T. T., *J. Biol. Chem.* **236**, 65 (1961).
31. Daughaday W. H., Mariz I. K., *Metabolism* **19**, 11 (1961).
32. Daughaday W. H., Holloszy J., Mariz I. K., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 53 (1961).
33. Decourt J., Dreyfus G., *Actualités Endocrinol.* 1962, str. 89.
34. Devis R., *Hormonologie surrenale*, red. M. Paget i L. Hartmann, Paryż 1965, str. 49.
35. Dezgraz P., V^e Symposium Ouest-Européen de Chimie Clinique, Paris, 1965. *Cyt. wg Ann. Biol. Clin.* **23**, 1060 (1965).
36. Diczfalusy E., Lauritzen C., *Oestrogene beim Menschen*, Berlin, 1961.
37. Dobriner K., Liberman S., *Ciba Found. Coll. Endocrinol.* **2**, 38 (1952).
38. Dorfman R. J., *Comp. Biochem. Physiol.* **4**, 319 (1962).
39. Eberlein W. R., Bongiovanni A. M., *J. Biol. Chem.* **223**, 85 (1956).
40. Eberlein W. R., *J. Clin. Invest.* **43**, 1255 (1964).
41. Eichhorn J., Hechter O., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **97**, 614 (1958).
42. Eichhorn J., Hechter O., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 196 (1959).
43. Ewald W., Werbin H., Chaikoff I. L., *Steroids* **3**, 505 (1964).
44. Ewald W., Werbin H., Chaikoff I. L., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 199 (1964).
45. Fishman J., Bradlow H. L., Gallagher T. F., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2273 (1959).
46. Fishman J., Bradlow H. L., Gallagher T. F., *J. Biol. Chem.* **235**, 3104 (1960).
47. Fishman J., Cox J. R., Gallagher T. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 318 (1962).
48. Flood C., Layne D. S., Ramcharon S., Rossipal E., Tait J. F., Tait S. A. S., *Acta Endocrinol.* **36**, 237 (1961).
49. Forchielli E., Dorfman R. J., *J. Biol. Chem.* **223**, 443 (1956).
50. Gandy H. M., Keutmann E. H., Izzo A. J., *J. Clin. Invest* **39**, 364 (1960).
51. Goldstein M., Gut M., Dorfman R. I., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 190 (1960).
52. Gray C. H., Greenaway J. M., Holmess N. J., Shaw D. A., *J. Endocrinol.* **24**, 199 (1962).
53. Green O. C., Migeon C. J., Wilkins L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **20**, 929 (1960).
54. Guillemin R., *Metabolism* **13**, 1206 (1964).
55. Haynes R. C., Kortiz S. B., Peron F., *J. Biol. Chem.* **234**, 1959 (1959).
56. Heard R. D., Jellinck P. H., O'Donnell V. J., *Endocrinology* **57**, 200 (1955).
57. Henry R., *Ann. Biol. Clin.* **23**, 211 (1965).
58. Isselbacher K. J., Axelrod J., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1070 (1955).
59. James V. H., Caie E., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 180 (1964).
60. Jaoude F. A., Baulieu E. E., Jayle M. F., *Acta Endocrinol.* **26**, 30 (1957).
61. Jenkins J. S., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 649 (1965).
62. Judajew N. A., *Chimiczeskije metody opredielenia steroidnych gormonów w biologiczeskich židkostiach*, Moskwa (1961).
63. Kahnt F. W., Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **38**, 1237 (1955).
64. Kahnt E. W., Neher R., Schmid K., Wettstein A., *Experientia* **17**, 19 (1961).
65. Kase N., Forchielli E., Dorfman R. J., *Acta Endocrinol.* **37**, 19 (1961).

66. Katz F. H., Lipman M. M., Frantz A. G., Jailer J. W., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 71 (1962).
67. Kawahara F. S., Wang S., Talalay P., *J. Biol. Chem.* **237**, 1500 (1962).
68. Kelly W. G., Bandi L., Lieberman S., *Biochemistry* **1**, 792 (1962).
69. Kelly W. G., Bandi L., Schollery J. N., Lieberman S., *Biochemistry* **1**, 172 (1962).
70. Kelly W. G., Bandi L., Lieberman S., *Biochemistry* **2**, 1249 (1963).
71. Knuppen R., Haupt O., Breuer H., *Biochem. J.* **96**, 33c (1965).
72. Kohler H., Hesse R., Pechet M., *J. Biol. Chem.* **239**, 4117 (1964).
73. Krawczyński J., *Post. Biochem.* **7**, 518 (1961).
74. Krüskemper H. L., Forchielli E., Ringold H. J., *Steroids* **3**, 295 (1964).
75. Langbye J., Mogensen E. F., *Acta Endocrinol.* **36**, 350 (1961).
76. Lazo-Wasem E., Zarrow M., *Endocrinology* **56**, 511 (1955).
77. Legrand I. C., *Ann. Biol. Clin.* **23**, 113 (1965).
78. Lindner H. R., Mann T., *J. Endocrinol.* **21**, 341 (1960).
79. Lipman M. M., Katz F. H., Jailer J. W., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 1268 (1962).
80. Lisboa B. P., Knuppen R., Beruer H., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 557 (1965).
81. Loke K., Marrian G., Johnson W., Meyer W., Cameron D., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 214 (1959).
82. Lombardo M. E., Hudson P. B., *J. Biol. Chem.* **229**, 181 (1957).
83. Longchamp J. E., Gual C., Ehrenstein M., Dorfman R. I., *Endocrinology* **66**, 416 (1960).
84. Longchamp J., *Exposée Ann. Bioch. Med.* **23**, 205 (1961).
85. Lucis O. J., Dynenfurth I., Venning E. H., *Canad. J. Biochem.* **39**, 901 (1961).
86. Makoff R., Roberts S., Fowler D. D., *J. Biol. Chem.* **239**, 12, (1964).
87. Marrian J. F., Watson E. J., Panattoni M., *Biochem. J.* **65**, 12 (1957).
88. Marrian G., Loke K., Watson R., Panattoni T., *Biochem. J.* **66**, 60 (1957).
89. Meio de R. H., Lewycka G., Wiserkaniuk M., Salciunas D., *Biochem. J.* **68**, 1 (1958).
90. Meyer A. S., *Experientia* **11**, 99 (1955).
91. Meyer A. S., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 441 (1955).
92. Migeon C., Sandberg A., Dreckter H., Smith D., Paul A., Samuels L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **16**, 9 (1956).
93. Migeon C., Sandberg A., Paul A., Samuels L., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **16**, 1291 (1956).
94. Migeon C. J., Waal P. E., Bertrand J., *J. Clin. Invest.* **38**, 619 (1959).
95. Miller L. L., Axelrod L. R., *Metabolism* **3**, 438 (1954).
96. Mitchel J. E., Hobkirk R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 72 (1959).
97. Morato T., Hayano M., Dorfman R. J., Axelrod L. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 334 (1961).
98. Nadel E. M., Joung B. G., Hilger A. G., Burnstein S., *J. Lab. Clin. Med.* **63**, 44 (1964).
99. Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 1171 (1960).
100. Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 623 (1960).
101. Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 1171 (1960).
102. Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 1628 (1960).
103. Nocke W., Breuer A., Knuppen R., *Acta Endocrinol.* **36**, 393 (1961).

104. Nose Y., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **233**, 1348 (1958).
105. Oertel G. W., *Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Harn*, Berlin 1964.
106. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *Experientia* **17**, 450 (1961).
107. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *J. Clin. Invest.* **41**, 981 (1962).
108. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *Experientia* **18**, 273 (1962).
109. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *J. Clin. Invest.* **41**, 987 (1962).
110. Pasqualini J. R., Lafoscade G., Jayle M. F., *Steroids* **4**, 188 (1962).
111. Pasqualini J. R., Uhrich F., Jayle M. F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **45**, 695 (1963).
112. Pasqualini J. R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **45**, 277 (1963).
113. Pasqualini J. R., Dutter F., Jayle M. F., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 331 (1963).
114. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **157**, 238 (1963).
115. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *Clin. Chim. Acta* **8**, 283 (1963).
116. Pasqualini J. R., Dutter F., Jayle M. F., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 331 (1963).
117. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *Biochem. J.* **88**, 315 (1963).
118. Pasqualini J. R., Jayle M. F., *Nature* **198**, 1095 (1963).
119. Pasqualini J. R., *Nature* **201**, 501 (1964).
120. Pasqualini J. R., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **259**, 934 (1964).
121. Pasqualini J. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 15 (1964).
122. Pasqualini J. R., *Ann. Biol. Clin.* **23**, 251 (1965).
123. Peron F., *Exposés Ann. Bioch. Med.* **22**, 185 (1960).
124. Peterson R. E., Wyngaarden J. B., Guerra S. L., Brodie B. B., Bunin J., *J. Clin. Invest.* **34**, 1779 (1955).
125. Philbert M., *Ann. Biol. Clin.* **23**, 429 (1965).
126. Prader A., Anders G. J., Habich H., *Helv. Paediat. Acta* **17**, 271 (1962).
127. Reynolds J. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **113**, 980 (1963).
128. Reynolds J. W., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 416 (1965).
129. Roberts S., Szego C. M., *Endocrinology* **39**, 182 (1956).
130. Roberts K. D., Bandi L., Calvin H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 958 (1964).
131. Rochefort G. J., Rosenberger J., Saffran M., *J. Physiol.* **146**, 105 (1959).
132. Rosenberg E., Rosenfeld G., Ungar F., Dorfman R. I., *Endocrinology* **58**, 708 (1956).
133. Ryan K. J., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 658 (1958).
134. Ryan K. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 268 (1959).
135. Ryan K. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 2006 (1959).
136. Ryan K. J., *Endocrinology*, **66**, 491 (1960).
137. Saba N., *Biosynthesis and Secretion of Adrenocortical Steroids*, Cambridge, 1960 str. 50.
138. Sandberg A., Slaunwhite W., *J. Clin. Invest.* **35**, 1331 (1956).
139. Sandberg A., Slaunwhite W., Jackson J. E., Frawley T. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 929 (1962).
140. Sandberg A. A., Slaunwhite W. R. Jr., *J. Clin. Invest.* **44**, 694 (1965).
141. Sandor T., Lanthier A., *Acta Endocrinol.* **42**, 355 (1963).
142. Savard K., *Endocrinology* **67**, 276 (1960).
143. Shimizu K., Dorfman R. I., Gut M., *J. Biol. Chem.* **235**, PC 25 (1960).
144. Shimizu K., Hayano M., Gut M., Dorfman R. I., *J. Biol. Chem.* **236**, 695 (1961).
145. Shimizu K., Gut M., Dorfman R. I., *J. Biol. Chem.* **237**, 699 (1962).

146. Schmidlin J., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 973 (1960).
147. Schmidlin J., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **45**, 331 (1962).
148. Schneider J. J., Lewbart M. L., *J. Biol. Chem.* **222**, 787 (1956).
149. Schwers J., Eriksson G., Wiquist N., Diczfalusy E., *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 313 (1965).
150. Seeman A., Saracino K. T., Gueria P., *Acta Endocrinol.* **37**, 31 (1961).
151. Sharma D. C., Forchielli E., Dorfman R. I., *J. Biol. Chem.* **237**, 1495 (1962).
152. Sharma D. C., Forchielli E., Dorfman R. I., *J. Biol. Chem.* **238**, 572 (1963).
153. Sharma D. C., Dorfman R. I., *Biochemistry* **3**, 1093 (1964).
154. Scheppard H., Swenson R., Mowles T. F., *Endocrinology* **73**, 819 (1963).
155. Siiteri P. K., Vande Wiele R. L., Lieberman S., *J. Clin. Endocr. Metab.* **23**, 588 (1963).
156. Solomon P., Levitan S., Lieberman S., *Proc. Canad. Physiol. Soc.* 20th Meeting, Montreal, 1956, str. 56.
157. Stitch S. R., Oakey R. E., Eccles S. S., *Biochem. J.* **88**, 70 (1963).
158. Supniewski J., *Post. Biochem.* **6**, 437 (1960).
159. Szego C. M., Roberts S., *J. Biol. Chem.* **221**, 619 (1956).
160. Tait J. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **23**, 1285 (1963).
161. Talalay P., Wang S. F., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 300 (1955).
162. Talalay P., *Ann. Rev. Biochem.*, red. J. M. Luck i P. D. Boyer, Palo Alto, 1965 str. 347.
163. Tomaoki B., Pincus G., *Endocrinology* **69**, 527 (1961).
164. Uete T., Venning E. H., *Endocrinology* **72**, 397 (1963).
165. Ulick S., Larach J., Lieberman S., *Trans. Assoc. Am. Physicians* **71**, 225 (1958).
166. Ulick S., Kusch K., August S. T., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4482 (1961).
167. Ulick S., Kusch Vetter K., *J. Biol. Chem.* **237**, 3364 (1962).
168. Ulick S., Kusch Vetter K., *J. Clin. Invest.* **41**, 1406 (1962).
169. Ulick S., Gauthier E., Kusch Vetter K., Markello J. K., Jaffe S., Lowe C. U., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 669 (1964).
170. Vande Wiele R. L., Mac Donald P., Gurpide E., Lieberman S., *Rec. Progr. Horm. Res.* **19**, 275 (1963).
171. Velle W., Erichsen S., *Acta Endocrinol.* **33**, 277 (1960).
172. Villee D. B., Engel L. L., Loring J. M., Villee C. A., *Endocrinology* **69**, 354 (1961).
173. Villee C. A., Loring J. M., Villee D. B., *Excerpta Med.* **51**, 143 (1962).
174. Villee D. B., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 442 (1964).
175. Wallace E. Z., Lieberman S., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **23**, 90 (1963).
176. Wang S., Kawahara F. S., Talalay P., *J. Biol. Chem.* **238**, 576 (1963).
177. Ward M. G., Engel L. L., *J. Biol. Chem.* **239**, PC 3604 (1964).
178. Weliky I., Engel L. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2089 (1962).
179. Weliky I., Engel L. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 1302 (1963).
180. Wettstein A., *Actes Soc. Helv. Sci. Nat.* 136 sess. ann. Bâle, 1956, str. 22.
181. Wettstein A., *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* **62**, 214 (1956).
182. Wettstein A., *Experientia* **17**, 329 (1961).
183. Wieland R. G. Courcy C., Hirschmann H., *Steroids* **2**, 61 (1963).
184. Wright A. A., *J. Endocrinol.* **24**, 291 (1962).
185. Wyngaarden J., Peterson R., Wolff A., *J. Biol. Chem.* **212**, 963 (1955).
186. Zander J., *Klin. Wschr.* **38**, 5 (1960).
187. Zander J., *Rev. Franc. Endocr. Clin.* **4**, 409 (1963).

MONIKA FONBERG-BROCZEK *

Przemiany trójterpenów i steroli w okresie wegetacyjnym roślin wyższych

The Metabolism of Triterpenoids and Steroles in Higher Plants during their Development

Some aspects of triterpenoides and steroles biosynthesis in higher plants are reviewed as well as the changes of levels and composition of these compounds during the development stages.

W latach pięćdziesiątych Rużiczka zaproponował teoretyczny schemat biogenezy trójterpenów i steroli opierający się na przypuszczeniu, że związki te wywodzą się od skwalenu i powstają w serii reakcji cyklizacji, przesunięć i eliminacji grup metylowych.

Wykrycie przez Lynena, Rużiczkę, Blocha, Popjaka i Folkersa (9, 16, 40, 41, 60) aktywnych jednostek pięciowęglowych: pirofosforanu kwasu mewalonowego i pirofosforanu izopentenylu pozwoliło na wyjaśnienie biosyntezy skwalenu w organizmach zwierzęcych i grzybach. Badania Nicholas'a, Capstack'a i Nesa (14, 46, 52) wskazują na podobną drogę biosyntezy tego związku w roślinach wyższych. W ostatnich latach wykryto metylowane sterole — związki o pośredniej pomiędzy sterolami i trójterpenami ilości grup metylowych, oraz połączenia steroli i trójterpenów z kwasem adenylovym i adenozyzną będące prawdopodobnie metabolitami pośrednimi biosyntezy sterydów i trójterpenów czterocyklicznych jak również pięciocyklicznych. Wyzolowanie cholesterolu z glonów morskich (67) i z ziemniaka (33) wskazuje na podobny mechanizm enzymatyczny przemian skwalenu do steroli zarówno w świecie roślinnym jak i zwierzęcym. Dane dotyczące biosyntezy i przemian trójterpenów w roślinach wyższych są fragmentaryczne, ale zdają się potwierdzać biogenetyczną teorię Rużiczki — Eschenmosera.

Rola steroli w fizjologii roślin, choć nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniona, jest powszechnie uznawana. Obecność steroli w błonie komórkowej wskazuje na ich rolę w aktywnym transporcie substancji.

* Dr, st. asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Trójterpeny natomiast zaliczane do grupy metabolitów wtórnych uważane były dotychczas za związki nie posiadające znaczenia morfogenetycznego i fizjologicznego. Jednakże niektórzy autorzy przypisywali im już dość dawno ważną rolę fizjologiczną, traktując je jako hormony roślinne aktywne w regulacji przepuszczalności błony komórkowej.

Przemiany trójterpenów i steroli w okresie wegetacyjnym zostały zbadane tylko w niewielu gatunkach roślin. We wszystkich tych pracach stwierdzono w okresie kwitnienia wzmogoną biosyntezę związków trójterpenowych i sterolowych w całej roślinie lub tylko w samych kwiatach. Przyjmuje się powszechnie, że kwitnienie jest kontrolowane przez hormon zwany florigenem. Budowa florigenu nie została dotychczas ustalona, istnieją jednak dane, że należy on do grupy sterydów (62). Zmiany jakościowe steroli obserwowane u niektórych roślin w okresie kwitnienia (42) i hamowanie kwitnienia przez inhibitory syntezy steroli (72) przemawiają na korzyść tego poglądu. Trójterpenom nie przypisuje się podobnego znaczenia. Stwierdzono jednak wielokrotnie wzmogoną ich biosyntezę w okresie kwitnienia, lub pojawianie się trójterpenów wyłącznie w kwiatach. Powyższe fakty wskazują, że również i trójterpeny mogą odgrywać pewną rolę biologiczną w procesie kwitnienia.

I. Biosynteza trójterpenów i steroli

Reguła izoprenowa mająca dziś historyczne tylko znaczenie była przez wiele lat podstawą teorii biogenezy związków terpenoidowych jak również podstawą ich klasyfikacji. Hipoteza Rużiczki sformułowana po raz pierwszy w 1921 r. rozciągnęła regułę izoprenową na terpenoidy wyższe i przyczyniła się wydatnie do poznania budowy wielu związków terpenoidowych. Pełną biogenetyczną hipotezę sformułowali Rużiczka, Eschenmoser i Heusser w 1953 r. (59). Następnie Woodward i Bloch (70) oraz Dauben (20) stwierdzili, że skwalen jest biogenetycznie spokrewniony z lanosterolem i cholesterolem. Późniejsze lata przyniosły wiele prac, których wynikiem było wykrycie aktywnej jednostki pięciowęglowej i szczegółowe wyjaśnienie wielu etapów biosyntezy prekursorów skwalenu, a także ustalenie ścisłego biogenetycznego związku między skwalenem, trójterpenami i sterolami.

Biosyntezę trójterpenów i steroli (związków trójterpenoidowych) można przedstawić w pięciu kolejnych etapach:

- 1) przemiany octanu do mewalonianu,
- 2) przemiany mewalonianu do pirofosforanu izopentenylu, który jest prawdopodobnie czynną jednostką izoprenową we wszystkich organizmach żywych,
- 3) połączenie (polimeryzacja ogon-głowa) trzech cząsteczek pirofosforanu izopentenylu dające w rezultacie pirofosforan farnezylu,

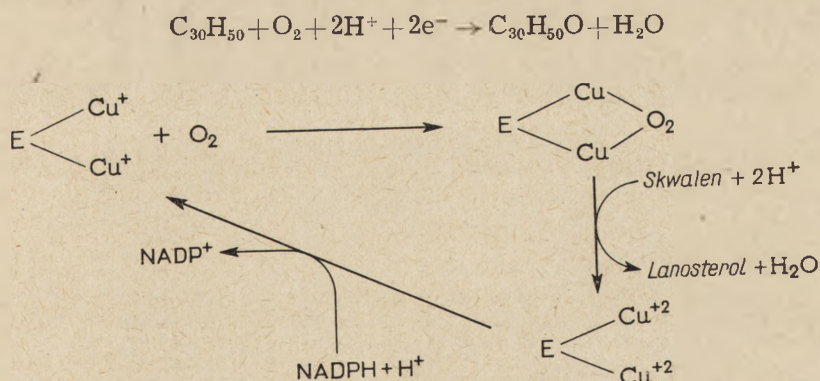
4) połączenie (ogon-ogon) dwóch reszt farnezylowych dających cząsteczkę skwalenu o symetrycznej strukturze,

5) przemiany alifatycznego prekursora (skwalenu) w odpowiednie cykliczne trójterpenoidy.

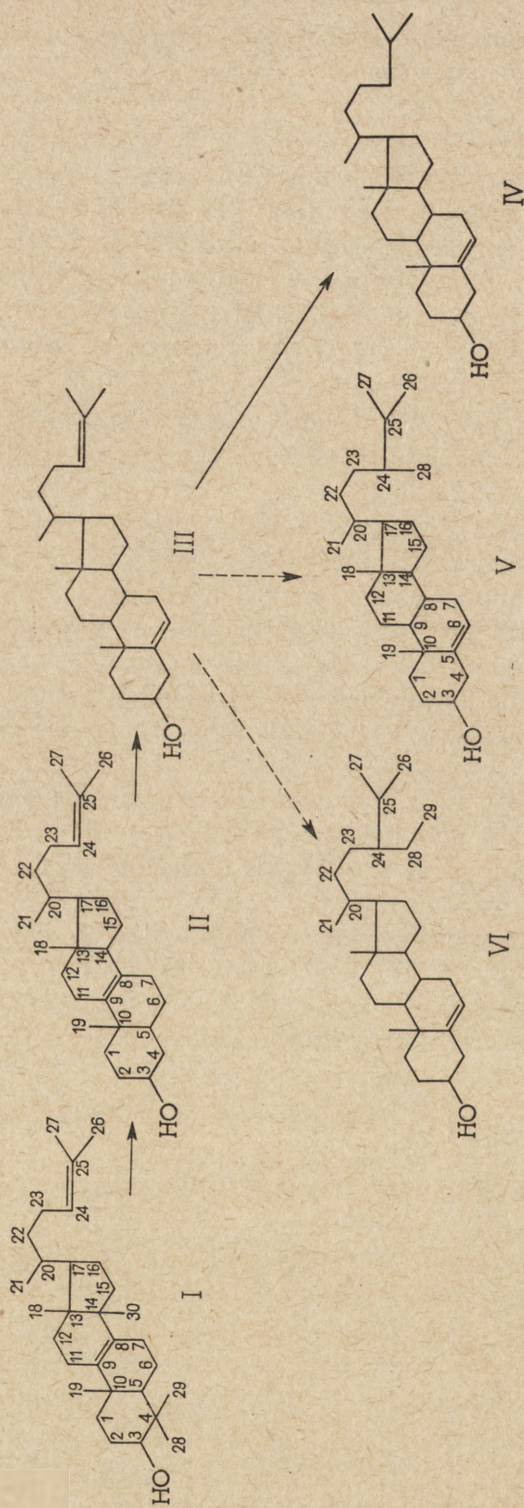
Podstawowy mechanizm biochemiczny etapów 2 i 3 został wyjaśniony przed rokiem 1960 i szczegółowo opisany (17, 32, 56, 63). Natomiast obecnie badane są stereochemiczne aspekty etapów 2—4 i 5. Szczególnie przekształcenie skwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych (faza 5) jest do dzisiaj mało zbadane, choć pewne fakty doświadczalne przemawiają na korzyść teoretycznych założeń biogenetycznej reguły izoprenowej Rużiczki (60).

Teorię tę można pokrótce sformułować w następujący sposób: Atak kationu OH^+ zapoczątkowuje biologiczną cyklizację skwalenu zachodzącą w szeregu ciągle przebiegających reakcji. Przed każdą cyklizacją łańcuch skwalenu jest specyficjnie pofalduwany: tworzy się określona sekwencja potencjalnych pierścieni sześcioczłonowych o układach krzesłowych i wannowych. To specyficzne ukształtowanie skwalenu warunkujące budowę produktów końcowych jest prawdopodobnie spowodowane przez system enzymów cyklizujących (oksydocyklazy skwalenu). Przekształcenie skwalenu zachodzi wskutek szeregu przemian na sąsiadujących ze sobą atomach węgla, tj. przyłączeń, eliminacji i przesunięć grup metylowych.

Na przedstawiony przez Rużiczkę mechanizm cyklizacji skwalenu wskazują pewne dane doświadczalne. Tchen i Bloch (64) wyizolowali preparat enzymatyczny z homogenatu wątroby wieprza, katalizujący przejście skwalenu do lanosterolu w obecności tlenu i NADPH (65), ale nie powodujący dalszych przemian do cholesterolu. Preparat ten powoduje włączanie do grupy wodorotlenowej lanosterolu O_2 a nie tlenu z H_2O na co wskazują doświadczenia z $^{18}\text{O}_2$ i H_2^{18}O . Bloch nadał enzymowi obecnemu w tym preparacie nazwę oksydocyklazy skwalenu i zaproponował następujący przebieg cyklizacji:



Rys. 1. Mechanizm działania oksydocyklazy skwalenu (wg 58a)



Rys. 2. Przemiany lanosterolu w sterole o 27, 28 i 29 atomach węgla w cząsteczce (wg 39)
Objaśnienia w tekście

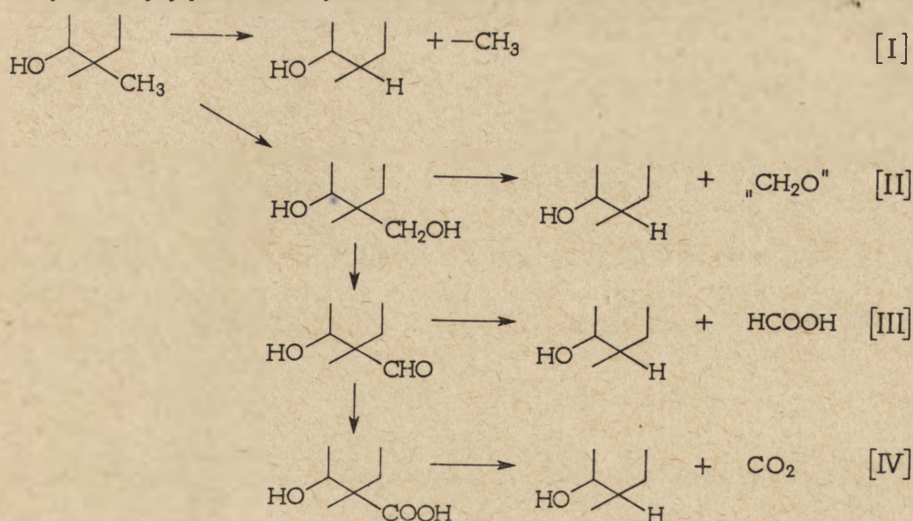
Dokładniejszy mechanizm działania tego enzymu podał T c h e n (wg 58a). Według niego aktywna oksydocyklaza zawiera 2 atomy miedzi w formie zredukowanej. Tlen cząsteczkowy powoduje utlenienie atomów miedzi i ich reakcję ze skwalenem. Redukcja enzymu do wyjściowej formy aktywnej zachodzi przy współudziale NADPH.

Biogenezę steroli i trójterpenów w roślinach wyższych w ostatnich latach badało wielu autorów (6, 8, 25, 30, 34, 51) a wyniki tych prac, prowadzonych na młodych roślinach, zdają się potwierdzać podstawowy schemat biogenezy analogiczny do drogi wykrytej uprzednio w zwierzętach i grzybach (octan \rightarrow mewalonian \rightarrow skwalen \rightarrow lanosterol). Interpretacja wyników badań nad włączaniem prekursorów do izolowanych organów roślin starszych jest nieco trudniejsza (51, 52, 53) i wskazuje, że trójterpeny pięciocykliczne powstają prawdopodobnie na osobnej drodze cyklizacji skwalenu.

Przemiana lanosterolu (I) przedstawiona na schemacie 2 polega na:

- zastąpieniu grup metylowych przy C-4 i C-14 atomami wodoru,
- izomeryzacji wiązania podwójnego Δ^{8-9} do Δ^{5-6} , tj. przemianie zymosterolu (II) na desmosterol (III),
- uwodorowaniu bocznego łańcucha (cholesterol, IV),
- wprowadzeniu dodatkowych grup metylowych w pozycję 24 desmosterolu (sterole roślinne o 28-u (V) i 29-u (VI) atomach węgla w cząsteczce).

Doświadczenia B l o c h a (55) wskazują, że z czterech teoretycznie możliwych mechanizmów eliminacji grup metylowych (przedstawionych na rysunku 3): bezpośredniego odłączania grupy metylowej przy współudziale czynnej metioniny (I), utleniania do grupy hydroksymetylowej i odłączenia jej jako aldehydu mrówkowego (II), utleniania do grupy for-

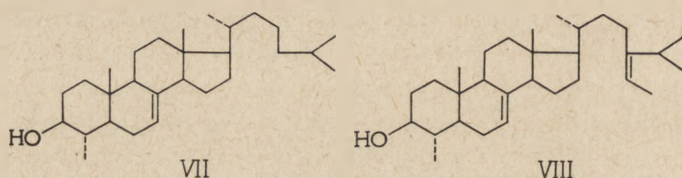


Rys. 3. Proponowane mechanizmy eliminacji grup metylowych lanosterolu
Objaśnienia w tekście

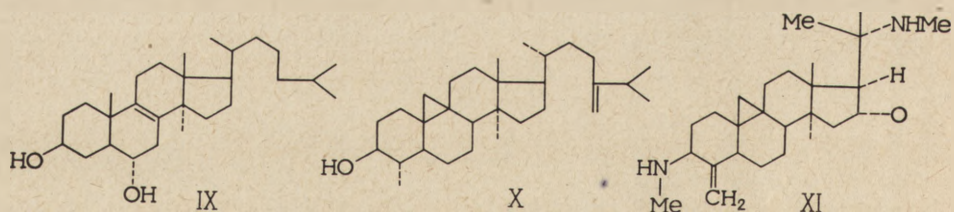
mylowej i odłączania jako kwasu mrówkowego (III) i wreszcie utleniania do grupy karboksylowej i odłączania jako dwutlenku węgla (IV), najprawdopodobniejszy jest mechanizm czwarty.

Można więc założyć, że każda z trzech grup metylowych (dwie przy C-4 i jedna przy C-14) lanosterolu jest utleniana do COOH i następnie eliminowana drogą dekarboksylacji jako CO₂. Dotychczas jednak nie wyizolowano pośrednich hipotetycznych produktów z częściowo utlenioną grupą metylową, jak również nie wyodrębniono enzymu biorącego udział w tym utlenieniu.

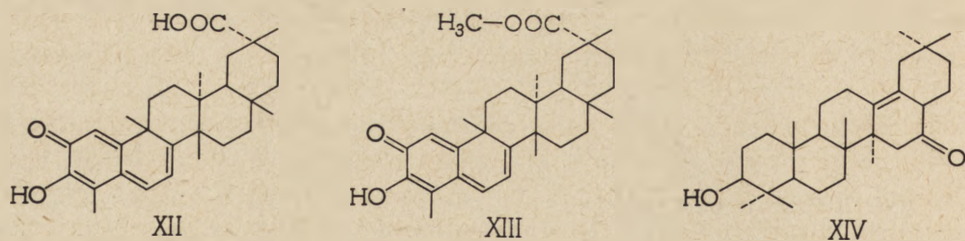
Wykrycie 4 α -metylo Δ^7 cholesterolu (VII) (metostenol) (21) i citrostadienolu (VIII) (44) sugeruje, że grupa metylowa przy C-14 ulega wcześniej eliminacji niż przy C-4.



Metostenol wykryto zarówno w świecie roślinnym (21) jak i zwierzęcym (27, 69), z materiału zwierzęcego wyizolowano również Δ^8 izomer metostenolu (35). W roślinach istnieje możliwość eliminacji grup metylowych w innej kolejności niż u zwierząt. W 1963 roku D j e r a s s i (22) w *Peniocereus macdougalli* zidentyfikował macdougallinę (IX), związek zawierający grupę metylową w pozycji C-14, który zdaniem tego autora powstaje z lanosterolu przez usunięcie grup metylowych w pozycji C-4. Obecność jednej grupy metylowej przy C-4 z jednoczesną obecnością grupy metylowej w pozycji C-14 stwierdzono w cykloeukalenolu (X) (18) i w blisko spokrewnionym z tym związkiem alkaloidzie cyklobuksynie (XI) (13).



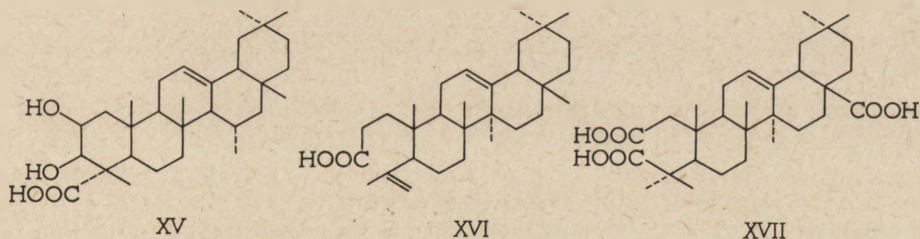
W tkankach roślinnych znaleziono również trójterpeny pięciocykliczne demetylowane w pozycji C-4 — celastrol (XII) i pristimerynę (28) oraz w pozycji C-17 — albigenię (XIV) (7).



Obecność demetylowanych trójterpenów zarówno cztero- jak i pięciocyklicznych sugeruje istnienie mechanizmów demetylujących dla obu tych grup związków.

W przeciwieństwie do wyżej omówionych reakcji demetylacji lanosterolu utlenienie i dekarboksylacja trójterpenów czterocyklicznych może dotyczyć również łańcucha bocznego, przy czym grupy metylowe przy C-4 pozostają nienaruszone (11).

Utlenianie grup metylowych trójterpenów pięciocyklicznych nie prowadzi zwykle do ich eliminacji. Wyjątkowo łatwo ulega utlenieniu do grupy karboksylowej grupa metylowa przy C-17. Wśród wszystkich pięciocyklicznych kwasów trójterpenowych istnieją zaledwie nieliczne wyjątki, w których grupa karboksylowa znajduje się przy innych węglach cząsteczki; należy do nich kwas komowy (XV) (66), który ma grupę karboksylową przy C-4 i dwie grupy hydroksylowe w pozycji C-2 i C-3. Oprócz grupy hydroksylowej przy C-3, która występuje w każdym naturalnym związku z grupy trójterpenoidów, wprowadzane są dodatkowe grupy hydroksylowe w rozmaite pozycje układu trójterpenowego (C-2, C-8, C-12, C-20). Z materiału roślinnego wyodrębniono alkohole trójterpenowe jedno-, dwu-, trój- i czterowodorotlenowe. W wyniku dalszego utleniania związków hydroksylowanych w pozycji C-2 i C-3 może dojść do otwarcia pierścienia A z wytworzeniem jednej lub dwóch grup karboksylowych. Przykładem tego typu przemian może być powstawanie kwasu nyktantowego (XVI) (4) lub oleanotrójkarboksylowego (XVII) (19).



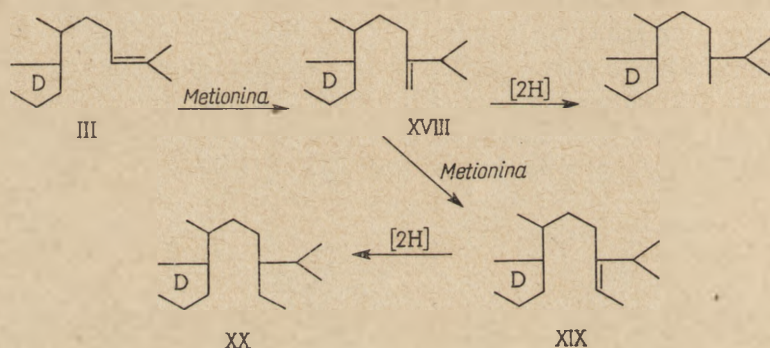
W czasie tego utleniania grupy metylowe przy C-4 i C-14 pozostają nienaruszone. Układów enzymatycznych kierujących wprowadzaniem grup funkcyjnych do trójterpenów pięciocyklicznych nie udało się do chwili obecnej wyizolować. Reakcje utleniania trójterpenów zachodzą w starszych tkankach roślinnych, w młodych roślinach występują związki zawierające zwykle jedną grupę OH.

Badania nad pochodzeniem grup metylowych, etylowych lub etylenowych występujących w łańcuchach bocznych steroli i trójterpenów czterocyklicznych wykazały, że ich donorem jest metionina. Stwierdzenie bezpośredniego wprowadzenia grupy metylowej z metioniny w pozycję 24 ergosterolu było pierwszym opisanym przypadkiem C-metylacji przy udziale tego donora (1). Następnie stosując metioninę podwójnie znakowaną w grupie metylowej ($-^{14}\text{CD}_3$) udowodniono (39), że we wszystkich

przypadkach C-metylacji w łańcuchach bocznych steroli włączają się tylko dwa atomy wodoru z grupy metylowej metioniny, natomiast w przypadku N-metylacji cała grupa $-CH_3$ metioniny ulega podstawieniu (68). Dyskutowuje się kilka mechanizmów C-metylacji (39) przy założeniu, że produktami pośrednimi mogą być:

- pochodne cyklopropanu,
- hydroksymetylopochodne,
- metylenopochodne.

Pierwszy mechanizm przyjęto przez analogię do znanego przebiegu C-metylacji kwasów tłuszczowych, a drugi przez analogię do reakcji Prinsa (71). Trzeci mechanizm wprowadzenia grupy metylowej polega na dołączeniu jej w pozycję 24 łańcucha bocznego steroli z równoczesnym przesunięciem wiązania podwójnego, co powoduje powstanie grupy metylenowej, która następnie może ulegać redukcji do grupy metylowej (39). W wyniku następnej metylacji z grupy metylenowej powstaje grupa etylenowa a przez jej redukcję — grupa etylowa. Wszystkie te przemiany przedstawia rysunek 4.



Rys. 4. Wprowadzenie dodatkowych grup metylowych w pozycję 24 łańcucha bocznego steroli (wg 39)

III — desmosterol, XVIII — 24-metylenocholesterol, XIX — fukosterol, VI* — sitosterol

Dowodów na pochodzenie obu atomów węgla grupy etylenowej z czynnej metioniny dostarczyły badania Arigonięgo (3) nad powstawaniem citrostadienolu (VIII) w soi. Autor ten stwierdził równomierne włączanie piętna z $-^{14}CH_3$ metioniny do obu atomów węgla grupy etylenowej łańcucha bocznego tego związku. Podobne rozmieszczenie piętna w grupie etylowej β -sitosterolu syntetyzowanego po podaniu radioaktywnej metioniny, stwierdzili Nicholas (54) w *Salvia officinalis* oraz Castle (15) w *Pisum sativum*. Również Bader i wsp. (5) dowiedli, że grupa etylowa spinasterolu syntetyzowanego przez *Menyanthes trifoliata* tworzy się przez kolejne przenoszenie grupy metylowej z metioniny i sugerują, że pośrednim produktem w tej reakcji może być 24-metylenopochodna. Ponadto Mercer (45) stwierdził, że zarówno w grupie winy-

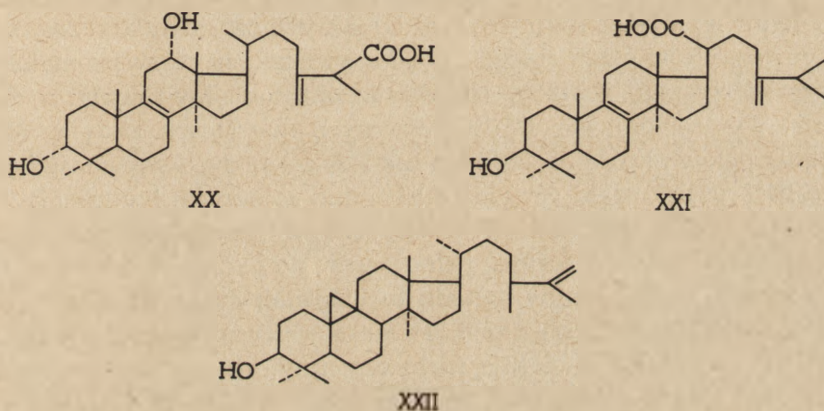
* W rysunku zamiast VI wstawiono omyłkowo XX

lowej fukosterolu (z *Fucus spiralis*) jak i w grupie etylowej β -sitosterolu (z grochu i modrzewia) syntetyzowanych w obecności metioniny podwójnie znakowanej w grupie metylowej ($-^{14}\text{CT}_3$), dwa atomy węgla i cztery atomy wodoru pochodzą z tego donora. Sugeruje to, że grupa winylowa na C-24 łańcucha bocznego steroli jest prekursorem grupy etylowej.

Lederer (39) wykrył w pyłkach kwiatowych cały szereg homologiczny steroli, które zawierają grupy metylenową, metylową, etylenową i etylową na C-24, co wskazuje na opisany wyżej mechanizm metylacji.

Równoległe doświadczenia (15, 54) z wbudowywaniem znacznej etioniny wykazały, że jest ona donorem grup etylowych tylko w niewielkim stopniu.

Wydaje się, że prekursorem steroli roślinnych jest zymosterol, natomiast takie trójterpeny, jak kwas polyporenowy (XX), eburikowy (XXI), cyklolaudenol (XXII) powstawałyby bezpośrednio z lanosterolu, który w tym przypadku byłby akceptorem grupy metylowej.



II. Zmiany poziomu i składu trójterpenów i steroli w czasie wegetacji

Od momentu kiełkowania do chwili utworzenia nowych nasion wyróżnia się podstawowe cztery stadia rozwojowe. W pierwszym z nich, w stadium kiełkowania, czynnikiem decydującym o rozwoju jest temperatura. W trzech dalszych stadiach — światło. Stadium drugie od ukazania się pierwszych liści do okresu kwitnienia jest regulowane długością okresów naświetlania. Trzecie stadium odpowiadające kwitnieniu regulowane jest składem widma świetlnego a stadium czwarte, tworzenie się nasion i owoców, jest pod kontrolą natężenia światła.

Skład jakościowy trójterpenów i steroli stosunkowo najlepiej został zbadany w nasionach zbóż. W zarodkach zbóż występują wolne lub związane estrowo sterole i trójterpeny czterocykliczne, a z trójterpenów pię-

ciocyklicznych najczęściej występuje β -amyryna. W czasie kiełkowania, trójterpenoidy, które w nasieniu stanowią frakcję przechodzącą do wyciągu eterowego, mogą pojawiać się w postaci rozpuszczalnych w wodzie połączeń, powstających prawdopodobnie w wyniku połączenia z cukrami lub nukleotydami. W ekstraktach wodnych kiełkującej kukurydzy znaleziono związki o charakterze zasad, które jak wykazał Burlet (12) przyspieszają wzrost i podział mikroorganizmów. Faudi (26) stwierdził, że działają one również na rośliny wyższe i w zależności od stężenia stymulują lub hamują podziały komórkowe. Przypuszcza się, że związki te są połączeniami trójterpenów z ADP lub ATP (10).

Pierwsze badania nad przemianą trójterpenów w okresie wegetacyjnym polegały na określeniu aktywności hemolitycznej wyciągów z materiału roślinnego. Kroeber (38) w 1929 r. zastosował tę metodę do badania zmian zawartości saponin w *Agrostemma githago* i *Saponaria officinalis* w różnych stadiach wzrostu tych roślin i stwierdził podwyższenie poziomu saponin we wszystkich organach rośliny w okresie kwitnienia. Schumann (61) w roku 1941 badał aktywność hemolityczną 19 gatunków *Primula* w ciągu całego roku i stwierdził, że pierwsze maksimum aktywności wyciągu z kłączy odpowiada okresowi kwitnienia, a drugie, znacznie wyższe, pojawia się w pierwszych miesiącach zimy w okresie tworzenia pąków, które następnego roku dadzą pędy. Aktywność hemolityczna liści wykazywała również maksimum w okresie kwitnienia. Netti (47) badał aktywność hemolityczną w poszczególnych organach *Saponaria officinalis* oznaczając jednocześnie po hydrolizie kwasowej aglikon saponiny — gipsogeninę metodą turbidymetryczną. Stwierdził on, że saponina powstaje we wszystkich organach w czasie tworzenia liści. Młode nasiona *Saponaria* zawierają mało saponiny, ale jej ilość zwiększa się w czasie dojrzewania. Największe nagromadzenie saponiny daje się zauważyć na wiosnę w kwiatach i w pąkach kłączy.

Metoda hemolityczna jest mało dokładna, zwłaszcza jeśli się ją stosuje do wyciągów roślinnych, w których oprócz saponin mogą występować inne związki wykazujące również aktywność hemolityczną. Jednakże omówione badania odnoszą się do roślin zawierających duże ilości saponin trójterpenowych, wykazujących silną aktywność hemolityczną. Ponadto Netti oznaczając równocześnie aglikon otrzymał takie same wyniki jak Schumann, który stosował wyłącznie test hemolityczny, co wskazuje na użyteczność testu hemolitycznego dla celów porównawczych.

Zastosowanie metod rozdziału chromatograficznego i oznaczenia aglikonów saponin lub wolnych terpenoidów metodami chemicznymi pozwoliło na dokładniejsze zbadanie jakościowych i ilościowych przemian tych związków w okresie wegetacji roślin.

Badania nad włączaniem znakowanych prekursorów do steroli i trójterpenów wykazały, że młode rośliny mają zdolność biosyntezy *de novo* trójterpenów i steroli. Siewki soi równolegle syntetyzują β -sitosterol, trój-

terpeny czterocykliczne i sojasapogenole (trójterpeny pięciocykliczne) (2, 3, 29). W kiełkującym grochu bardzo aktywna jest biosynteza β -amyriny, natomiast wolniej przebiega biosynteza steroli (6).

Enslin i Rehm (23, 24, 58) stosując metodę chromatograficzną i wagowe oznaczanie ilości glikozydów ustalili w swoich badaniach nad kukurbitacynami (trójterpenami czterocyklicznymi) 21 gatunków roślin z rodziny *Cucurbitaceae*, że w czasie wzrostu rośliny związki te podlegają zmianom nie tylko ilościowym, ale również jakościowym. Zarodek ziarna w stanie spoczynku nie zawiera kukurbitacyn, w młodych roślinach natomiast pojawiały się one zawsze, nawet w gatunkach, które w późniejszych stadiach rozwoju ich nie zawierały. W młodych roślinach związki te występują zawsze w postaci glikozydów. Siewki roślin rodziny *Cucurbitaceae* zawierały na ogół trzy kukurbitacyny, natomiast w roślinach dorosłych, w których „substancje gorzkie” są obecne przez cały okres wegetacji może być nawet 8 kukurbitacyn.

Nicholas i wsp. (31, 48, 49) znaleźli w młodych siewkach *Plantago major* tylko β -sitosterol i trójterpeny czterocykliczne, natomiast kwas ursolowy pojawiał się w okresie wyrastania pierwszych liści w całej roślinie, a kwas oleanolowy tylko w częściach nadziemnych w okresie kwitnienia. Najwyższy poziom glikozydów stwierdzono w kwiatach i liściach. W *Chenopodium album* badacze ci stwierdzili obecność steroli w całej roślinie od pierwszych stadiów wegetacji, natomiast kwas oleanolowy pojawiał się dopiero w okresie kwitnienia i tylko w kwiatach.

Inna praca tych samych autorów przynosi bardziej szczegółowe opracowanie zmian ilościowych i jakościowych w okresie wegetacyjnym u *Salvia officinalis* i *Ocimum basilicum* (49). Nasiona obu tych roślin w stanie spoczynku zawierają tylko sterole — głównie β -sitosterol. W *Salvia officinalis* kwasy trójterpenowe (kwasy ursolowe i oleanolowe) pojawiają się w młodych siewkach i poziom ich wzrasta w miarę wzrostu rośliny. Największe stężenie steroli i kwasu oleanolowego występuje w liściach w okresie kwitnienia, natomiast kwasów ursolowych — w kwiatach tej rośliny. Podobne zmiany zaobserwowano w *Ocimum basilicum*. W jednodniowych siewkach tej rośliny znajduje się β -sitosterol oraz związki, które dają reakcję Liebermana-Burcharda — prawdopodobnie glikozydy kwasów trójterpenowych (kwasów ursolowych i kwasu oleanolowego). W piątym tygodniu rośliny zawierają wolne sterole i kwasy ursolowe, w tym samym okresie znikają glikozydy trójterpenowe. W okresie kwitnienia podnosi się zawartość steroli, a wolny kwas ursolowy występuje we wszystkich organach nadziemnych, w największym stężeniu znajduje się on w liściach górnych pięt i kwiatach. Oprócz tego w kwiatach pojawia się kwas oleanolowy.

Badania Kasprzyk i Fonberg (36) nad rozmieszczeniem i zmianami ilościowymi trójterpenów i steroli w nogietku (*Calendula officinalis*) wykazały, że w nasionach tej rośliny znajdują się jedynie sterole

i związany glikozydowo kwas oleanolowy. Biosynteza *de novo* tych związków rozpoczyna się w siewce w momencie kiedy zaczynają zielenieć liście i zachodzi w młodych liściach do chwili osiągnięcia przez nie pełnego wzrostu. Sterole i glikozydy kwasu oleanolowego występują we wszystkich częściach rośliny w czasie całego okresu wegetacji, związkom tym towarzyszą drobne ilości β -amyryny. W okresie kwitnienia podnosi się zawartość steroli w młodych tkankach rośliny, a niektóre organy: korzeń, kwiaty i młode liście zaczynają wybiórczo gromadzić trójterpeny. W organach tych gromadzi się kwas oleanolowy związany glikozydowo, a ponadto w pąku kwiatowym powstają *de novo* alkohole trójterpenowe z grupy α -amyryny, które występują w postaci wolnej i związane estrowo. Są to alkohol jednowodorotlenowy kalendol i powstające nieco później dwuwodorotlenowe alkohole — faradiol i arnidiol. Alkohole trójterpenowe nie są transportowane do innych części rośliny. Wzrost zawartości steroli i kwasu oleanolowego w siewce jak również wzrost zawartości wszystkich związków trójterpenoidowych w kwiecie jest równoległy. Zaobserwowane fakty, mogą świadczyć o specyficznej roli trójterpenów przynajmniej w niektórych okresach wegetacji roślin, np. w okresie kwitnienia. Jednakże, jak już zaznaczono uprzednio, rola trójterpenów w fizjologii roślin nie jest wyjaśniona i zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Biosyntezę trójterpenoidów w izolowanych organach roślin badał Nicholas (50) przy użyciu znakowanych prekursorów. Stosując metodę (37) polegającą na obcinaniu pod wodą organów roślin i podawaniu znakowanego $2\text{-}^{14}\text{C}$ -octanu i mewalonianu w roztworze wodnym autor ten stwierdził, że w izolowanych organach *Salvia officinalis* (liście, łodygi, kwiaty) przebiega biosynteza *in situ* zarówno steroli jak i trójterpenów. Nicholas badał podaną powyżej metodą również kinetykę biosyntezy steroli i trójterpenów w *Salvia sclarea* (52), *Salvia officinalis* (51) i *Ocimum basilicum* (53), stosując jako prekursory $2\text{-}^{14}\text{C}$ -octan i $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mewalonian i badając następnie frakcję skwalenu, kwasów trójterpenowych i steroli. Aktywność właściwa skwalenu osiągała maksimum po 50 minutach, a aktywność steroli po 20 godzinach. Taką samą kolejność biosyntezy obserwuje się u zwierząt i grzybów. Trójterpeny natomiast (kwas oleanolowy i kwasy ursolowe) osiągają górną granicę aktywności właściwej po około trzech tygodniach. A więc w tym przypadku nie stwierdzono równoległej biosyntezy trójterpenów i steroli.

Na podstawie omówionych prac można wnioskować, że stadium kiełkowania charakteryzuje się pojawianiem steroli i trójterpenów czterocyklicznych, a czasem również β -amyryny. Związki te występują często w postaci rozpuszczalnych w wodzie glikozydów lub nukleotydów. Nawet te rośliny, które w późniejszym okresie rozwoju zawierają trójterpeny w stanie wolnym tworzą w pierwszym okresie rozwoju odpowiednie glikozydy (np. rośliny z rodziny *Cucurbitaceae*, *O. basilicum*). Młode siewki zawierają na ogół sterole i trójterpeny czterocykliczne, natomiast trój-

terpeny pięciocykliczne z wyjątkiem β -amyryny powstają później. Wydaje się, że biosynteza trójterpenów pięciocyklicznych jest związana z pojawieniem się chlorofilu w roślinach. Obecność dużej ilości glikozydów trójterpenowych w rosnących i różnicujących się tkankach roślin nasuwa przypuszczenie, że związki te odgrywają jakąś rolę fizjologiczną. W okresie kwitnienia obserwuje się syntezę i nagromadzanie nowych trójterpenów przeważnie w postaci wolnej lub związanych estrowo. Wbudowywanie znakowanych prekursorów do trójterpenoidów przez izolowane organy roślin wskazywałoby na zdolność biosyntezy *in situ* tych związków we wszystkich organach nadziemnych.

III. Uwagi końcowe

Wyniki omówionych badań wskazują, że biosynteza trójterpenów czterocyklicznych i steroli w roślinach wyższych przebiega przy udziale podobnych układów enzymatycznych jak u zwierząt i grzybów. Świadczy o tym miejsce wbudowania radioaktywnych atomów węgla prekursorów, w skwalenie, lanosterolu i sterolach. Ostatnio stwierdzono włączanie *in vivo* do trójterpenów pięciocyklicznych (β -amyryny) ^{14}C i T mewalonianu znakowanego podwójnie ($2\text{-}^{14}\text{C}\text{-}4\text{R}\text{-T}$) w stosunku 6:6 (57). Wyniki te są zgodne z biogenetyczną teorią Rużiczki-Eschenmosera.

Jednakże nie udało się do tej pory wyodrębnić z materiału roślinnego pośrednich związków między skwaleniem i lanosterolem i trójterpenami pięciocyklicznymi ani też wyizolować układów enzymatycznych katalizujących poszczególne etapy ich biosyntezy. Także dalsze przemiany trójterpenów w roślinach są w chwili obecnej mało zbadane. Wyjaśnienia wymaga również miejsce biosyntezy trójterpenów pięciocyklicznych w komórce.

Wydaje się, że zastosowanie nowych sposobów podawania roślinom znakowanych prekursorów *in vivo* oraz prowadzenie prac na homogenatach tkanek roślinnych pozwolą na rozwiązanie w najbliższych latach niektórych z wymienionych zagadnień.

Rola trójterpenów i steroli w roślinach jest w chwili obecnej zagadnieniem prawie nie wyjaśnionym. Wydaje się, że sterole oprócz swej niewątpliwiej roli w budowie błony komórkowej mogą mieć również funkcje zbliżone do roli hormonów działając w aktywnych połączeniach z innymi związkami. Podobieństwo budowy niektórych trójterpenów czterocyklicznych jak również stwierdzone *in vitro* zastępowanie steroli przez trójterpeny w błonie komórkowej sugeruje, że w roślinie związki te mogą mieć podobne znaczenie.

LITERATURA

1. Aleksander G. J., Gold A. M., Schwenk M., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2967 (1957).
2. Arigoni D., *Experientia* **14**, 153 (1958).
3. Arigoni D., Ciba Found. Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Steroles, J. and A. Churchill Ltd. Londyn 1959, str. 231.
4. Arigoni D., Barton D. H. R., Bernasconi R., Djerassi C., Mills J. S., Wolf D. E., *J. Chem. Soc.* str. 1900 (1960).
5. Bader S., Guglielmetti J., Arigoni D., *Proc. Chem. Soc.* str. 16, (1964).
6. Baisted D. J., Capstack E., Nes W. R., *Biochemistry* **1**, 537 (1962).
7. Barva A. K., Raman S. P., *Tetrahedron* **18**, 55 (1962).
8. Benned R. D., Heftmann E., Purcell A. E., Bonner J., *Science* **134**, 671 (1961).
9. Bloch K., Ciba Found. Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Steroles, J. and A. Churchill Ltd. Londyn 1959, str. 4.
10. Boiteau P., Pasich B., Ratsimamanga R. A., Les triterpenoides en physiologie vegetale et animale, Gauthier-Villars Paris 1964, str. 750.
11. Boiteau P., Pasich B., Ratsimamanga R. A., Les triterpenoides en physiologie vegetale et animale, Gauthier-Villars Paris 1964, str. 997.
12. Burlet E., *Schweiz. Allg. Path. Bact.* **13**, 5 (1950).
13. Brown K. S., Kupchan S. M., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4590 (1962).
14. Capstack E., Baisted D. J., Newschwander W. W., Blondin G., Nes W. R., *Biochemistry* **1**, 1178 (1962).
15. Castle M., Blondin G., Nes W. R., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3306 (1963).
16. Cornforth J. W., Cornforth R. M., Popjak G., Gore J. Y., *Biochem. J.* **69**, 146 (1958).
17. Cornforth J. W., *J. Lipid. Res.* **1**, 3 (1959).
18. Cox J. S. G., King F. E., King T. J., *J. Chem. Soc.* str. 514 (1959).
19. Crowley J. K., *Proc. Chem. Soc.* str. 27 (1962).
20. Dauben W. G., Abraham S., Hotta S., Chaikoff I. L., Bradlow H. L., Soloway A. H., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3038 (1963).
21. Djerassi C., Krakower G. W., Lemin A. J., Liu L. H., Mills J. S., Villotti R., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6284 (1958).
22. Djerassi C., Knight J. C., Wilkinson D. I., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 835 (1963).
23. Enslin P. R., Rehm S., *J. Sci. Fed. Agr.* **8**, 687 (1957).
24. Enslin P. R., Rehm S., Rivet D. E. A., *J. Sci. Food Agr.* **8**, 673 (1957).
25. Euw J. W., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **47**, 711 (1964).
26. Faudi J. G., Thèse, Strasbourg 1957, cyt. wg 10, str. 750.
27. Franz J. D., Dawidson A. G., Dulit E., *Fed. Proc.* **15**, 255 (1956).
28. Grant P. K., Johnson A. W., Juby P. F., King T. J., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 549 (1960).
29. Gusiewa A. R., Passechniczenko W. A., Borkina M. G., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **133**, 228 (1960).
30. Heftmann E., *Am. Rev. Plant Physiol.* **14**, 225 (1963).
31. Hiltibran R. C., Wadkins C. L., Nicholas H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5125 (1953).
32. Jachymczyk W., *Post. Biochem.* **9**, 91 (1963).
33. Johnson D. F., Bennet R. D., Heftmann E., *Science* **140**, 198 (1963).
34. Johnson D. F., Heftmann E., Haughland G. V. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **194**, 102 (1964).
35. Kandutsch A. A., Russel A. E., *J. Biol. Chem.* **235**, 2253 (1961).

36. Kasprzyk Z., Fonberg M., Komunikat na IV Zjeździe FEBS, kwiecień 1966.
37. Korotkov G., Barker H. J., *Am. J. Botany* **35**, 12 (1948).
38. Kroeber H., *Heil. u. Ges. Pfl.* **12**, 131 (1929).
39. Lederer E., *Experientia* **20**, 473 (1964).
40. Lynen F., Proc. of International Symposium of Enzyme Chemistry, Maruzen Co Tokyo 1958, str. 57.
41. Lynen F., Ciba Found. Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Steroles. J. and A. Churchill Ltd. Londyn 1959, str. 95.
42. Marker R. E., Wagner R. B., Ulshafer P. R., Wittbecker E., Goldsmith D. P. J., Ruof C. H., *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1199 (1943).
43. Mason H. S., *Adv. Enzymol.* **19**, 79 (1957).
44. Mazur Y., Weizman A., Sondheimer F., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1007 (1958).
45. Mercer B. J., *Biochem. J.* **96**, 17p (1965).
46. Nes W. R., Rosin N. L., 6-th International Congress of Biochemistry New York 1964, Abstr. VII, str. 588.
47. Netien G., Thèse Lyon 1935, 354, cyt. wg 10, str. 755.
48. Nicholas H. J., Wadkins C. L., Hiltibran R. C., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 495 (1955).
49. Nicholas H. J., *J. Pharm. Sci.* **50**, 645 (1961).
50. Nicholas H. J., *J. Pharm. Sci.* **50**, 623 (1961).
51. Nicholas H. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 1476 (1962).
52. Nicholas H. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 1480 (1962).
53. Nicholas H. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 1485 (1962).
54. Nicholas H. J., Moriarty S., *Fed. Proc.* **22**, 529 (1963).
55. Olson J. A., Lindberg M., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **226**, 94 (1957).
56. Popjak G., Cornforth J. W., *Adv. Enzymol.* **22**, 281 (1960).
57. Rees H. H., Mercer E. I., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **96**, 30p (1965).
58. Rehm S., Enslin P. R., Meeuse A. D. J., Wessels J. H., *J. Sci. Food Agric.* **8**, 687 (1957).
- 58a. Richards J. H., Hendrikson J. B., The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins, W. A. Benjamin Inc, New York 1964, str. 280.
59. Rużiczka L., Eschenmoser A., Heusser H., *Experientia* **9**, 375 (1953).
60. Rużiczka L., *Proc. Chem. Soc.* str. 341 (1959).
61. Schumann G., *Arch. Pharm.* **279**, 67 (1941).
62. Siegelmann H. W., Hendricks S. B., Bortwick H. A., *Proc. Intern. Seeds Test. Assoc. Copenhagen* **22**, 1 (1956).
63. Tchen T. T., Metabolic Pathways, red. Greenberg, Academic Press, New York 1960, str. 389.
64. Tchen T. T., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **226**, 921 (1957).
65. Tchen T. T., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **226**, 931 (1957).
66. Thomas A. F., *Tetrahedron* **15**, 212 (1961).
67. Tsudak K., Agaki S., Kischida Y., Hayatsu R., Sakai K., *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* **6**, 724 (1958).
68. Du Vigneaud V., Rachele J. R., White A. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5131 (1956).
69. Wells W. H., Neiderhiser D. H., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6569 (1957).
70. Woodward R. B., Bloch K., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2023 (1953).
71. Yang N. C., Yang D. D. H., Ross B. C., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 133 (1959).
72. Zeeraart J. A. D., Environmental Control of Plant Growth, red. L. T. Evans, New York 1963, str. 289.

III Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych Warszawa

W dniach 4—7 kwietnia odbył się w Warszawie III Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych zorganizowany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne. W zjeździe wzięło udział 1570 osób w tym 545 z Polski i 1025 z zagranicy. Uczestnicy reprezentowali ośrodki naukowe wszystkich krajów Europy oraz szeregu krajów zamorskich.

W ramach Zjazdu odbyło się Sympozjum na temat struktury i funkcji elementów genetycznych (zorganizowane przez D. Shugara), Kollokwium o biochemii mitochondriów (zorganizowane przez E. C. Slatera, L. Wojtczaka i Z. Kaniugę) oraz Kollokwium o biochemii płytek krwi (zorganizowane przez E. Kowalskiego i S. Niewiarowskiego). Ponadto na licznych równoległych posiedzeniach przedstawiono 303 doniesienia z różnych dziedzin biochemii.

Zjazd został otwarty sesją inauguracyjną w sali kongresowej Pałacu Kultury i Nauki. Na sesji odczytano list do uczestników Przewodniczącego Komitetu Nauki i Techniki Wicepremiera E. Szyra, przemówienia powitalne wygłosili Prezes Polskiej Akademii Nauk J. Groszkowski i Prezydent Międzynarodowej Unii Biochemicznej S. Ochoa, a P. Grabar wygłosił wykład pt. Immunochemia białek.

W obradach Sympozjum przedstawiono 16 referatów programowych obejmujących całokształt współczesnej wiedzy o molekularnych mechanizmach dziedziczenia. Szczególnym zainteresowaniem cieszyła się sesja o kodzie genetycznym, na której referaty wygłosili H. Khorana, S. Ochoa i H. Mathaei. Kollokwium o biochemii mitochondriów zgromadziło wielu najwybitniejszych badaczy z tej dziedziny. Przedstawili oni nowe wyniki badań nad mechanizmem fosforylacji oksydatywnej i interesujące hipotezy dotyczące mechanizmu magazynowania energii. Referaty E. C. Slatera i H. Krebsa wzbudziły żywe zainteresowanie. Kollokwium o płytkach krwi było pierwszym spotkaniem biochemików zajmujących się tą nową i dynamicznie rozwijającą się dziedziną. Zagadnienia biochemii płytek krwi omówiono wszechstronnie począwszy od metabolizmu nukleotydowego płytek (T. H. Spaet) aż do roli lizosomów w funkcji płytek (E. Kowalski). Szczegółowe sprawozdanie ze Zjazdu ukaże się w czwartym zeszytcie tego tomu *Postępów Biochemii*.

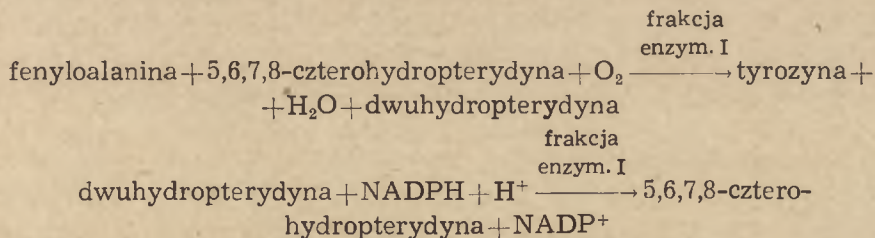
KRYSTYNA BEŁŻECKA *

Zaburzenia biochemiczne w fenyloketonurii

The Biochemic Lesions in Phenylketonuria

The metabolism of phenylalanine, the interference of phenylalanine or its metabolites with enzymic systems and the pathogenesis of the mental defect in phenylketonuria are discussed.

Z hydroksylacją fenyloalaniny wiąże się występowanie wrodzonego bloku metabolicznego zwanego fenyloketonurią (*Oligophrenia phenylpyruvica*). Mechanizm hydroksylacji fenyloalaniny u zwierząt omówiono w oddzielnym artykule w *Postęпах Biochemii* 8, 475 (1962). Blok metaboliczny w fenyloketonurii polega na braku w wątrobie frakcji enzymatycznej I, która w obecności czterohydropterydyny utlenia fenyloalaninę do tyrozyny, natomiast obecna jest frakcja II układu hydroksylującego, katalizująca przy udziale NADPH_2 redukcję nieczynnej dwuhydropterydyny do jej formy aktywnej 5,6,7,8-czterohydropterydyny.



W roku 1934 Fölling (15) po raz pierwszy znalazł w moczu niektórych dzieci upośledzonych umysłowo znaczne ilości kwasu fenylopirogronowego. Od tego czasu zidentyfikowano szereg innych przypadków fenyloketonurii i rozpoczęto szerokie badania biochemiczne i genetyczne nad wyjaśnieniem tego zagadnienia. Jervis (20) w 1947 roku stwierdził w przypadkach fenyloketonurii zablokowanie przemiany fenyloalaniny do tyrozyny. Wykazał on, że u ludzi zdrowych podawanie fenyloalaniny prowadzi do wyraźnego podniesienia się poziomu tyrozyny we krwi, natomiast u chorych na fenyloketonurię zjawisko to nie występuje. Udenfriend i Bessman (43) podawali doustnie znaczącą ^{14}C -fenyloala-

* Dr, adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie.

ninę zdrowym i chorym na fenyloketonurię a następnie izolowali z białek osocza tyrozynę i fenyloalaninę i oznaczali ich radioaktywność właściwą. Stosunek aktywności tyrozyny do aktywności fenyloalaniny, przyjęty jako wskaźnik stopnia przekształcenia fenyloalaniny w tyrozynę, wykazywał u osób zdrowych wartości 10 razy wyższe niż u chorych. W roku 1953 Jervis (22) stwierdził bezpośrednio w wyciągach z wątroby uzyskanych przy sekcji zwłok osób chorych brak aktywności hydroksylazowej. Badaną aktywność wykazywały natomiast wyciągi z wątrób osób zdrowych. Wyniki te potwierdzili później Wallace, Moldave i Meister (45) stosując do badań próbki wątroby uzyskane przez biopsję. W roku 1957 Mitoma, Auld i Udenfriend (32) stwierdzili, że w wątrobie chorych na fenyloketonurię brak jest frakcji enzymatycznej I.

Blok enzymatyczny powoduje u chorych wzrost zawartości fenyloalaniny w osoczu do 20—60mg⁰/₀ (4, 7, 9, 25), podczas gdy u osób zdrowych aminokwas ten występuje w stężeniu rzędu 1,5mg⁰/₀. Zwiększone do 7mg⁰/₀ ilości fenyloalaniny stwierdzono również w płynie mózgowo-rdzeniowym, co stanowi przyrost tego samego rzędu jaki spotyka się we krwi (9, 19).

W moczu chorych na fenyloketonurię wydala się fenyloalanina (21) jak również szereg jej metabolitów. Wiadomo obecnie, że obok kwasu fenylopirogronowego, pierwszego metabolitu znalezionego w nadmiernych ilościach w moczu, regularnie występują także kwas fenylo mlekowy (13, 21, 50) oraz fenyloacetyloglutamina (49). Ilość tych substancji waha się w zależności od diety i wagi pacjenta, w granicach 0,5—2g na dobę. W moczu chorych wykryto ponadto kwas o-hydroksyfenylooctowy wydalany w ilości 0,1—0,4g na dobę oraz kwasy: indoloctowy i indolmlekowy w ilościach 0,02—0,15g na dobę (2, 3). Podano również, że wydalanie kwasów: p-hydroksyfenylo mlekowego i p-hydroksyfenylooctowego może nieco wzrosnąć (10).

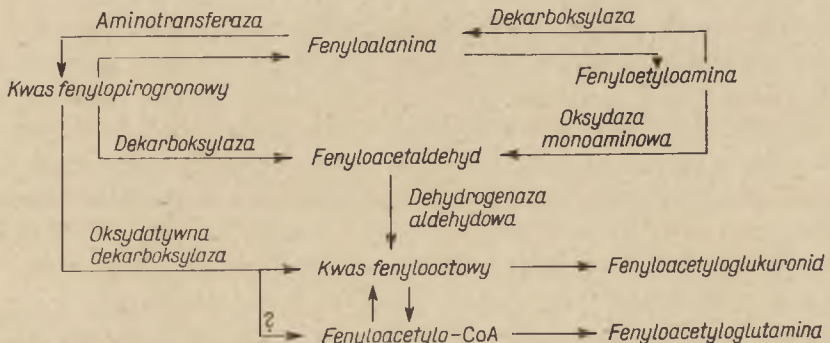
Kwas fenylopirogronowy stanowiący 1/3 wydalanych metabolitów fenyloalaniny jest jedynym związkem, którego obecność stwierdzono również we krwi w ilości 0,31—1,78mg⁰/₀ oraz w pocie 6—56mg⁰/₀ (21). W moczu pojawia się on w momencie, gdy poziom fenyloalaniny we krwi przekroczy 15mg⁰/₀. Kwas fenylopirogronowy może powstawać z fenyloalaniny pod działaniem oksydazy L-aminokwasów lub na drodze transaminacji. Dowód na znaczenie transaminacji w tworzeniu się tego kwasu uzyskali Meister i wsp. (31), którzy stwierdzili 40% zmniejszenie się wydalania kwasu fenylopirogronowego po podaniu pacjentom dużych ilości glutaminy. Kwas glutaminowy i asparagina powodowały ten sam efekt, choć w mniejszym stopniu. Otrzymane wyniki tłumaczą autorzy przesunięciem równowagi reakcji transaminacji na skutek zwiększonego stężenia dawcy grup α-aminowych. Dotąd brak danych na temat aktywności aminotransferazy fenyloalaninowej w fenyloketonurii wrodzonej.

Niewiele stosunkowo wiadomo również o tworzeniu się kwasu fenylo-
mlekowego, stanowiącego 1/5 wydalanych metabolitów fenyloalaniny.
Jego konfiguracja L wskazuje na to, że może on powstawać z kwasu feny-
lopirogronowego pod działaniem dehydrogenazy mleczanowej w nerkach
lub innych tkankach. Me i s t e r (28) stwierdził, że krystaliczna dehy-
drogenaza L-mleczanowa z serca wołu redukuje ketokwasy odpowiadające
większości naturalnych aminokwasów.

Wyjaśnienie drogi powstawania wydalanego kwasu fenylooctowego
w postaci fenyloacetyloglutaminy napotkało na duże trudności. Dobrze
poznana oksydacyjna dekarboksylacja α -ketokwasów nie została dla kwa-
su fenylopirogronowego stwierdzona *in vitro*. Można przypuszczać, że
analogicznie do przekształcenia kwasu pirogronowego do acetylo-CoA
tworzy się fenyloacetylo-CoA. M o l d a v e i M e i s t e r (34) wykazali,
że preparaty z ludzkiej wątroby i nerki katalizują powstawanie fenylo-
acetyloglutaminy z glutaminy i fenyloacetylo-CoA. M e i s t e r (30)
stwierdził nawet, że w skrawkach wątroby otrzymanych przez biopsję od
pacjenta z fenyloketonurią, powstawanie fenyloacetyloglutaminy odbywa
się znacznie szybciej niż w wątrobie człowieka zdrowego. Kwas fenylo-
octowy mógłby również tworzyć się z kwasu fenylopirogronowego pod
działaniem zwykłej dekarboksylazy a następnie dehydrogenazy alde-
hydowej. Trzecią możliwą drogą powstawania kwasu fenylooctowego jest
jego tworzenie się poprzez produkt dekarboksylacji fenyloalaniny — fe-
nyloetyloaminę, która z kolei pod wpływem oksydazy monoaminowej
przekształca się w aldehyd fenylooctowy a następnie pod działaniem de-
hydrogenazy aldehydowej w kwas fenylooctowy.

Możliwe drogi metaboliczne tworzenia się kwasu fenylooctowego w fe-
nyloketonurii ilustruje schemat 1 podany przez L y m a n a (27).

Jakkolwiek nie ulega wątpliwości, że podstawowym zaburzeniem bio-
chemicznym występującym w fenyloketonurii jest brak frakcji enzyma-



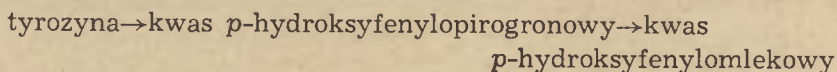
Schemat 1. Możliwe drogi metaboliczne tworzenia się kwasu fenylooctowego w fe-
nyloketonurii (wg 27)

Reprodukowane z F. L y m a n, Phenylketonuria, 1963, za pozwoleniem wydawcy Charles C
Thomas Publisher, Springfield, Illinois

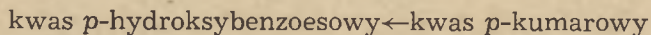
tycznej hydroksylującej fenyloalaninę w pozycji *para*, to jednak pozostaje szereg niewyjaśnionych aspektów tego schorzenia.

Dotychczas nie jest znany mechanizm tworzenia się kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego. Obecność w moczu chorych zwiększonych ilości kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego można nawet uważać za bardziej charakterystyczną dla fenyloketonurii niż wydalanie kwasu fenylopirogronowego. Przy 15mg⁰/₁₀₀ stężeniu fenyloalaniny w osoczu kwas *o*-hydroksyfenylooctowy wydalany jest w moczu w ilościach 50—60mg, podczas gdy kwasu fenylopirogronowego przy tym stężeniu fenyloalaniny nigdy nie stwierdzono. Prekursorem dla kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego jest fenyloalanina (44) i wydalana jego ilość jest proporcjonalna do poziomu fenyloalaniny w osoczu dorosłych chorych na fenyloketonurię (3). Kwas *o*-hydroksyfenylooctowy może powstawać również z *o*-tyrozyny oraz z kwasu fenylopirogronowego. Podanie doustne fenylopirogronianu sodowego powoduje zwiększone wydalanie kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego (41). Hydroksylaza fenyloalaninowa otrzymana z wątroby wprowadza grupę -OH specyficznie w położenie *para* do reszty alaniny. Jest możliwe, że istnieją inne mechanizmy przeprowadzające reakcję hydroksylacji w położeniu *orto*, przy czym mogą one nabierać znaczenia dopiero wówczas, gdy normalna droga przekształcania się fenyloalaniny jest zablokowana.

Metabolitem fenyloalaniny pojawiającym się również w zwiększonych ilościach w moczu chorych na fenyloketonurię jest kwas hipurowy (16). Wydaje się, że kwas benzoesowy może powstać z fenyloalaniny w sposób podobny do stwierdzonego przez B o o t h a i wsp. (8) przekształcenia tyrozyny do kwasu *p*-hydroksybenzoesowego u szczurów i królików wg sugerowanego ciągu reakcji:



↓



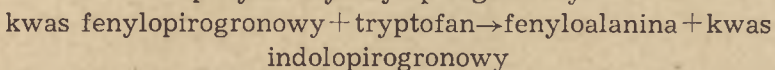
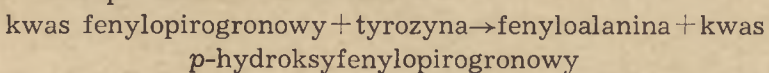
Do nieprawidłowości drugorzędowych występujących w fenyloketonurii należy zaliczyć przede wszystkim ograniczone powstawanie melanin (12, 29, 33). Przyczyną tego zaburzenia może być hamowanie przez nagromadzoną fenyloalaninę i jej metabolity enzymu tyrozynazy — miedzioproteidu, który katalizuje przejście tyrozyny w 3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę (DOPA) z równoczesnym utlenieniem do DOPACHINONU, pierwszego związku na drodze syntezy barwników melaninowych.

Z ostatnich badań N a g a t s u, L e v i t t a oraz U d e n f r i e n d a (35) wynika, że DOPA może powstać z tyrozyny nie tylko pod działaniem tyrozynazy. Autorzy wyizolowali z nadnerczy wołu inną hydroksylazę tyrozyny i stwierdzili, że kofaktorem jej jest czterohydropterydyna, co może wskazywać na analogię tego układu enzymatycznego z hydroksylazą fe-

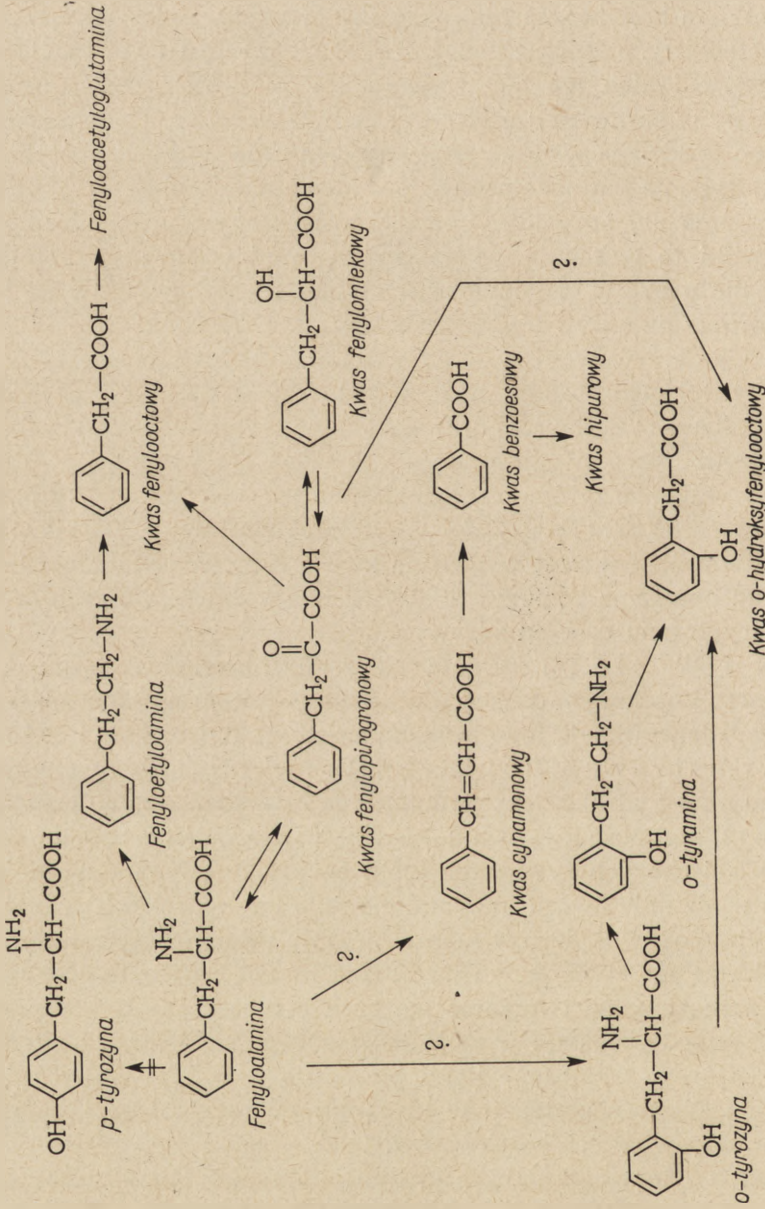
nyloalaninową. Obecność tej hydroksylazy tyrozyny stwierdzono w rdzeniu nadnerczy i mózgu zwierząt. Zmniejszone tworzenie się u chorych na fenyloketonurię noradrenaliny i adrenaliny, wykazane przez Weil-Malherbe (46) mogłoby być w świetle badań Nagatsu i wsp. wynikiem hamowania hydroksylazy tyrozyny przez fenyloalaninę oraz jej metabolity. Jednak z badań Boylena i Quastela (11) wynika, że fenyloalanina nie ma wpływu na biosyntezę ^{14}C -adrenaliny z ^{14}C -tyrozyny w skrawkach nadnerczy świnki morskiej. Dodanie fenylopirogrońianu sodowego w ilości porównywalnej do poziomu spotykanego we krwi chorych na fenyloketonurię powodowało natomiast 50% zahamowanie tworzenia się adrenaliny przy równoczesnym gromadzeniu się DOPA. Wyniki te wskazują, że przyczyną zmniejszonego powstawania adrenaliny może być w fenyloketonurii hamujące działanie kwasu fenylopirogrońowego na aktywność dekarboksylazy DOPA.

Zaburzenia obserwowane w fenyloketonurii dotyczą również dekarboksylacji 5-hydroksytryptofanu, o czym świadczy zmniejszony poziom serotoniny w osoczu chorych (37) oraz wydalanie zmniejszonych ilości kwasu 5-hydroksyindolooctowego w moczu. Z badań Davisona i Sandlera (14) wynika, że zarówno fenyloalanina jak i jej metabolity hamują *in vitro* aktywność dekarboksylazy 5-hydroksytryptofanu. Baldridge i wsp. (5) stwierdzili wzrost wydalania kwasu 5-hydroksyindolooctowego w przypadku obniżenia poziomu fenyloalaniny w osoczu chorych oraz po podaniu L-tryptofanu osobom zdrowym.

Berry i Woolf (6) zwrócili uwagę na obecność związku, który interferował w ilościowym oznaczeniu kwasu fenylopirogrońowego w moczu chorych. Identyfikacją tego związku zajęli się Boscott i Bickel (10) oraz Armstrong i Robinson (1), stwierdzając w moczu znaczne ilości kwasu *p*-hydroksyfenylomlekowego i *p*-hydroksyfenylooctowego a następnie (2) obecność kwasu indolomlekowego i indolooctowego. Badając moczu dzieci chorych żywionych dietą pozbawioną fenyloalaniny zauważono, że wydalanie kwasu indolomlekowego i *p*-hydroksyfenylomlekowego zmniejszało się dopiero w momencie, gdy poziom fenyloalaniny był na tyle niski, że nie stwierdzono wydalania kwasu fenylopirogrońowego. Wyniki te wskazują, że tworzenie się tych aromatycznych pochodnych kwasu mlekowego pozostaje w związku z obecnością kwasu fenylopirogrońowego, którego wzmożone ilości powodują prawdopodobnie przesunięcie równowagi transaminacji w kierunku tworzenia się z tyrozyny i tryptofanu odpowiednich ketokwasów.



Przy udziale dehydrogenazy mleczanowej nerek kwas *p*-hydroksyfenylopirogrońowy ulega następnie redukcji do kwasu *p*-hydroksyfenylo-



Schemat 2. Metabolizm fenylalaniny w fenylloketonurii (wg 27)
 Reprodukowane z F. L y m a n, Phenylketonuria, 1963, za zezwoleniem wydawcy Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois

mlekowego, natomiast kwas indolopirogronowy — do kwasu indolomlekowego. Wydaje się natomiast, że powstawanie kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego oraz indolooctowego odbywa się pod działaniem flory jelitowej.

Wyżej podany schemat 2 cytowany przez Lymana (27) ilustruje wadliwy metabolizm fenyloalaniny w fenyloketonurii.

Wydaje się, że charakterystyczne dla fenyloketonurii upośledzenie umysłowe, jako konsekwencja tego zaburzenia metabolicznego, spowodowane jest wysokim stężeniem fenyloalaniny lub jej metabolitów. Hipoteza o wbudowywaniu u chorych na fenyloketonurię dodatkowej fenyloalaniny do białka hemoglobiny okazała się niesłuszna z chwilą stwierdzenia, że białko hemoglobiny (23) jak również białka osocza tych chorych (24) nie wykazują różnic strukturalnych w porównaniu z osobnikami zdrowymi.

Zaburzenia w normalnym funkcjonowaniu mózgu mogą być rezultatem zakłócenia wewnątrzkomórkowej równowagi aminokwasów, spowodowanego nadmiarem fenyloalaniny w tkankach (26). Dotychczas jednak nie przeprowadzono w przypadkach fenyloketonurii analizy wolnych aminokwasów w mózgu lub innych tkankach.

Brak zależności pomiędzy zawartością fenyloalaniny we krwi oraz ilością kwasu fenylopirogronowego i fenyloamlekowego w moczu a stopniem inteligencji chorych wskazuje, że związki te nie mają bezpośrednio działania toksycznego.

Woolf i Vulliamy (47, 48) sugerują, że kwas fenylooctowy jest odpowiedzialny za zaburzenia psychiczne obserwowane w fenyloketonurii. Hipotezę tę wysunęli autorzy opierając się na wynikach prac Sherwina i Kennarda (40), którzy po podaniu dorosłym zdrowym osobnikom 5g dawki kwasu fenylooctowego stwierdzili takie objawy jak pragnienie, nudności, senność i zawroty głowy. Podanie chorym dzieciom nawet dużych dawek kwasu fenylooctowego było jednak jak się wydaje, bez wpływu.

Kwas fenylooctowy mógłby również działać toksycznie poprzez odciąganie z mózgu glutaminy do tworzenia wydalanego z moczem połączenia — fenyloacetyloglutaminy.

Istotne znaczenie dla wywołania zaburzeń funkcji mózgowych mogą mieć również aminy. Obecności *o*-tyraminy — prekursora kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego nie stwierdzono jednak dotychczas w płynach ustrojowych u chorych. Stwierdzono natomiast znaczne zwiększenie wydalenia fenyloetyloaminy po podaniu chorym na fenyloketonurię inhibitorów oksydazy monoaminowej takich jak: β -fenyloizopropylhydrozyna, nialamid, izokarboksyazyd oraz pargylina (18, 36). Badania Perry'ego i wsp. (39) nie wykazały obecności amin w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych nawet po podaniu inhibitorów. Możliwe jednak, że aminy nie są transportowane *in vivo* z mózgu do płynu mózgowo-rdzeniowego.

Stwierdzone u chorych na fenyloketonurię obniżenie poziomu serotoniny mogłoby mieć związek z upośledzeniem umysłowym. Rola serotoniny nie jest jeszcze dobrze poznana, wydaje się jednak, że amina ta ma znaczenie dla funkcji centralnego systemu nerwowego. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem serotoniny we krwi a stopniem inteligencji u chorych (38). Wyjaśnienie tego zagadnienia przez podanie serotoniny chorym jest niewykonalne ze względu na stwierdzoną niezdolność tego związku do przekroczenia bariery krew—mózg.

Kompetytywne hamowanie dekarboksylazy kwasu glutaminowego przez pochodne fenyloalaniny, które wykazał *in vitro* Hanson (17) a następnie potwierdził Tashian (42), może mieć duże znaczenie dla tworzenia kwasu γ -aminomasłowego w mózgu. Stężenia substratów stosowane w tych doświadczeniach były jednak wyższe niż spodziewane *in vivo*.

Z przytoczonych hipotez patogenezy zaburzeń umysłowych towarzyszących fenyloketonurii wynika, że odpowiedzialny za wywołane zmiany może być jeden lub kilka związków toksycznych. Całkowite wyjaśnienie tego problemu ułatwi w przyszłości leczenie fenyloketonurii, które w chwili obecnej polega na ograniczeniu fenyloalaniny w diecie chorych do podstawowego minimum niezbędnego do normalnej syntezy białka.

LITERATURA

1. Armstrong M., Robinson K., *Fed. Proc.* **13**, 175 (1954).
2. Armstrong M., Robinson K., *Arch. Biochem.* **52**, 287 (1954).
3. Armstrong M., Shaw K., Robinson K., *J. Biol. Chem.* **213**, 797 (1955).
4. Armstrong M., Low N., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **94**, 142 (1957).
5. Baldrige R., Borofsky L., Baird H., Reichle F., Bullock D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **100**, 529 (1959).
6. Berry J., Woolf L. *Nature* **169**, 202 (1952).
7. Bickel H., Gerrard J., Hickmans E., *Acta Paed.* **43**, 64 (1954).
8. Booth A., Masri M., Robbins D., Emerson O., Jones F., De Eds F., *J. Biol. Chem.* **235**, 2649 (1960).
9. Borek E., Brecher A., Jervis G., Waelsch H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **75**, 86 (1950).
10. Boscott R., Bickel H., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5**, 380 (1953).
11. Boylen J., Quastel J., *Biochem. J.* **80**, 644 (1961).
12. Dancis J., Balis M., *Pediatrics* **15**, 63 (1955).
13. Dann M., Marples E., Levine S., *J. Clin. Invest.* **22**, 87 (1943).
14. Davison A., Sandler M., *Nature* **181**, 186 (1958).
15. Fölling A., *Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's* **227**, 169 (1934).
16. Grümer H., *Nature* **189**, 63 (1961).
17. Hanson A., *Acta Chem. Scand.* **13**, 1366 (1959).
18. Jepson J., Lovenberg W., Zaltzman P., Oates J., Sjoerdsma A., Udenfriend S., *Biochem. J.* **74**, 5P (1960).
19. Jervis G., Block R., Bolling D., Kanze E., *J. Biol. Chem.* **134**, 105 (1940).
20. Jervis G., *J. Biol. Chem.* **169**, 651 (1947).

21. Jervis G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **75**, 83 (1950).
22. Jervis G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **82**, 514 (1953).
23. Jervis G., *Diseases of nervous system, Monograph Suppl.* **18**, 93 (1957).
24. Keup W., *Monatsschr. Psychiatr. Neurol.* **130**, 299 (1955).
25. Knox W., Edwards S., *J. Biol. Chem.* **216**, 489 (1955).
26. Knox W., Hsia D., *Amer. J. Med.* **22**, 687 (1957).
27. Lyman F., Phenylketonuria, Charles C Thomas publ., Springfield, Illinois, USA, 1963.
28. Meister A., *J. Biol. Chem.* **197**, 309 (1952).
29. Meister A., *Pediatrics* **21**, 1018 (1958).
30. Meister A., *Pediatrics* **21**, 1021 (1958).
31. Meister A., Udenfriend S., Bessman S., *J. Clin. Invest.* **35**, 619 (1956).
32. Mitoma Ch., Auld R., Udenfriend S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **94**, 634 (1957).
33. Miyamoto M., Fitzpatrick T., *Nature* **179**, 199 (1957).
34. Moldave K., Meister A., *J. Biol. Chem.* **229**, 463 (1957).
35. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **239**, 2910 (1964).
36. Oates J., Nirenberg P., Jepson J., Sjoerdsma A., Udenfriend S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 1078 (1963).
37. Pare C., Sandler M., Stacey R., *Lancet* **1**, 551 (1957).
38. Pare C., Sandler M., Stacey R., *Arch. Dis. Childhood* **34**, 422 (1959).
39. Perry T., Shaw K., Walker D., *Nature* **189**, 926 (1961).
40. Sherwin C., Kennard K., *J. Biol. Chem.* **40**, 260 (1919).
41. Tashian R., *Science* **129**, 1553 (1959).
42. Tashian R., *Metabolism* **10**, 393 (1961).
43. Udenfriend S., Bessman S., *J. Biol. Chem.* **203**, 961 (1953).
44. Udenfriend S., Mitoma C., Symposium on amino acid metabolism, John Hopkins Press, Baltimore, 1955, str. 876.
45. Wallace H., Moldave K., Meister A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **94**, 632 (1957).
46. Weil-Malherbe H., Blood adrenaline and intelligence, w Biochemistry of the developing nervous system, Acad. Press, New York, 1955, str. 458.
47. Woolf L., *Biochem. J.* **49**, ix-x (1951).
48. Woolf L., Vulliamy D., *Arch. Dis. Childhood* **26**, 487 (1951).
49. Woolf L., Griffiths R., Moncrieff A., *Brit. Med. J.* **1**, 57 (1955).
50. Zeller E., *Helv. Chim. Acta* **26**, 1614 (1943).

Komitet Organizacyjny
XVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
w Lublinie

Komunikat Nr 1

W porozumieniu z Zarządem Głównym PTM uprzejmie zawiadamiamy, że

ZJAZD
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
odbędzie się w Lublinie we wrześniu 1967 r.

PROGRAM ZJAZDU :

Otwarcie Zjazdu: Przemówienie Przewodniczącego Zarządu Głównego.

- 1 dzień obrad. Przed południem posiedzenie plenarne, temat: »Genetyka i zmienność, z uwzględnieniem kierowanego metabolizmu drobnoustrojów«. Po południu — obrady w sekcjach.
- 2 dzień obrad. Przed południem — posiedzenie plenarne, temat: »Współczesne zagadnienia immunologii«. Po południu — obrady w sekcjach.
- 3 dzień obrad. Przed południem — posiedzenie plenarne, temat: »Biochemia i biofizyka wirusów«. Po południu — obrady w sekcjach.

Projektuje się obrady popołudniowe w następujących sekcjach:

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| 1. Mikrobiologia ogólna. | 5. Mikrobiologia rolna. |
| 2. Mikrobiologia lekarska. | 6. Wirusologia. |
| 3. Mikrobiologia weterynaryjna. | 7. Immunologia. |
| 4. Mikrobiologia przemysłowa. | 8. Mikrobiologia wody i ścieków. |

Komitet Organizacyjny prosi, ażeby zgłoszenia doniesień na Zjazd zostały nadesłane do dnia 30 listopada 1966 wraz z następującymi danymi:

- a) imię i nazwisko, stanowisko, adres uczestnika Zjazdu,
- b) temat komunikatu (10 minut),
- c) wskazanie do której sekcji doniesienie powinno być włączone.

Sekretarz
Komitetu Organizacyjnego Zjazdu
Dr M. Tuszkiewicz

Przewodniczący
Komitetu Organizacyjnego Zjazdu
Prof. Dr J. Parnas

Adres Komitetu:
Lublin, Katedra Mikrobiologii Lek. A. M.
ul. Lubartowska 85

Na posiedzeniu Zarządu Głównego PTM w dniu 28.V.66 r. uchwalono dodatkowo, że w ramach XVI Zjazdu odbędzie się czwarte posiedzenie plenarne pt. „Ekologia gleby”.

TERESA LASKOWSKA-KLITA *

Przemiana kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego

The Metabolism of *p*-hydroxyphenylpyruvic Acid

The main metabolic pathway as well as other oxidative and reductive path of *p*-hydroxyphenylpyruvic acid are discussed.

Kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy jest produktem transaminacji tyrozyny. Może on ulegać w ustroju zarówno utlenianiu jak i redukcji.

I. Utlenianie kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego

Znane są dwie drogi utleniania tego związku. Produktem pierwszej jest kwas homogentyzynowy, produktem drugiej kwas *p*-hydroksyfenylooctowy. Lepiej poznana i ilościowo przeważająca jest pierwsza reakcja, katalizowana przez oksydazę kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego i stanowiąca ogniwo w łańcuchu przemian, w których tyrozyna utlenia się do CO₂ i H₂O.

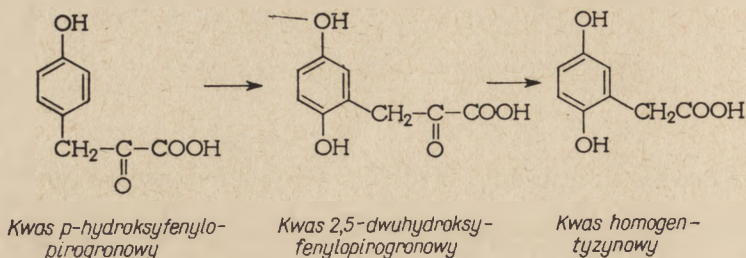
Powstawanie kwasu homogentyzynowego. Oksydaza kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego zwana również hydroksylazą kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego (E.C. 1.14.2.2) katalizuje następującą reakcję:
kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy + kwas askorbinowy + O₂ → kwas homogentyzynowy + kwas dehydroaskorbinowy + H₂O

W reakcji tej zachodzi równocześnie hydroksylacja pierścienia, przesunięcie łańcucha bocznego i jego tlenowa dekarboksylacja.

Pierwsze badania prowadzone przez Knox a i Le May - Knox a (10) wskazywały, że produktem pośrednim reakcji mógłby być kwas 2,5-dwuhydroksyfenylopirogronowy, ponieważ związek ten był utleniany przez wyciąg z wątroby. Badania te były zgodne ze schematem reakcji proponowanym w roku 1909 przez Neuba u e r a (15).

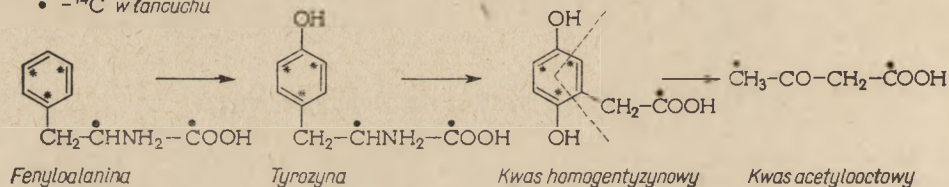
* Dr, starszy asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Warszawie.

W tym ujęciu przejście kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego w kwas homogentyzynowy następuje w dwu etapach, pierwszy obejmuje dołączenie grupy hydroksylowej do pierścienia i przesunięcie łańcucha bocznego, drugi zaś dekarboksylację tlenową powstałego związku.



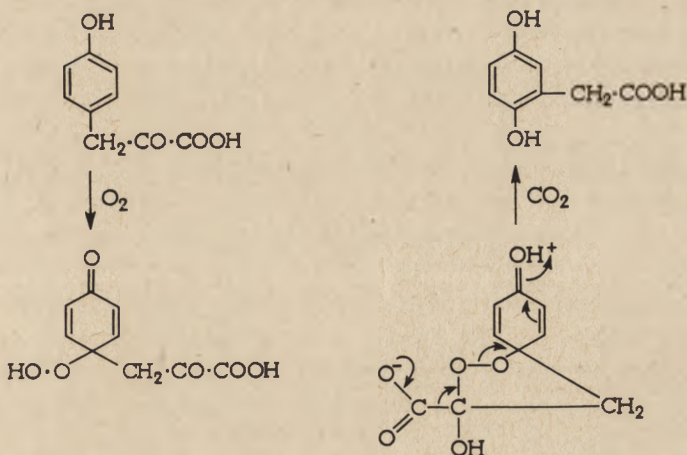
Przemieszczanie się łańcucha potwierdziły wyniki Schepartz a i G u r i n a (17) uzyskane w doświadczeniach izotopowych *in vivo*. Jeżeli podawano szczurom fenyloalaninę znakowaną ^{14}C w pozycji C-1, C-3 i C-5 pierścienia odnajdowano izotop w grupie metylowej kwasu acetylooctowego, co wskazuje na przesunięcie łańcucha bocznego przy pierścieniu.

- * ^{14}C w pierścieniu
- ^{14}C w łańcuchu



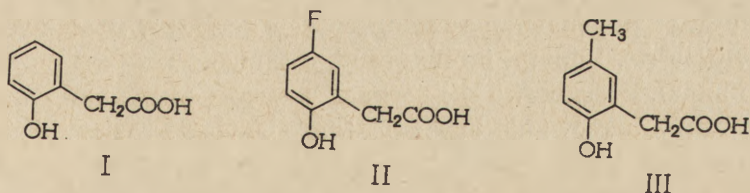
Natomiast w doświadczeniach z fenyloalaniną znakowaną ^{14}C w łańcuchu wykazano izotop w grupie $-\text{COOH}$ kwasu acetylooctowego. Jednak nie udało się wykazać powstawania kwasu 2,5-dwohydroksyfenylopirogronowego w toku zachodzącej reakcji enzymatycznej (5, 12). Badania prowadzone w pracowni K n o x a (5, 8) i przez L a D u i Z a n n o n i (12) w latach 1955—1957 nie potwierdziły udziału dwóch enzymów w przebiegu tej reakcji. Wyniki prac K n o x a (8) nad oczyszczaniem hydroksylazy z wątroby wieprzowej oraz analiza katalizowanej przez nią reakcji wykazały, że przejście kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego w kwas homogentyzynowy jest, mimo złożoności procesu, reakcją jednoetapową zachodzącą przy udziale jednego enzymu. Nie stwierdzono również powstawania, jako związku pośredniego w reakcji, kwasu 2,5-dwohydroksyfenylopirogronowego, ani też nie udało się wykazać utleniania tego kwasu przez oczyszczone preparaty hydroksylazy. Być może, że powstaje on przejściowo na powierzchni białka enzymu i jest natychmiast dalej utleniany, nie występuje więc w stanie wolnym.

W roku 1963 D a l y i W i t k o p p (4) zaproponowali inny mechanizm reakcji katalizowanej przez hydroksylazę kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego (rysunek 1)



Rys. 1. Mechanizm reakcji katalizowanej przez hydroksylazę kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego, proponowany przez Daly'ego i Witkoppa (4)

Zakładają oni konieczność występowania w substracie grupy hydroksylowej w położeniu *para*, która brałaby udział w przegrupowaniach wewnątrzcząsteczkowych zachodzących podczas reakcji. Jednakże badania Taniguchi i Armstronga (23) nie potwierdzają konieczności występowania grupy $-OH$. Autorzy ci wykazali, że kwas fenylpirogronowy i jego 4-fluoro- i 4-metylo- pochodne mogą być utleniane do kwasów 2-hydroksyfenylooctowego (I), 5-fluoro- (II) oraz 5-metylo-2-hydroksyfenylooctowego (III) przez oczyszczoną hydroksylazę kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego, mimo że żaden z tych związków nie posiada grupy hydroksylowej w położeniu *para* do łańcucha bocznego. Prawdopodobnie zatem grupa $-OH$ pomaga w przyłączeniu się substratu do aktywnego centrum enzymu i ułatwia reakcję, ale nie jest potrzebna do jej zapoczątkowania.



Jak zauważyli Knox i Le May-Knox (10) hydroksylaza kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego jest hamowana przez nadmiar substratu, a dodanie kwasu askorbinowego zapobiega zahamowaniu. Obserwacje te potwierdzono następnie w pracowniach La Du i Sealocka (11, 18). Aktywność tego enzymu w wątrobie świnek morskich jest *in vitro* taka sama zarówno u zwierząt chorych na szkorbut jak i normalnych. Dopiero po dootrzewnowym obciążeniu kwasem *p*-hydroksyfenylopirogronowym

zwierząt z awitaminozą C aktywność hydroksylazy spada do jednej trzeciej, czego nie obserwuje się u zwierząt zdrowych (30). Kwas L-askorbinowy zapobiega zatem w organizmie hamowaniu hydroksylazy przez nadmiar wprowadzonego substratu. *In vitro* kwas L-askorbinowy można zastąpić innym związkiem jak kwas izoaskorbinowy lub 2,6-dwuchlorofenyloindofenol (12), który w stanie zredukowanym w obecności glutationu lub cysteiny jest znacznie bardziej aktywny zwłaszcza w preparatach oczyszczonych (31). Śladową początkowo aktywność hydroksylazy kwasu p-hydroksyfenylopirogrońskiego u płodów i nowonarodzonych szczurów narastającą w pierwszych dniach życia, można było zwiększyć kilkakrotnie *in vitro* przez dodanie 2,6-dwuchlorofenyloindofenolu. Związek ten uczynnia także preparaty enzymatyczne, które straciły aktywność w wyniku długotrwałego przechowywania (7, 16). Podobne działanie aktywujące *in vitro* wykazują również inne związki o strukturze p-chinoidowej (29), mianowicie tionina i błękit toluidynowy w postaci zredukowanej.

Związkiem aktywującym hydroksylazę *in vitro* i *in vivo* jest występujący fizjologicznie w organizmach ubichinon, koenzym Q₁₀, który w obecności kwasu askorbinowego ma formę zredukowaną. U zwierzęcia chorego na skorbut wstrzyknięcie ubichinonu po doustnym obciążeniu tyrozyną zapobiega wydalaniu z moczem kwasu p-hydroksyfenylopirogrońskiego (31, 33). Również kwas foliowy zapobiega *in vivo* hamowaniu hydroksylazy kwasu p-hydroksyfenylopirogrońskiego przez nadmiar substratu, nie chroni jednak enzymu *in vitro*. Nie wiadomo czy przyczyną tego jest mała trwałość zredukowanej formy kwasu foliowego *in vitro*, czy też związek ten *in vivo* działa nie wprost lecz poprzez inne czynniki układu (32).

Mechanizm ochronnego działania substancji redukujących jest nadal nie wyjaśniony. Być może utrzymują one w stanie zredukowanym aktywne centrum enzymu, lub jakiś składnik układu, zapobiegając tym samym zmianom zachodzącym przy nadmiarze substratu, czy też powstawaniu z substratu pochodnych hamujących enzym.

Hamowanie enzymu przez związki rtęciowe i zniesienie tej inhibicji przez glutation przemawiałoby za obecnością grup -SH istotnych dla działania enzymu (5). Silnymi inhibitorami enzymu są również czynniki chelatujące metal. Początkowo sugerowano obecność jonów Cu²⁺ w cząsteczce enzymu (5), hamowanie bowiem dwuetylodwutiokarbaminianem ustępuje po dodaniu jonów Cu²⁺ (12). Ostatnie badania Goswami (6) wskazują jednak, że metalem związanym z białkiem enzymu jest raczej Fe²⁺ niż Cu²⁺. Z wyników doświadczeń Goswami wnioskuje, że z cząsteczki tlenu biorącej udział w reakcji jeden atom przyłącza się do substratu, a drugi pobiera elektrony z Fe²⁺ i łącząc się z wodorem daje cząsteczkę wody. Utlenienie żelaza w cząsteczce hydroksylazy powoduje prawdopodobnie jej inaktywację.

Taniguchi i wsp. (22) w roku 1963 wysunęli hipotezę, że hydroksylaza kwasu p-hydroksyfenylopirogrońskiego jest enzymem o dwóch

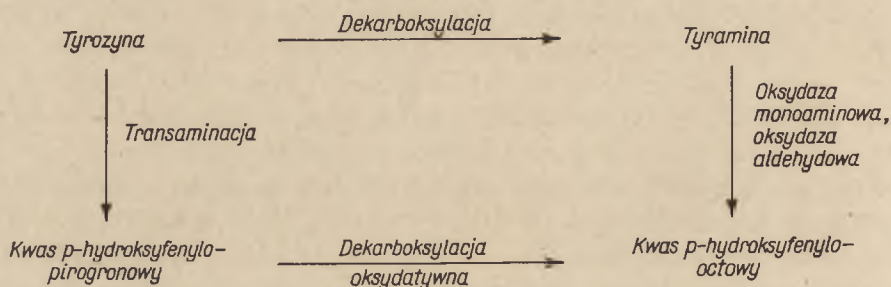
centrach aktywności. Jedno z nich brałoby udział w utlenianiu kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego do kwasu homogentyzynowego a drugie — w utlenianiu kwasu fenylpirogronowego do kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego. Hipotezę tę oparto na następujących obserwacjach. Podczas oczyszczania obie aktywności znajdowano w tych samych frakcjach białkowych. Czas potrzebny do inaktywacji cieplnej i wielkość tej inaktywacji w różnych temperaturach były dla obu aktywności te same. W obydwu przypadkach niezbędna jest obecność tlenu atmosferycznego oraz dużych ilości substancji redukującej jak kwas askorbinowy czy zredukowany 2,6-dwuchlorofenylindofenol. Obie reakcje hamowane są odwracalnie przez nadmiar substratu oraz przez czynniki kompleksujące metal.

Hipoteza o dwóch centrach aktywności jest szczególnie interesująca ze względu na występowanie kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego w moczu chorych na fenylketonurię. Dotychczas nie jest znany mechanizm powstawania tego związku w organizmie zwierzęcym. Po podaniu szczurom ¹⁴C-fenylalaniny stwierdzano w moczu obecność znakowanego kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego w ilościach proporcjonalnych do stężenia fenylalaniny w osoczu (23). Zwiększone wydalanie tego kwasu obserwowano również po obciążeniu kwasem fenylpirogronowym (1, 24). Kwas *o*-hydroksyfenylooctowy powstawać może po obciążeniu również z *o*-tyrozyny (25). Hipoteza *Taniguchi* wyjaśnia mechanizm powstawania kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego. Powstający z fenylalaniny kwas fenylpirogronowy byłby substratem dla drugiego centrum aktywności hydroksylazy kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego. Nagromadzający się u chorych na fenylketonurię kwas fenylpirogronowy wydalalby się z moczem po utlenieniu przez hydroksylazę do kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego.

Powstawanie kwasu p-hydroksyfenylooctowego. W roku 1952 *Kirberger i Bücher* (9) po doustnym i dootrzewnowym obciążeniu królików tyrozyną bądź też kwasem *p*-hydroksyfenylopirogronowym znajdowali w moczu kwas *p*-hydroksyfenylooctowy. Autorzy stwierdzili, że przemianie tej ulega około 1% podanej tyrozyny oraz około 40% kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego. W roku 1956 *Armstrong i wsp.* (2) wyizolowali ten związek z moczu ludzi zdrowych. Po podaniu kwasu *p*-metylopirogronowego izolowano z moczu królików kwas *p*-metylofenylooctowy połączony z glicyną (25). Z moczu szczurów obciążonych *p*-tyraminą izolowano kwas *p*-hydroksyfenaceturowy (połączony z glicyną kwas *p*-hydroksyfenylooctowy) (14).

Kwas *p*-hydroksyfenylooctowy powstawać może dwiema różnymi drogami. Może on być albo produktem dekarboksylacji oksydatywnej kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego, albo też może powstać z *p*-tyraminy pod działaniem kolejno dwóch enzymów oksydazy monoaminowej i oksydazy aldehydowej (patrz schemat 1). Zagadnienie powstawania kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego wyjaśniają doświadczenia *Willia*m-

s a i Babuscio ze związkami znakowanymi ^{14}C (28). U szczura 1% znakowanej tyrozyny zostaje utleniony do kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego wydalanego z moczem. Główna jego część, to znaczy 68%, powstaje w wyniku dekarboksylacji oksydatywnej kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego, zaś 32% z *p*-tyraminy.



Schemat 1. Powstawanie kwasu *p*-hydroksyfenylooctowego

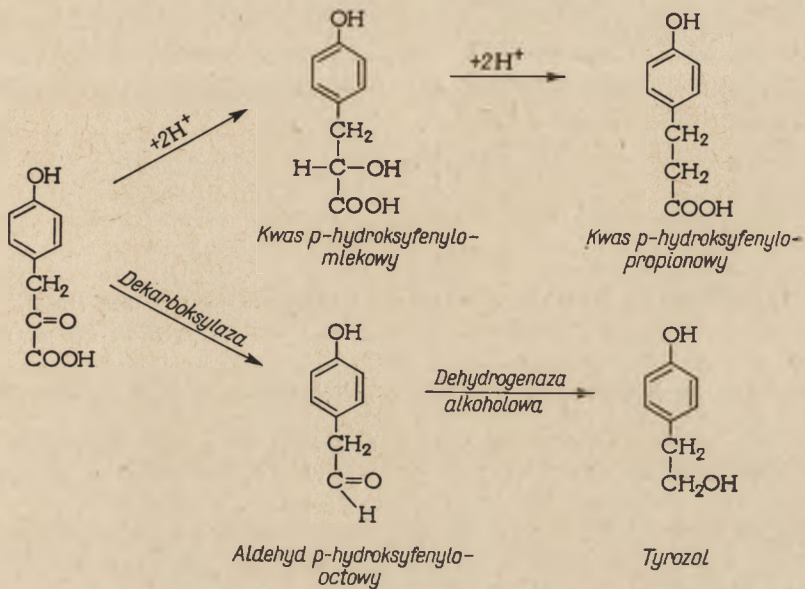
Mechanizm oraz układ enzymatyczny katalizujący dekarboksylację oksydacyjną kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego są zupełnie nieznanne. Brak jest również doświadczeń *in vitro* nad tym procesem, wszystkie dotychczasowe doświadczenia były przeprowadzane *in vivo*.

II. Redukcja kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego

Znane są dwie reakcje redukcji kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego. Jedna prowadzi do powstania kwasu *p*-hydroksyfenylopropionowego poprzez kwas *p*-hydroksyfenylomlekowy. Druga poprzedzana przez dekarboksylację zwykłą prowadzi do tyrozolu.

Powstawanie kwasu p-hydroksyfenylopropionowego. Me i s t e r w roku 1950 (13) badając aminotransferazę tyrozyny w wątrobie szczura zauważył, że powstający w reakcji kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy ulega redukcji przy udziale zredukowanego NAD do kwasu *p*-hydroksyfenylomlekowego. Autor przypuszczał, że enzymem katalizującym tę redukcję nie jest dehydrogenaza mleczanowa, bowiem oczyszczone preparaty tego enzymu w bardzo niewielkim procencie redukowały kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy. Weber i wsp. w roku 1964 (27) sugerowali, że w tkankach ssaków znajduje się dehydrogenaza zależna od NAD, która towarzyszy dehydrogenazie mleczanowej. Enzym ten miałby katalizować redukcję aromatycznych ketokwasów. W roku 1965 Skye i Ebner (21) frakcjonując siarczanem amonowym i etanolem dehydrogenazę mleczanową wątroby szczura oraz preparat handlowy tego enzymu z mięśnia sercowego, uzyskali wyniki potwierdzające przypuszczenie o istnieniu swoistego enzymu katalizującego redukcję kwasu *p*-hydroksyfenylopiro-

gronowego. W roku 1960 Booth i wsp. (3) w badaniach nad metabolizmem fenolowych pochodnych tyrozyny znaleźli w moczu szczura i królika kwas *p*-hydroksyfenylolekowy oraz kwas *p*-hydroksyfenylopropionowy. Obciążenie kwasem *p*-hydroksyfenylopirogronowym powodowało znaczne zwiększenie wydalania obu kwasów.



Rys. 2. Redukcja kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego

Powstawanie kwasu *p*-hydroksyfenylopropionowego obserwowano nie tylko u kręgowców. Sekeris i Karlson (19) podczas inkubacji tyrozyny z homogenatem larw *Calliphora* wykazał powstawanie obok innych związków również kwasu *p*-hydroksyfenylopropionowego. Brak jednak bliższych danych na temat mechanizmu tej reakcji.

Powstawanie tyrozolu. Sentheshaminganathan i Eldsen w roku 1958 (20) badali powstawanie tyrozolu przy udziale wyciągu z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy jest przez dekarboksylazę drożdżową przeprowadzany w aldehyd *p*-hydroksyfenylooctowy, który następnie jest redukowany do alkoholu. Redukcję tę katalizuje dehydrogenaza alkoholowa, a dawcą atomów wodoru jest zredukowany NAD.

Do niedawna sądzono, że tyrozol jest alkoholem powstającym tylko u mikroorganizmów, jednak ostatnio Nakajima i Sano (14) wykazali obecność tego związku w moczu szczurów. Nie wiadomo jednak, czy mechanizm powstawania tyrozolu u szczura jest taki sam jak u drożdży.

Uwagi końcowe

Główną drogą przemiany powstającego w procesie transaminacji tyrozyny kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego jest spalanie poprzez kwas homogentyzynowy do CO₂ i H₂O.

Pewna część tego kwasu może być metabolizowana również w inny sposób, a produkty przemian wydalane są z moczem. Uboczne drogi przemiany kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego nie są jednak jeszcze dokładnie poznane. Bliższych danych na ten temat dostarczą być może badania nad stanami patologicznymi, w których nagromadzają się produkty metabolizmu tego kwasu.

LITERATURA

1. Armstrong M. D., Shaw K. N. F., *J. Biol. Chem.* **213**, 805 (1955).
2. Armstrong M. D., Shaw K. N. F., Wall P. E., *J. Biol. Chem.* **218**, 293 (1956).
3. Booth A. N., Masri M. S., Robbins D. J., Emerson O. H., Jones F. T., De Eds F., *J. Biol. Chem.* **235**, 2649 (1960).
4. Daly J. W., Witkop B., *Angew. Chem. Intern. Ed.* **2**, 421 (1963).
5. Edwards S. W., Hsia D. J. J., Knox W. E., *Fed. Proc.* **14**, 206 (1955).
6. Goswami H. N. D., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 390 (1964).
7. Goswami H. N. D., Knox W. E., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 35 (1961).
8. Hager S. E., Gregerman R. J., Knox W. E., *J. Biol. Chem.* **225**, 935 (1957).
9. Kirberger E., Bücher T., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 294 (1952).
10. Knox W. E., Le May-Knox M., *Biochem. J.* **49**, 686 (1951).
11. La Du B. N. Jr., Greenberg D. H., *Science* **117**, 111 (1953).
12. La Du B. N., Zannoni V. G., *J. Biol. Chem.* **217**, 777 (1955).
13. Meister A., *J. Biol. Chem.* **184**, 117 (1950).
14. Nakajima T., Sano J., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 37 (1964).
15. Neubauer O., *Deut. Arch. Klin. Med.* **95**, 211 (1909).
16. Roka L., König G., Rubner H., *Z. Physiol. Chem.* **313**, 87 (1958).
17. Schepartz B., Gurin S., *J. Biol. Chem.* **180**, 663 (1949).
18. Sealok R. R., Goodland R. L., *Science* **114**, 645 (1951).
19. Sekeris C. E., Karlson P., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 103 (1962).
20. Sentheshaminganathan S., Eldsen S. R., *Biochem. J.* **69**, 210 (1958).
21. Skye II G. E., Ebner K. E., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 331 (1965).
22. Taniguchi K., Armstrong M. D., *J. Biol. Chem.* **238**, 4091 (1963).
23. Taniguchi K., Kappe T., Armstrong M. D., *J. Biol. Chem.* **239**, 3389 (1964).
24. Tashian R. E., *Science* **129**, 1553 (1959).
25. Udenfriend S., Mitoma C., w Symposium on amino acid metabolism. red. W. D. McElkoy and M. B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore 1955, str. 876.
26. Umerwa K., Sakamoto Y., Ichihara K., *J. Biochem. (Tokyo)* **46**, 479 (1959).
27. Weber W. W., Zannoni V., La Du B. N., *Fed. Proc.* **23**, 475 (1964).
28. Williams C. M., Babuscio A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 393 (1961).
29. Zannoni V. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 1172 (1962).

30. Zannoni V. G., La Du B. N., *J. Biol. Chem.* **234**, 2925 (1959).
31. Zannoni V. G., La Du B. N., *J. Biol. Chem.* **235**, 165 (1960).
32. Zannoni V. G., Jacoby G. A., Malawista S. E., La Du B. N., *J. Biol. Chem.* **237**, 3506 (1962).
33. Zannoni V. G., Jacoby G. A., La Du B. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 220 (1962).

HANNA WEHR *

O lipoproteidach surowicy

Serum Lipoproteins

Data concerning the classification, chemical composition and physiological role of serum lipoproteins as well as their patterns in some physiological and pathological conditions are presented.

Ze względu na znaczenie tłuszczu jako źródła oraz formy przechowywania energii transport lipidów jest bardzo ważnym procesem w ustroju.

Tłuszcze są transportowane z krwią w postaci lipoproteidów. Połączenie nierozpuszczalnych w wodzie trójglicerydów z białkiem i fosfolipidami nadaje cząsteczce powinowactwo do wody i umożliwia swobodną wędrówkę w płynach ustrojowych. Integralnym składnikiem lipoproteidów jest ponadto cholesterol występujący w nich częściowo w postaci zestryfikowanej z resztami kwasów tłuszczowych.

Większość lipoproteidów surowicy ma ciężar cząsteczkowy od 200 000 do 10 000 000 i zawiera 10—95% lipidów (36).

Podział lipoproteidów surowicy

Lipoproteidy surowicy różnych gatunków zwierząt różnią się dość znacznie. Poniżej przedstawione dane dotyczą surowicy krwi ludzkiej.

Cholesterol i fosfolipidy surowicy występują we frakcji euglobulinowej. Elektroforeza bibułowa wykazuje obecność dwu głównych frakcji lipoproteidowych: α -lipoproteidy o ruchliwości elektroforetycznej trochę większej niż α_1 globuliny i β -lipoproteidy wędrujące razem z β -globulinami (48). W surowicy u osób zdrowych ilość β -lipoproteidów jest około dwa razy większa niż α -lipoproteidów. Czasem elektroforeza wykazuje jeszcze frakcję prealbuminową a często, zwłaszcza po posiłku bogatym w tłuszcz, pojawia się frakcja zajmująca obszar od linii startu aż do frakcji β — są

* Dr med., adiunkt, kierownik Laboratorium Zespołu Klinik Zakaźnych Akademii Medycznej w Warszawie.

to lipoproteidy zawierające dużą ilość tłuszczu obojętnego czyli chylomikrony. W elektroforezie wolnej i w elektroforezie pasmowej na skrobiu lub żywicach poliwinylowych chylomikrony stanowią frakcję α_2 , podczas gdy pozostałe frakcje lipoproteidowe wędrują podobnie jak na bibule.

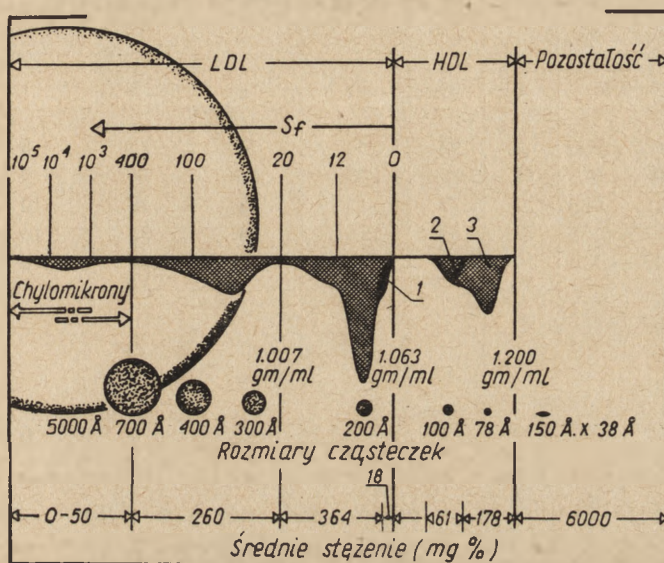
Na agarze lipoproteidy mają większą ruchliwość elektroforetyczną. Główna ich grupa (odpowiadająca β -lipoproteidom) występuje blisko α -globulin stanowiąc 55—60% wszystkich lipoproteidów. Oprócz niej występują lipoalbuminy (20—25%) i frakcja prealbuminowa (15—20%). Immuno elektroforeza na agarze pokazuje, że w obrębie każdej z tych frakcji pojawia się jedna linia precypitacyjna barwiąca się charakterystycznie dla lipidów (68). β -lipoproteidy badane immuno elektroforetycznie po rozdziale na żelu skrobiowym wykazują obecność dwóch lub nawet trzech linii (35).

Frakcjonując białka surowicy według *Cohna* otrzymuje się dwie główne grupy lipoproteidowe: we frakcji IV zawarte są α -lipoproteidy, a we frakcji III β -lipoproteidy (10).

Przyjęto też podział lipoproteidów na frakcje w oparciu o ich gęstość w stanie uwodnionym (*hydrated density*). Lipoproteidy mają niższą gęstość niż pozostałe białka surowicy. Poddane ultrawierowaniu w roztworach o dość niskich stężeniach soli „wypływają” do góry. Na tym zjawisku oparta jest metoda flotacji wprowadzona przez *Gofmana* i wsp. (24). Analogicznie do stałej sedymentacji przyjęto pojęcie stałej flotacji oznaczanej symbolem S_f . Metoda ultrawierowania pozwala rozdzielić lipoproteidy surowicy na kilka głównych grup. Przy wirowaniu w roztworze o ciężarze właściwym 1,063 chylomikrony stanowią grupę o stałej flotacji powyżej 400. Frakcja ta zwiększa się wybitnie w lipemii pokarmowej. Cząsteczki o niższych stałych flotacji w tym roztworze nazwano lipoproteidami o niskiej gęstości (LDL—ang. *low density lipoproteins*). Wyodrębniana często grupa lipoproteidów o bardzo niskiej gęstości (VLDL) o S_f od 20 do 400 stanowi klasę pośrednią między chylomikronami a LDL cięższymi. Ciężar właściwy lipoproteidów o wysokiej gęstości (HDL—ang. *high density lipoproteins*) mieści się w granicach 1,063—1,200. Grupę tę dzieli się na podgrupy HDL₁, HDL₂ i HDL₃ o wzrastających ciężarach właściwych. HDL₁ występuje w bardzo małych ilościach i flotuje razem z najcięższą częścią LDL. W warunkach stosowanych do rozdzielania LDL cząsteczki HDL₂ i HDL₃ nie flotują w ogóle i żeby rozdzielić je przy pomocy ultrawierowania trzeba stosować wyższe stężenia soli. Gęstość dla HDL₂ mieści się w granicach 1,063—1,125, a dla HDL₃—w granicach 1,125—1,200. *Barclay* i wsp. (5) opisali występowanie jeszcze dwu frakcji między HDL₂ i HDL₃.

W surowicy występują również lipoproteidy o ciężarze właściwym powyżej 1,20. Są to głównie kompleksy wolnych kwasów tłuszczowych z albuminami. Rozdział lipoproteidów surowicy uzyskany metodą ultra-

wirowania przedstawia schematycznie rysunek 1. Jak widać im niższy jest ciężar właściwy białek danej frakcji, tym wyższa ich stała flotacji i tym większe rozmiary ich cząsteczek. α -lipoproteidy elektroforezy bi-bułowej odpowiadają mniej więcej frakcji ultrawirówkowej HDL, a β -lipoproteidy frakcji LDL.



Rys. 1. Frakcje lipoproteidów surowicy (wg 36)
Objaśnienia w tekście
Reprodukiwane za zezwoleniem Academic Press, Inc.

Opracowano metody chromatograficzne, które pozwalają rozdzielać lipoproteidy surowicy na frakcje odpowiadające dość dokładnie frakcjom uzyskanym przez ultrawirowanie (47).

Lipoproteidy grupy β wytrącane są wybiórczo przez niektóre związki wielkocząsteczkowe np. mukopolisacharydy, pochodne dekstranu (46), heparynę (9), K agar (32).

Budowa lipoproteidów

Skład chemiczny i budowa cząsteczek lipoproteidów zostały dość dokładnie poznane. Tablica 1 przedstawia skład chemiczny większości grup lipoproteidowych surowicy (45). Ze wzrostem ciężaru właściwego lipoproteidów zmniejsza się w nich stopniowo zawartość lipidów a zwiększa ilość białka. Najwięcej trójglicerydów zawierają chylomikrony, a zawartość fosfolipidów jest najwyższa we frakcjach ciężkich, najwięcej ich zawiera grupa HDL₃. Cholesterol natomiast występuje najobficiej we frakcjach „środkowych”, najwięcej jest go w grupie LDL o stałej flotacji 0—20.

Tablica 1

Skład chemiczny lipoproteidów surowicy (wg 45)

Rodzaj	Gęstość	% białka	% lipi- dów	Składniki lipidowe jako % lipidów całkowitych				
				Trójglice- rydy	Fosfoli- pidy	Estry chole- sterolu	Chole- sterol wolny	Wolne kwasy tłusz- czowe
Chylomi- krony	<0,96	1	99	88	8	3	1	—
LDL	0,96 —1,006	7	93	56	20	15	8	1
	1,006—1,019	11	89	29	26	34	9	1
	1,019—1,063	21	79	13	28	48	10	1
HDL	1,063—1,125	33	67	16	43	31	10	—
	1,125—1,210	57	43	13	46	29	6	6
Kom- pleksy al- bumin z kwasami tłuszczo- wymi		99	1	0	0	0	0	100

Głównym fosfolipidem surowicy jest lecytyna. Oprócz niej występują w mniejszych ilościach sfingomielina i fosfatydyloetanolamina. Najwięcej lecytyny zawarte jest we frakcji HDL, a sfingomieliny we frakcji LDL o S_f 0—20. Fosfatydyloetanolamina występuje mniej więcej w równych ilościach w różnych frakcjach lipoproteidowych (42). Przy pomocy metody chromatografii gazowej udało się ustalić również zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w lipidowych składnikach lipoproteidów surowicy (18). Trójglicerydy i frakcja wolnych kwasów tłuszczowych zawierają najwięcej kwasu olejowego i nieco mniej palmitynowego; w fosfolipidach dominuje kwas palmitynowy i linolowy, zaś w estrach cholesterolu kwas linolowy znacznie przeważa nad innymi kwasami. W sumie około 70% cholesterolu występuje w postaci zestryfikowanej.

Skład procentowy kwasów tłuszczowych w lipidach różnych frakcji ultrawirówkowych wykazuje pewne różnice. Skład frakcji HDL i LDL o S_f 0—20 jest podobny, natomiast frakcja LDL o S_f 20—400 w porównaniu z nimi zawiera w trójglicerydach więcej kwasu linolowego a mniej kwasów krótkołańcuchowych, w fosfolipidach — więcej palmitynowego i stearynowego a mniej linolowego i arachidonowego, a w estrach cholesterolu — więcej palmitynowego i olejowego a mniej linolowego i arachidonowego.

Skład aminokwasowy części białkowej różnych grup lipoproteidów jest podobny, stwierdzono jednak pewne różnice dotyczące ilości aminokwasów N końcowych. W grupie HDL głównym aminokwasem N końcowym jest kwas asparaginowy, a w grupie LDL o S_f 3—20 kwas glutami-

nowy. W miarę wzrostu S_f ilość tego ostatniego spada, wzrasta natomiast ilość treoniny, seryny oraz kwasu asparaginowego. Istnieje więc pewne podobieństwo budowy części białkowej lipoproteidów wysokiej gęstości i chylomikronów (59).

W skład lipoproteidów surowicy wchodzi niewielkie ilości węglowodanów. W β -lipoproteidach normalnej surowicy ludzkiej stwierdzono obecność galaktozy, mannozy, glukozy i kwasu sialowego (40).

Lipoproteidy są związkami bardzo nietrwałymi. Rozpadają się one pod wpływem dializy, zamrażania, śladów metali ciężkich jak również podczas ekstrakowania surowicy rozpuszczalnikami organicznymi. Poszczególne rodzaje lipoproteidów różnią się odpornością na działanie rozmaitych czynników. Na przykład grupa LDL pod wpływem eteru znacznie bardziej zmienia się niż HDL, jest natomiast bardziej odporna na działanie mocznika. Wskazują to na inny typ wiązań między składnikami lipoproteidów różnych frakcji (2).

Cząsteczki lipoproteidów o niższej gęstości (tzn. większe) są kuliste. W miarę wzrostu ciężaru właściwego i zmniejszania się średnicy kształt cząsteczek jest coraz bardziej elipsoidalny.

Synteza i przemiany jednych lipoproteidów w inne

Chylomikrony powstają w ścianie jelita i poprzez układ limfatyczny wchodzi do krwiobiegu. Część trójglicerydów wchodzących w ich skład jest hydrolizowana w krwi przy udziale enzymu lipazy lipoproteidowej. Uwolnione kwasy tłuszczowe ulegają w różnych tkankach dalszym przemianom lub estryfikacji. Największa ilość kwasów tłuszczowych jest gromadzona (w postaci trójglicerydów) w tkance tłuszczowej.

Część chylomikronów dochodzi do wątroby i tam ulega dalszym przemianom (31, 26). Wątroba może również syntetyzować *de novo* kwasy tłuszczowe i inne składniki lipoproteidów. Stwierdzono, że skrawki wątroby włączają radioaktywny octan do części białkowej i lipidowej lipoproteidów (38) oraz radioaktywną leucynę do białkowej komponenty lipoproteidów o gęstości poniżej 1,063 i w trochę mniejszym stopniu do frakcji o gęstości od 1,063 do 1,21 (54). Trójglicerydy wątrobowe są bezpośrednimi prekursorami krążących we krwi lipoproteidów o gęstości poniżej 1,006 i pośrednimi prekursorami tych o wyższym ciężarze właściwym (28). Synteza lipoproteidów w wątrobie jest bardzo szybka, szybsza niż synteza albuminy surowicy (53). Duże uszkodzenia tego narządu lub jego usunięcie powodują spadek poziomu lipoproteidów surowicy (45).

Zagadnienie przemian jednych lipoproteidów w inne nie zostało jeszcze całkowicie wyjaśnione. Ciężar właściwy i rozmiary lipoproteidów zmieniają się w zależności od stopniowego pobierania względnie oddawania ładunku lipidowego. Częściowo bierze udział w tych przemianach

lipaza lipoproteidowa, która hydrolizuje nie tylko trójglicerydy chylomikronów ale również innych lipoproteidów o niskiej gęstości. W ten sposób lipoproteidy o wyższej S_f są stopniowo transformowane w lipoproteidy o niższych S_f .

Nie wiadomo dotąd czy istnieje odrębność metaboliczna różnych grup lipoproteidowych. Szereg faktów przemawia za metaboliczną odrębnością grupy LDL i HDL. Opisano różnice w budowie części białkowych cięższych LDL i HDL oraz różnice pod względem antygenowym (70). W obrębie LDL frakcje o S_f 0—20 i S_f 20—100 są podobne immunochemicznie, jednak nie ma korelacji między nimi u danego osobnika. Różnice w rozmieszczeniu kwasów tłuszczowych i różnice dotyczące części białkowych mogą przemawiać za pewną niezależnością metaboliczną tych frakcji. Pewien związek metaboliczny stwierdzono między grupą lżejszych LDL i grupą HDL. Poza wspomnianym już podobieństwem budowy ich części białkowych stwierdzono, że część białkowa chylomikronów jest w równowadze z lipoproteidami grupy HDL (17).

Na podstawie przedstawionych danych trudno jest ująć w jedną całość przebieg wzajemnych przemian lipoproteidów. Niektórzy autorzy przyjmują istnienie dwu niezależnych od siebie cykli przyłączania i odłączania ładunku lipidowego: jeden dotyczyć ma LDL, drugi HDL (16). Lindgren i Nichols (36) wysunęli przypuszczenie, że część lipidowa w cząsteczce LDL (złożona z cholesterolu, fosfolipidów i glicerydów) otoczona jest cząsteczkami lipoproteidów wysokiej gęstości, a więc, że cząsteczki HDL są częścią składową cząsteczki LDL. Istnieje też pogląd, że chylomikrony mogą być źródłem HDL (11, 70). W ostatnim czasie Nichols i wsp. (43, 55) wykazali, że podczas inkubacji surowicy *in vitro* trójglicerydy przechodzą z frakcji o S_f 20—10⁵ do frakcji o S_f 0—20 i do lipoproteidów wysokiej gęstości. Jednocześnie estry cholesterolu i fosfolipidy są przenoszone w drugą stronę, tzn. z HDL i frakcji o S_f 0—20 do frakcji o S_f 20—10⁵. Przechodzenie trójglicerydów z lipoproteidów lżejszych do cięższych a estrów cholesterolu i fosfolipidów — z cięższych do lżejszych nie jest reakcją enzymatyczną lecz zjawiskiem fizycznym. Autorzy uważają zdolność do takich przemian za podstawową cechę lipoproteidów, a różnice w zawartości kwasów tłuszczowych w glicerydach różnych frakcji lipoproteidowych tłumaczą specyficznością reakcji przenoszenia.

W surowicy zachodzi również przenoszenie kwasów tłuszczowych z jednych lipidów na drugie. Zaobserwowane już dawno (65) zjawisko spadku stężenia wolnego cholesterolu w inkubowanej surowicy bez zmian w zawartości cholesterolu całkowitego dopiero ostatnio zostało dokładnie wyjaśnione. Oczyszczono enzym — transferazę kwasów tłuszczowych, który katalizuje przenoszenie cząsteczki kwasu tłuszczowego z lecytyny HDL na cholesterol wolny wszystkich frakcji lipoproteidowych. Przenoszone są głównie cząsteczki kwasów nienasyconych, tzn. pochodzące z C-2

lecytyny. W rezultacie w surowicy spada ilość cholesterolu wolnego i lecytyny, wzrastają natomiast estry cholesterolu, glicerofosfocolina i wolna cholina. Dwa ostatnie związki powstają z lizolecytyny utworzonej w wyniku odłączenia od lecytyny cząsteczki kwasu tłuszczowego. Transferaza kwasów tłuszczowych jest hamowana przez wysokie stężenie kwasów żółciowych. (20, 21, 22, 23, 63) Enzym jest syntetyzowany w wątrobie, ale miejscem jego działania jest surowica (8). Wydaje się, że opisana reakcja transestryfikacji pod względem ilościowym ma duże znaczenie w ogólnym metabolizmie cholesterolu. Reakcja transestryfikacji jest niezależna od opisanego poprzednio zjawiska przenoszenia trójglicerydów z lipoproteidów lżejszych na cięższe i zastępowania ich estrami cholesterolu i fosfolipidami. To ostatnie zjawisko może zachodzić w nieobecności transferazy kwasów tłuszczowych. W surowicy oba procesy przebiegają równocześnie i niezależnie od siebie.

Znaczenie fizjologiczne lipoproteidów

Chylomikrony przenoszą trójglicerydy przez układ limfatyczny z jelit do krwiobiegu. Tkanka tłuszczowa pobiera trójglicerydy z chylomikronów tylko w czasie lipemii pokarmowej. W innych okresach pobiera je z lipoproteidów frakcji LDL o wyższym ciężarze właściwym i ten ostatni proces uważać można za ilościowo ważniejszy, ponieważ zachodzi on stale (37). Główną rolą powstających w wątrobie β -lipoproteidów jest zatem transport trójglicerydów z wątroby do tkanki tłuszczowej. O l s o n i V e s t e r (45) są zdania, że część peptydowa β -lipoproteidów tylko jeden raz odbywa drogę z ładunkiem lipidowym i potem jest degradowana. β -lipoproteidy transportują również cholesterol. Wiadomo, że w sytuacjach gdy synteza cholesterolu jest nadmierna lub jego rozpad opóźniony, frakcja „wysokocholesterolowa” surowicy tzn. głównie frakcja o $S_f 0-20$ stanowi system usuwający nadmiar cholesterolu — jej poziom w surowicy wtedy wzrasta.

Wysoka zawartość kwasu linolowego w estrach cholesterolu nasuwa przypuszczenie, że cholesterol w lipoproteidach może mieć specjalne znaczenie w transporcie kwasu linolowego (25). Podobną rolę mogłyby odgrywać fosfolipidy w przenoszeniu kwasów nienasyconych. Znaczenie fosfolipidów polega jednak przede wszystkim na tworzeniu niezbędnej do transportu rozpuszczalnej formy tłuszczu. Przy niedoborze choliny tkanka wątrobowa nie uwalnia trójglicerydów do płynu otaczającego, podczas gdy w warunkach prawidłowych uwalnianie takie zachodzi (27).

Rola α -lipoproteidów (HDL) w transporcie tłuszczu jest mniej wyjaśniona. Możliwe, że odgrywają one rolę w tworzeniu chylomikronów w komórkach jelita i w ten sposób są związane z przenoszeniem lipidów z jelita do wątroby (45).

Wolne kwasy tłuszczowe o krótszych łańcuchach są transportowane głównie z albuminami surowicy. Shafrir i Gatt (62) stwierdzili, że w miarę wzrostu apolarności cząsteczek kwasów tłuszczowych (czyli w miarę zwiększania się długości łańcucha) lipoproteidy odgrywają coraz większą rolę w ich transporcie w porównaniu z albuminami. Procentowa zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w lipoproteidach nie jest wielka, ale ilościowe znaczenie tego transportu jest dość duże.

Lipoproteidy transportują z krwią niektóre hormony i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (np. estrogeny, witaminy A). Również aktywność pewnych enzymów związana jest z lipoproteidami surowicy. Uriel (69) wykazał, że dwie strefy aktywności esterazowej surowicy związane są jedna z LDL, druga z HDL. Ponadto takie czynniki układu krzepnięcia krwi jak antytrombina III i prawdopodobnie antytrombina II czyli ko-faktor heparyny (14) mają charakter lipoproteidowy. Anderson uważa (1), że zmiany w stężeniu lipoproteidów surowicy mogą wpływać na fizjologiczny mechanizm fibrynolizy. Riding stwierdził hamowanie plazminy przez β -lipoproteidy (56).

Regulacja gospodarki lipidowej i kontrola transportu tłuszczu w dużym stopniu odbywa się w wątrobie. Pierwszym etapem mobilizacji tłuszczu z rezerw jest przeniesienie go do wątroby. α - i β -lipoproteidy ulegają rozpadowi w tym narządzie. Wątroba wychwytuje z surowicy estry cholesterolu (67) i odgrywa ważną rolę w degradacji i przemianach cholesterolu i fosfatydów (34, 72).

Lipoproteidy surowicy w niektórych stanach fizjologicznych i patologicznych

Lipidy oznaczane w wyciągach alkoholowo-eterowych (lub innych) surowicy są w rzeczywistości artefaktami, produktami rozpadu lipoproteidów. Ich stężenie ogólne stanowi wypadkową stężeń tych związków w różnych klasach lipoproteidowych. W praktyce laboratoryjnej jest jednak łatwiej oznaczyć lipidy np. cholesterol, fosfolipidy lub trójglicerydy niż wykonać analizę lipoproteidów, gdyż elektroforeza nie daje bardzo wyraźnych wyników, zaś analiza ultrawirówkowa wymaga bardzo kosztownego wyposażenia i długotrwałej procedury. Toteż oznaczanie lipidów w surowicy metodami chemicznymi stosuje się powszechnie i w przybliżony sposób spełnia ono jednak zadanie w dziedzinie diagnostyki.

Poniżej przedstawione dane dotyczą zmian poziomu lipidów i lipoproteidów surowicy u ludzi zdrowych i w kilku wybranych stanach patologicznych. Ogólnie biorąc, frakcja LDL zmienia się o wiele bardziej pod wpływem różnych czynników niż HDL.

Wiek, płeć, czynniki pokarmowe. Różnice w zawartości lipoproteidów między surowicą męczyzn i kobiet zmieniają się zależnie od rodzaju

frakcji i od wieku osobnika. U obu płci wzrasta z wiekiem ogólny poziom lipoproteidów surowicy.

Po jedzeniu wzrasta frakcja chylomikronów. W głodzie obserwuje się wzrost wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu, fosfolipidów i β -lipoproteidów w surowicy. W przewlekłym niedożywieniu zmiany są niewielkie i wykazują raczej tendencję spadkową. Przy odżywianiu hiperkalorycznym występuje wzrost cholesterolu i β -lipoproteidów (45). Skład jakościowy pożywienia również wpływa na lipoproteidy surowicy. Podawanie nienasyconych kwasów tłuszczowych obniża wyraźnie poziom cholesterolu i β -lipoproteidów. Decydujące znaczenie mają egzogenne kwasy: linolowy i linolenowy (29). Ciężkie niedożywienie białkowe powoduje zmniejszenie rezerw tłuszczu, często spadek lipidów surowicy i stłuszczenie wątroby. Przyczyną tych zmian jest prawdopodobnie ograniczona synteza części białkowej lipoproteidów (58).

Czynniki hormonalne. W niedoczynności tarczycy wzrasta a w nadczynności maleje poziom cholesterolu surowicy i poziom głównej frakcji cholesterolowej lipoproteidów (LDL o S_f 0—20). Zmiany te zależą od szybkości przemiany cholesterolu: w niedoczynności tarczycy szybkość jest zmniejszona a w nadczynności zwiększona (64).

Estrogeny obniżają poziom lipoproteidów surowicy i stosunek frakcji β do α , androgeny zaś działają odwrotnie.

Na temat wpływu glukokortykoidów kory nadnerczy (kortyzon i in.) istnieje wiele sprzecznych danych (7). Podane zdrowym ludziom mogą prowadzić do spadku poziomu lipidów surowicy, u chorych działają różnie (6). Wydaje się, że hormony te biorą udział w uwalnianiu trójglicerydów z wątroby (49). Mineralokortykoidy (np. dezoksykortykosteron) nie powodują wyraźnych zmian w zakresie lipoproteidów. Adrenalina pobudza uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej i zwiększa ich poziom w surowicy. Jako skutek tej zwiększonej mobilizacji wzrastają również lipoproteidy surowicy (66).

Miażdżyca. Zagadnieniem interesującym od dawna wielu autorów jest uzależnienie występowania miażdżycy od profilu lipoproteidowego surowicy. Badania nad tymi lipoproteidami stały się bardzo popularne właśnie w związku z przypisywaną im rolę w powstawaniu miażdżycy. Początkowo uważano, że decydujący dla powstawania miażdżycy jest wzrost frakcji lipoproteidowej o S_f 12—30 (51). U chorych stwierdza się jednak również wzrost frakcji o S_f 20—100, podwyższony poziom cholesterolu i podwyższony stosunek frakcji β do frakcji α . Zmiany te nie są regułą i są różnie interpretowane przez różnych autorów (53).

Nerczyca. W zespole nerczycowym stwierdza się wzrost lipoproteidów grupy LDL, natomiast HDL są obniżone. Poziom cholesterolu surowicy znacznie wzrasta, ale stosunek ilości cholesterolu całkowitego do wolnego pozostaje w normie. Mechanizm powstawania tych zmian nie jest zupełnie jasny. Wysuwano możliwość upośledzonego usuwania lipidów przez

wątrobę (41). Gitlin i wsp. (19) stwierdzili u dzieci chorych na nerczycę zmniejszone przekształcanie lipoproteidów grupy o S_f 10—200 w lipoproteidy o S_f 3—9. Katabolizm lipoproteidów α był zwiększony. Marsh wykazał u szczurów z nerczycą eksperymentalną zwiększoną syntezę lipoproteidów w wątrobie (39).

Hyperlipemia samoistna. Obserwuje się ogólny wzrost trójglicerydów, wzrost chylomikronów i frakcji o S_f 100—400. Ilość lipoproteidów wysokiej gęstości zwykle jest zmniejszona, poziom cholesterolu jest niski. Jako przyczynę wysuwano możliwość braku lipazy lipoproteidowej w tkankach, ale stwierdzano to tylko u niektórych chorych (57).

Choroby nowotworowe. Opisano charakterystyczne obniżenie frakcji HDL₂. Wsunięto nawet hipotezę, że frakcja ta odgrywa jakąś rolę w zjawisku podatności na nowotwory (4).

Kwasica cukrzykowa. Występuje wzrost frakcji lipoproteidowej o S_f 12—400 i wzrost ogólny cholesterolu. Przyczyną zmian jest prawdopodobnie brak glukozy i mobilizacja tłuszczu zapasowego podobnie jak w głodzie. W cukrzycy kontrolowanej nie obserwowano żadnych zmian.

Choroby wątroby. Przy dużym uszkodzeniu funkcji wątroby obserwuje się spadek poziomu lipidów surowicy (30, 50), co jest zrozumiałe ze względu na rolę wątroby w syntezie tych związków. Stosunek frakcji β do α wzrasta, a zawartość procentowa cholesterolu zestryfikowanego znacznie spada, co ostatnio próbuje się częściowo tłumaczyć brakiem syntetyzowanej w wątrobie transferazy kwasów tłuszczowych. W zastoju żółci zmiany są inne: występuje hypercholesterolemia, hyperfosfatydemia i znaczny wzrost frakcji β -lipoproteidów.

Zmiany jakościowe w lipoproteidach surowicy. W niektórych stanach patologicznych zaobserwowano pojawianie się lipoproteidów nietypowych o zmienionej budowie i składzie chemicznym. W hyperlipemii samoistnej stwierdzono (12), że skład kwasów tłuszczowych w chylomikronach jest zmieniony a ogólna ilość kwasów wielonienasyconych w estrach cholesterolu obniżona. Sporo danych na temat atypowych lipoproteidów surowicy dotyczy chorób wątroby, zwłaszcza zastoju żółci. Wielu autorów stwierdziło w tych warunkach zmiany składu chemicznego i własności we frakcji β , a mianowicie wyższy niż normalnie stosunek lipidów do białka, zmniejszony stosunek cholesterolu zestryfikowanego do wolnego, obniżony stosunek cholesterolu do fosfolipidów oraz zwiększoną ilość lecytyny, a także zmienione wiązania lipidów z białkami, zmniejszoną trwałość i wytrącanie się w warunkach, w jakich normalne lipoproteidy się nie wytrącają. (13, 15, 33, 44, 50, 52, 60, 64, 71) Poza tym w chorobach wątroby zmieniony jest skład kwasów tłuszczowych w estrach cholesterolu (73).

Obraz funkcji fizjologicznej i zmian patologicznych lipoproteidów surowicy jest jeszcze niepełny, ale literatura bieżąca przynosi dużo prac poświęconych temu zagadnieniu co sprzyja coraz lepszemu jego poznaniu.

LITERATURA

1. Anderson A. J., Lack C. H., *Clin. Sci.* **26**, 97 (1964).
2. Avigan J. J., *J. Biol. Chem.* **226**, 957 (1959).
3. Barclay M., Barclay R. K., Terebus-Kekish O., Shah E. B., Skipski V. P., *Clin. Chim. Acta* **8**, 721 (1963).
4. Barclay M., Escher G. C., Kaufman J., Terebus-Kekish O., Greene E. M., Skipski V. P., *Clin. Chim. Acta* **10**, 39 (1964).
5. Barclay M., Terebus-Kekish O., Skipski V. P., Barclay R. K., *Clin. Chim. Acta* **11**, 389 (1965).
6. Boyd G. S., Oliver M. F., Cholesterol, Chemistry, Biochemistry and Pathology, red. R. P. Cook, New York 1958, str. 181.
7. Boyd G. S.; The Control of Lipid Metabolism, red. J. K. Grant, Londyn, New York 1963, str. 100.
8. Brot N., Lossow W. J., Chaikoff I. L., *J. Lipid Res.* **3**, 413 (1962).
9. Burstein M., Praverman A., *Rev. Med. Chir. des Mal. du Foie, de la Rate et du Pancreas* **33**, 21 (1958).
10. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derouaux G., Gillespie S. M., Kahnt F. W., Lever W. F., Lin C. H., Mittelman D., Mouton R. F., Schmid K., Urana E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 465 (1950).
11. Cornwell D. G., Kruger F. A., *J. Lipid Res.* **2**, 110 (1961).
12. Cornwell D. G., Kruger F. A., Hamwi G. J., Brown J. B., *Metab. Clin. and Exptl.* **11**, 840 (1962).
13. Dangerfield W. C., Hurworth E., *Clin. Chim. Acta* **7**, 292 (1962).
14. Davie E. W., Ratnoff O. D., The Proteins, Composition, Structure and Function tom III, red. H. Neurath, New York 1965, str. 359.
15. Eder H. A., Russ E. M., Rees Pritchett R. A., Wilber M. M., Barr D. P., *J. Clin. Invest.* **34**, 1147 (1955).
16. Fasoli A., Biochemical Problems of Lipids, red. A. C. Frazer, *Biochim. Biophys. Acta Library*, tom I, 1963, str. 313.
17. Fredrickson D. S., Gordon R. S., *Physiol. Rev.* **38**, 585 (1958).
18. Freeman N. K., Lindgren F. T., Nichols A. V., Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, tom VI, red. R. T. Holman, W. O. Lundberg, T. Malkin, Londyn 1963, str. 216.
19. Gitlin D., Cornwell D. G., Nakasato D., Oncley J. L., Hughes W. I., Janeway C. A., *J. Clin. Invest.* **37**, 172 (1958).
20. Glomset J. A., Parker F., Tjoden M., Williams R. H., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 398 (1962).
21. Glomset J. A., *J. Biol. Chem.* **65**, 128 (1962).
22. Glomset J. A., Wright J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 266 (1964).
23. Glomset J. A., Kaplan D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 41 (1965).
24. Gofman J. W., Lindgren F. T., Elliot H., *J. Biol. Chem.* **179**, 973 (1949).
25. Green C., Oncley J. L., Karnovsky M. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 2884 (1960).
26. Green C., Webb J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 404 (1964).
27. Haines D. S. M., Sailen Mookerjea, *Can. J. Biochem. Physiol.* **4**, 507 (1965).
28. Havel R. J., Felts J. M., van Duyne C. M., *J. Lipid Res.* **3**, 297 (1962).
29. Hess R., Advances in Lipid Research, tom II, red. R. Paoletti, D. Kritchevsky, Londyn, New York 1964, str. 295.
30. Ignatowska H., Praca doktorska, Warszawa 1965.
31. Kay R. E., Entenman C., *J. Biol. Chem.* **236**, 1006 (1961).

32. Kellen J., *Z. Ges. Inn. Med.* **16**, 812 (1962).
33. Kunkel H. G., Slater R. J., *J. Clin. Invest.* **31**, 677 (1952).
34. Lands W. E. M., Annual Review of Biochemistry, tom 34, red. P. D. Boyer, J. M. Luck, California 1965, str. 313.
35. Lawrence S. M., Shean F. C., *Science* **137**, 227 (1962).
36. Lindgren F. T., Nichols A. V., The Plasma Proteins, tom II, red. F. W. Putnam, New York, Londyn 1960, str. 1.
37. Markscheid L., Shafir E., *J. Lipid Res.* **6**, 247 (1965).
38. Marsh J. B., *Fed. Proc.* **17**, 270 (1958).
39. Marsh J. B., *J. Biol. Chem.* **238**, 1752 (1963).
40. Marshall W. W., Kummerow F. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 271 (1962).
41. Milne M. D., Biochemical Disorders in Human Diseases, red. R. H. S. Thompson, E. J. King, New York 1957, str. 211.
42. Nelson G. J., Freeman N. K., *J. Biol. Chem.* **235**, 578 (1960).
43. Nichols A. V., Smith L., *J. Lipid Res.* **6**, 206 (1965).
44. Nys A., Vandembroucke J., *Acta Gastroent. Belg.* **19**, 142 (1956).
45. Olson R. E., Vester J. W., *Physiol. Rev.* **40**, 677 (1960).
46. Oncley J. L., Walton K. W., Cornwell D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4666 (1957).
47. Oppl J., *Clin. Chim. Acta* (w druku).
48. Owen J. A., Adv. Clin. Chem. tom I, red. H. Sobotka, C. P. Stewart, New York 1958, str. 237.
49. Paoletti R., The Control of Lipid Metabolism, red. J. K. Grant, Londyn-New York 1963, str. 171.
50. Phillips G. B., *J. Clin. Invest.* **39**, 1639 (1960).
51. Pierce F. T., Gofman J. W., *Circulation* **4**, 25 (1951).
52. Pierce F. T., Kimmel J. R., Burns T. W., *Metabolism* **3**, 228 (1954).
53. Polonovski M., Boulanger P., Macheboeuf M., Roche J., *Biochimie Medicale*, tom III, Paris 1961, str. 777.
54. Radding C. M., Bragden J. H., Steinberg D., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 443 (1958).
55. Rehnberg C. S., Nichols A. V., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 595 (1964).
56. Riding I. M., Ellis D., *J. Atheroscl. Res.* **4**, 189 (1964).
57. Robinson D. S., Advances in Lipid Research, tom I, red. R. Paoletti D. Kritchevsky, Londyn, New York 1963, str. 133.
58. Robinson D. S., Seakins A., Biochemical Problems of Lipids, red. A. C. Frazer, *Biochim. Biophys. Acta Library*, tom I, 1963, str. 359.
59. Rodbell M., *Science* **127**, 701 (1958).
60. Russ E., Raymunt J., Barr D., *J. Clin. Invest.* **35**, 133 (1956).
61. Scott P. J., Dykes P. W., Davis J., Walton K., Biochemical Problems of Lipids, red. A. C. Frazer, *Biochim. Biophys. Acta Library* tom I, 1963, str. 318.
62. Shafir E., Gatt S., Khasis S., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 365 (1965).
63. Shah S. N., Lossow W. J., Chaikoff I. L., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 176 (1964).
64. Sobeslavsky C., Jirgl V., Tepka E., *Českosl. Gastroent. a Viživa* **14**, 491 (1960).
65. Sperry W. M., *J. Biol. Chem.* **111**, 467 (1935).
66. Steinberg D., The Control of Lipid Metabolism, red. J. K. Grant, Londyn, New York 1963, str. 111.
67. Tinoco J., Lyman R. L., Okey R., *Can. J. Biochem. Physiol.* **43**, 585 (1965).
68. Uriel J., Grabar P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **38**, 1235 (1956).

69. Uriel J., *Ann. Inst. Pasteur* **101**, 104 (1961).
70. Vandenheuvel F. A., *Can. J. Biochem. Physiol.* **179**, 1299 (1962).
71. Wehr H., Abstr. of the II Meet. of the Fed. Europ. Bioch. Soc. Wiedeń 1965, str. 61.
72. Zilversmit D. B., *Am. J. Med.* **23**, 120 (1957).
73. Zollner N., Wolfram G., Amin G., *Klin. Wchnschr.* **40**, 273 (1962).

**Komitet Organizacyjny IV Zjazdu Naukowego
Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych**

Białystok, Klinika Chorób Zakaźnych AMB,
ul. Sosnowa 5/7, tel. 31-08, 23-83

Komunikat Nr 4

Komitet Organizacyjny, uprzejmie powiadamia, iż w dniach 16—18 września 1966 r., odbędzie się w Białymstoku IV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych z następującą problematyką:

- 1) Wirusowe zapalenie wątroby,
- 2) Wolna tematyka.

Karta uczestnictwa — 50 zł, dla członków Towarzystwa, dla nie członków — 80 zł. Opłatę za kartę uczestnictwa, za udział w bankiecie, ewentualne wyżywienie (jedna doba), za udział w wycieczce, należy przesłać na załączonym przekazie do dnia 15.VI.1966 r., na numer konta I OM w Białymstoku 12-9-612, Komitet Organizacyjny IV Naukowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych.

Otwarcie Zjazdu nastąpi w dniu 16.X.1966 r., o godz. 9,45 w Sali Wykładowej Bloku „D” Akademii Medycznej w Białymstoku ul. Mickiewicza 2. Punkt Informacyjny czynny będzie na Dworcu Głównym PKP i w Hotelu „Cristal” przy ul. Próchniaka w dniu 15.IX.66 r., od godz. 12,00 do dnia 16.IX.66 r. do godz. 12,00.

Zakwaterowanie na okres Zjazdu możliwe jest:

- 1) w Domu Akademickim, gdzie niezależnie od ilości zamieszkałych osób w pokoju opłata wynosić będzie 14,— zł od osoby (pokoje 2 i 4-ro osobowe — komfort częściowy),
- 2) w Hotelu „Cristal” z odpłatnością za dobę: w pokoju 1-osobowym 40 zł, w pokoju 2-osobowym — 32,50 zł, w pokoju 3-osobowym — 28 zł, (komfort częściowy). Ilość pokoi hotelowych ograniczona.

Wyżywienie całodzienne w Domu Akademickim za opłatą 55 zł, (Organizuje Komitet Organizacyjny) w restauracji „Cristal” — 100 zł, od osoby (Rezerwacja miejsc).

W trakcie trwania Zjazdu przewidziane jest zorganizowanie koncertu orkiestry symfonicznej, cena biletu 21,— zł i bankietu w dniu 16.IX.66 r. — 130 zł od osoby. W trakcie trwania obrad Zjazdu chętni będą mieli możliwość nabycia biletu do Teatru Dramatycznego im. Al. Węgierki w Białymstoku w cenie 17,— zł do kin itp. W dniu 18.IX.66 r., przewidziane są następujące wycieczki:

- 1) Jednodniowa autokarem do Białowieży — 105 zł, od osoby (z wyżywieniem) oraz 2-wu dniowa (wyjazd w sobotę po południu, do Augustowa i Suwałk — 295 zł od osoby (z zakwaterowaniem i wyżywieniem).

Organizacja wycieczek uzależniona jest od liczby zgłoszeń.

Wszystkie rozliczenia finansowe będą realizowane w Biurze Zjazdu, mieszczącym się w bloku „D” Akademii Medycznej w Białymstoku ul. Mickiewicza 2. Zgłoszenie uczestnictwa prosimy uprzejmie potwierdzić nadesłaniem wypełnionej karty ankietowej

Przewodniczący Zarządu Głównego
Pol. Tow. Epid. i Lek. Ch. Zakaźnych
(—) Prof. dr med. K. Szymoński

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
IV Naukowego Zjazdu PTE i LCHZ
(—) Doc. dr med. P. Boroń

Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
IV Naukowego Zjazdu PTE i LCHZ
(—) Dr med. D. Prokopowicz
(—) Lek. med. T. Szpakowicz

JADWIGA PASSENT *

Chemiczne i fizyczne własności rybosomów

The Chemical and Physical Properties of Ribosomes

The chemical and physical properties of the ribosomes as well as the methods of isolation and purification are reviewed. The article deals also with the influence of metals, polyamines and antibiotics on the ribosomes.

Rybosomami nazywamy cząstki nukleoproteidowe o ciężarze cząsteczkowym 2,7 — 4,5 miliona i o zawartości RNA 40—60% (88). Pełnią one ważną i jeszcze nie całkiem wyjaśnioną rolę w procesie biosyntezy białka. Produkty asocjacji rybosomów nazywamy polisomami, ergosomami, ciężkimi rybosomami; cząstki powstałe w wyniku dysocjacji rybosomów nazywamy podjednostkami. W niektórych tkankach rybosomy występują samodzielnie, w innych są osadzone na endoplazmatycznym retikulum. Frakcję komórkową, która na obrazie otrzymanym przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazuje obecność błon endoplazmatycznych z osadzonymi na nich rybosomami, nazywamy mikrosomami. Pod względem chemicznym mikrosomy zawierają 60—70% białka, 20—30% lipidów i do 10% kwasów nukleinowych (66). Przyjmuje się, że w tkankach produkujących białko „na eksport” (np. retikulocyty czy wątroba), rybosomy są osadzone na błonach endoplazmatycznych, natomiast tkanki zatrzymujące swoje białko (tkanki embrionalne, skóra, włosy) zawierają rybosomy wolne.

Rybosomy z reguły zbudowane są z dwóch podjednostek, z których jedna jest w przybliżeniu dwukrotnie większa od drugiej (118). Ciekawy wyjątek prezentuje praca Decroly'ego i Cape'a, którzy badając rybosomy z jaj ropuchy pazurzastej *Xenopus laevis* w różnych stadiach larwalnych, nie byli w stanie uzyskać dysocjacji rybosomów na podjednostki (25).

* Mgr, starszy asystent Zakładu Biochemii Ewolucyjnej IBB PAN.

Wykaz używanych skrótów: tRNA — przenoszący RNA; sRNA — rozpuszczalny RNA; mRNA — informacyjny RNA; rRNA — rybosomowy RNA; SDS — sól sodowa siarczanu dodecyłu; EDTA — kwas etylenodwuaminoczeroctowy.

Jednym z charakterystycznych parametrów rybosomów jest współczynnik sedymentacji *S*, który jest miarą szybkości opadania cząstek w czasie wirowania. Wielkość tego współczynnika jest zależna nie tylko od sił przyspieszających cząstkę, ale także od wielkości, kształtu, gęstości, stężenia cząstek w roztworze i od lepkości roztworu.

I. Występowanie rybosomów

Rybosomy występują powszechnie w mikroorganizmach, komórkach roślin i zwierząt. W szybko dzielących się komórkach bakteryjnych rybosomy stanowią do 30% ich masy (118). W mikroorganizmach występują rybosomy o współczynnikach sedymentacji 70*S* (*E. coli*, *B. cereus*) i 80*S* (*Azotobacter*). W środowisku pozbawionym jonów magnezu rybosomy 70*S* rozpadają się na podjednostki 30*S* i 50*S*, a rybosomy 80*S* na podjednostki 40*S* i 60*S*. Z obrazu uzyskanego przy pomocy mikroskopu elektronowego Huxley i Zubay (45), a także Hall i Slayter (40) wyliczyli wielkość podjednostek i rybosomów *E. coli*. Podobne eksperymenty przeprowadzili w 1963 roku Spirin i wsp. (99).

Tablica 1

Wymiary rybosomów *E. coli* i ich podjednostek (w Å)

podjednostki			
30 <i>S</i>	50 <i>S</i>	70 <i>S</i>	
	dł. 140—160	130 × 160	Huxley i Zubay (45)
95 × 170	140 × 170	170 × 200	Hall i Slayter (40)
70—90 × 160	średn. 160	160 × 190	Spirin i wsp. (99)

Znane są także nietypowe rybosomy bakteryjne, o wyższej zawartości RNA — do 75% i o niższych stałych sedymentacji. Rybosomy takie izoluje się z komórek, na które uprzednio podziało inhibitorami biosyntezy białka jak np. puromycyną lub chloramfenikolem. Antybiotyki te powodują niezrównoważoną syntezę RNA, a powstające w tych warunkach rybosomy mają stałe sedymentacji 18—25*S* (23, 68, 75). Podobne rybosomy można otrzymać z mutantą *E. coli* wymagającego metioniny, a hodowanego na pożywce nie zawierającej jej (69). Te nietypowe rybosomy własnościami przypominają bardziej RNA niż normalne rybosomy (55), mimo, iż niektóre z nich zdolne są do włączania ¹⁴C-aminokwasów (69). Uważa się je za prekursorów normalnych rybosomów.

Drożdże zawierają rybosomy 80*S*, których obraz w mikroskopie elektronowym przypomina obraz rybosomów zwierzęcych. Po usunięciu jonów magnezu dysocjują one na podjednostki 60*S* i 40*S* (19).

Rośliny mają rybosomy zawierające około 40% RNA. Współczynnik sedymentacji rybosomu wynosi 80*S*, a jego podjednostek — 40*S* i 60*S*.

Rybosomy roślinne, tak jak i inne, są stabilizowane przede wszystkim przez jony magnezu. Rybosomy z kielków pszenicy wymagają także manganu i wapnia (61), a rybosomy tytoniu przede wszystkim jonów wapnia (83). Interesującym preparatem jest frakcja rybosomowa wyizolowana z grzybni *Penicillium funiculosum*. Frakcja ta, zwana heleniną, jest aktywna terapeutycznie wobec wirusa zapalenia mózgu myszy i wirusa *poliomyelitis* małp (58).

Zwierzęce rybosomy mają stałą sedymentacji 80S. Dysocjują na podjednostki 60S i 40S. Znane są rybosomy bezkręgowców, wyizolowane z dzielących się komórek hydry (95), czy z ślinianek muchy *Chironomus* (38), a także z jaj jeżowca (13, 37) i z larw *Drosophili* (57). Rybosomy kręgowców, nie należących do ssaków, opisane są dość szeroko; znane są rybosomy z wątroby żaby, mózgu embrionu kurzego, wątroby kaczki (30, 107). Rybosomy ssaków poznano bardzo gruntownie. W swojej fundamentalnej pracy, która podaje opis 40 rodzajów tkanek, P a l a d e stwierdził, że tylko dojrzałe erytrocyty nie zawierają rybosomów (78). Niedojrzałe komórki syntetyzujące hemoglobinę — retikulocyty — są bogate w rybosomy, które dysocjują na podjednostki po usunięciu jonów magnezu (110). Wirowanie przez dwie godziny w gradiencie gęstości sacharozy (15—30%) oraz obraz w mikroskopie elektronowym wykazały, że 75% rybosomów retikulocytów występuje w zespołach składających się z pięciu rybosomów, tzn. w postaci polisomów (polirybosomów), zwanych w tym wypadku pentamerami (116). Według większości badaczy polisom jest jednostką czynną, biorącą udział w biosyntezie białka (67, 82, 116). Zespół ten w trakcie polimeryzacji łańcucha polipeptydowego ulega rozpadowi na monomery. Inną tkanką bogatą w rybosomy jest wątroba; obraz w mikroskopie elektronowym wykazuje rybosomy osadzone na endoplazmatycznym retikulum. W czasie homogenizacji retikulum ulega rozerwaniu i tworzą się z niego pęcherzyki z przyłączonymi w dalszym ciągu rybosomami. Wolne rybosomy można wyizolować przy pomocy substancji rozpuszczających retikulum. Oczyszczone rybosomy otrzymano z wątroby szczura, królika, świnki morskiej, myszy itd. (42, 50, 89, 104). Typową procedurę izolowania polisomów z wątroby podaje praca M u n r o i wsp. (67). Znane są także rybosomy z guzów wątroby np. hepatoma Novikoffa, które w odróżnieniu od rybosomów ze zdrowej wątroby dużo słabiej włączają ^{14}C -aminokwasy do białek (16). Opisano też rybosomy z trzustki (29), mózgu (38), tkanek embrionalnych, włosów (7), skóry (78), komórek rozrodczych (78), mięśni szkieletowych (10), a także mięśnia sercowego (85). Polisomy otrzymano również z tkanki limfatycznej królika (92) i z komórek HeLa (87).

Wiadomo, że rybosomy umiejscowione są w cytoplazmie. Niektórzy badacze donoszą o wyizolowaniu rybosomów z mitochondriów (86, 109). Obraz w mikroskopie elektronowym wskazuje na istnienie cząstek podobnych do rybosomów w jądrach komórek zwierzęcych: embrionalnych,

nerwowych i wątrobowych (79). Rybosomy wyizolowane z jąder grasicy cielęcej różnią się od rybosomów cytoplazmatycznych niższym współczynnikiem sedimentacji (78S) i wyższą zawartością RNA (60%), są jednak zdolne do włączania aminokwasów (84). Rybosomy cytoplazmatyczne z komórek grasicy są stabilizowane przez jony potasu (90), natomiast rybosomy otrzymane z jąder grasicy wymagają jonów sodu dla zachowania aktywności (2).

II. Otrzymywanie rybosomów

Otrzymywanie rybosomów obejmuje trzy zasadnicze etapy: rozbicie ścian komórkowych, oddzielenie rybosomów od innych składników komórki oraz oczyszczenie preparatu.

Do rozbicia ścian komórkowych można stosować rozcieranie z piaskiem lub tlenkiem glinu (aluminą), szok osmotyczny, prasę Frencha, homogenizatory z tłokami lub nożami, ultradźwięki. Wybór metody zależy od twardości tkanki.

Do izolacji rybosomów stosuje się wirowanie. Rozbite komórki zawieszają się w buforze (typowy bufor: 0,01M tris-HCl pH 7,5, zawierający 0,01M MgCl₂, 0,06M KCl, 0,006M 2-merkaptoetanolu) i poddaje wirowaniu przy 10 000 g. Odrzucony osad zawiera nierozbite komórki, fragmenty ściany komórkowej, jądra i mitochondria. Rybosomy izoluje się z supernatantu przez wirowanie w ciągu trzech godzin przy 78 000 g, w ciągu 1,5 godz. przy 105 000 g lub przez 1 godz. przy 150 000 g. Jeżeli środowisko zawiera sacharozę, czas wirowania musi być odpowiednio dłuższy. Sacharozę do ultrawirowania zastosował po raz pierwszy H o g e b o o m w 1948 roku. Wysokie ciśnienie osmotyczne roztworów sacharozy ogranicza pęcznienie, a w odróżnieniu od soli nie wywołuje agregacji składników komórkowych (44). Odwirowane rybosomy zawieszają się następnie w buforze i delikatnie homogenizuje. Zawiesinę taką klaruje się przy 15 000 g, następnie rybosomy izoluje się z supernatantu przez ponowne wirowanie jak podano wyżej. Jeśli rybosomy osadzone są na endoplazmatycznym retikulum, to zwykle rozpuszcza się retikulum po pierwszym wirowaniu przy 10 000 g działaniem dezoksyholanu sodu. Związek ten nie powoduje fizycznych uszkodzeń rybosomów i tylko nieznacznie obniża ich zdolność do włączania aminokwasów (51). Można też użyć niejonowego detergentu Lubrolu W (kopolimer polioksyetylenu i alkoholu cetylowego), który jednak ma słabsze działanie oczyszczające (84).

Polisomy otrzymuje się zwykle przy pomocy czterogodzinnego wirowania w 2M sacharozie przy 105 000 g (122). Oddzielenie rybosomów od podjednostek, a także jednych podjednostek od drugich wymaga wirowania w gradiencie gęstości. Najczęściej używa się sacharozy w stężeniach 5—20%, w której cząstki rozmieszczają się stosownie do swoich współ-

czynników sedymentacji (11). Po zakończeniu wirowania probówkę plastikową przekłuwa się, a wyciekającą zawiesinę zbiera w kilkukropłowych frakcjach. Pozwala to na ustalenie stężenia cząstek w poszczególnych frakcjach przez pomiar absorpcji w ultrafiolecie, zmierzenie radioaktywności kolejnych frakcji itp.

Przy izolowaniu rybosomów należy brać pod uwagę rodzaj badań, do których mają one być użyte. W przypadku badań nad włączaniem aminokwasów *in vitro*, istotne jest uzyskanie rybosomów o dużej aktywności, a więc ich izolowanie powinno być możliwie szybkie. Natomiast w przypadku badań fizykochemicznych nad rybosomami najważniejsza jest czystość frakcji i nabiera wtedy wagi sprawa uwolnienia rybosomów od wędrujących z nimi białek. Siła wiązania białek z rybosomami maleje ze wzrostem siły jonowej i *pH* środowiska. Stosowanie buforu o dużej sile jonowej i wysokim *pH* jest jednak niebezpieczne ze względu na możliwą w tych warunkach agregację rybosomów. Stosuje się czasem strącanie rybosomów magnezem (105), barem (80), a także sperminą (125), co pozwala na usunięcie części białek i ferrytyny. Inną metodą jest oczyszczanie na drodze chromatografii kolumnowej w obecności jonów magnezu (81). Jedną z nowszych metod izolowania rybosomów z retikulocytów, opisana przez Arnsteina i wsp. (3), polega na wytrąceniu rybosomów z supernatantu pomitochondrialnego przez obniżenie jego *pH* 1N kwasem octowym. Otrzymane w ten sposób rybosomy, zawieszony w buforze o *pH* 7,6, wykazują w układzie syntetyzującym zwiększone włączanie fenyloalaniny po dodaniu poliU, podobnie jak rybosomy otrzymane na drodze wirowania.

W czasie izolowania rybosomy mogą ulegać degradacji na skutek działania rybonukleazy obecnej w ekstrakcie. Zapobiega się temu stosując inhibitory RN-azy. Nie można jednak używać jednego z lepszych inhibitorów RN-azy, soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS), gdyż posiada on właściwość oddzielania kwasów nukleinowych od białka rybosomów (47). Najczęściej używa się bentonitu, czyli uwodnionego krzemianu glinowego, kompleksującego białka o charakterze zasadowym (33), do których należy rybonukleaza. Ciekawie rozwiązali ten problem Cox i Arnstein, którzy izolując rybosomy z trzustki wołu użyli jako inhibitora przeciwciała wobec RN-azy (22).

Kryteria czystości preparatu. Do identyfikacji rybosomów najczęściej służy obraz otrzymany w czasie ultrawirowania. Stosuje się w tym celu ultrawirówki analityczne, zaopatrzone w układy optyczne, które pozwalają na odczyt absorpcji w ultrafiolecie. Obraz taki wykazuje granice charakterystyczne dla rybosomów oraz granice frakcji wolniej sedymentującej, która zawiera białka supernatantu i frakcji szybciej sedymentującej, zawierającej osad mikrosomów i agregaty rybosomów. W miarę oczyszczania preparatu frakcje osadzające się wolniej i szybciej od rybosomów ulegają zmniejszeniu.

Przy określaniu czystości preparatu rybosomów bierze się pod uwagę widmo absorpcji w ultrafiolecie. Ponieważ maximum absorpcji kwasów nukleinowych przypada na 260 m μ , natomiast białko wykazuje maximum w 280 m μ , wywołane obecnością aminokwasów aromatycznych, zatem w miarę oczyszczania preparatu od zaadsorbowanego białka rośnie stosunek absorpcji w 260 m μ do absorpcji w 280 m μ . Obecność zaadsorbowanych białek można też wykryć elektroforetycznie, chromatograficznie lub immunochemicznie (43). Niekiedy wystarczającym kryterium oczyszczania rybosomów jest zmniejszanie się aktywności enzymatycznej preparatu.

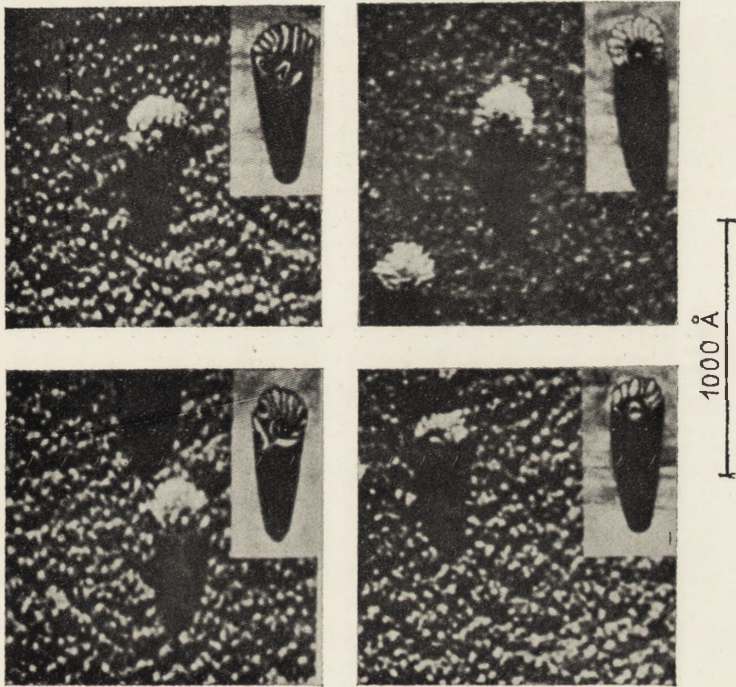
Chemicznym kryterium czystości jest zawartość kwasów rybonukleinowych, białka i lipidów w preparacie rybosomów. Ilość RNA ustala się zwykle na podstawie zawartości rybozy oznaczonej metodą orcynolową. Zawartość białka oznacza się najczęściej metodą Lowry i wsp. (60), wobec albuminy wołu lub trypsyny krystalicznej jako standardów. Miarą zawartości lipidów może być ilość cholesterolu (1), lub fosforu lipidowego, tzn. fosforu frakcji ekstrahującej się mieszaniną alkoholu i eteru (110). Oczyszczone rybosomy nie powinny zawierać lipidów.

Suchą masę rybosomów oznacza się ważąc je po liofilizacji i suszeniu w 105°C.

III. Składniki strukturalne rybosomów

Do najlepiej zbadanych należą rybosomy *Escherichia coli*. Kształt całego rybosomu *E. coli* zbliżony jest do cylindra. Potraktowanie go 0,5M NaCl powoduje dysocjację na podjednostki 30S i 50S (100). Podjednostka 50S ma kształt kopulasty, natomiast podjednostka 30S jest bardziej płaska i kształt jej jest mniej regularny (45). Hart (41) uzyskał bardzo ciekawe obrazy podjednostek 50S rybosomów *E. coli* w mikroskopie elektronowym (rysunek 1). Obrazy te wykazują istnienie wyraźnych rys na powierzchni podjednostki, a także obecność obszaru „oko-podobnego”. Autor sugeruje, że obszar „oko-podobny” może być miejscem przyłączania podjednostki 30S. Rysy na powierzchni podjednostki powstają na skutek spętnienia łańcucha nukleoproteidowego o średnicy ok. 35 Å. Praca ta potwierdza wcześniejszy eksperyment Spirina, który w środowisku o niskiej sile jonowej i w nieobecności jonów magnezu uzyskał obrazy niespełnionych podjednostek 30S i 50S w postaci nici nukleoproteidowych o średnicy 30—40 Å (101).

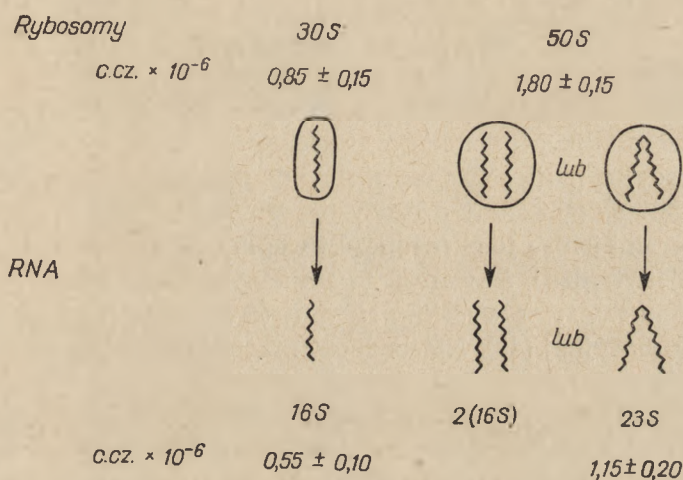
Kwasy rybonukleinowe. Analiza sedymentacyjna RNA rybosomów otrzymanych z *E. coli* wskazuje na istnienie RNA o stałych sedymentacji 16S i 23S (59). Według Kurlanda (54) w podjednostce 30S znajduje się RNA o stałej sedymentacji 16S i ciężarze 560 000, natomiast w podjednostce 50S występuje RNA 23S o ciężarze 1 100 000, lub dwa łańcuchy RNA 16S (rysunek 2).



Fys. 1. Obraz podjednostek 50S rybosomów *E. coli* w mikroskopie elektronowym (wg 41)

Ostatnio jednak Iwabuuchi i wsp. (46) donieśli, że podjednostki 50S rybosomów *E. coli* zawierają jedynie RNA o stałej sedymentacji 23S. Ilość reszt nukleotydujących w RNA rybosomów z *E. coli* wynosi dla RNA o stałej sedymentacji 16S: 1640 ± 50 a dla RNA o stałej sedymentacji 23S: 3090 ± 120 (65).

Hall i Doty (39) stwierdzili, że rybosomy z wątroby cielęcia zawierają również dwa rodzaje RNA: jeden o stałej sedymentacji 18S i o ciężarze 600 000, drugi — 28S, o ciężarze 1 300 000. Marcot-Queiroz i wsp. znaleźli w RNA rybosomów drożdży frakcję o stałej sedymentacji RNA rozpuszczalnego tzn. 4S. Po dysocjacji rybosomów zlokalizowali tę frakcję w podjednostce 60S. Frakcja ta nie miała jednak zdolności przyłączania aminokwasów (62).



Rys. 2. Schematyczny obraz podjednostek rybosomu *E. coli* (wg 54)

Kwasy nukleinowe rybosomów występują w postaci upakowanych pętli (39) lub sztywnych pałeczek (49). Obie te postacie zawierają pewien obszar o strukturze spiralnej, utrzymywany przez wiązania wodorowe, co wynika z badań nad wpływem temperatury na gęstość optyczną i na skręcalność optyczną RNA (9), a także z badań prowadzonych przy pomocy promieni X (98).

W rybosomach zwierzęcych puryny stanowią 50% składu RNA, w bakteryjnych do 60% (21). Zasady metylowane i pseudourydyna znajdują się w niewielkich ilościach i prawdopodobnie pochodzą z RNA przenoszącego (tRNA), występującego jako zanieczyszczenie preparatu (27). Wbrew dotychczasowym poglądom (64) przypuszcza się obecnie, że skład nukleotydowy RNA większej podjednostki rybosomu może być całkiem różny od składu RNA podjednostki mniejszej (118).

Białko. Wiadomości o strukturalnych białkach rybosomów są skąpe. Badania nad nimi są trudne, gdyż po usunięciu kwasów nukleinowych

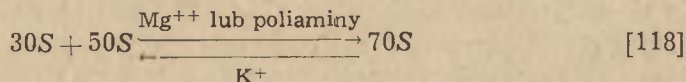
białka te przechodzą w postać nierozpuszczalną. Białko rybosomów *E. coli*, stosunkowo najlepiej poznane, ma charakter zasadowy, dzięki wysokiej zawartości lizyny i argininy. Aminokwasy aromatyczne oraz aminokwasy zawierające siarkę występują w niewielkiej ilości (97). Przeciętny ciężar cząsteczkowy łańcucha polipeptydowego w rybosomach *E. coli* wynosi 25 000—30 000, przy czym na podjednostkę 30S przypada 10 łańcuchów, a na podjednostkę 50S — 20 łańcuchów (115, 117). Punkt izoelektryczny białek rybosomów *E. coli* wynosi 8.5 (5). Także białka rybosomów z retikulocytów mają charakter zasadowy (28). Zupełnie innego rodzaju białko zawierają rybosomy wyizolowane przez Bayleya ze słonolubnej bakterii *Halobacterium cutirubrum* (5). Białko to ma kwaśny charakter, a jego punkt izoelektryczny wynosi 3.9.

IV. Wpływ środowiska na rybosomy

Już wczesne prace nad rybosomami wykazały, że ulegają one rozpadowi w czasie dializy. Substancje niskocząsteczkowe, przechodzące przez błonę dializacyjną mają ochronny wpływ na preparaty rybosomów. Chao (19) stwierdził, że rybosomy drożdży precypitują w wodzie destylowanej, a stabilizatorami ich są jony magnezu i wapnia. Kilka lat wcześniej Keller i wsp. stwierdzili, że włączanie aminokwasów *in vitro* przez rybosomy wątroby zależy w wysokim stopniu od zawartości magnezu w mieszaninie inkubacyjnej (48). Niezbędność magnezu potwierdzono następnie w badaniach nad włączaniem aminokwasów *in vitro* do oczyszczonych rybosomów z *E. coli* (108), pędów grochu (119), retikulocytów (56), wątroby szczura (52) i in. Badania przy pomocy ultrawirówki i mikroskopu elektronowego wykazały, że od stężenia jonów magnezu zależna jest równowaga między rybosomem i jego podjednostkami (110, 111). Badania te doprowadziły do hipotezy, że funkcja magnezu polega na utrzymywaniu razem podjednostek w rybosomie. Natomiast Watson w 1964 roku wysunął przypuszczenie, że jony magnezu spełniają przede wszystkim rolę zubojeźniania grup fosforanowych, a podjednostki rybosomu utrzymywane są razem przez specyficzne wiązania wodorowe pomiędzy zasadami nukleotydowymi ich kwasów rybonukleinowych (118). Tso i wsp. (111) po trawieniu frakcji rybosomowej RN-azą znaleźli w supernatancie 85% całkowitej zawartości magnezu. Wynika z tego, że magnez jest przyłączony do kwasu nukleinowego rybosomu.

Oprócz magnezu w rybosomach znajdują się także jony innych metali. Zawartość ich jest wysoka. 1 gram RNA rybosomów, ekstrahowanych przy pomocy fenolu może zawierać do 980 µg magnezu, a zawartość wapnia może być sześciokrotnie wyższa (112). Oprócz tego znaleziono w rybosomach sód, potas, żelazo, mangan, cynk, nawet miedź i kadm, ale niektóre z tych metali mogą adsorbować się na rybosomach w czasie ich izolowania.

Innym składnikiem komórkowym silnie związanym z rybosomami są poliaminy. Zawartość poliamin w komórce jest znaczna — na 1 gram wilgotnej masy *E. coli* przypada 30 μ moles aminowych grup poliamin (63). W preparatach rybosomów powszechnie znajduje się putrescynę, kadawerynę, spermidynę i 1,3-dwuaminopropan. Po dodaniu radioaktywnych poliamin do hodowli komórkowej izoluje się rybosomy z poliaminami nieznakowanymi; poliaminy są więc tak silnie związane, że nie ulegają wymianie. Współdziałają one w utrzymaniu równowagi jonowej, wywierającej wpływ na stabilność rybosomów:



Poliaminy wzmagają także włączanie aminokwasów *in vitro*, przy czym stymulacja ta jest różna w stosunku do poszczególnych aminokwasów (24, 71).

Podobny efekt *in vitro* jak dodanie sperminy czy spermidyny wywołuje dodanie do układu takich antybiotyków jak neomycyna lub streptomycyna. Davies i wsp. stwierdzili, że dodanie streptomycyny do układu syntetyzującego polifenylalaninę w obecności poliU zmienia własności kodujące układu, w wyniku czego następuje stymulacja włączania leucyny i izoleucyny, z równoległym zahamowaniem włączania fenyloalaniny (24). Wpływ tych antybiotyków na rybosomy wynika z ich poliaminowego charakteru; kationowe grupy guanidynowe streptomycyny współdziałają z rybosomami, które zachowują się jak polianiony (12).

Puromycyna działa na innej zasadzie. Cząsteczka puromycyny jest analogiem strukturalnym połączenia sRNA-aminokwas (53), dzięki czemu jej grupa aminowa może zostać acylowana końcową grupą karboksylową rosnącego łańcucha polipeptydowego. W wyniku następuje przedwczesne odłączanie polipeptydu od rybosomu i zahamowanie syntezy (70).

Wpływ chloramfenikolu na biosyntezę białka polega najprawdopodobniej na kompetycji z mRNA o miejsce przyłączenia na rybosomie (120). Rybosomy są także miejscem działania biologicznego grupy antybiotyków glutarimidowych. Najlepiej poznana jest rola aktydionu (cycloheximid), który hamuje przeniesienie aminokwasu z sRNA na rybosomy (94), a także zapobiega zależnemu od GTP rozpadowi polisomów, który towarzyszy wydłużaniu się łańcucha peptydowego (123). Ostatnio ukazała się praca sugerująca, że aktydion zwalnia tempo tworzenia się polisomów przez zahamowanie łączenia się mRNA z rybosomami (20).

Potraktowanie rybosomów czynnikami wiążącymi magnez lub poliaminy prowadzi do degradacji rybosomów. Związkami najbardziej efektywnymi w wiązaniu magnezu są wersenian (EDTA), pirofosforan sodu i ATP. Fosforan i ADP wiążą magnez dużo słabiej. Jeszcze słabiej reagują cytrynian i dwuwęglan (19). Rozpadowi rybosomów pod wpływem tych związków towarzyszy uwalnianie do środowiska RNA, nukleotydów, enzy-

mów jak np. β -galaktozydaza (32) czy tryptofanaza (31) i białka (111). Praca Szafrńskiego i wsp. (103) wskazuje także na uwalnianie się do środowiska wolnych zasad i zdeaminowanych nukleozydów, pochodzących prawdopodobnie z rozkładu informacyjnego RNA, co wydaje się być związane nie tylko z obecnością rybonukleazy rybosomowej, ale także nukleozydazy i dezaminazy.

Rybonukleaza, której aktywność wykrywano powszechnie w preparatach rybosomów, uważana była dotychczas za integralny składnik rybosomów, a w rybosomie *E. coli* lokalizowano ją w podjednostce 30S (96, 106). Ostatnio poglądy te ulegają zmianie, m. in. dzięki wykryciu rybosomów nie zawierających rybonukleazy, jak rybosomy z *Pseudomonas fluorescens* wyizolowane przez Wade'a i Robinsona (113) oraz rybosomy ze szczepu *Escherichia coli* M.R.E. 600 wyizolowane przez Cammacka i Wade'a (15). Także Ochoa i wsp. w pracy nad kierunkiem odczytywania kodu genetycznego donieśli o zastosowaniu układu o niskiej aktywności nukleaz, zawierającego rybosomy z *E. coli* i supernatant z *Lactobacillus arabinosus* (91). Prace Neu'a i Heppela pozwalają sądzić, że *in vivo* rybonukleaza umiejscowiona jest pomiędzy ścianą komórki i błoną komórkową. W czasie rozbicia komórki rybonukleaza ulega uwolnieniu i może adsorbować się na rybosomach (72, 73, 74). Za hipotezą adsorpcyjną przemawiają doświadczenia, w których na rybosomy z *Ps. fluorescens* nie zawierające rybonukleazy, a także na rybosomy z *E. coli* B działano rybonukleazą wyizolowaną z rybosomów *E. coli* B. W pierwszym przypadku 80%, a w drugim — 98% podanej RN-azy zaadsorbowało się na rybosomach (114).

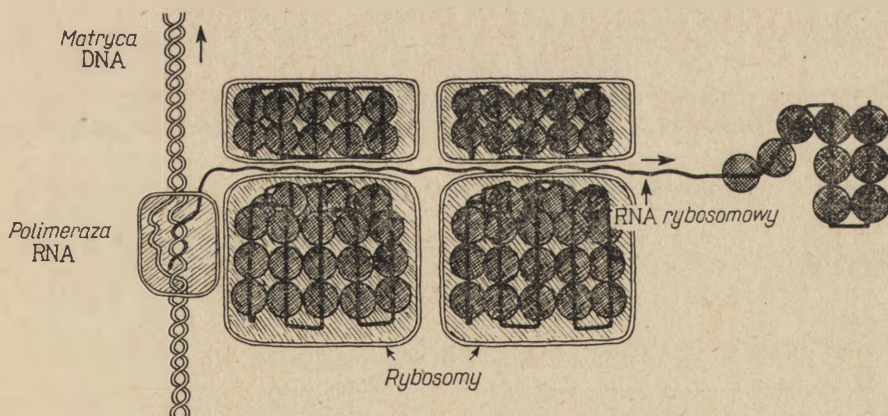
Do rybosomów przyłączone są także substancje znajdujące się tam chwilowo, niejako w czasie akcji: kwas nukleinowy przenoszący (tRNA), kwas nukleinowy informacyjny (mRNA), nowotworzący się polipeptyd, a także enzymy przenoszące. W rybosomach *E. coli* tRNA wiąże się z podjednostką 50S (6, 17), powstający łańcuch białkowy przyłączony jest poprzez terminalną cząsteczkę tRNA (17, 35), natomiast mRNA wiąże się z podjednostką 30S (4, 76).

V. Powstawanie rybosomów

W odróżnieniu od stosunkowo dużej ilości danych dotyczących strukturalnych składników rybosomów, niewiele jeszcze wiadomo na temat mechanizmu ich powstawania. Kwasy rybonukleinowe powstają najprawdopodobniej w jądrze (93). Z prac Yankofsky'ego i Spiegelmana, Goodmana i Richa wynika, że nie tylko informacyjny RNA i rozpuszczalny RNA, ale także kwas rybonukleinowy rybosomów syntetyzowany jest na matrycy DNA (36, 126). W 1965 roku Dubna i wsp. (26) posługując się techniką tworzenia hybrydów DNA-RNA, zlokalizowali na chromosomie *Bacillus subtilis* geny — determinanty dla

kwasów rybonukleinowych o stałych sedymentacji 4S (rozpuszczalny RNA) oraz 16S i 23S (kwasy nukleinowe rybosomów). Autorzy przypuszczają, że białko rybosomów jest determinowane przez te same geny, które determinują RNA rybosomów, bądź też, że oba rodzaje genów są umiejscowione bardzo blisko siebie.

Jedną z ciekawszych hipotez na temat mechanizmu powstawania rybosomów przedstawia Stent (102). Opiera się on m.in. na pracach badacza z grupy Nirenberga, którzy w 1964 r. zidentyfikowali *in vitro* kompleks DNA-polimeraza RNA-RNA-rybosom (8, 14). Jak wiadomo polimeraza RNA jest enzymem katalizującym uporządkowaną polimeryzację nukleotydów na matrycy DNA. Enzym ten został wyizolowany z wątroby szczura (121), a także z szeregu bakterii (18, 34). Jeżeli układ zawiera kwas dezoksyrybonukleinowy jako matrycę, polimerazę RNA, oraz trójfosforany 5'-rybonukleozydów adeniny, guaniny, uracylu, cytozyny, to w czasie inkubacji nukleotydy ulegają polimeryzacji do RNA. Produkt taki ma sekwencję zasad komplementarną do DNA matrycowego i stymuluje syntezę białka w układach bezkomórkowych (124), a więc wykazuje właściwości informacyjnego RNA. Podobny mechanizm przypisuje Stent tworzeniu się kwasów rybonukleinowych rybosomów. Mechanizm uwalniania się powstającego łańcucha RNA z kompleksu z polimerazą jest według Stenta jednakowy zarówno dla RNA informacyjnego jak i RNA rybosomów i polega na wiązaniu powstającego RNA przez rybosomy.



Rys. 3. Powstawanie i uwalnianie się nici kwasu rybonukleinowego przy udziale rybosomów (wg 102)
Reprodukowany za pozwoleniem autora

W przypadku RNA informacyjnego tworzą się od razu polisomy, natomiast powstający RNA rybosomów spełnia początkowo rolę mRNA w stosunku do białek rybosomowych. Za takim poglądem przemawiają też prace Otaki i wsp. (77), a także Nakady (69), którzy wykazali, że

RNA wyizolowany z niedojrzałych rybosomów bakteryjnych stymuluje włączanie aminokwasów *in vitro*. Po połączeniu się z białkiem rybosomów RNA przerywa swoją funkcję informacyjną tworząc już dojrzały rybosom.

LITERATURA

1. Abell L. L., Levy B. B., Brodie B. B., Kendall F. E., *J. Biol. Chem.* **195**, 357 (1952).
2. Allfrey V. G., Mendt R., Hopkins J. W., Mirsky A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 907 (1961).
3. Arnstein H. R. V., Cox R. A., Gould H., Potter H., *Biochem. J.* **96**, 500 (1965).
4. Barbu E., Panijel J., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **250**, 1382 (1960).
5. Bayley S. T., doniesienie osobiste, IEG no 7, memo 137.
6. Beinert H., *J. Biol. Chem.* **190**, 287 (1951).
7. Birbeck M. S. C., Mercer E. H., *Nature* **189**, 558 (1961).
8. Bladen H. A., Byrne R., Levin J. G., Nirenberg M. W., *J. Mol. Biol.* **11**, 78 (1965).
9. Boedtker H., *J. Mol. Biol.* **2**, 171 (1960).
10. Brenner C. B., Davies M. C., Florini J. R., *Biochemistry* **3**, 1713 (1964).
11. Britten R. J., Roberts R. B., *Science* **131**, 32 (1960).
12. Brock T. D., *Fed. Proc.* **23**, 965 (1964).
13. Burny A., Marbaix G., Quertier J., Brachet J., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 526 (1965).
14. Byrne R., Levin J. G., Bladen H. A., Nirenberg M. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 140 (1964).
15. Cammack K. A., Wade H. E., *Biochem. J.* **96**, 761 (1965).
16. Campbell P., Greengard O., *Biochem. J.* **71**, 148 (1959).
17. Cannon M., Krug R., Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **7**, 360 (1963).
18. Chamberlin M., Berg P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 81 (1962).
19. Chao F. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 426 (1957).
20. Colombo B., Felicetti L., Baglioni C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 389 (1965).
21. Cooper A. H., *Biochem. J.* **84**, 18P (1962).
22. Cox R. A., Arnstein H. R. V., *Biochem. J.*, **83**, 4P (1962).
23. Dagley S., White A. E., Wild D. G., Sykes J., *J. Gen. Microbiol.* **29**, 59 (1962).
24. Davies J., Gilbert W., Gorini L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 883 (1964).
25. Decroly M., Cape M., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 601 (1965).
26. Dubnau D., Smith J., Marmur J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 724 (1965).
27. Dunn D. B., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 286 (1959).
28. Edelman T. S., Tso P. O. P., Vinograd J., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 393 (1960).
29. Everett G. A., Holley R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 390 (1961).
30. Fawcett D. W., *J. Natl. Canc. Inst.* **15**, 1475 (1955).
31. Feiss M., Demoss R. D., *J. Mol. Biol.* **14**, 283 (1965).
32. Fogel Z., Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 601 (1964).
33. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A., *Virology* **14**, 54 (1961).
34. Geiduschek E. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 1571 (1965).

35. Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **6**, 374 (1963a).
36. Goodman H., Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2101 (1962).
37. Gros P. R., Philpott D. E., Nass S. J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 135 (1959).
38. Haguenu F., *Intern. Rev. Cytol.* **7**, 427 (1958).
39. Hall B. D., Doty P., *J. Mol. Biol.* **1**, 111 (1959).
40. Hall C. E., Slayter H. S., *J. Mol. Biol.* **1**, 329 (1959).
41. Hart R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 1415 (1965).
42. Henshaw E. C., Bojarski T. B., Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **7**, 122 (1963).
43. Hess E. L., Lagg S. E., *Biochemistry* **2**, 726 (1963).
44. Hogeboom G. H., Schneider W. C., Palade G. E., *J. Biol. Chem.* **172**, 619 (1948).
45. Huxley H. E., Zubay G., *J. Mol. Biol.* **2**, 10 (1960).
46. Iwabuchi M., Kono M., Oumi T., Osawa S., doniesienie osobiste IEG no 7, memo 84.
47. Kay E. R. M., Dounce A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4041 (1953).
48. Keller E. B., Zamecznik P. C., Lotfield R. B., *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 378 (1954).
49. Kisselev N. A., Gavrilova L. P., Spirin A. S., *J. Mol. Biol.* **3**, 778 (1961).
50. Kirsch J. F., Siekevitz P., Palade G. E., *J. Biol. Chem.* **325**, 1417 (1960).
51. Korner A., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 554 (1959).
52. Korner A., *Biochem. J.* **81**, 168 (1961).
53. Korzybski T., Kuryłowicz W., Antybiotyki, PWN, Warszawa, 1959, s. 187.
54. Kurland C. G., *J. Mol. Biol.* **2**, 83 (1960).
55. Kurland C. G., Nomura M., Watson J. D., *J. Mol. Biol.* **4**, 388 (1962).
56. Lamfrom H., Glowacki E. R., *J. Mol. Biol.* **5**, 97 (1962).
57. Landgridge R., *Science* **140**, 1000 (1963).
58. Lewis U. J., Rickes E. L., Williams D. E., McClelland L., Brink N. G., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5178 (1960).
59. Littauer U. Z., Harris R. J. C., Protein Biosynthesis, Academic Press N. Y., 1961.
60. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. J., Randall R. J., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
61. Lyttleton J. W., *Nature* **187**, 1026 (1960).
62. Marcot-Queiroz J., Julien J., Rosset R., Monier R., *Bull. Chim. Biol.* **47**, 183 (1965).
63. Martin R. G., Ames B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2171 (1962).
64. Midgley J. E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 513 (1962).
65. Midgley J. E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 340 (1965).
66. Moulé Y., Chauveau J., Rouiller C., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 547 (1960).
67. Munro A. J., Jackson R. J., Korner A., *Biochem. J.* **92**, 289 (1964).
68. Nakada D., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 455 (1965).
69. Nakada D., *J. Mol. Biol.* **12**, 695 (1965).
70. Nathans D., *Fed. Proc.* **23**, 984 (1964).
71. Nathans D., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 496 (1961).
72. Neu M. C., Heppel L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 1267 (1964).
73. Neu M. C., Heppel L. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 109 (1964).
74. Neu M. C., Heppel L. A., *J. Biol. Chem.* **239**, 3893 (1965).
75. Nomura M., Watson J. D., *J. Mol. Biol.* **1**, 204 (1959).
76. Okamoto T., Takanami M., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 325 (1963).

77. Otaka E., Osawa S., Sibatani A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 568 (1964).
78. Palade G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 59 (1955).
79. Palay S. L., Palade G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 69 (1955).
80. Petermann M. L., Hamilton M. G., *J. Biol. Chem.* **224**, 725 (1957).
81. Peterson E. A., Kuff E. L., *Fed. Proc.* **20**, 390 (1961).
82. Philipps G. R., *Nature* **205**, 567 (1965).
83. Pirie N. W., *Biochem. J.* **47**, 614 (1950).
84. Pogo A. O., Pogo B. G. T., Littau W. C., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Hamilton M. G., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 849 (1962).
85. Rampersad O. R., Zak R., Rabinowitz M., Wood L. G., DeSal-
le L., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 95 (1965).
86. Rendi R., *Exptl. Cell Res.* **17**, 585 (1959).
87. Robbins E., Scharff M. D., *Fed. Proc.* **24**, 445 (1965).
88. Roberts R. B., *Microsomal Particles and Protein Synthesis*, Pergamon Press,
Oxford, 1958, s. VII.
89. Robinson C. L., Novelli G. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 459 (1962).
90. Sachs H., *J. Biol. Chem.* **228**, 23 (1957).
91. Salas M., Smith M. A., Stanley W. M., Wahba A. J., Ochoa S.,
J. Biol. Chem. **240**, 3988 (1965).
92. Scharff M. D., Uhr J. W., *Science* **148**, 646 (1965).
93. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**,
240 (1963).
94. Siegel M. R., Sisler H. D., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 83 (1964).
95. Slautterback D. B., Fawcett D. W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 441
(1959).
96. Spahr P. F., Hollingworth B., *J. Biol. Chem.* **236**, 823 (1961).
97. Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **4**, 395 (1962).
98. Spencer M., Fuller W., Wilkins M. H. F., Brown G. L., *Nature* **194**,
1014 (1962).
99. Spirin A. S., Kisselev N. A., Shakulov R. S., Bogdanov A. A.,
Biochimija **28**, 920 (1963).
100. Spirin A. S., Kisselev N. A., Sixth Internatl. Congress of Biochemistry,
Nucleic Acids, N.Y. 1964, s. 32.
101. Spirin A. S., *Macromolecular Structure of Ribonucleic Acids*, Reinhold Pub.
Corp., N.Y. 1964, str. 176.
102. Stent G. S., *Proc. Roy. Soc.*, (Londyn), **B**, w druku, 1966.
103. Szafranski P., Perzyński S., Krasicka B., *Acta Biochim. Polon.* **11**,
159 (1964).
104. Takanami M., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 152 (1960).
105. Takanami M., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 318 (1960).
106. Tal M., Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 40 (1963).
107. Taylor A. R., Sharp D. G., Woodhall B., *Science* **97**, 226 (1943).
108. Tissières A., Schlessinger D., Gros F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
46, 1450 (1960).
109. Truman D. E. S., *Exptl. Cell Res.* **31**, 313 (1963).
110. Tso P. O. P., Bonner J., Vinograd J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**,
451 (1956).
111. Tso P. O. P., Bonner J., Vinograd J., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 570
(1958).
112. Wacker W. E. C., Valee B. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 3257 (1959).
113. Wade H. E., Robinson H. K., *Nature* **200**, 661 (1963).
114. Wade H. E., Robinson H. K., *Biochem. J.* **97**, 747 (1965).

115. Waller J. P., *J. Mol. Biol.* **10**, 319 (1964).
116. Warner J. R., Rich A., Hall C. E., *Science* **138**, 1399 (1962).
117. Watson J. D., *Science* **140**, 18 (1963).
118. Watson J. D., *Bull. Chim. Biol.* **46**, 1399 (1964).
119. Webster G. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 402 (1957).
120. Weisberger A. S., Wolfe S., *Fed. Proc.* **23**, 976 (1964).
121. Weiss S. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1020 (1960).
122. Wettstein F. O., Staehelin T., Noll H., *Nature* **197**, 430 (1963).
123. Wettstein F. O., Noll H., Penman S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 525 (1964).
124. Wood W. B., Berg P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 94 (1962).
125. Zipser D., *J. Mol. Biol.* **7**, 739 (1963).
126. Yankofsky S., Spiegelman S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1069 (1962).

MONOGRAFIE

1. Bonner J., Tso P. O. P., *The Nucleohistones*, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1964.
2. Petermann M. L., *The Physical and Chemical Properties of Ribosomes*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1964.
3. Wiseman A., *Organization for Protein Biosynthesis*, Blackwell Sci. Publ., 1965.

TOMASZ GOŁASZEWSKI* i JAN W. SZARKOWSKI**

Powstawanie i rozwój rybosomów

Formation and Development of Ribosomes

Ribonucleoprotein particles appearing in bacterial cells in spite of artificially unbalanced RNA and protein synthesis are compared with protein deficient priribosomes formed in normal bacteria. The data concerning the relation of priribosomal RNA to messenger RNA are reviewed. The messenger function of priribosomal RNA in the synthesis of ribosomal protein is discussed and the probability of priribosomes maturation in which no preexisting ribosomes are involved is considered.

Wiadomości na temat powstawania i rozwoju rybosomów są stosunkowo skromne, jeśli porównać je z obszerną literaturą dotyczącą funkcji tych organelli w procesach syntezy białek. Rybosomy, niezależnie od pochodzenia, zawierają ok. 60% RNA i 40% białka. Przyjmując powszechny pogląd o nieodzowności w pełni uformowanych rybosomów w procesie biosyntezy białka, trudno wytłumaczyć, na jakiej drodze — szczególnie w aspekcie filogenetycznym — powstaje strukturalne białko samych rybosomów. Nie jest zupełnie jasne, czy powstawanie rybosomów jest procesem autokatalitycznym, czy też wymaga ono obecności DNA lub informacyjnego RNA, a więc czy stanowi proces spokrewniony z przekazywaniem informacji genetycznej. Nie zupełnie jasny jest też stosunek informacyjnego RNA do RNA inicjującego powstawanie rybosomów czyli tzw. prekursorowego (progeniturowego) RNA, różniącego się niektórymi właściwościami od RNA rybosomów dojrzałych (46, 86).

Badania nad formowaniem rybosomów obejmują poznawanie szlaków metabolicznych obydwu podstawowych składników — RNA i białka, a przede wszystkim uwzględniać muszą miejsce ich syntezy w komórce, jakość obu składników i ich wzajemne stosunki ilościowe w ontogenezie tych organelli. Badania te mogą ewentualnie dostarczyć nowych danych o procesie przenoszenia informacji genetycznej.

* Dr, st. asystent, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

** Doc. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

Rozmieszczenie i formy rybosomów w komórce

W świecie zwierzęcym (72) jak również u roślin wyższych (91) rybosomy występują głównie w cytoplazmie i pozostają związane z tzw. endoplazmatycznym reticulum. U bakterii, które nie posiadają endoplazmatycznego reticulum, rybosomy związane są z błonami innego typu (72). U organizmów wyższych, prócz rybosomów występujących w cytoplazmie, znaleziono rybosomy w jądrze (1), jąderku (6) i innych organellach komórkowych — w mitochondriach (73) i chloroplastach (59). Biorą one tam prawdopodobnie udział w autonomicznej syntezie białek w sposób podobny jak w pozaorganellowych rejonach cytoplazmy. Pisaliśmy o tym szerzej w artykule przeglądowym na temat biosyntezy białek w chloroplastach (27). Stwierdzenie cząstek rybonukleoproteidowych w jądrze komórkowym dało B o n n e r o w i asumpt do wysunięcia hipotezy o jądrowym pochodzeniu rybosomów cytoplazmatycznych.

Wirowanie ekstraktów lub homogenatów komórkowych w gradiencie sacharozy (8, 9, 13, 79, 97) pozwala wyróżnić z populacji rybosomów cytoplazmatycznych różne formy (podjednostki strukturalne) charakteryzujące się odmiennymi wartościami stałych sedymentacji. Formy te nie różnią się między sobą ani stosunkiem białka do RNA (97) ani też składem nukleotydowym i aminokwasowym (78, 79). Odmienna sekwencja nukleotydów w RNA podjednostek rybosomowych 30S i 50S u *Escherichia coli* wskazuje, zdaniem A r o n s o n a (4), na brak genetycznego związku między nimi. Właśnie fakt występowania podjednostek rybosomów o odmiennych stałych sedymentacji (13) nasunął przypuszczenie o stadialnym rozwoju tych organelli, polegającym między innymi na asocjacji jednostek mniejszych. Przypuszczenie to zostało wysunięte przez R o b e r t s a i wsp. (8, 9, 11, 55) a także przez O t a k ę i wsp. (68). Ci ostatni podkreślali, że w czasie wzrostu komórek *Escherichia coli*, przy stałym stężeniu jonów magnezu, ilość rybosomów o stałej sedymentacji 30S i 50S maleje i w wykładniczej fazie wzrostu ilościowo przeważają rybosomy o stałej sedymentacji 70S. O tych ostatnich wiadomo, że najaktywniej włączają znakowane aminokwasy (10). Stanowiłyby one ostateczne stadium rozwojowe rybosomu u *Escherichia coli*. W odpowiednim stężeniu jonów magnezu mogą powstawać wskutek agregacji dwóch takich rybosomów cząstki o stałej sedymentacji 100S.

Rybosomy o stałej sedymentacji 70S, jak się dzisiaj przyjmuje, łączą się w układy zawierające kilka do kilkudziesięciu rybosomów, tworząc tzw. polisomy (77, 99). Te układy stanowią już jednostki programowane zawierające nić informacyjnego RNA. Tworzenie polisomów, jako proces łączenia się rybosomów dojrzałych, nie wchodzi w zakres tego artykułu. Nadmienimy tylko, że w procesie tym mogą odgrywać pewną rolę wykryte niedawno połączenia nukleoproteidowe zawierające informacyjny RNA, nazwane przez ich odkrywców, S p i r i n a i wsp. (81), informosomami.

Spirin i wsp. podkreślają jednak, iż nie można tych kompleksów uważać za prekursorów rybosomów. Podobnie prekursorami rybosomów nie wydają się być połączenia podjednostek rybosomowych z informacyjnym RNA (31, 38, 56) ani też wykryte w pracowni Nirenberga połączenia nukleoproteidowe zawierające DNA (7). Nie wiadomo, w jakim stosunku do normalnych prekursorowych form rybosomów pozostają cząstki rybo-nukleoproteidowe o stałej sedymentacji 45S i 60S wykryte ostatnio w cytoplazmie komórek HeLa przez Girarda i wsp. (25).

Miejsce syntezy składników rybosomu

Miejscem syntezy prekursorowego RNA rybosomów u organizmów wyższych jest jądro komórkowe, prawdopodobnie jąderko. Według Perry'ego (71) 95% trytu włączonego do komórek fibroblastów po 30 minutowej inkubacji ze znakowaną ^3H -cytydyną wykrywa się w jądrze. Jeśli natomiast po tej wstępnej inkubacji prowadzi się czterogodzinną inkubację komórek w obecności cytydyny nieznakowanej, tryt wykrywa się głównie w cytoplazmie. Świadczyłoby to, iż większa część RNA cytoplazmy syntetyzowana jest właśnie w jądrze. Ponieważ wiadomo, że większą część RNA cytoplazmy stanowi RNA rybosomów, można przyjąć, iż rybosomowy RNA jest pochodzenia jądrowego. Jednak Webster i wsp. (100) obserwowali syntezę RNA rybosomów również w bezjądrowych fragmentach komórkowych glonu *Acetabularia crenulata*.

Hipotezę o jąderkowym pochodzeniu RNA rybosomów popierają obserwacje dokonane przez Browna i Gurdona (12) na letalnym mutancie południowo-afrykańskiej ropuchy *Xenopus laevis*. Mutant ten, w przeciwieństwie do szczepów dzikich, nie posiada normalnie wykształconych jąderek w jądrze komórkowym i nie tworzy rybosomów. Szczepy dzikie tego organizmu, w okresie embriogenezy nie wytwarzają jąderek do stadium gastrulacji, a zarazem nie wytwarzają w tym czasie rybosomów korzystając z rybosomów powstałych w okresie oogenezy.

Białka rybosomów syntetyzowane są przynajmniej częściowo w cytoplazmie. Tamaki i Mueller (94, 95, 96) są zdania, że w komórkach HeLa łączenie rybosomowego RNA z białkiem następuje już w jądrze komórkowym. Z prac grup Roberta (8, 9, 11, 55) i Osawy (35, 41) wynika, że u *Escherichia coli* pierwszym stadium rozwojowym rybosomu jest wolny RNA o stałej sedymentacji ok. 14S—16S, który następnie przyłącza białka.

Jeśli przyjmujemy, że w komórkach organizmów wyższych istnieją odmienne pule rybosomów: w jądrze, mitochondriach, plastydach i cytoplazmie, wówczas nie jest wykluczone współdziałanie różnych organelli w budowie rybosomów poszczególnych typów. U roślin zielonych np. białko rybosomów cytoplazmatycznych jest, być może, syntetyzowane częściowo przez chloroplasty (patrz 27).

Sposoby badania procesu rozwoju rybosomów

Śledzenie syntezy obu składników rybosomu i procesów formowania tej organelli wymagało specjalnego podejścia metodycznego i wyboru odpowiedniego obiektu badań. Badania prowadzono np. używając tzw. „rozluźnionego” (*relaxed*) mutantu $K_{12}W6$ *Escherichia coli* (84), u którego — przy braku metioniny w pożywce — zahamowana jest synteza białka a zachodzi przez pewien czas synteza RNA (51, 52). Stosowano również inne szczepy tej bakterii, u których stwierdza się ścisłą zależność syntezy RNA od obecności aminokwasów w pożywce (*stringent mutants*). U tych szczepów przy braku koniecznego aminokwasu w pożywce następuje równoczesne zahamowanie syntezy białka i RNA. Ich normalną syntezę białek można zakłócać za pomocą takich czynników jak: chloramfenikol, puromycyna, streptomycyna oraz analogi prekursorów RNA jak 5-fluorouracyl, 8-azaguanina i 8-azaadenina. Przy stosowaniu wymienionych antybiotyków następuje zahamowanie syntezy białek bez równoczesnego zahamowania syntezy RNA i powstają wówczas cząstki nukleoproteidowe z wyraźną przewagą RNA. Cząstki te będziemy określać w dalszym ciągu tego artykułu jako: cząstki „chloramfenikolowe”, cząstki „puromycynowe” i cząstki „streptomycynowe”.

U mutantów ze ściśle sprzężoną syntezą RNA i białka możliwe jest zakłócenie syntezy RNA rybosomów przy przeniesieniu bakterii z pożywki zawierającej gorsze źródło energii do pożywki z lepszym źródłem energii; wówczas przez pierwsze 20 minut po zmianie podłoża odbywa się selektywna synteza rybosomowego RNA (69). Przeniesienie zaś bakterii z pożywki o bogatszym źródle energii do pożywki o uboższym źródle, np. zawierającej zamiast glukozy kwas bursztynowy, powoduje zahamowanie syntezy RNA, głównie RNA rybosomów (30). Brak jonów potasu w pożywce również zakłóca normalnie zrównoważoną syntezę białek i RNA w komórce (20, 21, 22) a brak jonów magnezu powoduje rozpad istniejących rybosomów (54, 63).

Operowanie tego rodzaju obiektami badań, u których można było obserwować przesuwanie się równowagi syntezy obu składników rybosomu, pozwoliło na nagromadzenie cennych wiadomości sugerujących stadialny rozwój tych organelli.

Synteza rybosomowego RNA w warunkach głodu aminokwasowego u mutantów *Escherichia coli* z rozprzężoną syntezą białek i RNA

Z prac Mandela i Boreka (51, 52) oraz Nakady i wsp. (62) wiadomo, że w warunkach głodu metioninowego u „rozluźnionego” mutantu $K_{12}W6$ *Escherichia coli* syntetyzowane są wszystkie rodzaje RNA — rybosomowy o stałej sedimentacji 16S i 23S, rozpuszczalny 4S i informacyjny. Według Dagley'a i wsp. (17) 70% RNA syntetyzowanego

w tych warunkach w komórce stanowi RNA odmienny od RNA frakcji rozpuszczalnej. Nagromadzany RNA pojawia się przede wszystkim w formie cząstek rybonukleoproteidowych o stałej sedymentacji między 16S i 25S (17, 62), choć stwierdzano również cząstki o stałej sedymentacji 30S i 45S (88).

Cząstki rybonukleoproteidowe pojawiające się w czasie głodu metioninowego są bardziej wrażliwe na działanie rybonukleazy niż normalne rybosomy. Wynika to prawdopodobnie z dwu przyczyn: mniej upakowanej struktury drugorzędowej RNA tych cząstek — stwierdza się między innymi znacznie mniejszy stopień metylacji jego zasad azotowych (52, 86) — jak również mniejszej zawartości białka (61). Zawartość białka i RNA w tych cząstkach jest inna niż w rybosomach normalnych i wynosi odpowiednio 30% i 70% (88). Sam zaś RNA tych cząstek daje się rozdzielić na dwa składniki o stałej sedymentacji 16S i 23S, a pod względem stopnia spolimeryzowania odpowiada kwasowi rybonukleinowemu normalnych rybosomów.

Po przerwaniu głodu aminokwasowego piętno znakowanego uprzednio RNA, zawartego w cząstkach rybonukleoproteidowych o nietypowych wartościach stałej sedymentacji, pojawia się bardzo szybko w podjednostkach rybosomowych 30S względnie 50S, które normalnie występują u *Escherichia coli*. Nie wiadomo jednak, czy włączanie RNA do normalnych podjednostek odbywa się po uprzedniej jego degradacji, czy też bezpośrednio włączane są cząstki rybonukleoproteidowe lub wolny RNA. Według N a k a d y i wsp. (62) czas potrzebny na pojawienie się piętna znakowanego RNA w podjednostkach 30S i 50S po ustaniu głodu metioninowego wynosi ok. 15 minut. Natomiast całkowity rozpad cząstek nagromadzonych w czasie głodu aminokwasowego, zachodzący po zahamowaniu syntezy RNA dwunitrofenolem, następuje po 75 minutach. Wskazywałoby to, że po ustaniu głodu aminokwasowego włączanie RNA do normalnych rybosomów odbywa się bez uprzedniej jego depolimeryzacji.

Według S y p h e r d a (88, 89) cząstki rybonukleoproteidowe powstające w warunkach głodu metioninowego, są prekursorami normalnych rybosomów i pojawiają się również w normalnych warunkach wzrostu bakterii lecz w znacznie mniejszych ilościach i dlatego są trudne do zaobserwowania. W obecności koniecznych aminokwasów w pożywce przekształcają się one w rybosomy dojrzałe poprzez przypadkowe łączenie się między sobą.

Bezpośrednio po przerwaniu głodu aminokwasowego rozpoczyna się intensywna synteza białka, przy czym jest to preferencyjna synteza białek rybosomów (53, 61, 98). Około 65% piętna znakowanych aminokwasów pojawia się wówczas w rybosomach, natomiast w normalnych warunkach wzrostu komórek *Escherichia coli* we frakcji rybosomowej wykrywa się tylko około 20% znakowanych aminokwasów (61). Uprzywilejowana synteza białek rybosomowych trwa znacznie dłużej niż wynosi połowiczny

okres trwania informacyjnego RNA. Wskazywałoby to, iż RNA nagromadzony w niedojrzałych rybosomach w czasie głodu aminokwasowego sam kieruje syntezą białka rybosomowego, tym bardziej, że zaobserwowano stymulujący wpływ tego RNA na włączanie znakowanych aminokwasów do białka *in vitro*. Stymulacja ta jest znacznie wyższa niż stymulacja obserwowana po dodaniu RNA rybosomów dojrzałych i ma miejsce również w obecności aktynomycyny D hamującej syntezę nowego RNA oraz w obecności dezoksyrybonukleazy niszczącej matrycę DNA dla nowosyntetyzowanego informacyjnego RNA; natomiast całkowicie znosi stymulację rybonukleaza. Interesujące było spostrzeżenie N a k a d y (61), że dodatek polinukleotydu urydylowego nie wpływał stymulująco na włączanie fenyloalaniny do omawianych niedojrzałych rybosomów. Zdaniem tego autora może to wskazywać, iż rybosomy niedojrzałe nie są zdolne do przyjęcia informacyjnego RNA pochodzącego z zewnątrz. Dysponują one własnym RNA, kierującym syntezą białek rybosomów aż do momentu osiągnięcia przez nie dojrzałości funkcjonalnej. Z chwilą, kiedy synteza białek własnych jest już ukończona, dojrzały rybosom musi korzystać z informacji dochodzącej z zewnątrz w postaci informacyjnego RNA. Tak więc zdaniem N a k a d y, odróżnić można dwa etapy funkcjonalnego rozwoju rybosomu: pierwszy, czynny, kiedy własne białko rybosomu niedojrzałego syntetyzowane jest pod kontrolą prekursorowego RNA rybosomu, odgrywającego wówczas rolę RNA informacyjnego i drugi — rozpoczynający się w momencie skompletowania białek własnych rybosomu, kiedy to kończy się informacyjna rola RNA rybosomowego i dojrzały rybosom staje się biernym akceptorem informacyjnego RNA kierującego syntezą innych białek. Pogląd o biernej, podporowej niejako roli rybosomów w powszechnie akceptowanym schemacie syntezy białek przyjęto po wykryciu informacyjnego RNA (10).

Sygnałem do ustania informacyjnej roli RNA rybosomu jest, być może, jakaś zmiana w drugorzędowej strukturze lub zakrycie jego powierzchni przez powstające białko. Nie jest wykluczone, że pewną rolę odgrywałaby tu metylacja zasad azotowych (28, 51, 52, 61, 86).

W syntezie białek rybosomu odgrywałby rolę również RNA przenoszący aminokwasy, podobnie jak się to dzieje we wszystkich układach syntetyzujących białko. N a k a d a (61) stwierdzał *in vitro* włączanie znakowanego węglem ^{14}C RNA rozpuszczalnego do niedojrzałych rybosomów powstających w czasie głodu metioninowego. Pewną ilość rozpuszczalnego RNA w preparatach takich rybosomów stwierdzili już uprzednio G o r d o n i B o m a n (28). Obecność tej frakcji RNA — obok odpowiednich enzymów i systemu regenerującego energię — była niezbędna w procesie włączania znakowanych aminokwasów przez niedojrzałe rybosomy *in vitro* (53).

Dodatkowe dowody na informacyjną rolę RNA zawartego w cząstkach

rybosomowych powstających w czasie głodu metioninowego u mutantu „rozluźnionego” *Escherichia coli*, uzyskał Nakada stosując 5-fluorouracyl jako czynnik zakłócający powstawanie „normalnego” RNA.

Synteza RNA rybosomów w obecności inhibitorów syntezy białka

Jak już wspomniano, w badaniach nad rozwojem rybosomów przydatne okazały się substancje zakłócające zrównoważoną normalnie syntezę białka i RNA. Najszerzej badano wpływ chloramfenikolu. Antybiotyk ten, w odpowiednim stężeniu (5), hamuje całkowicie syntezę białek nie hamując syntezy RNA (14, 23, 24), która zachodzi przez ok. 2 godziny od momentu dodania chloramfenikolu do pożywki (101).

Pierwszą obszerną pracę o wpływie tego antybiotyku na pojawianie się nietypowych cząstek rybonukleoproteidowych w komórce *Escherichia coli* ogłosili Nomura i Watson w 1959 roku (65). Okazało się, że w obecności chloramfenikolu zanikają normalnie występujące w komórce podjednostki rybosomów 30S i 50S, pojawiają się natomiast cząstki lżejsze o stałych sedymentacji 18S i 25S. Zawierają one około 25% białka i 75% RNA (43, 44, 64, 82, 90). Kwas rybonukleinowy tych cząstek stanowi ok. 60% RNA komórek *Escherichia coli* (17) a u *Aerobacter aerogenes* — nawet 80% (23). Skład nukleotydowy tego RNA nie odbiega od składu RNA rybosomów *Escherichia coli* powstających w trakcie wzrostu bakterii bez dodatku antybiotyku (15, 42, 70). Według Kurlanda i Maaløe (43) co najwyżej 25% RNA tych cząstek syntetyzowane jest przed dodaniem antybiotyku, reszta powstaje w jego obecności. Ten RNA nie różni się zasadniczo pod względem wielkości cząsteczek od RNA rybosomów normalnych. Według Kurlanda i wsp. (44) w tworzących się w obecności chloramfenikolu cząstkach o stałej sedymentacji 18S występuje RNA o stałej sedymentacji 16S, a w cząstkach 25S — RNA ma stałą sedymentacji 23S. Oba typy RNA stwierdza się w rybosomach normalnych *Escherichia coli* (72). Zdaniem Kurlanda i Maaløe (43) 23S RNA może pochodzić z rozpadu rybosomów, które powstały przed dodaniem antybiotyku. W związku z tym autorzy wysuwają przypuszczenie, iż cząstki „chloramfenikolowe” 18S odpowiadają normalnie pojawiającym się prekursorowym formom rybosomów. Sądzi się dzisiaj, że w cząstkach „chloramfenikolowych” nagromadza się prekursorowy RNA rybosomów (46).

Białko cząstek rybonukleoproteidowych powstających w obecności antybiotyku musi pochodzić z puli białek syntetyzowanych przed jego dodaniem. Cząstki te, powstałe w obecności antybiotyku i znakowanych aminokwasów, nie zawierały piętna (43). Jednakże po usunięciu chloramfenikolu są one zdolne do syntezy własnego białka. Otaka i wsp. (69) stwierdzili, że RNA cząstek „chloramfenikolowych”, powstałych po prze-

niesieniu bakterii do pożywki energetycznie bogatszej — kiedy to synteza informacyjnego RNA była selektywnie zahamowana — stymulował włączanie znakowanych aminokwasów do białek *in vitro*. Sugerowałoby to, że RNA tych cząstek może pełnić rolę RNA informacyjnego. Same zaś cząstki „chloramfenikolowe” mają zdolność włączania niektórych aminokwasów do białek własnych bez dodatku guanozynotrójfosforanu i dojrzałych rybosomów (66).

Istniałoby więc pewne podobieństwo cząstek powstających w obecności chloramfenikolu do cząstek powstających w warunkach głodu metioninowego u mutanta rozprzężonego *Escherichia coli* (16). Tym bardziej, że zarówno jedne jak i drugie przekształcają się w normalne podjednostki 30S bądź 50S z chwilą przywrócenia normalnych warunków hodowli (64). Również zdaniem Szakulowa, Bogdanowa i Spirina (90), po usunięciu chloramfenikolu powstają normalne podjednostki rybosomów przez spontaniczne przyłączanie się białek cytoplazmatycznych do cząstek „chloramfenikolowych”. Autorom tym udało się nawet przeprowadzić taką syntezę *in vitro*. Cząstki „chloramfenikolowe” reprezentują, być może, jakieś pośrednie stadia rozwojowe rybosomu i stanowią prawdopodobnie odpowiedniki „prorybosomów” pojawiających się w małych ilościach w warunkach normalnej hodowli bakterii.

Podobne twory pojawiają się w obecności antybiotyku puromycyny, hamującego syntezę białek. Z pracy Sellsa (76) wiadomo, że w obecności puromycyny następuje nagromadzenie RNA w komórkach *Escherichia coli*. W warunkach tych powstaje RNA rybosomowy o stałej sedymentacji 16S i 23S a także RNA 4S przenoszący aminokwasy. Według Hosokawy i Nomury (34) powstają wówczas głównie cząstki nukleoproteidowe 20S i 25S. Zawierają one 70% RNA i 30% białka. Kwasy rybonukleinowe tych cząstek o stałych sedymentacji 16S i 23S, mają skład nukleotydowy analogiczny jak RNA rybosomów normalnych. Po usunięciu antybiotyku piętno znakowanego uprzednio radioaktywnym fosforem RNA tych cząstek pojawia się po 90 minutach w normalnych podjednostkach rybosomów 30S i 50S. Równocześnie odbywa się preferencyjna synteza białek rybosomów. Przekształcanie cząstek „puromycynowych” w normalne rybosomy odbywa się zasadniczo bez uprzedniej degradacji RNA i bez odłączania białka. Tylko nieznaczna część RNA cząstek „puromycynowych” może być wykorzystana do budowy normalnych rybosomów po uprzedniej degradacji (34).

Tamaoki i Mueller (94) badając wpływ puromycyny na syntezę RNA rybosomów w komórkach HeLa stwierdzili, że w obecności tego antybiotyku piętno znakowanych prekursorów RNA nie pojawia się w kwasie rybonukleinowym rybosomów. Jednakże w tych warunkach odbywa się, przynajmniej częściowo, synteza wysokopolimeryzowanego RNA o stałej sedymentacji 45S, który zdaniem szeregu autorów (26, 75, 95) łączy się z białkiem i następnie przekształca w rybosomowy RNA 16S

i 28S w wyniku degradacji. Puromycyna hamowałaaby proces tworzenia się rybosomów w komórkach HeLa poprzez hamowanie syntezy białka (96), które w warunkach normalnych tworzy kompleks ze wspomnianym wysokospolimeryzowanym RNA już na terenie jądra komórkowego.

Inny antybiotyk — streptomycyna, hamujący syntezę białek bez zahamowania syntezy RNA (29) zakłóca również normalny proces powstawania rybosomów (16). Niedawne badania D u b i n a (18) wykazały, że u szczepu ML-35 *Escherichia coli* hodowanego w obecności streptomycyny pojawiają się cząstki o stałej sedymentacji ok. 15S zawierające kwas rybonukleinowy. Autor sugeruje podobieństwo tych cząstek do cząstek „chloramfenikolowych” i przyjmuje, że mogą być one prekursorami rybosomów. Jak dotąd nie ma w literaturze bliższej charakterystyki cząstek „streptomycynowych”.

Jak już wspomniano, zahamowanie syntezy białka przy zachowanej syntezie RNA w komórce bakteryjnej, następuje również przy niedostatku potasu w pożywce. Badania tego zjawiska u *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* prowadzili E n n i s i L u b i n (20). Okazało się, że u mutantu B-207 *Escherichia coli* rybosomowy RNA gromadzi się w tych warunkach w cząstkach nukleoproteidowych opadających w czasie wirowania wolniej niż normalne podjednostki rybosomowe 30S (21). W cząstkach tych RNA przeważał ilościowo nad białkiem. Kwas rybonukleinowy tych cząstek składał się z dwu frakcji, o stałych sedymentacji 16S i 23S. Po dodaniu potasu do pożywki piętno znakowanych uprzednio ¹⁴C-guaniną kwasów rybonukleinowych tych cząstek pojawiało się najpierw w podjednostkach rybosomów 30S a potem 50S. Również w tym samym czasie — po przerwaniu głodu potasowego — następowała preferencyjna synteza białek rybosomów. Po podaniu znakowanej leucyny stwierdzono bowiem trzykrotnie wyższą aktywność właściwą białek rybosomów niż pozostałych białek cytoplazmy. Zdaniem E n n i s a i L u b i n a (21, 22) wyniki te wskazywałyby na zwiększenie pewnej frakcji informacyjnego RNA związanego z niedojrzałymi rybosomami i kierującego syntezą białek rybosomowych. Spostrzeżenia tych autorów popierałyby przedstawione poglądy N a k a d y (61) o informacyjnym charakterze RNA cząstek rybosomowych zatrzymanych sztucznie w rozwoju.

Obok jonów potasu również jony magnezu wywierają charakterystyczny wpływ na losy RNA rybosomów. Z jednej strony, zmniejszenie w pożywce stężenia jonów magnezu poniżej poziomu w komórce, powoduje rozpad rybosomów 70S na podjednostki (63, 87) a nawet odłączenie się RNA od białka (54), z drugiej zaś przerwanie głodu magnezowego doprowadza do pojawienia się cząstek rybonukleoproteidowych podobnych do cząstek „chloramfenikolowych” (87). Powstałe cząstki charakteryzują się stałą sedymentacji 25S.

Warto dodać, że mutant B14 *Escherichia coli* z uzależnioną ściśle od aminokwasów syntezą RNA wytwarza niedojrzałe rybosomy o niskiej

stałej sedimentacji i przewodze RNA nawet w nieobecności niezbędnych aminokwasów ale w obecności magnezu, jeśli uprzednio hodowany był w warunkach głodu magnezowego (63).

Do badań nad procesem dojrzewania rybosomów stosowano również analogi prekursorów RNA. Najszerzej, jak dotąd, badano wpływ 5-fluorouracylu. A r o n s o n (3) zauważył, że w komórkach *Escherichia coli* inkubowanych w obecności tego analogu wzrasta ilość cząstek rybonukleoproteidowych o niskich stałych sedimentacji. Postawił on pytanie, czy 5-fluorouracyl interferuje w procesie przekształcania małych rybosomów w duże, normalne rybosomy, czy też komórka w tych warunkach produkuje dużą ilość rybosomów małych. Analog ten nie miał wpływu na już istniejące rybosomy dojrzałe 70S — nie obserwowano bowiem zmniejszenia ich aktywności w procesie włączania znakowanych aminokwasów. Tym samym pierwotny jego wpływ odnieść możnaby do procesu rozwoju rybosomów.

K e m p n e r (39) zaobserwował, że u drożdży w obecności 5-fluorouracylu syntetyzuje się znacznie mniejsza ilość rybosomowego RNA niż normalnie — piętno znakowanych prekursorów RNA pojawia się wówczas przede wszystkim w RNA pozostającym po odwirowaniu rybosomów.

Z badań I w a b u c h i i w s p. (36) wynika, że cząstki „chloramfenikolowe” zawierające 5-fluorouracyl w swoim RNA, różnią się od cząstek „chloramfenikolowych” nie zawierających tego analogu. Jeśli inkubować oba typy cząstek w obecności 5-fluorouracylu ale bez dodatku chloramfenikolu w pożywce, te ostatnie przekształcają się w normalne podjednostki rybosomowe 30S i 50S, zaś cząstki zawierające 5-fluorouracyl w RNA przekształceniu takiemu nie ulegają. A n d o h i C h a r g a f f (2) są zdania, że cząstki rybonukleoproteidowe pojawiające się u *Escherichia coli* w obecności 5-fluorouracylu nie są prekursorami rybosomów.

N a k a d a (61) oraz M a r q u i s e e i N a k a d a (53) posługując się tym analogiem stwierdzili, że jego dodatek do pożywki, w której hoduje się „rozluźnionego” mutantu *Escherichia coli* w obecności metioniny, po uprzednim głodzie metioninowym, nie hamuje powstawania normalnych rybosomów. Znakowany 5-fluorouracyl pojawia się wówczas jedynie w małych rybosomach powstających już po jego dodaniu, nie pojawia się natomiast w normalnych podjednostkach rybosomów 30S i 50S. Jeśli zaś fluorouracyl dodaje się do pożywki w okresie głodu metioninowego, to po wprowadzeniu metioniny do podłoża nie pojawiają się normalne podjednostki rybosomów i nie zachodzi też preferencyjna synteza białek rybosomowych. Wniosek N a k a d a y wypływający z tych doświadczeń — że rybosomy zawierające RNA nagromadzony w czasie głodu aminokwasowego mogą kierować syntezą własnych białek, o ile ich RNA nie zawiera w swym składzie nienaturalnych składników — potwierdzałyby jego tezę o prekursorowym RNA rybosomów jako nośniku informacji dla własnego białka tej organelli.

W badaniach nad procesem formowania się rybosomów używano również 8-azaguaniny (16, 67, 68) i 8-azaadeniny (16). Z doświadczeń O t a k i i wsp. (67, 68) wynika, że 8-azaguanina hamuje syntezę białek i zmniejsza syntezę RNA rybosomów u *Escherichia coli* (68) i *Bacillus cereus* (67). RNA syntetyzowany w tych warunkach, zawierający 8-azaguaninę, gromadzi się w cząstkach rybonukleoproteidowych o znacznej przewadze RNA nad białkiem. Jest to głównie prekursorowy RNA, który zdaniem autorów, w normalnych rybosomach występuje jedynie w małych ilościach. Wniosek taki oparty jest na następującej obserwacji: O t a k a i wsp. rozdzielali na kolumnie z DEAE-celulozy frakcję rybosomową z *Escherichia coli* (68) i *Bacillus cereus* (67). W obu przypadkach uzyskiwali oni dwie główne frakcje. Pierwsza z nich wymywała się z kolumny chlorkiem sodu i stanowiła 85% rozdzielanego materiału, druga — wymywała się ługiem. Znakowaną adeninę, włączoną do rybosomów *in vivo*, wykrywano głównie we frakcji pierwszej. Jeśli jednak rozdzielaniu poddawano frakcję rybosomową powstałą w obecności 8-azaguaniny w pożywce, stosunki obu szczytów chromatograficznych ulegały zmianie i rozmieszczenie piętna znakowanej adeniny było odmienne: frakcja druga znacznie wzrastała i zawierała 85% piętna. Nagromadzał się więc RNA, który w normalnych rybosomach występuje w małych ilościach a proces powstawania ich białek w tych warunkach był zakłócony.

Prekursory rybosomów w normalnych warunkach wzrostu bakterii

Zastosowanie chromatografii kolumnowej pozwala, jak się wydaje, na wyodrębnienie pewnych pośrednich form rybosomów pojawiających się w czasie normalnego wzrostu komórek. Próby takie przeprowadzano w pracowni R o b e r t s a (8, 9, 11) i w innych laboratoriach (48, 49, 68).

L i n d i g k e i t i wsp. (47, 48, 49) rozdzielając na DEAE-celulozie materiał rybosomowy komórek *Escherichia coli* hodowanych w warunkach normalnych — a także w obecności chloramfenikolu — uzyskali pięć różnych frakcji rybonukleoproteidowych. Skład nukleotydomy RNA wyizolowanego z poszczególnych frakcji nie był jednakowy i niektóre z nich zawierały RNA bardziej zbliżony do składu nukleotydomy DNA. Szczególnie interesującą wydawała się frakcja wymywana z kolumny ługiem, która prawdopodobnie odpowiadała analogicznej frakcji otrzymanej przez T a k a i i wsp. (93). Zawierała ona więcej urydyny i mniej guaniny niż pozostałe frakcje a ponadto wykazywała zdolność do tworzenia hybrydów z DNA. Zdaniem wymienionych autorów, był w niej obecny prekursorowy RNA rybosomów. Poszczególne frakcje, z wyjątkiem jednej, zawierającej większość rybonukleoproteidów rybosomowych, wykazywały charakterystyczną przewagę ilościową RNA nad białkiem i — jak sugerują autorzy — stanowią pośrednie stadia rozwojowe rybosomów.

Na podstawie podobnych eksperymentów Roberts i wsp. (8, 9, 11, 55) już uprzednio wysunęli hipotezę o stadialnym procesie formowania się rybosomów, polegającym na stopniowym przyłączaniu się białek do RNA prekursorowego. Ten prekursorowy RNA rybosomów, którego ostatecznie uformowana cząsteczka ma stałą sedymentacji ok. 14S, stanowi jedynie ok. 3% ogólnej ilości RNA rybosomów w komórce *Escherichia coli*, hodowanej w normalnych warunkach. Byłby on, zdaniem autorów, pierwszym stadium rozwojowym rybosomów nazwanym eosomem. Piętno znakowanego uracylu po krótkiej inkubacji pojawiało się w tej właśnie klasie cząstek. Następnym stadium rozwojowym byłyby tzw. neosomy o stałej sedymentacji 30S lub 43S zawierające RNA i białko z przewagą pierwszego ze składników. RNA neosomów stanowi ok. 7% rybosomowego RNA komórek *Escherichia coli*. Spirin (80) podkreśla podobieństwo neosomów do cząstek „chloramfenikolowych”.

Podobne poglądy na temat stadialnego rozwoju rybosomów, od wolnego RNA począwszy, wyrazili pracownicy grupy Osawy (35, 41). Ich zdaniem, wolny RNA o stałej sedymentacji ok. 16S zapoczątkowuje syntezę podjednostek rybosomów typu 30S. Odbywałaby się ona poprzez stadia cząstek rybonukleoproteidowych 18S i 28S. Natomiast prekursorowy RNA o stałej sedymentacji 23S byłby odpowiedzialny za formowanie podjednostek typu 50S poprzez stadia rozwojowe cząstek rybonukleoproteidowych 25S, 32S, 38S i 43S (35).

Wydaje się więc, że teoria stadialnego rozwoju rybosomów u bakterii zaczyna zdobywać coraz powszechniejsze uznanie. Nie dysponujemy jednak dotychczas szerszym materiałem dowodowym o stadiach rozwojowych rybosomu u innych organizmów. Wiadomo np., że mikrosomy etiolowanych kielków grochu dają się rozdzielać elektroforetycznie na kilka frakcji (50). Podobnie, rybosomy wyizolowane z zielonych i etiolowanych kielków żyta (*Secale cereale*) można rozdzielić na kilka frakcji nukleoproteidowych na kolumnie z DEAE-celulozy (92). Fakt, że etiolowanie roślin powoduje częściowe zahamowanie ich rozwoju nasuwa myśl o równoczesnym zahamowaniu rozwoju rybosomów, podobnie jak to ma miejsce przy sztucznym zakłócaniu zrównoważonej zazwyczaj syntezy białka i RNA u bakterii.

Uwagi końcowe

Przedstawione w tym artykule badania wskazują, że przy zakłóceniu normalnie zrównoważonej syntezy RNA i białka w komórkach bakteryjnych następuje sztuczne zahamowanie procesu rozwoju rybosomów. Nagromadzają się wówczas cząstki rybonukleoproteidowe o małej ilości białka i przewodzie RNA. Cząstki te odpowiadają prawdopodobnie prekursorowym formom rybosomów, jakie pojawiają się w niewielkich jedynie

ilościach u bakterii hodowanych w normalnych warunkach wzrostu. Formowanie rybosomów odbywałoby się przez stopniowe przyłączanie białek do prekursorowego RNA rybosomów pojawiającego się w plazmie w stanie wolnym lub luźno związanym z dojrzałymi rybosomami (54). U organizmów wyższych prekursorowy RNA rybosomów syntetyzowany jest najprawdopodobniej w jądrze komórkowym. Według Scherrera i wsp. (75) oraz Tamaki i Mullera (literatura — patrz pozycja 95) w komórkach HeLa RNA rybosomów tworzy się bezpośrednio przez rozpad jakiejś większej cząsteczki RNA o stałej sedymentacji ok. 45S, który w tym przypadku byłby właściwym RNA prekursorowym rybosomów.

Zdaniem Kitazume i wsp. (40) informacyjny RNA, o składzie nukleotydowym podobnym do DNA, jest niezbędnym prekursorem RNA rybosomów u drożdży. Wiadomo bowiem, że w warunkach intensywnej syntezy białek w czasie wzrostu drożdży, kiedy proces formowania rybosomów musi być również intensywny, informacyjny RNA jest nietrwały, natomiast gdy synteza białek u tego organizmu jest zahamowana stabilność tego RNA jest znaczna.

Przypomnieć tu należy jednak, że u *Escherichia coli* rybosomowy RNA powstawał w warunkach znacznie zmniejszonej (60) a nawet całkowicie zahamowanej syntezy informacyjnego RNA (69). Przeczyłoby to hipotezie o pochodzeniu RNA rybosomów z postulowanego przez Jacoba i Monoda (37) RNA informacyjnego.

Prawdopodobnie prekursorowy RNA rybosomowy stanowi odmienną frakcję informacyjnego RNA niż ten postulowany przez francuskich badaczy. Już dawniej Hayashi i Spiegelman (30) sugerowali, że nie cały informacyjny RNA w komórce działa w jednakowy sposób. Szybko znakujący się fosforem radioaktywnym RNA, identyfikowany jako informacyjny, jest heterogenny i, obok frakcji o składzie nukleotydowym podobnym do DNA, zawiera RNA rybosomowy (58), być może prekursorowy.

Zdaniem Stenta (85) prekursorowy RNA rybosomów syntetyzuje się na matrycy DNA. Po uwolnieniu się jego nici z kompleksu z DNA stawałby się on z kolei matrycą dla białek rybosomu. Jak podkreśla McCarthy (54) wolny RNA eosomu pozostaje luźno związany z dojrzałymi rybosomami, których RNA mógłby służyć jako nośnik informacji dla białek rybosomów dojrzewających. Roberts (74) jest zdania, że neosomy tworzą kompleksy z nowopowstającym RNA rybosomów, biorąc udział w syntezie białek rybosomowych w sposób analogiczny jak polisomy w syntezie innych białek komórkowych. Tak więc autorzy ci, zakładając udział RNA rybosomów niedojrzałych w syntezie białek tej organelli podkreślają konieczną obecność rybosomów już wykształconych w procesie formowania i dojrzewania nowych rybosomów.

Istnieje szereg dowodów pośrednich na udział składników rybosomów w przekazywaniu informacji dla nowopowstających organelli tego typu.

Tak np. Stent (85) zwraca uwagę, że duża zawartość guaniny w RNA rybosomów i duża zawartość argininy, glicyny i kwasu glutaminowego w ich białku może pozostawać w związku z przewagą tej zasady purynowej w trójkach kodujących wymienione aminokwasy. Ostatnie prace Hollanda i wsp. (32) wskazują, że w przeciwieństwie do natywnego RNA rybosomów dojrzałych, częściowo zdegradowany w swej drugorzędowej strukturze RNA tej organelli bardzo intensywnie stymuluje włączanie znakowanych aminokwasów do białek. Należy przypomnieć, że RNA rybosomów sztucznie zatrzymanych w rozwoju ma mniej upakowaną strukturę drugorzędową i podobnie intensywnie stymuluje włączanie aminokwasów do białek rybosomowych (53, 61).

Pośrednim dowodem potwierdzającym przypuszczenie o obecności w składnikach rybosomu pewnych informacji niezbędnych dla jego rozwoju jest np. rekonstrukcja *in vitro* podjednostek 30S bądź 50S z cząstek „chloramfenikolowych” i białek rybosomowych dokonana przez Szakulowa, Bogdanowa i Spirina (90). Dowodem takim mogą być także uwieńczone sukcesem próby rekonstrukcji podjednostek 30S i 50S, aktywnych w syntezie białek (33, 45, 83) z nieaktywnych cząstek rybonukleoproteidowych i białek uwolnionych z rybosomów w czasie ich wirowania w roztworze chlorku cezu (57). Rekonstrukcja ta — należy tu podkreślić — odbywała się spontanicznie w niskiej temperaturze i bez dodatku kofaktorów.

Stymulacja włączania znakowanych aminokwasów do białka *in vitro* przez niedojrzałe rybosomy rozprzężonych mutantów *Escherichia coli* (znacznie większa niż wywoływana przez RNA rybosomów dojrzałych) (53), uprzywilejowana synteza białek rybosomów po przerwaniu głodu aminokwasowego (53, 61, 98), a także stymulacja syntezy białka przez RNA cząstek „chloramfenikolowych” nie zawierających informacyjnego RNA (69) — oto obserwacje pozwalające na wyciągnięcie pewnych ostrożnych wniosków. Jeśli rzeczywiście RNA rybosomów niedojrzałych ma zdolność kierowania syntezą białek tej organelli — a teza ta zdobywa dziś coraz więcej zwolenników (19, 61, 63, 74) — to może właśnie na tej drodze odbywałoby się formowanie pierwszych rybosomów w komórce. Tym sposobem można byłoby lepiej zrozumieć problem nakreślony we wstępie tej pracy: jak dochodzi do syntezy białka rybosomów, jeśli przyjmujemy nieodzowność rybosomów dojrzałych w syntezie wszystkich białek komórkowych.

LITERATURA

1. Allfrey V. G., V Internatl. Congr. Biochem. Moscow 1961, Symp. II, Preprint No 140.
2. Andoh T., Chargaff E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1181 (1965).
3. Aronson A. I., *Biochim. Biophys. Acta* 49, 98 (1961).
4. Aronson A. I., *J. Mol. Biol.* 5, 453 (1962).

5. Aronson A. I., Spiegelman S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 70 (1961).
6. Birnstiel M. L., Chipchase M. I. H., Hyde B. B., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 454 (1963).
7. Bladen H. A., Byrd R., Levin J. G., Nirenberg M. W., *J. Mol. Biol.* **11**, 78 (1965).
8. Boezi J. A., Bolton E. T., Britten R. J., Cowie D. B., McCarthy B. J., Midgley J. E., Roberts R. B., Carnegie Institution of Washington, Year Book 60, 1960/61, str. 263.
9. Bolton E. T., Britten R. J., Cowie D. B., McCarthy B. J., McQuillen K., Roberts R. B., Carnegie Institution of Washington Year Book 58, 1958/59, str. 259.
10. Brenner S., Jacob F., Meselson M., *Nature* **190**, 576 (1961).
11. Britten R. J., McCarthy B. J., Roberts R. B., *Biophys. J.* **2**, 83 (1962).
12. Brown D. D., Gurdon J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 139 (1964).
13. Chao F. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 426 (1957).
14. Dagley S., Sykes J., *Nature* **183**, 1608 (1959).
15. Dagley S., Sykes J., *Biochem. J.* **74**, 11P (1960).
16. Dagley S., White A. E., Wild D. G., Sykes J., *Nature* **194**, 25 (1962).
17. Dagley S., Turnock G., Wild D. G., *Biochem. J.* **88**, 555 (1963).
18. Dubin D. T., *J. Mol. Biol.* **8**, 749 (1964).
19. Ecker R. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1465 (1965).
20. Ennis H. L., Lubin M., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 614 (1964).
21. Ennis H. L., Lubin M., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 605 (1965).
22. Ennis H. L., Lubin M., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 624 (1965).
23. Fraenkel P. G., Neidhardt F. C., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 96 (1961).
24. Gale E. F., Folkes J. P., *Biochem. J.* **53**, 493 (1953).
25. Girard M., Latham H., Penman S., Darnell J. E., *J. Mol. Biol.* **11**, 187 (1965).
26. Girard M., Penman S., Darnell J. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 205 (1964).
27. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **10**, 491 (1964).
28. Gordon J., Boman H. G., *J. Mol. Biol.* **9**, 638 (1964).
29. Hahn F. E., Ciak J., *Bacteriol. Proc.* 1959, str. 131 (cyt. wg 18).
30. Hayashi M., Spiegelman S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1564 (1961).
31. Henshaw E. C., Revel M., Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **14**, 241 (1965).
32. Holland J., Buck C., McCarthy B., *Biochemistry* **5**, 358 (1966).
33. Hosokawa K., Fujimura R. K., Nomura M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 198 (1966).
34. Hosokawa K., Nomura M., *J. Mol. Biol.* **12**, 225 (1965).
35. Iwabuchi M., Kono M., Oumi T., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 211 (1965).
36. Iwabuchi M., Otaka E., Kono M., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 83 (1966).
37. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
38. Joklik J. W., Becker Y., *J. Mol. Biol.* **13**, 511 (1965).
39. Kempner E. S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 111 (1961).
40. Kitazume Y., Ycas M., Vincent W. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 265 (1962).
41. Kono M., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 326 (1964).
42. Kurland C. G., *J. Mol. Biol.* **2**, 83 (1960).
43. Kurland C. G., Maaløe O., *J. Mol. Biol.* **4**, 193 (1962).
44. Kurland C. G., Nomura M., Watson J. D., *J. Mol. Biol.* **4**, 383 (1962).

45. Lerman M. I., Spirin A. S., Gawrilova L. P., Golov V. F., *J. Mol. Biol.* **15**, 268 (1966); Appendix: Spirin A. S., Belitsina N. V., *ibid.* str. 282.
46. Lindigkeit R., Coutelle R., Raabe G., Venker P., *Acta Biol. Med. Germ.* **10**, 501 (1963).
47. Lindigkeit R., Handschack W., *Acta Biol. Med. Germ.* **14**, 456 (1965).
48. Lindigkeit R., Handschack W., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 241 (1965).
49. Lindigkeit R., Handschack W., Coutelle R., *Acta Biol. Med. Germ.* **13**, 438 (1964).
50. Loening U. E., *Biochem. J.* **97**, 125 (1965).
51. Mandel L. R., Borek E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 11 (1962).
52. Mandel L. R., Borek E., *Biochemistry* **2**, 560 (1963).
53. Marquisee M. J., Nakada D., *Fed. Proc.* **24**, 655 (1965). Part I No 2.
54. McCarthy B. J., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 880 (1962).
55. McCarthy B. J., Britten R. J., Roberts R. B., *Biophys. J.* **2**, 57 (1962).
56. McConcey E. M., Hopkins J. W., *J. Mol. Biol.* **14**, 257 (1965).
57. Meselson M., Nomura M., Brenner S., Davern S., Schlesinger D., *J. Mol. Biol.* **9**, 696 (1964).
58. Migdley J. E. M., McCarthy B. J., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 696 (1962).
59. Mikulska R., Odincowa M. S., Sisakian I. M., *Biochimja* **27**, 1061 (1962).
60. Mitsui H., Ishihama A., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 401 (1963).
61. Nakada D., *J. Mol. Biol.* **12**, 695 (1965).
62. Nakada D., Anderson J. A. C., Magasanik B., *J. Mol. Biol.* **9**, 472 (1964).
63. Nakada D., Marquisee M. J., *J. Mol. Biol.* **13**, 351 (1965).
64. Nomura M., Hosokawa K., *J. Mol. Biol.* **12**, 242 (1965).
65. Nomura M., Watson J. D., *J. Mol. Biol.* **1**, 204 (1959).
66. Otaka E., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 146 (1966).
67. Otaka E., Osawa S., Oota Y., *J. Mol. Biol.* **3**, 693 (1961).
68. Otaka E., Osawa S., Oota Y., Ishihama A., Mitsui H., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 310 (1962).
69. Otaka E., Osawa S., Sibatani A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 568 (1964).
70. Pardee A. B., Paigen K., Presidge L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 162 (1957).
71. Perry A. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 2179 (1962).
72. Peterman M. L., *The Physical and Chemical Properties of Ribosomes*, Elsevier Publishing Comp. Amsterdam 1964.
73. Rendi R., *Exptl. Cell Res.* **17**, 585 (1959).
74. Roberts R. B., *J. Theoretical Biol.* **8**, 49 (1965).
75. Scherrer K., Latham K., Darnell J. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 240 (1963).
76. Sells B. H., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 230 (1964).
77. Slayter H. S., Warner J. R., Rich A., Hall C. E., *J. Mol. Biol.* **7**, 652 (1963).
78. Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **4**, 395 (1962).
79. Spahr P. F., Tissières A., *J. Mol. Biol.* **1**, 237 (1959).
80. Spirin A. S., *Macromolecular Structure of Ribonucleic Acids*, New York, Reinhold Publishing Corporation, Chapman Hall, Ltd., London 1964, str. 161.

81. Spirin A. S., Bielicina N. W., Ajtchozina M. A., *Ž. Obszcz. Biol.* **25**, 321 (1964).
82. Spirin A. S., Kisjelew N. A., Szakułow R. S., Bogdanow A. A., *Biochimija* **28**, 920 (1963).
83. Staehelin T., Meselson M., *J. Mol. Biol.* **16**, 245 (1966).
84. Stent G. S., Brenner S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 2005 (1961).
85. Stent G. S., doniesienie osobiste: IEG No 7, memo No 72.
86. Stevens A., *Fed. Proc.* **24**, 655 (1965). Part I—No 2.
87. Suzuki M., Hayashi Y., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 610 (1964).
88. Sypherd P. S., *J. Bacteriol.* **90**, 403 (1965).
89. Sypherd P. S., *J. Bacteriol.* **90**, 411 (1965).
90. Szakułow R. S., Bogdanow A. A., Spirin A. S., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **153**, 233 (1963).
91. Szarkowski J. W., Buttrose M. S., Mühlethaler K., Frey-Wyssling A., *J. Ultrastructure Res.* **4**, 222 (1960).
92. Szarkowski J. W., Gołaszewski T., dane niepublikowane.
93. Takai M., Kondo N., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 416 (1962).
94. Tamaoki T., Mueller G. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 404 (1963).
95. Tamaoki T., Mueller G. C., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 73 (1965).
96. Tamaoki T., Mueller G. C., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 81 (1965).
97. Tissières A., Watson J. D., Schlesinger D., Hollingworth B. R., *J. Mol. Biol.* **1**, 221 (1959).
98. Turnock G., Wild D. G., *Biochem. J.* **90**, 32P (1964).
99. Warner J. R., Knopf P. M., Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 122 (1963).
100. Webster G., Whitman S. L., Heintz R. L., *Plant Physiol.* **37**, XX (1962), Supplement.
101. Wilson C., Gross F., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 478 (1964).

ADDENDUM

Już po oddaniu do druku tego artykułu Muto, Otaka i Osawa stwierdzili (Doniesienie osobiste, I.E.G. Nr 7, Scientific Memo Nr 220), że cząstki nukleoproteidowe powstające w warunkach głodu metioninowego u rozluźnionego mutantu *E. coli* K-12 są niezdolne do samodzielnej syntezy białek po dodaniu metioniny do pożywki. Uprzywilejowana synteza białek rybosomowych w komórce odbywa się wówczas głównie w frakcji dojrziałych strukturalnie rybosomów 70S. Cząstki nukleoproteidowe powstałe w warunkach głodu aminokwasowego biorą w niej udział zapewne jedynie w połączeniu z dojrzalymi rybosomami, ponieważ stwierdzono występowanie kompleksów tych cząstek z rybosomami 70S. Autorzy przypuszczają, że RNA tych cząstek spełnia rolę informacyjnego RNA. Natomiast zdaniem Turnocka (*J. Mol. Biol.* **17**, 289 (1966)) jest to mało prawdopodobne. Wykazał on ostatnio, że prekursorowe formy rybosomów u rozluźnionego mutantu *E. coli* K-12 58-161 zakazonego fagiem tuż przed zakończeniem głodu metioninowego nie przekształcają się w dojrzale rybosomy po dodaniu metioniny. Fag blokując syntezę RNA gospodarza hamuje proces budowy rybosomów, co wskazywałoby, iż RNA zawierający informację dla syntezy białek rybosomu syntetyzowany jest dopiero po zakończeniu głodu aminokwasowego.

RECENZJE

Gyogy Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure und Peptid Chemie, Basel, Berlin, Walter de Gruyter, 1966

Pod tym tytułem ukazała się ostatnio małego formatu książeczka niezwykle cenna szczególnie dla tych, którzy interesują się w swoich badaniach aminokwasami, peptydami i białkami. Bardzo starannie wydana na doskonałym, lśniącym papierze, pięknie oprawiona w twardej okładce monografia ta budzi zainteresowanie nie tylko ze względu na treść, ale i estetykę wydawniczą. Na podkreślenie zasługują: bogata ilustracja — 128 rysunków sprzętu, aparatury, chromatogramów; 52 tabele i 463 pozycje bibliograficzne.

Monografia — podręcznik składa się z 4 części.

W I części autor daje zwięzłe ale doskonałe opisy bogato ilustrowane modelami sprzętu i aparatury techniki cienkowarstwowej chromatografii jakościowej i ilościowej z cennym rozdziałem poświęconym współczynnikom R_f w tej metodzie.

W części II omówione jest szczegółowo przystosowanie tej techniki do aminokwasów i peptydów. Krótkie, zwięzłe opisy zaznajamiają czytelnika z wynikami uzyskiwanymi na różnych adsorbentach przez poszczególnych autorów.

W części III autor przedstawia zastosowanie tej techniki do badań sekwencji aminokwasowej w białkach i peptydach. Podkreślić należy szczególnie staranne i wyczerpujące opracowanie tych rozdziałów w oparciu o doświadczenia własne.

Część IV poświęcona jest adaptacji metody do badań aminokwasów i peptydów w materiale biologicznym.

Chromatogramy aminokwasów moczu i krwi z różnych przypadków klinicznych mogą budzić zainteresowanie wielu pracowni biochemiczno-klinicznych.

Ze względu na wysokie wartości teoretyczne i praktyczne tej niewielkiej książeczki i jej aktualność (wydanie 1966 r.), jak i z uwagi na słabą znajomość języka niemieckiego u naszych młodszych pracowników naukowych sądzę, że przetłumaczenie jej na język polski byłoby bardzo pożyteczne.

J. Opieńska-Blauth

Maksymilian Pluta, Mikroskopia fazowo-kontrastowa i interferencyjna, Warszawa 1966, PWN, str. 370, Rys. XXV

Książka dotyczy optycznej aparatury o dużym znaczeniu w badaniach cytologicznych i cytochemicznych. Układy optyczne zwane mikroskopem kontrastowo-fazowym oraz mikroskopem interferencyjnym posiadają następujące dwie zalety w badaniach biologicznych: oba układy pozwalają na obserwacje obiektów przejrzystych, niezabarwionych, a więc — konkretnie — żywych komórek umieszczonych

w wodnych środowiskach, oraz oba umożliwiają mierzenie suchej masy zawartej w obserwowanych strukturach. To drugie zastosowanie jest oczywiście bardziej interesujące, w szczególności zaś dlatego, iż czułość tego pomiaru jest imponująco wysoka. Jednostką jaką posługujemy się w pomiarach interferometrycznych suchej masy struktur komórkowych jest 1×10^{-13} g.

Istotą działania układów kontrastujących fazy względnie mikroskopów interferencyjnych jest przekształcenie różnic w przesunięciu fazy światła przechodzącego przez obiekt, wobec fazy światła przechodzącego przez otaczające obiekt środowisko, na różnice w amplitudzie światła. To przekształcenie jest warunkiem zarówno obserwacji jak i pomiarów obiektów przejrzystych czyli tzw. obiektów fazowych, ponieważ ani oko ludzkie, ani elektroniczne elementy światłoczułe nie są wrażliwe na przesunięcie fazy światła. Zmiany tej po prostu nie percepują.

Książka mgr Pluty w jasny i świetnie ilustrowany sposób podaje zarówno teorię, jak i praktyczne istniejące rozwiązania układów używanych obecnie. Autor jest twórcą polskiego mikroskopu interferencyjnego, który to mikroskop w pracowni recenzenta doskonale spełnia swe zadania.

Ostatni rozdział książki zawiera krótkie wyliczenie zastosowań mikroskopii interferencyjnej w naukach biologicznych. Książka jest jak najbardziej godna polecenia dla biologów, biochemików i biofizyków interesujących się ilościowymi pomiarami przekształceń zachodzących na terenie poszczególnych komórek.

K. Ostrowski

**Mansel Davies, Some electrical and optical aspects of molecular behaviour,
Pergamon Press 1965; str. X+190**

W serii chemicznej *The Commonwealth and International Library* wydawanej przez Pergamon Press ukazało się już wiele wartościowych książek dla studentów napisanych przez świetnych specjalistów by wymienić tutaj chociażby K. J. Laidler'a dwa tomiki poświęcone kinetyce reakcji chemicznych (*Reaction Kinetics*, vol. 1, 2) czy A. D. Buckingham'a *The Laws and Applications of Thermodynamics*. Książka Davies'a jest kolejnym tomem tej serii i to bardzo udanym.

W zwięzły sposób przedstawia w niej autor pewne elektryczne i optyczne właściwości cząsteczek, związane z ich zdolnością do polaryzacji pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego lub elektromagnetycznego, mające szczególne znaczenie w badaniach struktury molekularnej i oddziaływań międzycząsteczkowych. Mimo zwięzłości książka obejmuje jakościowo całość problematyki. Trzy pierwsze rozdziały (pomijając wstępny rozdział 1) autor poświęca omówieniu zachowania się cząsteczek w polu elektrycznym o częstotliwości pozwalającej na reorientację cząsteczek przy zmianie kierunku pola. Czytelnik znajdzie tutaj fenomenologiczny i ilościowy opis dielektrycznych właściwości roztworów, pojęcie molowej refrakcji i jej zastosowanie w badaniach strukturalnych, metody pomiaru momentów dipolowych, oraz obszerne omówienie wybranych wyników pomiarów momentów z punktu widzenia struktury cząsteczek (rozdział 3). W rozdziale 5 przedstawiono zachowanie się cząsteczek w polu elektrycznym w funkcji jego rosnącej częstotliwości aż do wartości, przy których cząsteczki nie nadążają za szybkością zmian kierunku pola. Związana z tym absorpcja dielektryczna, metody jej pomiaru oraz dyskusja struktury wody, struktury polarnych cząsteczek w niepolarnych rozpusz-

czalnikach i struktury ciała stałego w świetle danych doświadczalnych to treść tego rozdziału. Właściwości optyczne cząsteczek związane z ich polaryzowalnością przejawiające się przy ich oddziaływaniu z promieniowaniem elektromagnetycznym, które nie jest przez nie pochłaniane są przedmiotem rozdziału 6. Czytelnik znajdzie tam krótki wykład zjawiska rozproszenia światła, metody pomiaru rozproszenia oraz metody oznaczania masy i kształtu cząsteczek, zwłaszcza polimerów, oparte na pomiarach rozpraszania światła, następnie dyskusję anizotropii polaryzacji cząsteczek i związanego z nią zjawiska Kerra oraz dyskusję optycznej aktywności cząsteczek. Ostatni rozdział (7) poświęcony jest elektrostatycznym oddziaływaniom pomiędzy cząsteczkami różnego typu z punktu widzenia zasięgu tych oddziaływań i ich energii.

Autorytatywnie, w sposób zdradzający doświadczonego wykładowcę, autor osiąga zawsze swój cel przy pomocy dobrze dobranych modeli i przykładów oraz prostego opisu matematycznego. Ogromną zaletę książki stanowi połączenie wykładu podstawowych zjawisk fizycznych z opisem zasad pomiaru odpowiednich wielkości i dyskusja licznych, trafnie dobranych, danych doświadczalnych (tabele, wykresy), ilustrujących w jaki sposób dochodzi się na ich podstawie do wniosków dotyczących struktury cząsteczek. Każdy rozdział uzupełniony jest licznymi zadaniami umożliwiającymi lepsze praktyczne opanowanie przeczytanego materiału oraz spisem pozycji bibliograficznych szerzej traktujących omawiane zagadnienia.

Książka w zasadzie przeznaczona jest dla studentów chemii specjalizujących się w fizykochemicznych metodach badania struktury cząsteczek. Jest to jednak tekst wprowadzający, dostępny dla każdego czytelnika z wyższym wykształceniem przyrodniczym. Spośród czytelników *Postępów Biochemii* recenzent poleca ją tym wszystkim, którzy interesują się fizykochemicznymi podstawami biochemii i biologii molekularnej.

K. L. Wierzchowski

AUTOREFERATY PRAC DOKTORSKICH

Badania nad mechanizmem enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę

JULIAN GRUDA

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Promotor: prof. dr WŁODZIMIERZ NIEMIERKO

Uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
w Warszawie nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 30.IX.1965 r.

Przeprowadzono szereg doświadczeń w celu wyjaśnienia czy w czasie enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę powstaje jako produkt przejściowy połączenie enzymu z ortofosforanem.

Enzym inkubowano z ^{32}P -ATP i nieradioaktywnym ortofosforanem albo z nieradioaktywnym ATP i radioaktywnym ortofosforanem. Stwierdzono, że ortofosforan wiążący się z miozyną w czasie reakcji enzymatycznej (w ilości około 1 mola na mol białka) pochodzi bezpośrednio z ATP, bez uprzedniego uwolnienia się do środowiska. W czasie inkubacji miozyny z substratem zachodzi również wiązanie się z białkiem pewnej ilości ADP.

Częściowe zahamowanie aktywności ATP-azowej miozyny przy pomocy CuSO_4 lub PCMB nie wywiera wpływu na ilość związanego ortofosforanu pochodzącego z ATP.

Badano wpływ blokowania różnej liczby grup SH przy pomocy dwusiarczku β -hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylu (HEDD) na właściwości ATP-azowe miozyny. Stwierdzono, że nawet po zablokowaniu wszystkich dostępnych dla tego odczynnika grup SH rodzimej miozyny, tj. 6 ekw. $\text{SH}/10^5\text{g}$ białka, enzym zawsze zachowuje w obecności jonów Ca lub Mg pewną, aczkolwiek niewielką aktywność ATP-azową. Właściwości enzymatyczne tak zmodyfikowanej miozyny („6 S-S miozyny”) różnią się pod wieloma względami od właściwości enzymatycznych miozyny rodzimej. W nieobecności jonów Ca lub Mg „6 S-S miozyna” nie wykazuje żadnej aktywności ATP-azowej, powodującej przyrost wolnego ortofosforanu. Jednakże nawet w tych warunkach obserwuje się wiązanie z „6 S-S miozyną” ortofosforanu i ADP pochodzących bezpośrednio z ATP, bez uprzedniego uwolnienia się do środowiska.

Wysunięto hipotezę, która tłumaczy wiązanie się ortofosforanu i ADP w czasie inkubacji ATP z miozyną rodzimą powstawaniem przejściowego produktu hydrolizy ATP. Brak zaś wpływu zahamowania ATP-azy miozynowej na powstawanie tego przejściowego produktu tłumaczy jest hipotezą o kilkuetapowej hydrolizie ATP

przez rodzimą miozynę. W oparciu o powyższe hipotezy zaproponowano mechanizm tłumaczący dwufazowy efekt czynników modyfikujących ATP-azę miozynową.

Część wyników jest przedmiotem następujących publikacji:

1. Gruda J., Kąkol I., Rzyśko Cz., *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. biol.* 8, 129, (1960).
2. Gruda J., Kąkol I., Rzyśko Cz., Niemierko W., V Intern. Congr. Biochem. 10, 19, 1417, 1961.
3. Gruda J., Kąkol I., Niemierko W., *Acta Biochim. Polon.* 9, 215, (1962).
4. Kąkol I., Bitny-Szlachto S., Gruda J., *Materiały I Krajowego Kongresu Biochemii*, str. 15, Łódź 1963.
5. Kąkol I., Gruda J., Bitny-Szlachto S., *Acta Biochim. Polon.* 11, 411, (1964).

Zaburzenia gospodarki lipidowej w marskości wątroby

HANNA IGNATOWSKA

Pracę wykonano w II Klinice Chorób Wewnętrznych A. M. w Warszawie

Promotor: Prof. dr IRENA CHMIELEWSKA

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi U. W. nadająca stopień doktora nauk przyrodniczych z dnia 11.X.1965 r.

Celem pracy była ocena gospodarki lipidowej w stanie przewlekłego uszkodzenia wątroby, przebiegającego z upośledzeniem jej czynności. Model doświadczalny stanowiła grupa 38 chorych, w wieku od 40 do 75 lat, z rozwiniętym obrazem klinicznym marskości wątroby, a model fizjologiczny — grupa osób zdrowych w wieku odpowiadającym wiekowi badanych chorych oraz grupa osób zdrowych młodych do 40 roku życia.

W surowicy krwi, oznaczano: lipidy całkowite, fosfolipidy, cholesterol całkowity i wolny, trójglicerydy, niezestryfikowane kwasy tłuszczowe oraz aktywność lipazy lipoproteidowej. Trójglicerydy oznaczano metodą własną, która umożliwiła bezpośrednie określenie tej frakcji w surowicy krwi. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Poziom lipidów całkowitych, fosfolipidów oraz cholesterolu całkowitego u chorych różni się od poziomu u osób zdrowych w tym samym wieku. Nie ma natomiast różnic w poziomie tych frakcji, jak również w poziomie trójglicerydów między grupą chorych a grupą zdrowych osób młodych.

Uwzględniając czynnik wieku należy stwierdzić, że uszkodzenie wątroby prowadzi do obniżonego poziomu trójglicerydów, cholesterolu całkowitego, fosfolipidów i lipidów całkowitych w surowicy krwi. Obniżenie to może być spowodowane zarówno obniżeniem syntezy tych frakcji lipidowych w wątrobie, jak również obniżeniem syntezy kompleksu białkowo-lipidowego.

Poziom niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych jest u chorych znamienne wyższy niż u młodych zdrowych ludzi. Może to być spowodowane zaburzeniami równowagi między stopniem mobilizacji kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej i stopniem ich wychwytywania przez wątrobę.

W surowicy i osoczu chorych nie stwierdza się samoistnej aktywności lipazy lipoproteidowej. Natomiast po heparynie aktywność lipolityczna w drugiej godzinie inkubacji jest u chorych znacznie wyższa niż u zdrowych. Fakt ten można wytłu-

maczyć przyjmując, że w osoczu osobników z marskością wątroby gromadzący się produkt reakcji nie hamuje aktywności enzymu, lub też że brak jest inhibitorów regulujących aktywność lipolityczną w normalnym osoczu.

Wyniki prac wskazują, że ocena zaburzeń gospodarki lipidowej może mieć praktyczne znaczenie dla diagnostyki marskości wątroby. Sugerują również, że obniżony poziom lipidów u chorych z marskością wątroby może być przyczyną obserwowanego u tych chorych mniejszego nasilenia miażdżycy oraz rzadszego występowania zawału serca.

Fragmenty pracy zostały wydrukowane w *Pol. Arch. Med. Wewn.* 24, 3, 1964.

Badania nad wpływem głodu i niskiej temperatury na przemianę węglowodanów u gąsienic mola woskowego *Galleria mellonella* L.

EWA LENARTOWICZ

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Promotor: prof. dr STELLA NIEMIERKO

Uchwała Rady Naukowej Instytutu nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 30.IX.1965 r.

Badano zawartość węglowodanów i rozmieszczenie ich w poszczególnych narządach u gąsienic mola woskowego w ostatnim okresie wzrostu. Ogólna ilość węglowodanów w ciele gąsienic wynosi od 1,6% (wkrótce po ostatniej wylince) do 1,0% (przed przepoczwarczeniem). 65% sumy węglowodanów przypada na trehalozę, a 10—18% na glikogen. Trehaloza występuje głównie w hemolimfie, natomiast glikogen w ciele tłuszczowym. Wśród cukrów prostych przeważają aminocukry, poziom glukozy jest bardzo niski. Powszechnie spotykane trudności w oznaczaniu glukozy u owadów, jak stwierdzono, spowodowane są wysoką aktywnością trehalazy i dużą zawartością trehalozy w ich ciele. Dla szybkiego zahamowania aktywności enzymu przy przygotowywaniu materiału do analiz najodpowiedniejszym okazało się odbiać kwasem trójchlorooctowym w 0°. Szczególnie dogodnym w tym materiale jest oznaczanie glukozy za pomocą reakcji z heksokinazą i dehydrogenazą glukozy-6-fosforanu.

Wpływ głodu badano w okresie do 26 dni. Gąsienice dojrzałe do przepoczwarczenia głodzono po podwiązaniu za pierwszym segmentem tułowia, młodsze — bez ligatury. Na skutek głodu ogólna zawartość węglowodanów w ciele gąsienic stopniowo spada do 0,2—0,4%. W początkowym okresie zużywana jest trehaloza, podczas gdy ilość glikogenu utrzymuje się na stałym poziomie (u gąsienic młodszych), bądź też nawet przejściowo wzrasta (u gąsienic starszych, podwiązanych). Dopiero po znacznej stracie trehalozy dochodzi do obniżenia poziomu glikogenu. Zawartość cukrów prostych również spada w tych warunkach.

W związku z przejściowym wzrostem poziomu glikogenu podczas głodu gąsienic podwiązanych, być może związanym z zaburzeniami hormonalnymi, badano możliwość konwersji tłuszczów w węglowodany drogą cyklu gliksalowego. Jednakże nie udało się wykryć aktywności liazy izocytrynianowej.

Badania nad wpływem niskiej temperatury prowadzono na gąsienicach ziębiomych w ciągu 10 dni w 2°, nie pobierających pokarmu. Niespodziewanie okazało się, że zawartość trehalozy obniża się w 2° równie szybko jak przy 30°. Poziom glikogenu spada już po jednym dniu do połowy. Jednocześnie następuje jednak wielokrotny wzrost ilości glukozy (od 0,1 do 1,2mg/g) powstającej prawdopodobnie z trehalozy. Poziom innych cukrów prostych nie ulega wyraźnym zmianom. Spośród badanych produktów glikolizy w niskiej temperaturze jedynie zawartość kwasu pirogronowego znacznie wzrastała, co mogłoby świadczyć o osłabieniu utleniania tego związku. Nagromadzanie glukozy i kwasu pirogronowego równoważy w jednej trzeciej łączną stratę trehalozy i glikogenu.

W celu zorientowania się w mechanizmie zaobserwowanych zmian badano aktywność trehalazy i fosforylazy. W okresie głodu gąsienic aktywność obu tych enzymów spada. Natomiast u gąsienic przebywających w niskiej temperaturze aktywność fosforylazy wzrasta, podczas gdy aktywność trehalazy nie zmienia się. Dane te sugerują, że zaobserwowane zmiany w metabolizmie węglowodanów mogą być związane z różnym wpływem temperatury na enzymy katalizujące ich rozpad.

Akumulacja i przemiany kwasów organicznych w tytoniach giberelinowanych

SEWERYN NIRAZ

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Wyższej Szkoły Rolniczej w Szczecinie

Promotor: Prof. dr JAN DOBROWOLSKI

Uchwała Rady Wydziału Rolniczego Wyższej Szkoły Rolniczej w Szczecinie nadająca stopień naukowy *doktora nauk rolniczych* z dnia 29.IX.1965 r.

Badano wpływ gibereliny na nagromadzenie się kwasów organicznych i zmiany aktywności dehydrogenazy kwasu jabłkowego (1.1.1.37) oksyreduktaza L-jabłczan: :NAD) w liściach Machorki Pomorskiej, oraz na zawartość kwasów organicznych w liściach Machorki Brazylijskiej i Tytoniu Mocnego Skroniowskiego.

Przeprowadzono doświadczenia wazonowe i polowe. Kwas giberelowy stosowano w fazie szybkiego wzrostu począwszy od ukorzeniania się roślin, w fazie kwitnienia oraz w fazie dojrzwania. Do seryjnych analiz kwasów organicznych używano własnej modyfikacji metody chromatografii kolumnowej na żelu kwasu krzemowego oraz metody chromatografii bibułowej. Aktywność dehydrogenazy kwasu jabłkowego w liściach Machorki Pomorskiej oznaczano metodą *Thunberga* w modyfikacji własnej. Równolegle w tym samym materiale oznaczano aktywność katalazy (1.1.1.6) oksydoreduktaza $H_2O_2 : H_2O_2$).

Okazało się, że kwas giberelowy bardzo aktywnie stymuluje wzrost Machorki Pomorskiej oraz Machorki Brazylijskiej i powoduje wzmoczone nagromadzenie kwasów organicznych w liściach tych roślin. Zawartość końcowa kwasów organicznych w stymulowanej gibereliną Machorce Pomorskiej była, w przeliczeniu na suchą masę, średnio o 20% wyższa, aniżeli w roślinach kontrolnych. Machorka traktowana gibereliną jest szczególnie bogatym źródłem kwasów: cytrynowego i jabłkowego. Tytoń Mocny Skroniowski, na którego wzrost giberelina wpływała najslabiej wykazywał mniejsze różnice w zawartości kwasów organicznych.

Kwas giberelowy wywierał znaczny wpływ na przemianę kwasów organicznych, szczególnie trójkarboksylowych kwasów cytrynowego oraz *izo*-cytrynowego oraz kwasu jabłkowego, a w znacznie mniejszym stopniu na przemiany pozostałych kwasów dwukarboksylowych.

Kwas giberelowy powodował stopniowe obniżanie się aktywności dehydrogenazy kwasu jabłkowego, co tłumaczy wzmożoną akumulację kwasu jabłkowego. Stopniowe obniżanie się aktywności dehydrogenazy kwasu jabłkowego, który jest regulatorem rytmu kwasowego u machorki, wpływa także pośrednio na nagromadzenie i przemiany pozostałych kwasów organicznych. Obniżaniu się aktywności dehydrogenazy kwasu jabłkowego towarzyszył w okresie początkowym i pod koniec traktowania gibereliną znaczny spadek aktywności katalazy. Wzrost aktywności tego enzymu w fazie poprzedzającej kwitnienie związany jest ze szczególnie intensywnym wzrostem machorki w tym okresie.

W pracy uzyskano wiele interesujących danych dotyczących jakościowego oraz ilościowego składu kwasów organicznych u Machorki Pomorskiej, Machorki Brazylijskiej i Tytoniu Mocnego Skroniowskiego. Dane te mogą mieć znaczenie praktyczne dla przemysłu tytoniowego.

Fragmety pracy zostały opublikowane:

1. S. N i r a z, I Krajowy Kongres Biochemii, Łódź 1963, str. 164.
2. S. N i r a z, Materiały II Ogólnopolskiej Konferencji Chromatograficznej, Lublin 1963, str. 86.
3. S. N i r a z, Materiały III Krajowego Sympozjum PTBioch. „Budowa i własności enzymów”, Kazimierz n/Wisłą 1964, str. 37.
4. S. N i r a z, Zeszyty Naukowe UMK w Toruniu (1966).

Peptydy nieamfolitowej frakcji moczu

IRENA SZUMIEL

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego

Promotor: prof. dr IRENA CHMIELEWSKA

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UW nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 11.X.1965 r.

Połączenia aminokwasowe o charakterze nieamfolitowym stanowią — jak stwierdzili w 1962 roku Chmiełewska i Toczko — od 50 do 70% aminokwasów związanych moczu ludzkiego. W tej grupie związków znane były tylko aryloglicyny i fenyloacetylglutamina. Badania podjęte nad nieamfolitowymi połączeniami aminokwasowymi moczu miały za zadanie określenie ich wydalania w porównaniu z innymi frakcjami aminokwasów związanych oraz ich wstępną charakterystykę.

Materiałem do badań były próby dobowe moczu mężczyzn na diecie normalnej oraz nie otrzymujących pożywienia białkowego, w okresie pierwszych 3 dni po operacji przewodu pokarmowego. Wyniki wstępnych oznaczeń azotu α -aminowego frakcji nieamfolitowej nasunęły przypuszczenie, że zmienne, zależne od niebiałkowych składników pożywienia, ilości aryloglicyn w moczu utrudniają właściwą ocenę wydalania powstających w przemianie białkowej aminokwasów związanych frakcji nieamfolitowej. Aryloglicyny oddzielano zatem przez ekstrakcję ciągłą eterem etylowym. Połączenia aminokwasowe pozostające we frakcji nieamfolitowej po oddzie-

leniu aryloglicyn mają charakter N-podstawionych peptydów; uwalniają one grupy $-NH_2$ w warunkach łagodnej hydrolizy kwasowej, są natomiast odporne na hydrolizę rozcieńczonymi zasadami, co wyklucza cykliczną strukturę typu dwuketopiperazyn. Jest prawdopodobne, że niektóre z N-podstawionych peptydów są połączone z cukrowcami; w skład peptydów wchodzi: glicyna, kwasy glutaminowy i asparaginy, seryna, treonina, prolina, cystyna, leucyna, fenyloalanina i tyrozyna.

Oznaczenie ilości aryloglicyn na podstawie zawartości azotu aminowego w hydrolizatach kwasowych ekstraktów eterowych pozwoliło na określenie wydalania pozostałych aminokwasów związanej frakcji nieamfolitowej. Wynosiło ono w próbach moczu normalnego średnio 46mg N- NH_2 /dobę, a w próbach moczu pooperacyjnego — średnio 126mg N- NH_2 /dobę, czyli blisko 3 razy więcej. Ilości azotu α -aminowego związanego frakcji amfolitowej w próbach moczu normalnego wynosiły średnio 79mg/dobę, a w próbach moczu pooperacyjnego nieco wzrastały — do średnio 97mg/dobę. Obserwowane po operacji zwiększenie wydalania aminokwasów związanych wyraża się zatem przede wszystkim w podwyższeniu w moczu ilości połączeń o charakterze nieamfolitowym, odmiennych od aryloglicyn. Wydaje się to być związane z katabolizmem własnych białek ustroju, o którego nasileniu świadczyło wydalanie przez ludzi w okresie postu pooperacyjnego od 5 do 10g azotu ogólnego na dobę. Można również sądzić, że peptydy frakcji nieamfolitowej moczu są pochodzenia endogennego; jako produkty pośrednie rozpadu własnych białek organizmu mogą one stanowić interesujący materiał do badań nad metabolizmem białkowym człowieka.

Wyniki pracy opublikowano w *Clin. Chim. Acta* **11**, 501 (1965) oraz zgłoszono do druku w *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol. i Acta Physiol. Polon.*

SPRAWOZDANIA

Konferencja na temat biochemii lipidów w Noordwijk (Holandia)

5—10 września 1965 r.

Międzynarodowe konferencje na temat biochemii lipidów (*International Conferences on Biochemistry of Lipids*) odbywają się dość regularnie, począwszy od 1948 r. Początkowo przedstawiano tam prace z rozmaitych dziedzin badań nad lipidami, w miarę jednak rozwoju tego kierunku biochemii zaznaczyła się tendencja do ściślejszego precyzowania tematu obrad. Konferencja w Noordwijk, we wrześniu 1965 r., dziewiąta już z kolei, poświęcona była w całości fosfolipidom. Komitet organizacyjny stanowili dr J. Boldingh, prof. C. Böttcher i prof. L. M. van Deenen, znani specjaliści w tej dziedzinie badań. Na konferencji spotkało się 240 uczestników z różnych krajów i kontynentów; ogłoszono 90 komunikatów i 6 referatów przeglądowych. Wobec dużej liczby doniesień organizatorzy, aczkolwiek niechętnie, zmuszeni byli rozdzielić obrady na dwie równoległe sekcje, tym bardziej, że program przewidywał dużo czasu na dyskusję oraz osobiste kontakty. Przeważnie odbywały się dwie sesje dziennie, przed i po południu. Każdą sesję otwierał wspólny dla obydwu sekcji referat przeglądowy, wygłaszany przez zaproszonego referenta. Organizacja była znakomita, czas przemówień ściśle przestrzegany, co bardzo ułatwiało przechodzenie z jednej sekcji na drugą.

Omawiane były różne aspekty biochemii fosfolipidów, mianowicie: 1) zagadnienia strukturalne, 2) metabolizm, 3) zagadnienia fizykochemiczne oraz 4) zagadnienia funkcjonalne.

Sesję poświęconą zagadnieniom strukturalnym otwierał referat przeglądowy D. J. Hanahana o fosfolipidach, zawierających w cząsteczce oprócz kwasu tłuszczowego — długołańcuchowy alkohol. Związki te, wykryte niedawno, są blisko spokrewnione z plazmalogenami, zawierającymi w cząsteczce długołańcuchowy aldehyd. Występują najczęściej u zwierząt wodnych, ale zdołano je również wyizolować z niektórych tkanek zwierząt lądowych. Funkcje ich i znaczenie słabo są dotąd poznane.

W komunikatach tej sesji omawiano budowę niektórych rzadko występujących w naturze fosfolipidów, strukturę kardiolidów, skład fosfolipidowy niektórych tkanek zwierzęcych (płuca, mózg) oraz metody izolacji, rozdziału i identyfikacji tych związków. Sprawę otrzymywania fosfolipidów jednorodnych, zawierających ściśle określone kwasy tłuszczowe przy pierwszym i drugim (α i β) węglu glicerolu rozwiązano ostatnio w pracowni L. van Deenena. Pozwoliło to stwierdzić, że szereg właściwości fizykochemicznych fosfolipidu zależy od rodzaju kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład cząsteczki, i wpłynęło silnie na rozwój badań nad sztucznymi modelami błon.

Na sesji poświęconej metabolizmowi fosfolipidów ogłoszono wiele komunikatów i dwa referaty przeglądowe. W komunikatach poruszano m. in. sprawy biosyntezy fosfolipidów w narządach i homogenatach tkanek, enzymów biorących udział w metabolizmie fosfolipidów oraz rolę fosfolipidów podczas chłonięcia tłuszczów.

Na uwagę zasługiwał referat E. Kennedy'ego o powiązaniu układu permeazy β -galaktozydów z metabolizmem fosfolipidów u *E. coli*.

Układy, od których zależy transport i gromadzenie się β -galaktozydów u *E. coli* są wysoce specyficzne i genetycznie kontrolowane, dotychczas jednak mechanizmy chemiczne tych procesów są bardzo słabo poznane. Badania Kennedy'ego pozwoliły stwierdzić, że funkcjonowanie systemu permeazy u *E. coli* związane jest ze wzrostem biosyntezy niektórych frakcji fosfolipidów. W aktywnym transporcie galaktozydów ze środowiska do wnętrza komórki prawdopodobnie bierze udział określony lipoproteid, zlokalizowany w błonie komórkowej i zawierający fosfolipidy oraz specyficzne białko. Proponowany przez Kennedy'ego mechanizm działania tego lipoproteidu aczkolwiek zupełnie hipotetyczny, zasługuje niewątpliwie na uwagę.

Na udział fosfolipidów w aktywnym transporcie wskazywali również H. S. Jacob i M. L. Karnovsky. Stwierdzili oni, że podczas wzmoczonego transportu Na^+ w cieniach erytrocytów wzrasta wbudowywanie nieorganicznego fosforanu ze środowiska w fosfolipidy i odwrotnie, gdy transport Na^+ jest zahamowany, wbudowywanie fosforanu silnie spada. Dotyczy to przede wszystkim fosfolipidów o ujemnym ładunku (np. fosfatydyloseryny), które aktywują ATP-azę, biorącą udział w transporcie jonów przez błony.

Biosynteza lecytyny, może zachodzić w organizmie zwierzęcym w dwojaki sposób: bądź przez wiązanie choliny z CTP-choliny, bądź przez metylację fosfatydyloetanolaminy. Jak wynikało z doniesień kilku różnych autorów (C. Artom, R. L. Lyman i wsp., J. Bremer), drugi szlak biosyntezy, zachodzący głównie w wątrobie, jest znacznie intensywniejszy u samic niż u samców, zależy ponadto od wieku i stanu odżywienia zwierzęcia. Synteza lecytyny natomiast z udziałem całej cząsteczki choliny zachodzi szybko w różnych narządach i nie wykazuje różnic w zależności od wieku i płci. Wysuwano hipotezę, (Lyman), że hormony płciowe mogą w pewnym stopniu wpływać na przebieg syntezy lecytyny.

Mówiąc o biosyntezie fosfatydyloinozytolu w niektórych tkankach świnki morskiej, J. N. Hawthorne przedstawił dane, wskazujące że prekursorem jego w trzustce jest kwas fosfatydowy.

Kwas fosfatydowy jest również prekursorem niektórych lipidów śluzówki jelitowej podczas chłonięcia tłuszczu. Resynteza glicerydów w jelicie może zachodzić bądź przez acylację monoglicerydów powstających podczas hydrolizy tłuszczów, bądź przez acylację α -glicerofosforanu. M. G. Morehouse i wsp. stwierdzili, że podawanie piętnowanego kwasu tłuszczowego prowadzi do powstania piętnowanych fosfolipidów w śluzówce jelita, natomiast podawanie piętnowanych monoglicerydów prowadzi do wzrostu radioaktywności tylko w glicerydach obojętnych. Biosynteza fosfolipidów jest zatem powiązana z chłonieniem tłuszczu tylko wówczas, gdy resynteza trójglicerydów zachodzi poprzez α -glicerofosforan i kwas fosfatydowy; w drugim szlaku biosyntezy trójglicerydów fosfolipidy nie biorą udziału. Zdaniem A. C. Frazera, wzmoczona synteza lecytyn podczas chłonięcia tłuszczu pozostaje w związku z tworzeniem się chylomikronów w śluzówce jelitowej, a nie z funkcją fosfolipidów w samym procesie chłonięcia lipidów. Na ten temat panuje wciąż zresztą rozbieżność zdań.

Działanie enzymów odgrywających rolę w metabolizmie fosfolipidów omawiane było przez kilku autorów. Mechanizm działania enzymów rozpuszczalnych na nierozpuszczalne w wodzie substraty, jakimi są fosfolipidy, nasuwa wiele problemów. Interesujący referat na ten temat wygłosił R. M. C. Dawson, podając jako przykład działanie fosfolipazy C na lecytynę. Związki amfipatyczne, jakimi są fosfolipidy, zawierające w cząsteczce grupy hydrofobowe (kwasy tłuszczowe) oraz grupy hydrofilne (reszty fosforanowe oraz zasady azotowe) w wodnych roztworach łączą się w ściśle zorientowane agregaty cząstek, micelle. Grupy hydrofilne skierowane są na zewnątrz, w stronę fazy wodnej, a łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczo-

wych skierowane są do wewnątrz micelli. Na granicy faz lipid-woda powstaje pewne napięcie interfazalne oraz pole elektrostatyczne. Wielkość i znak ładunku powierzchniowego micelli zależy od rodzaju fosfolipidu wchodzącego w jego skład. W przypadku lecytyn gęstość ładunku powierzchniowego (netto) jest niewielka, ze względu na wzajemne zobojętnianie się reszt kwasowych i zasadowych obecnych w cząsteczce. Niezbędnym warunkiem działania fosfolipaz na fosfolipidowy substrat jest obecność na powierzchni micelli ładunku elektrycznego o znaku przeciwnym, niż ładunek netto cząsteczki enzymu. Toteż fosfolipaza C, której cząsteczki mają ujemny ładunek netto, działa na lecytynę wówczas, gdy do środowiska wprowadzi się długołańcuchowy amfipatyczny kation. Taki nierozpuszczalny w wodzie amfipat (np. stearyloamina) wchodzi w skład micelli, nadając jej ładunek dodatni. Powoduje to nie tylko przyciąganie cząsteczki enzymu do interfazy micelli, ale również właściwą orientację centrum aktywnego enzymu w stosunku do substratu, umożliwiając reakcję. Zatem warunki elektrostatyczne, występujące w środowisku, zawierającym rozpuszczalny substrat, są decydujące dla przebiegu reakcji.

Wiele uwagi na konferencji poświęcono zagadnieniom związanym z fizyko-chemicznymi właściwościami fosfolipidów. Jako istotny składnik wszystkich błon biologicznych, fosfolipidy niewątpliwie wywierają silny wpływ na funkcjonowanie struktur subkomórkowych. Ponieważ wszystkie procesy zachodzące w żywych organizmach przebiegają w środowisku wodnym, sprawa przystosowania się fosfolipidów do tego środowiska niewątpliwie ma duże znaczenie. Właściwościom micellar-nych roztworów fosfolipidów poświęcony był referat C. J. F. Böttchera. Omawiał on wielkości micelli w środowisku o różnej stałej dielektrycznej, właściwości micelli mieszanych (złożonych z różnych lipidów) oraz siły działające pomiędzy cząsteczkami lipidów w micelli. L. Saunders wskazywał na fakt, że rodzaj kwasów tłuszczowych w cząsteczce lecytyny silnie warunkuje własności fizyczne micelli, m. in. ich wielkość i kształt. G. Colacicco i M. M. Rapport stwierdzili, że potencjał powierzchniowy sztucznych warstewek monomolekularnych jest odbiciem różnic strukturalnych pomiędzy fosfolipidami. Wielkość potencjału powierzchniowego zależy m. in. od rodzaju kwasów tłuszczowych fosfolipidu, a wzrasta przy zastąpieniu kwasu tłuszczowego przez długołańcuchowy aldehyd, jak wynikało z badań J. H. Schulmana. Podobnie stopień nienasyconienia kwasu tłuszczowego odgrywa dużą rolę przy współdziałaniu lecytyny z cholesterolem podczas tworzenia mieszanych warstewek monomolekularnych (R. Demel), oraz przy łączeniu się lecytyny z białkiem (F. D. Collins i G. G. Pury).

Na posiedzeniu, poświęconym funkcji fosfolipidów D. Green wygłosił referat przeglądowy o roli lipidów w ultrastrukturze błon biologicznych, wysuwając pogląd, że podstawowy model struktury jest jednakowy dla błon różnego pochodzenia (np. mikrosomów, erytrocytów itd.). Pogląd ten wywołał ożywioną dyskusję i wiele zastrzeżeń. Dyskutanci podkreślali, że niejednokrotnie skład chemiczny błon bywa tak różny, że bardzo trudno zmieścić wszystkie dane w jednym modelu (np. błony bakterii, które nie zawierają ani wielonienasyconych kwasów, ani cholesterolu).

Funkcje fosfolipidów są niewątpliwie bardzo różnorodne i różni autorzy zwracali uwagę na rozmaite aspekty tego zagadnienia. W strukturze lipoproteidów surowicy krwi rola fosfolipidów może polegać na wiązaniu podjednostek białkowych oraz na solubilizowaniu innych lipidów (B. Shore i V. Shore). W chylomikronach osocza fosfolipidy wraz z białkiem tworzą otoczkę, umożliwiającą właściwą dyspersję i stabilność emulsji tłuszczowej (D. B. Zilversmit). Zdaniem J. Glover'a, zdolność różnych steroli do tworzenia micelli z fosfolipidami może być jednym z czynników, warunkujących ich przyswajanie przez organizm zwierzęcy. Sterole roślinne, np. które są bardzo słabo wchłaniane przez jelito, znacznie trudniej tworzą mieszane micelle z fosfolipidami, niż dobrze wchłaniane sterole zwierzęce.

Udział fosfolipidów w procesie krzepnięcia krwi, stwierdzono już dość dawno. Doświadczenia E. E. Nishizawy i wsp. wykazały, że frakcja fosfolipidów serynowych silnie opóźniała czas krzepnięcia krwi *in vivo* oraz agregację płytek krwi *in vitro*.

Wiele nagromadziło się w ostatnich czasach danych wskazujących na rolę fosfolipidów w działaniu niektórych enzymów. S. J. Wakil i wsp. stwierdzili, że obecność fosfolipidów jest niezbędna dla działania desaturazy kwasów tłuszczowych oraz oksydoreduktazy NADH-cytochrom c w mikrosomalnym łańcuchu oddechowym. Dodanie fosfolipidów mikrosomalnych w micellarnej postaci przywraca aktywność enzymatyczną cząstkom, które na skutek odlipidowania aktywność tę utraciły.

Na rolę fosfolipidów w aktywnym transporcie, poza wspomnianymi już poprzednio Kennedym i H. S. Jacobem, wskazywał M. Rodbell, podkreślając fakt, że fosfolipidy w błonach komórkowych tkanki tłuszczowej są czynnikiem regulującym transport glukozy do wnętrza komórek. Fosfolipaza C, podobnie jak insulina, prawdopodobnie zmienia strukturę błony z lamellarnej w micellarną wzmagając w ten sposób transport glukozy.

Wiele jeszcze innych zagadnień poruszano na konferencji, których w krótkim sprawozdaniu nie sposób oczywiście omówić. Z doniesień, które częstokroć stały na bardzo wysokim poziomie, wynikało wyraźnie, jak coraz subtelniejsze metody badań pozwalają już niekiedy na rozwiązywanie problemów, których istnienia nawet nie podejrzewano dawniej. Dotyczy to przede wszystkim badań nad strukturą i fizyko-chemicznymi właściwościami fosfolipidów, od których to badań oczekiwać można wyjaśnienia funkcji tych związków w żywej komórce i ich roli w przebiegu szeregu procesów chemicznych. Ile w tej dziedzinie jest jednak jeszcze spraw istotnych a zupełnie niewyjaśnionych, wystąpiło na jaw w czasie ogólnej dyskusji, którą zorganizowano ostatniego dnia obrad. Dyskusja obracała się dookoła struktury błon biologicznych, udziału fosfolipidów w tej strukturze i ich roli w funkcjonowaniu tych struktur. Ścisłej mówiąc, dyskusja polegała raczej na wysunięciu szeregu pytań, na które nie można jeszcze znaleźć odpowiedzi. Nasuwała ona refleksję, że im głębiej się sięga w poznaniu struktury żywej materii, tym więcej powstaje nowych problemów; sam jednak fakt sformułowania tych problemów może dawać nadzieję na ich rozwiązanie w przyszłości.

P. Włodawer

KRONIKA PTBioch

Referaty wygłoszone na zebraniach naukowych w Oddziałach:

Łódź: Rola nerki w antagonizmie jodowo-wapniowym (Dr T. Toczyski)
Wpływ pH na wymiary jonów ortofosforanowych w roztworach wodnych (Dr H. Pannusz, Mgr. D. Wilmańska, Mgr. G. Jaksik)

Olsztyn: Biochemia zjawisk odpornościowych (Prof. Dr K. Zakrzewski)
Utlenianie wewnątrzcząsteczkowe (Doc. Dr L. Wojtczak)

Wpływ czynników konserwujących na metabolizm azotowy w kiszonkach (Dr W. Podkówka)

Rola hormonów w regulacji biosyntezy białek (Prof. Dr I. Chmielewska)

Szczecin: Kierunki badań fotobiologicznych i perspektywy stosowania w nich chemiluminescencji (Dr J. Sławinski)

Warszawa: Strukturotwórczy wpływ czynników o alifatycznym charakterze na kwasy nukleinowe (Doc. Dr W. Szer)

Cysteinowa modyfikacja cytochromu b₂ (Mgr. G. Palamarczyk-Leszczynska, Mgr. J. Pachecki)

Związki fenotiazyny jako inhibitory cytochromu b₂ (Mgr. J. Maruchin)

Wrocław: Budowa i własności aktywności mięśni szkieletowych (Doc. Dr W. Drabikowski)

Enzymy rozkładające peptydy γ -glutamylowe (Dr A. Szewczuk)

Stopnie i tytuły naukowe:

Kraków: Doc. Dr Maria Sarnecka-Keller uzyskała tytuł docenta etatowego na Wydz. Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego

Olsztyn: Dr Piotr Masłowski uzyskał stopień i tytuł docenta biochemii

Nagrody naukowe: Doc. Dr P. Masłowski uzyskał nagrodę III stopnia Ministra Szkolnictwa Wyższego za pracę naukową.

Organizacja placówek naukowych:

Kraków: Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. został przekształcony w Międzywydziałową Katedrę Chemii Fizjologicznej (kier.: Doc. Dr W. Ostrowski) z trzema Zakładami: Zakład Chemii Fizjologicznej Wydz. Lek., Zakład Chemii Klinicznej Wydz. Lek. (w organizacji) i Zakład Biochemii Wydz. Farmacji (kier.: Doc. Dr T. Szczepkowski)

W ramach Instytutu Pediatrii A. M. (Kraków-Prokocim) powstał Ośrodek Naukowo-Badawczy (kier.: Dr Z. Szafran) w którego skład wchodzi Pracownia Biochemii.

W najbliższej przyszłości będzie organizowana Katedra Biochemii i Biofizyki Wydz. Biologii i N. o Z. Uniw. Jagiellońskiego.

SPIS TREŚCI

R. Dąbrowska, B. Szukalski — Metabolizm hormonów steroidowych	309
M. Fonberg-Broczek — Przemiany trójterpenów i steroli w okresie wegetacyjnym roślin wyższych	347
K. Bełżecka — Zaburzenia biochemiczne w fenyloketonurii	363
T. Laskowska-Klita — Przemiana kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylopirogrono- wego	373
H. Wehr — O lipoproteidach surowicy	383
J. Passent — Chemiczne i fizyczne własności rybosomów	397
T. Gołaszewski i J. W. Szarkowski — Powstawanie i rozwój ry- bosomów	413
Recenzje książek (J. Opieńska-Blauth, K. Ostrowski, K. L. Wierzchowski) .	431
Autoreferaty prac doktorskich (J. Gruda, H. Ignatowska, E. Lenartowicz, S. Niraz, I. Szumiel)	435
Konferencja na temat biochemii lipidów (P. Włodawer)	441
Kronika PTBioch.	445

W 4-tym zeszytcie tego tomu ukaza się:

1. Odwracalność reakcji przenoszenia elektronów i energii w łańcuchu oddechowym, Z. Kaniuga, J. Bryła
2. Transport elektronów u bakterii tlenowych, W. Zagórski
3. Mechanizm działania enzymów flavinowych, A. Gardas
4. Udział fosfolipidów w reakcjach łańcucha oddechowego, M. Erecińska, T. Chojnacki
5. Transport jonów i metabolitów przez błony mitochondrialne, A. B. Wojtczak
6. Udział karnityny w utlenianiu kwasów tłuszczowych w mitochondriach, J. Zborowski
7. Kwas dezoksyrybonukleinowy w mitochondriach, R. Wierzbicki, J. Bartkowiak

POSTĘPY BIOCHEMII
July 1966

ARTICLES IN POLISH

Volume 12

Number 3

R. Dąbrowska, B. Szukalski — The Metabolism of Steroid Hormones (Dep. Gen. Chem., School Med., Warszawa)	309
M. Fonberg-Broczek — The Metabolism of Triterpenoids and Steroles in Higher Plants during their Development (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	347
K. Bełżecka — The Biochemic Lesions in Phenylketonuria (Dep. Physiol. Chem., School Med., Warszawa)	363
T. Laskowska-Klita — The Metabolism of Hydroxyphenylpyruvic Acid (Dep. Physiol. Chem., School Med., Warszawa)	373
H. Wehr — Serum Lipoproteins (Lab. Inf. Dis. Clin, School Med., Warszawa)	383
J. Passent — The Chemical and Physical Properties of Ribosomes (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	397
T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski — The Formation and Development of Ribosomes (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	413
Chronicle	431

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.*, 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, miejsce i rok wydania; np.: Przyłęcki S. J., *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, Łódź, 1947. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York, 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

R. Dąbrowska, B. Szukalski — Metabolizm hormonów sterydowych	309
M. Fonberg-Broczek — Przemiany trójterpenów i steroli w okresie wegetacyjnym roślin wyższych	347
K. Bełżecka — Zaburzenia biochemiczne w fenyloketonurii	363
T. Laskowska-Klita — Przemiana kwasu <i>p</i> -hydroksyfenylopirogrono- wego	373
H. Wehr — O lipoproteidach surowicy	383
J. Passent — Chemiczne i fizyczne własności rybosomów	397
T. Gołaszewski i J. W. Szarkowski — Powstawanie i rozwój ry- bosomów	413
Recenzje książek (<i>J. Opieńska-Blauth, K. Ostrowski, K. L. Wierzchowski</i>) .	431
Autoreferaty prac doktorskich (<i>J. Gruda, H. Ignatowska, E. Lenartowicz, S. Niraz, I. Szumiel</i>)	435
Konferencja na temat biochemii lipidów (<i>P. Włodawer</i>)	441
Kronika PTBioch.	445