

# BIOLOGJA LEKARSKA

Wydawana pod kierunkiem Dr. S. OTOLSKIEGO

Rok XIV. — Nr. 5

Maj 1935

## O WSPÓŁCZESNYM STANIE CHEMJI I FIZJOLOGJI KWASÓW NUKLEINOWYCH.

DOC. DR. ANTONI DMOCHOWSKI

(Dokończenie)

Odczepianie gwaniny i kwasu fosforowego zachodziło więc zupełnie równolegle: jedynie przy b. znacznej koncentracji enzymu występowały minimalne różnice.

Wobec ujemnego wyniku metod enzymatycznych, L e v e n e i D m o c h o w s k i (111) powrócili do metod chemicznych. Obserwacje J o r p e s a (115) nad mniejszą trwałością uwodorodnionych nukleotydów pirymidynowych (dwyhydrocytydyny i dwyhydrourydy) świadczyły naogół o wielkim wpływie zmian w budowie poszczególnych składników na trwałość całego związku. Można więc było przypuszczać, że np. dezaminacja grupy aminowej kwasu adenilowego lub gwanilowego może na tyle wzmocnić wiązanie rybozy z kwasem fosforowym, lub osłabić wiązanie puryny z rybozą, iż możliwem się stanie otrzymanie kwasu rybozofosforowego.

L e v e n e wielokrotnie usiłował dezaminować kwas gwanilowy kwasem azotawym według wskazówek K n o p f a (103), zawsze jednak z wynikiem ujemnym; czysty kwas gwanilowy rozpadał się stale na gwanozynę i kwas fosforowy. Podobnie ujemne wyniki otrzymał T h a n n h a u s e r (213) przy próbach dezaminacji kwasu adenilowego drożdżowego.

W 1931 r. ukazało się doniesienie tymczasowe S c h m i d t a (187), iż przy dezaminacji enzymatycznej kwasu gwanilowego

odczepiała się równolegle i ksantyna, pozostawiając kwas rybozofosforowy, jakoby identyczny z kwasem fosfo-d-rybozowym z kwasu inozynowego.

Na tle wszystkich dotychczasowych prac, ta ostatnia obserwacja wydała nam się b. nieprawdopodobną; ulepszywszy metodę *Stuedela* (199, 199a) otrzymywania soli kwasu gwanilowego, próbowaliśmy dezaminować sól potasową wprost kwasem azotawym na kwas ksantylowy.

Tym razem rezultat najzupełniej odpowiedział oczekiwaniom—otrzymano łatwo kwas ksantylowy ( $C_{10}H_{13}N_4O_4P$ ) w postaci pseudokrystalicznej; analiza elementarna była w zupełnej zgodzie z teorią.

Obliczony skład kwasu ksantylowego	Znaleziono
C — 32,95	C — 32,95
H — 3,60	H — 3,55
N — 15,68	N — 15,62
P — 8,51	P — 8,60
NH <sub>2</sub> —0	NH <sub>2</sub> — ślady

W ten sposób do 4-ch znanych dotychczas monorybonukleotydów przybył piąty — kwas ksantylowy.

Próby hidrolizy kwasu ksantylowego na ksantynę i kwas rybozofosforowy powiodły się nadspodziewanie, gdyż, chociaż wiązanie z kwasem fosforowym było słabsze, niż w kwasie inozynowym, to jednak jeszcze słabsze było wiązanie z ksantyną. Hidroliza kwasu adenilowego drożdżowego, kwasu gwanilowego i ksantylowego (wszystkich w 1% roztworach wolnych kwasów bez dodania HCl) dała następujący obraz:

#### Hidroliza monorybonukleotydów w 1% roztworach w 50° C

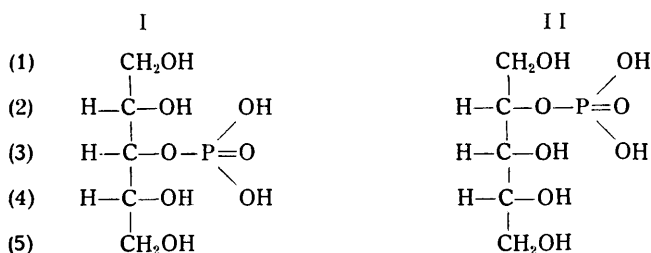
Czas w godzinach	Kwas adenilowy		Kwas gwanilowy		Kwas ksantylowy	
	% PO <sub>4</sub>	% rybozy	% PO <sub>4</sub>	% rybozy	% PO <sub>4</sub>	% rybozy
0	0	0	0	4,8	0	0,9
23	—	—	—	6,3	—	—
47	—	1,2	—	9,0	ślady	44,5
95	0	5,3	0	13,1	5,9	47,4

W warunkach tak łagodnej hidrolizy kwasy adenilowy i gwanilowy ulegały tylko niewielkim zmianom, gdy ksantylowy odczepiał około 50% całej ksantyny i minimalne ilości kwasu fosforowego.

W ten sposób po 20 latach nieudanych wysiłków znaleziono wreszcie drogę do otrzymania wolnego kwasu rybozofosforowego z kwasu nukleinowego drożdżowego (111).

Już w kilka miesięcy potem, *Levene* i *Harris* (112, 112a), stosując dawne metody, opracowane przy badaniu kwasu inozyncwego, izolowali z kwasu ksantylowego ów nowy kwas rybozofosforowy i oznaczyli jego budowę. Okazało się najpierw, że po utlenieniu grupy aldehydowej na kwasową tworzą się oba laktony (1,4) i (1,5), że więc grupa fosforanowa nie może być przyłączona do węgla (4) lub (5) rybozy, a tylko (2) lub (3); szybkość hidrolizy zaś w 0,01 n HCl była bez porównania większa, niż dawnego kwasu fosfo-d-rybonowego z kwasu inozynowego.

Ponieważ próby rozstrzygnięcia między położeniem (2) lub (3) kwasu fosforowego zapomocą metylowania zawiodły, zredukowano nowy kwas rybozofosforowy na odpowiedni alkohol (rybitofosforowy); alkohol ten był optycznie nieczynny, co przemawiało za budową I, a nie II (przyczyna — kompensacja wewnętrzcząsteczkowa).



Kwas fosforowy był więc w pierwotnym kwasie gwanilowym przyłączony do węgla (3), a nie (2). Ostatnio *Levene* i *Stiller* (131) otrzymali również drugi, optycznie czynny alkohol rybito-5-fosforowy.

W 1933 r. *Levene* i *Harris* (113) otrzymali identycz-

ną metodą kwas hipoksantylowy z adenilowego drożdżowego, a z niego powyższy kwas rybozo-3-fosforowy, stwierdzając ostatecznie, że wszystkie mononukleotydy z tetranukleotydu rybozowego są 3-fosforybofuranozydami, a taką samą budowę posiadają prawdopodobnie i dezoksyrybonukleotydy.

Budowa tetranukleotydu rybozowego została równocześnie potwierdzona zupełnie niezależnymi, pięknymi badaniami P a r n a s a i K l i m k a (171,172). Badacze ci stwierdzili zupełnie odmienne zachowanie się obu znanych kwasów adenilowych wobec alkalicznego roztworu  $\text{CuSO}_4$ : tylko kwas adenilowy mięśniowy wytwarzał rozpuszczalny, zabarwiony kompleks miedziowy, co świadczyło o obecności w nim dwóch sąsiednich grup OH rybozy, przyczem mogły to być tylko grupy (2) i (3); kwas adenilowy drożdżowy (nukleotyd adeninowy P a r n a s a) nie tworzył kompleksu miedziowego, jedna więc z grup OH rybozy, (2) lub (3) musiała być zesteryfikowana kwasem fosforowym; rozstrzygnięcie pomiędzy obiema grupami nie było jednak możliwe na tej drodze.

#### D) Polinukleotydy.

Do grupy polinukleotydów zaliczamy wszystkie złożone kwasy nukleinowe, izolowane w postaci soli z ustrojów żywych, rozpadające się przy słabszej lub mocniejszej hidrolizie na kilka (co najmniej 4) różnych jednonukleotydów purynowych i pirymidynowych.

Ogromną większość znanych polinukleotydów można podzielić na dwie grupy — 1<sup>o</sup> tetranukleotydy rybozowe i 2<sup>o</sup> dezoksyrybozowe, mogące polimeryzować się na jeszcze wyższe kompleksy i w formie połączeń z białkami tworzyć t. zw. nukleo-proteidy.

Że tetranukleotydy są istotnie określonymi indywidualnymi chemicznymi, wydaje się dzisiaj prawie pewnem. Izolowanie w teoretycznych ilościach 4-ch zasad azotowych, rybozy, kwasu fosforowego, nukleozydów i mononukleotydów, zgodnie z analizą elementarną izolowanego polinukleotydu drożdżowego, przesądza w sensie pozytywnym tetranukleotydową teorię L e v e n e'a.

Dla kwasu dezoksyrybozowego typu grasicowego sprawa struktury była nie dość jasna, ale izolowanie w ostatnich latach dezoksyrybozy, nukleozydów i nukleotydów w pracowniach *Levene'a* i *Thannhausera* potwierdza koncepcję analogicznej struktury obu grup polinukleotydów. Prawie wszystkie znane dotychczas kwasy nukleinowe należą do wyżej wspomnianych 2-ch grup tetranukleotydów.

Kwas nukleinowy rybozowy otrzymuje się przedewszystkiem z drożdży (*Hefenukleinsäure*) i z wielu roślin (np. z kielków pszenicznych) — stąd dawna nazwa kwasów nukleinowych roślinnych, pczatem jednak i z wielu tkanek zwierzęcych np. z trzustki (*Jones i Perkins*) (95) embrjonów kurzych, (*Calvery*) (36) i t. d.

Kwas nukleinowy dezoksyrybozowy to, par excellence, składnik substancji jąder komórkowych (znaleziony także i w bakterjach).

Kwas nukleinowy rybozowy nie został dotychczas otrzymany w stanie krystalicznym (najczystsze preparaty otrzymał, zdaje się, *Fürth* (75) przez oczyszczanie kwasem fosfcrowym); rozpada się on nadzwyczaj łatwo na jednonukleotydy (rozc. NaOH w zwykłej temperaturze); według *Stuedela* (198) stare preparaty tracą tę zdolność. Preparaty fabryczne rozkładające się dopiero po ogrzaniu z NaOH obserwowali również *Levene* i *Dmochowski* (111) modyfikując metodę *Stuedela* otrzymywania mononukleotydów rybozowych. Kwas dezoksyrybozowy z jąder komórkowych, otrzymywany głównie z grasicy bogatej w limfocyty, (*Thymusnucleinsäure*) występuje w 2-ch formach:  $\alpha$ -żelatynujących soli sodowych i  $\beta$ -nieżelatynujących; pierwsza forma stanowi, być może, formę spolimeryzowaną drugiej (*Fulgén*) (67); możliwym jest jednak inny stopień hydratacji (*Hammerssten*) (82).

Kwas grasicowy jest nader odporny na działanie NaOH, natomiast pod wpływem kwasów b. łatwo odczepia obie aminopuryny — adeninę i gwaninę tworząc t. zw. bezpurynowy kwas tyminowy o wolnych grupach aldehydowych, wykrywanych t. zw. reakcją nuklealową *Fulgéna*.

Analiza elementarna zgadza się dość dobrze z teoretycznymi wzorami  $C_{38}H_{40}N_{13}O_{29}P_4$  dla tetranukleotydu rybozowego

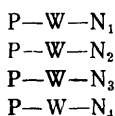
i  $C_{36}H_{51}N_{15}O_{25}P_4$  dla tetranukleotydu dezoksyrybozowego; budowę tę potwierdzają i termochemiczne badania Ellinga H a u s a (54) ciepła spalania mocno- i polinukleotydów.

Wbrew długotrwałym mniemaniom nie udało się nigdy izolowanie dwu i trójnukleotydów; odpowiednie związki T h a n n h a u s e r a (207) okazały się tylko mieszaniną mononukleotydów (Levene) (109).

### *Budowa polinukleotydów.*

Izolowanie mononukleotydów z danego tetranukleotydu nie rozstrzyga jeszcze kwestji powiązania ich między sobą.

Ze wzoru schematycznego,



gdzie P — grupa fosforanowa, W — węglowodan, N — zasada purynowa lub pirymidynowa widzimy, że istnieje kilka możliwości połączeń:

- 1) przez grupy fosforanowe (T h a n n h a u s e r),
- 2) przez eterowe wiązania między cząsteczkami węglowodanu (J o n e s),
- 3) przez estrowe połączenia grup fosforanowych i węglowodanów (L e v e n e).
- 4) mieszane (F e u l g e n, J o n e s).

Bez uwzględnienia nieznanych połączeń między zasadami azotowymi odrębnych nukleotydów, lub dość nieprawdopodobnych, dodatkowych połączeń między zasadami a węglowodanami, lub grupami fosforanowymi może istnieć 15 możliwych rodzajów połączeń 4-ch mononukleotydów.

Dla rozstrzygnięcia tych możliwości może służyć:

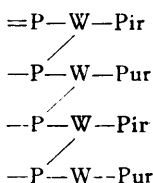
- 1) rodzaj otrzymywanych mononukleotydów (jedno lub dwufosforowe),
- 2) łatwość powstawania,
- 3) ilość i rodzaj grup jonizujących.

I. Hipoteza powiązania przez grupy fosforanowe nie da się pogodzić z izolowaniem dwufosfonukleotydów dezoksyrybozowych, ani ze stwierdzoną doświadczalnie obecnością 4-ch pierw-

szorzędowych i jednej drugorzędowej grupy kwasu fosforowego w tetranukleotydzie rybozowym. (L e v e n e), (przeczy temu T h a n n h a u s e r).

II. Trwałe wiązania eterowe pozwoliłyby na izolowanie dwu, trój lub czterccukrów, czego nie obserwowano jednak nigdy.

III. Najprawdopodobniejsze są wyłączone wiązania estrowe, przytem tylko następujący schemat czyni zadość wszystkim znanym faktom:



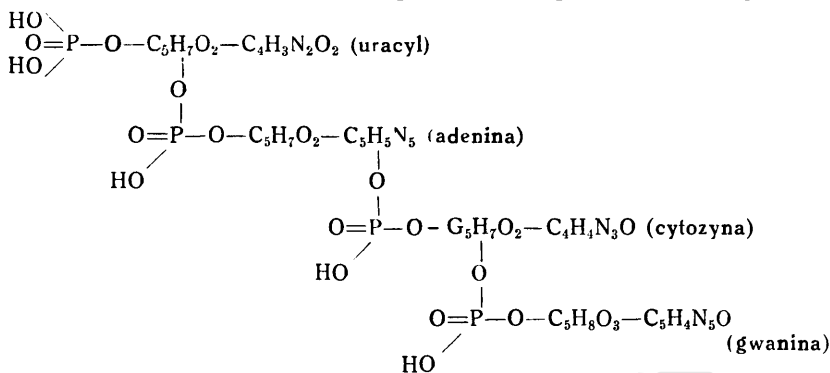
Obecność dwufosfonukleotydów pirymidynowych, jedna grupa drugorzędowa kwasu fosforowego).

Teorja L e v e n e'a, przyjmując identyczną budowę obu tetranukleotydów naogół dość dobrze tłumaczy ogół zjawisk, nie uwzględnia jednak niektórych obserwacji, jak łatwej (niezawsze) hydrolizy kwasu rybozowego zapomocą NaOH, w przeciwieństwie do odporności nań kwasu dezoksyrybozowego i składa może zbyt pochopnie wszystkie różnice na karb różnicy między rybczą i dezoksyrybozą.

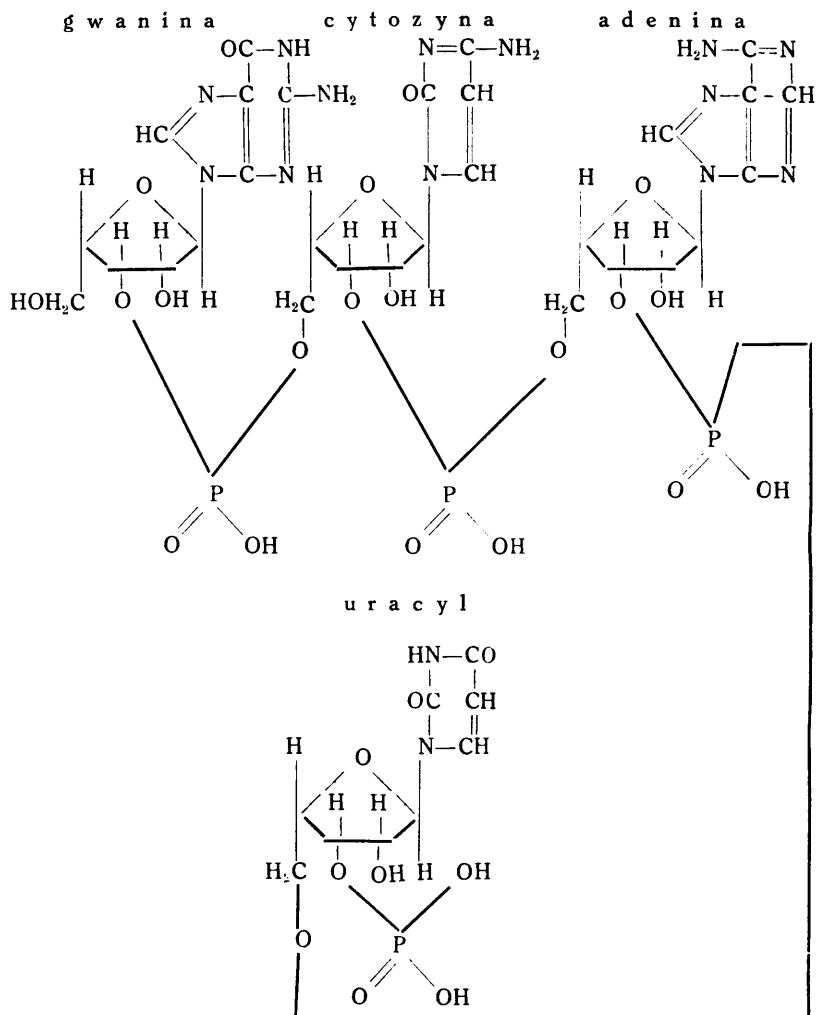
Całość naszych wiadomości o strukturze tetranukleotydu rybozowego można ująć w następującym schemacie (identycznym w zasadzie i dla tetranukleotydu dezoksyrybozowego), opartym na poglądach L e v e n e'a.

Schemat I: (L e v e n e)

*Budowa kwasu nukleinowego rybozowego (drożdżowego).*



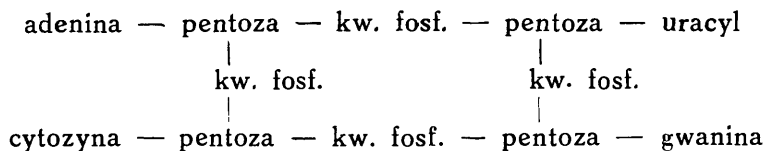
Uwzględniając wyniki najnowszych badań (furanozowa budowa d-rybozy, połączenie reszty fosforanowej z atomem węgla (3) rybozy w jednonukleotydach) możemy powyższy schemat napisać w następującej formie:



T a k a h a s h i (206) opierając się na odporności polinukleotydu rybozowego na działanie monofosfatazy i rozpadowi dopiero przy łącznym działaniu dwufosfatazy i monofosfatazy

(patrz część II) przyjmuje strukturę cykliczną tetranukleotydu. Musiałaby być ona utworzoną przez zesteryfikowanie ostatniej, wolnej grupy hydroksylowej skrajnego nukleotydu purynowego przez grupę drugorzędową kwasu fosforowego skrajnego nukleotydu pirymidynowego.

S c h e m a t II: (T a k a h a s h i)



Koncepcja ta stałaby w sprzeczności z obserwacjami L e v e n e'a co do istnienia jednej grupy drugorzędowej kwasu fosforowego, ponadto nie tłumaczy ona faktu braku kwasu adenylo-5-fosforowego przy hidrolizie tetranukleotydu na 4 mononukleotydy, wreszcie pierścień tego rodzaju musiałby być utworzony z 24 różnych atomów i byłby najbardziej skomplikowanym układem heterocyklicznym ze wszystkich znanych obecnie.

Nadmienić należy, że i schemat L e v e n e'a nie tłumaczy braku 5-fosfonukleozydów w produktach hidrolizy tetranukleotydu, być może jednak, że wiązanie grupy fosforanowej z węglem (5) ulega w 3, 5-dwufosfonukleozydach znacznemu osłabieniu; tylko odpowiednie doświadczenia mogłyby rozstrzygnąć te wątpliwości. Ostatnio K l e i n i R o s s i (u T h a n n h a u s e r a) (102b) nie mogli potwierdzić danych doświadczalnych T a k a h a s h i' e g o i oddzielić monofosfatazy od dwufosfatazy, zagadnienie poznania szczegółów budowy polinukleotydów pozostaje więc jeszcze otwartem. Nadmienić należy że nie stwierdzono dotychczas furanozowej budowy dezoksyrybozy; przy dezoksypranozie mieliśmy 3, 4-dwufosfonukleozydy, o odmiennych może własnościach od 3, 5-dwufosfonukleozydów.

### *Kwasy nukleinowe sprzężone.*

Tetranukleotydy rybozowe i dezoksyrybozowe, nawet spoli-meryzowane nie wyczerpują prawdopodobnie wszystkich możliwych form kwasów nukleinowych. Kontynuując prace F e u l-

gena (69, 70) i Hammarstena (83) nad t. zw. kwasami nukleinowymi sprzężonymi z trzustki (Guanylnukleinsäuren), Levene i Jorpes (116) stwierdzili, iż w  $\beta$ -nukleoproteidzie Jonesa (95) istnieje zarówno polinukleotyd rybozowy, jak i dezoksyrybozowy i że można je oba rozdzielić; pozatem zauważono, że polinukleotyd rybozowy składał się z 5, lub 6 mononukleotydów, że więc istnieje możliwość istnienia obok tetrapenta, heksta i t. d. polinukleotydów. (Jorpes) (97a). Wyniki te jednak wymagają jeszcze dokładniejszego zbadania.

Do dzisiaj znamy dopiero jeden przykład istnienia kwasów nukleinowych o innych częściowo składnikach, niż omawiane dotychczas. Johnson i Coghill (93) znaleźli bowiem w kwasie nukleinowym z prątków gruźliczych obok tyminy i cytozyny 5-metylocytozynę; jeśli ten fakt zostanie potwierdzony, należałoby liczyć się z możliwością występowania całego szeregu nieznanych kwasów nukleinowych, o odmiennych, być może, własnościach. Coghill (38) znalazł w kw. nukleinowym ze szczepów zjadliwych tyminę, niezjadliwych uracyl. Z tkanki rakowej, Stern i Willheim (197) izolowali kwas nukleinowy o znacznie mniejszej jakoby zawartości azotu, braku jednak jednej lub 2-ch grup azotowych (z 4-ch zwykłych) nie dowiedziono.

### *Nukleoproteidy.*

Pod nazwą nukleoproteidów rozumiemy połączenia wiele -- bądź jednonukleotydów z białkami. W tej właśnie formie zostały odkryte przez Mieschera kwasy nukleinowe, pierwsza jego „nukleina” bowiem nie była niczem innym, jak tylko związkiem białka z kwasem nukleinowym.

Jedną z największych zasług Mieschera było stwierdzenie, że gros substancji z plemników łososia jest prosto związkiem o charakterze soli, złożonej z zasadowego białka — protaminy i kwaśnej „nukleiny” nazwanej później kwasem nukleinowym.

Nukleoproteidy są więc rodzimymi składnikami organizmów żywych i zostały izolowane przedewszystkiem z organów obfitujących w jądra komórkowe. Główki dojrzałych plemników, jądrzaste krwinki ptasie, gruczoł grasicowy — to wszystko źródła

otrzymywania nie tylko kwasów nukleinowych, ale i nukleoproteidów.

Wyciągając taki materiał wodą, lepiej roztworami soli lub rozc. alkali, otrzymujemy po zakwaszeniu strąty — nukleoproteidy; przy trawieniu tych osadów pepsyną otrzymano t. zw. nukleiny, o wyższej zawartości fosforu.

Najlepiej stosunkowo poznano nukleoproteidy zawierające protaminy (z plemników ryb) lub histony (np. z grasicy), ale otrzymano również związki zawierające białka obojętne.

Badania nad nukleoproteidami były przeprowadzone z ogromnym nakładem pracy w ciągu lat kilkudziesięciu, nie dały one jednak spodziewanego wyniku. Przedewszystkiem okazało się, że roztwory nukleinianów w kwaśnej reakcji stale dają osady z białkami, że więc nukleoproteidy otrzymane z ustrojów żywych mogą być produktem sztucznym, pracownianym, o najzupełniej przypadkowym składzie; ponadto, najczęściej stosowane metody nie wykluczały w czasie ekstrakcji działania enzymów proteolitycznych lub nukleoklastycznych, uniemożliwiając otrzymanie jednolitych związków.

Wszystkie te trudności doprowadziły raczej do ujmowania wszystkich izolowanych nukleoproteidów za ciała o zmiennym, przypadkowym składzie, zależnym od szeregu czynników, jak różne pH, koncentracja soli i t. p. bez możności ujęcia tych wpływów w pewne określone prawa. (Steu del) (198a).

Dopiero nowoczesne ujęcie zarówno budowy białka, jak i roli grup polarnych (zdolnych do jonizacji) w powstawaniu złożonych układów koloidalnych pozwoliło na głębsze wniknięcie w ten niezwykle skomplikowany zespół czynników chemicznych i fizyko-chemicznych warunkujących powstawanie takich lub innych związków (H a m m a r s t e n) (82, 82a). Badania nad wiązaniami substancji koloidalnych, a w naszym wypadku, nad składem i warunkami powstawania nukleoproteidów, są od lat kilku prowadzone w Zakładzie Chemii Fizjologicznej U. W. pod kierownictwem p. prof. St. Przyłęckiego (179) i doprowadziły one nie tylko do pewnego zorientowania się w zawiłym splocie dawnych faktów, ale i do wykrycia nowych, oświetlających z nowego punktu widzenia całe zagadnienie istnienia nukleoproteidów.

Przedewszystkiem możliwem się stało podanie racjonalnej klasyfikacji nukleoproteidów; dzielimy je dzisiaj na:

- A) Mononukleotydroproteidy czyli połączenia jednej cząsteczki mononukleotydu z jedną cząsteczką białka— $MnB$
- B) Polinukleoproteidy czyli t. zw. nukleiny — połączenia określonego polinukleotydu (KN) z białkiem (B) —  $KNB$
- C) Polinukleiny — układy trój lub więcej składnikowe złożone z różnych polinukleotydu i różnych białek np.  $KN^1 KN^2 B$ ,  $KN, B^1 B^2$ , lub  $KN^1 KN^2 B^1 B^2$  i t. d.

Co się tyczy typu wiązania, to wszystko przemawia, iż nosi on charakter wiązań heteropolarnych (a więc typu soli), że jednak dzięki specyficznym własnościom obu składników jest to typ pośredni między hetero —, a homeopolarnym (typem związków organicznych) i powoduje silniejsze sprzężenie, niż w solach o obu jonach jednowartościowych.

Wiązanie zachodzi według wszelki go prawdopodobieństwa między zjonizowanymi grupami  $NH_3^+$  białek ( $NH_3^+$ ), a grupami kwasu fosforowego kwasów nukleinowych ( $PO^-$ ):  $R.NH_3^+ \cdots OP_2R_1$   
białko—kwas nukleinowy

Występowanie wiązań homeopolarnych (niebiegunowych) np. estrowego lub imidowego nie zostało dotychczas stwierdzone, aczkolwiek nie jest wykluczone.

Poza naturą wiązań ważny jest we wzorze  $(KN)_m B_n$  stosunek ilościowy obu składników.

W nukleinach okazało się, że przeważnie  $n=1$ , natomiast  $m$  waha się zależnie od rodzaju białka; dla protaminy  $m_{max} = 12$ , ovalbuminy 30, globuliny 60, zależąc przytem od 1) pH układu, 2) stosunku  $KN:B$  w roztworze, 3) obecności elektrolitów i 4) maksymalnej wartości katjonowej białka (ilości grup wytwarzających katjony).

Ilość grup kwasów nukleinowych wzrasta do maximum w pewnym optymalnym pH, różnym dla każdego białka, w którym ilość aktywnych grup  $NH_3^+$  będzie największa; wielkie stężenia soli będą prowadziły do wypierania  $KN$  z wiązań z białkiem; w rezultacie nazwa pewnej danej nukleiny obejmuje nie jeden, a cały szereg związków np. dla nukleoalbuminy od  $(KN)_1 B_1$  do  $(KN)_{30} B_1$ .

Obecnie staje się zrozumiałą różnorodność otrzymywanych związków, a także obserwowana wielokrotnie stałość składu izolowanych nukleoproteidów; tak np. nukleoklupeina z plemników śledzia otrzymywana w wysokich pH, przez różnych autorów (np. L y n c h) (146), ma stałe skład  $(KN)_4 B$ .

Naogół powyższe badania, aczkolwiek uwidoczniły niespodziewanie złożony charakter całego zagadnienia, rokują jednak nadzieję na ustalenie warunków izolowania określonych nukleoproteidów i, ostatecznie, na otrzymanie rodzimych substancji (P r z y ł ę c k i, F r a j b e r g e r i G e d r o y ę (180).

Poza właściwymi nukleoproteidami otrzymali P r z y ł ę c k i i G r y n b e r g (181) układy trójskładnikowe złożone z KN, białka i wielocukru np. glikogenu; białko jest tu łącznikiem.

## C z ę ś ć d r u g a.

### FIZJOLOGJA KWASÓW NUKLEINOWYCH I ICH POCHODNYCH.

Fizjologją, jak wiadomo, określamy naukę, rozpatrującą ogół procesów dynamicznych, zachodzących w substancji żywej. Terminu „fizjologja” używamy jednak dość często, choć niezbyt poprawnie, w węższym znaczeniu, gdy mamy na myśli całą sumę naszych wiadomości dotyczących się warunków występowania pewnego określonego ciała lub grupy ciał w ustroju żywym, jego roli w określonych procesach życiowych, tudzież losów związanych z obu kierunkami metabolizmu macierzystej komórki, lub tkanki.

Z tego też punktu widzenia, po uprzednim przeglądzie chemji kwasów nukleinowych i ich pochodnych, rozpatrzmy znane nam dotychczas fakty wskazujące na udział tych związków w pewnych procesach fizjologicznych i morfologicznych, określając całość wiadomości o ich chemodynamizmie jednym wyrażeniem — fizjologja (chemiczna) kwasów nukleinowych.

Już pierwsze chemiczne prace M i e s c h e r a, określające „nukleiny” jako najcharakterystyczniejsze substancje jąder komór-

kowych, były właściwie pracami nad fizjologią kwasów nukleinowych.

Dalsze rozczłonkowanie chemiczne tych ciał na związki typu zasad azotowych, węglowodanów i kwasu fosforowego (Kossel) wytworzyło teoretycznie tyleż kierunków badań fizjologiczno-chemicznych. Faktyczny rozwój tych zagadnień szedł długi czas w kierunku pogłębienia naszych wiadomości dotyczących się bądź wielkich kompleksów (nukleoproteidy, nukleiny, kwasy nukleinowe) pojmowanych jako rodzime składniki organizmów żywych, bądź też przeciwnie, ostatecznych produktów metabolicznego rozpadu tych złożonych związków.

Dopiero po upływie czterdziestu lat od wykrycia kwasów nukleinowych przez M i e s c h e r a, gdy L e v e n e i inni otrzymali pośrednie produkty rozpadu tych związków t. j. nukleozydy i nukleotydy, nastąpił nowy etap rozwoju fizjologii kwasów nukleinowych i ich pochodnych.

Szczególniej okres ostatnich kilku - kilkunastu lat zaznaczył się badaniami w kierunku izolowania z tkanek i soków organizmów wyżej wspomnianych ułamków, przyczem ilość ich wzrasta nieustannie, co najważniejsza zaś okazuje się, że odgrywają one pierwszorzędną rolę w wielu podstawowych procesach biologicznych.

Mówiąc o chemii kwasów nukleinowych wspomnieliśmy, że rzadko w którym z działów biochemii uwidacznia się tak ściśle związek między strukturą chemiczną składników substancji żywej, a rolą ich w określonych procesach fizjologicznych i morfologicznych, jak właśnie w rozpatrywanym przez nas dziale ciał nukleinowych; niejednokrotnie dopiero drobiazgowe badanie szczegółów budowy tych złożonych związków tłumaczy nam przyczyny ich występowania i odpowiedniego zachowania się w danej komórce, lub tkance.

Obecnie rozpatrzymy wszystkie fakty, któreby można ująć jednolicie jako należące do fizjologii kwasów nukleinowych, a więc, mono i polinukleotydów, określonych jako estry fosforowe pewnych węglowodanów (prawie wyłącznie pentoz) połączonych ze swej strony z pochodniami cyklicznych zasad azotowych (puryny i pirymidyny). Najbliższymi pochodniami tych właściwych kwasów nukleinowych byłyby z jednej strony połącze-

nia ich z białkami (nukleoproteidy), z drugiej — bezpośrednio produkty rozpadu — nukleozydy i estry fosforowe węglowodanów; dalszemi pochodniami byłyby oczywiście wszystkie teoretycznie możliwe składniki, z uwzględnieniem zmian jakim mogą one ulegać w organizmach żywych.

Niektóre z tych składników, bardziej specyficzne, dają się łatwiej wysledzić w wirze anabolicznych i katabolicznych procesów fizjologicznych (np. aminopuryny, dezoksyryboza), inne — niespecyficzne (np. kwas fosforowy) giną zazwyczaj w masie identycznych odłamków najróżnorodniejszych złożonych związków chemicznych.

W teorii należałoby omawiać oddzielnie fizjologję każdego ze składników; przy dzisiejszym stanie wiedzy o fizjologii niektórych z nich nie wiemy jednak nic, albo b. niewiele (pirymidyny, węglowodany pentozowe); w niektórych wypadkach mamy zaledwie pewne wskazówki co do pokrewieństwa izolowanych związków z kwasami nukleinowymi lub ich pochodniami (np. witaminy B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> itd.), to też podział ogółu faktów dotyczących fizjologii omawianej przez nas grupy związków chemicznych będzie dosyć dowolny i w miarę postępu wiedzy musi ustąpić miejsca racjonalnej klasyfikacji.

Fizjologję kwasów nukleinowych i ich pochodnych podzielimy więc na następujące działy:

- I. Fizjologja nukleoproteidów i polinukleotydów (tutaj należałaby również fizjologja niektórych specyficznych białkowych składników nukleoproteidów — protamin i histonów)
- II. Fizjologja mononukleotydów, pironukleotydów i nukleozydów
- III. Fizjologja wolnych puryn i pirymidyn.

W niniejszym przeglądzie rozpatrzemy tylko 2 pierwsze punkty, wyłączymy zaś całą obszerną dziedzinę t. zw. przemiany purynowej, obejmującej całość przemian, jakim podlegają w organizmie pochodne purynowe od chwili uwolnienia się ich z połączeń z węglowodanami, aż do wydalania ich z ustroju żywego pod postacią produktów końcowych metabolizmu purynowego; te ostatnie zagadnienia będą przedmiotem oddzielnych rozważań.

## FIZJOLOGJA NUKLEOPROTEIDÓW I POLINUKLEOTYDÓW.

Już prace *Mieschera* wykazały, że ogromną większość suchej substancji główek plemników niektórych ryb (do 95%) stanowią ściśle określone nukleoproteidy — sole kwasów nukleinowych z zasadowymi białkami, protaminami.

Takie nukleoproteidy zostały niejednokrotnie izolowane i oznaczono stosunek ilościowy cząsteczek kwasu nukleinowego i białka; tak np. w nukleoklupeinie z główek plemników śledzi lub innych ryb znaleziono stosunek 4:1 (np. *Lynch*) (146), skład jego wyrazi się więc wzorem  $(KN /_4 B$  gdzie *KN* — cząsteczka kwasu nukleinowego, *B* — białka (*Przyłęcki*) (179). Realne istnienie takich określonych, jednolitych związków jest możliwe tylko w stałym pH, przy określonej koncentracji elektrolitów i t. d. (*Przyłęcki*), tym niemniej rodzimy charakter ich nie ulega wątpliwości.

Podobnie wielkie ilości nukleoproteidów stwierdzono i w limfocytach gruczołu grasicowego i w jądrach krwinek ptasich, a ostatnio, dzięki nowej, b. pomysłowej metodzie izolowania jąder komórkowych, i w jądrach komórek np. mięśnia sercowego (*Behrend* (21).

Wszystkie te fakty narzucają wprost przypuszczenie pierwszorzędnej roli, jaką muszą odgrywać białkowe połączenia polinukleotydów w procesach morfo czy fizjogenetycznych, ogólnie biorąc, w procesach dzielenia się komórek.

Szczególnie zastanawiającym jest fakt, że organ komórkowy spełniający tak niesłychanie skomplikowane funkcje, jak podziału, przenczenia cech dziedzicznych i podlegający przytem głębokim i szybkim zmianom morfologicznym składa się w ogromnej większości z prostych stosunkowo (w wypadku protamin) substancji chemicznych.

Nie będziemy tutaj rozpatrywali wszystkich poglądów na rolę nukleoproteidów jąder komórkowych, a szczególnie materjalnego podłoża chromozomów — t. zw. chromatyny zbudowanej prawdopodobnie przeważnie z nukleoproteidów, tembardziej, że dotychczasowe hipotezy (*Kiesel*) (101) nie miały żadnego dostatecznego uzasadnienia, przedstawimy tu tylko wyniki now-

szych prac, które rzuciły nowe światło na możliwą rolę odgrywaną przez wolne i związane polinukleotydy komórkowe.

Dokładne zbadanie własności fizykochemicznych polinukleotydów dezoksyrybozowych przez H a m m a r s t e n a (82), a mianowicie poznanie stałych dysocjacji, ciśnienia osmotycznego, warunków istnienia układów kolloidalnych sol - żel w obecności elektrolitów i t. d. wykazało nader ciekawe fakty: oto kwasy nukleinowe dzięki swej charakterystycznej strukturze amfolitów z przewagą własności kwasowych tworzą w pH fizjologicznym układy kolloidalne nadzwyczaj chwiejne, znacznie chwiejniejsze od podobnych układów białkowych.

Nadzwyczajna wrażliwość własności kolloidalnych na wszelkie zmiany koncentracji elektrolitów czynią więc z polinukleotydów wolnych, lub luźno związanych, potężne, a zarazem czułe regulatory fizyko-chemicznych własności komórek i jąder komórkowych, umożliwiające szybki przebieg szeregu skomplikowanych procesów morfologicznych, jak np. procesu mitozy.

Regulacja szeregu własności fizycznych warunkujących plastyczność jądra, jako to lepkości, hydratacji, ciśnienia osmotycznego staje się więc ułatwioną przez obecność wysokocząsteczkowych związków o tak charakterystycznej budowie.

Wątpliwem jest, by na tem kończyła się rola kwasów nukleinowych w jądrze komórki. Wydaje się nam, że mogą one brać bezpośrednio lub pośrednio udział w innym, nadzwyczaj ważnym mechanizmie rozwojowym, a mianowicie w przenoszeniu cech dziedzicznych zapomocą zawiązków tych cech — genów.

Szczególnie koncepcja M o r g a n a prostoliniowego układu genów, czy to w chromonemach, czy chromomerach późniejszych autorów, nasuwa przypuszczenie istnienia charakterystycznego podłoża umożliwiającego istnienie trwałego, dość sztywnego zespołu kolejnych genów, pojmowanych jako aktywne centra o własnościach katalitycznych (G o l d s c h m i d t). Jak dotychczas, nic nie przemawia za bezpośrednim związkiem jakiegokolwiek hipotetycznej struktury genów ze strukturą chemiczną polinukleotydów, lub nukleoproteidów, wydaje się nam raczej, że geny „tkwią” w tym wybitnie fizyko-chemicznie odkształconym układzie (obfitość grup polarnych), jaki tworzą łańcuchy białkowe (nieraz niezmiernie prostej budowy, jak w

protaminach) w połączeniu heteropolarnym, lub innym, z pojedynczymi albo spolimeryzowanymi cząsteczkami polinukleotydów.

Tego rodzaju hipotezy wymagają jednak dokładnych badań nad lokalizacją nukleoproteidów czy polinukleotydów, przede wszystkim w znanych podścieliskach cech dziedzicznych — chromozomach.

Dzisiejsze metody histochemiczne umożliwiają już, do pewnego stopnia, podobne badania; najczęściej stosowana jest nuklealowa metoda Feulgena i Rosenbecka (68) oparta na aldehydowych własnościach węglowodanowego składnika tetranukleotydu dezoksyrybozowego (d-dezoksyrybozy) — tej charakterystycznej substancji jądra komórkowego.

Ostatnio Brachet (29) zastosował z powodzeniem reakcję Dischego (44) (z dwufenyloaminą) dla stwierdzenia prawdopodobnej transformacji polinukleotydów rybozowych w dezoksyrybozowe w zapłodnionych jajach jeźowców. Oznaczając jednocześnie zmiany w zawartości d-rybozy (metodą furfurołową), d-dezoksyrybozy oraz fosforu t. zw. nukleoproteidowego, Brachet stwierdził minimalne ilości dezoksyrybozy obok znacznych rybozy w jajach niezapłodnionych, oraz szybką transformację tej ostatniej w dezoksyrybozę po zapłodnieniu. Fosfor nukleoproteidowy, zgodnie z danymi poprzednich autorów (np. Needham i Needham) (163) nie ulegał przytem zmianie.

Rola zapłodnienia (co się tyczy ciał nukleinowych) polegałaby u jeźowców i wielu innych bezkręgowców jedynie na aktywacji obecnego w jajach enzymu (lub enzymów), powodującego przemianę polinukleotydów rybozowych w dezoksyrybozowe; u kręgowców, np. w jajach kurczaka, zachodzi, jak stwierdzono dawniej (np. Loeb), całkowita synteza podstawowych składników kwasów nukleinowych; podobnie u ryb (29a) (Brachet). Badania Brachet'a wyjaśniłyby więc dawny spór pomiędzy t. zw. teorią syntezy (Loeb) a teorią wędrówki substancji chromatynowej (Godlewski) (77) i byłyby pięknym przykładem zastosowania nowoczesnych metod embriologii chemicznej opartych na gruntownym poznaniu szczegółów struktury chemicznej złożonych składników substancji żywej.

Jednocześnie te badania Brachet'a i ostatnio Schmita (191) ujawniły niezwykle skomplikowany obraz całego zagadnienia roli nukleoproteidów jądra komórkowego. Przedewszystkiem samo przejście polinukleotydów rybozowych w dezoksyrybozowe jest reakcją złożoną z wielu faz chemicznych, zachodzić tu musi nie tylko redukcja rybozy na dezoksyrybozę, ale i zmetylowanie uracylu na tyminę (być może przez 5-metylocytozynę Johnsona i Cowghilla (93); Schmidt ujawnił ponadto nową trudność badania uprawniającą do b. ostrożnego wyciągania wniosków z pozytywnego lub negatywnego wyniku barwnych reakcji histochemicznych (np. nuklealowej); oto izolowane nukleoproteidy z niezapłodnionych jaj jeźców dawały reakcję Feulgena, podczas gdy w cytoplazmie in situ reakcja ta wypada ujemnie (Brachet); Schmidt przypisuje ten fakt czynnikowi rozproszenia badanej substancji w cytoplazmie. Nieregularne występowanie odczynu Feulgena u różnych roślin obserwowali również Boas i Biechelle (26) natomiast Proner (178) przedłużając okres hydrolizy otrzymywał stale pozytywne wyniki.

Widzimy więc, że kwestja lokalizacji i oznaczania kwasu dezoksyrybozowego (tymononukleinowego) zapomocą metod histochemicznych nie jest jeszcze w zupełności rozwiązana; między innymi należy wykluczyć obecność ciał dających reakcje zbliżone do nuklealowej (reakcja plazmalowa Feulgena) zbadać możliwość występowania kwasu tyminowego bez uprzedniej hydrolizy, wreszcie należy się liczyć z jakimiś pośrednimi fazami reakcji ryboza — dezoksyryboza.

Pomimo tych wszystkich trudności, kwas dezoksyrybozowy wydaje się być jednak charakterystyczną substancją jądrową i w tym sensie interpretujemy nawet pozytywną reakcję nuklealową w bakterjach; Brachet próbował więc użyć oznaczeń dezoksyrybozy, (całość jakoby we frakcji nukleoproteidowej) do nowego chemicznego określenia t. zw. stosunku jądrowo-plazmatycznego, badanego już wielokrotnie przez szereg morfologów i biochemików (Godlewski) (77), Schaefer i LeBreton (186), Truszkowski (215—16), Dmochowski (46, 46a).

W zasadzie stosunek Brachet'a:  $\frac{N_{kw} \text{ grasicow.}}{N_{całk.} - N_{kw.} \text{ grasic.}}$  jest z pewnością bliższy prawdziwego) stosunku:  $\frac{\text{chromatyna} + \text{sok jądrowy}}{\text{cytoplazma}}$

niż u wszystkich jego poprzedników, wobec powyżej jednak wymienionych niejasności oznaczania kwasu tymononukleinowego nie może być uważany za zupełnie zadawalniającą formę chemicznego odwzorowania stosunku mas jądra i cytoplazmy.

Obok metod barwnych stosujemy już i metody histoenzymatyczne dla lokalizacji kwasów nukleinowych. Van Herwerden (86) stosuje metodę nukleazową, polegającą na trawieniu nukleoproteidów, w utrwalonych skrawkach, zapomocą t. zw. enzymu nukleazy t. j. wyciągu ze śledziony lub innych organów. Jak zobaczymy później „nukleaza“ ta jest właściwie mieszaniną wielu enzymów nukleoklastycznych i rozkłada nukleoproteidy komórkowe aż do związków nie barwiących się barwnikami zasadowymi, czyli conajmniej do nukleozydów.

Ostatnio van Herwerden wykrył tą metodą b. ciekawe różnice trwałości powiązań kwasów nukleinowych z białkami w niedojrzałych i dojrzałych plemnikach wielu kręgowców i bezkręgowych.

Mianowicie główki plemników kręgowców z chwilą przejścia ze stadjum spermatydów w dojrzałe nie ulegają już zupełnie działaniu nukleazy, u bezkręgowych natomiast i u niektórych kręgowców (Rana) trawią się zupełnie. U niektórych ryb (Raja clavata) istnieją wyraźne odcinki, naprzemian ulegające i nieulegające działaniu nukleazy, przyczem wielkość ich odpowiada mniejwięcej wielkości chromomerów. Że części nietrawiące się są jednak nukleoproteidami, to stwierdza pozytywny wynik reakcji nuklealowej, (podobne stosunki znaleziono u Gallus domestic, Testudo i t. d.). Widzimy więc że metoda enzymatyczna jest dzisiaj w stanie wykryć subtelne różnice między nukleoproteidami i ujawnić nieprzewidywane szczegóły mikrostruktury komórkowej. Wydaje się, że jednoczesne zastosowanie udoskonalonej metody histoenzymatycznej (przez użycie pojedynczych, specyficznych enzymów z grupy nukleoklastycznych), wraz z odpowiednimi metodami barwienia umożliwi nam rozstrzygnięcie wielu zagadnień cytologiczno-genetycznych. Ochron-

ne działanie wiązania z białkami na polinukleotydy obserwowano już wielokrotnie; tak np. Bielschowsky (24) obserwował je przy działaniu na nukleoproteidy z ciałek ropnych b. silnego enzymu ze śluzówki jelita — t. zw. tymonukleiny; być może, że wiązanie to odgrywa ważną rolę w czasie przemiany jednych polinukleotydów w inne; ciekawem byłoby może zbadać je przy wszelkich anomaljach procesu mitozy np. w komórce nowotworowej, szczególnie wobec obserwacji Sterna i Wilheima (197) nad zmniejszonym stosunkiem N:P w kwasie nukleinowym izolowanym z nowotworów, w stosunku do kwasu z tkanek normalnych.

Wszystkie te fakty embriologiczne i histologiczne wykazują wyraźnie, że dokładna lokalizacja polinukleotydów rybozowych i dezoksyrybozowych, określenie stosunku ilościowego i związku genetycznego obu w zależności od etapu rozwojowego gamet, wreszcie izolowanie rodzimych, nukleoproteidowych form nukleinowych składników komórkowych wyjaśni nam w przyszłości wiele niezrozumiałych faktów z dziedziny mechanizmu rozwojowego, a w szczególności procesów mitozy i wędrówki genów.

\*

\*

\*

Prawie aż do ostatnich czasów wydawało się, że nukleoproteidy, względnie polinukleotydy, są to jedyne formy ciał t. zw. nukleinowych, grające jakąś rolę w fizjologicznych, bądź morfologicznych procesach życiowych.

Najzupełniej niespodziewanie stwierdzono jednak w ostatnim dziesięcioleciu udział mononukleotydów i ich pochodnych — pironukleotydów oraz nukleocydów w pewnych podstawowych procesach biochemicznych, jak procesy rozpadu cukrów w czasie fermentacji alkoholowej, kwasomlekowej (t. zw. glikolizy) i t. p.

Zjawisko udziału pośrednich produktów rozpadu wielkich kompleksów polinukleotydowych w procesach metabolizmu odmiennych grup składników biochemicznych ustrojów żywych nie różni się w zasadzie od innych, znanych nam tego rodzaju zjawisk. Jako ogólną zasadę ekonomii organizmu żywego można przyjąć zużytkowanie możliwie każdego etapu metabolizmu sub-

stancji wielkocząsteczkowych do wytworzenia specyficznych związków chemicznych, odgrywających następnie rolę integralnego składnika mechanizmu przemiany jakiejś innej grupy, mniej, lub więcej, złożonych substancji.

Punktem uchwytu w szeregu procesów metabolizmu takiej określonej grupy ciał są zazwyczaj (może i wyłącznie) procesy enzymatyczne, a omawiane specyficzne pośrednie produkty rozpadu bądź działają jako koenzymy, aktywatory, paralizatory i t. d., słowem odgrywają rolę regulatorów reakcji enzymatycznych, bądź stanowią część struktury enzymów np. witamin B<sub>2</sub>. W ten sposób, być może, można wyjaśnić genezę i rolę hormonów, witamin i koenzymów.

### ENZYMY GRUPY T. ZW. CIAŁ NUKLEINOWYCH.

Zanim przejdziemy do dokładnego rozpatrzenia działania pośrednich produktów przemiany nukleinowej rozpatrzmy najpierw cały zespół enzymów t. zw. nukleoklastycznych, przeprowadzających stopniowo najbardziej złożone kompleksy ciał nukleinowych w ostateczne produkty końcowe przemiany nukleinowej, wydalone nazewnątrż w różnych formach, przez różne formy organizmów żyjących.

Aparat enzymatyczny grupy t. zw. ciał nukleinowych jest niezwykle złożony i wyspecjalizowany. Nietylko każdy etap rozpadu na prostsze składniki jest związany z działaniem odrębnych enzymów (np. polinukleotydy → mononukleotydy → nukleozydy → zasady azotowe, węglowodany) ale i przemiany (np. dezaminacja), którym ulegają kolejne produkty rozpadu, a nawet izomerony tej samej fazy, wymagają obecności odrębnych enzymów.

W dawniejszej literaturze wszystkie te enzymy objęte były jedną wspólną nazwą „nukleazy”, dzisiejsza enzymologia grupuje je raczej w grupę enzymów t. zw. nukleoklastycznych, rozumiejąc pod tą nazwą cały zespół najróżnorodniejszych hydrolaz i desmolaz, katalizujących przemiany związków, określanych jako pochodne kwasów nukleinowych. W teorii podział enzymów nukleoklastycznych przedstawiały się następująco:

I. Hipotetyczne enzymy katalizujące rozpad nukleopro-

- teidów na białka i polinukleotydy.
- II. Enzymy depolimeryzujące złożone polinukleotydy na tetranukleotydy.
  - III. Enzymy rozkładające tetranukleotydy na mononukleotydy (dwufosfatazy, polinukleotydazy).
  - IV. Enzymy rozkładające mononukleotydy na nukleozydy i kwas fosforowy (nukleotydazy).
  - V. Enzymy rozkładające nukleozydy na węglowodany i zasady azotowe (nukleozydazy).
  - VI. Dezaminazy, specyficzne dla każdej z wspomnianych form związków purynowych i pirymidynowych.
  - VII. Oksydazy — podobnie jak dezaminazy
  - VIII. Urikaza, przeprowadzająca kwas moczowy w allantoinę.
  - IX. Allantoinaza, przeprowadzająca allantoinę w mocznik.
  - X. Wszelkie, najzupełniej jeszcze hipotetyczne enzymy, katalizujące przemiany węglowodanowych składników kwasów nukleinowych. (B r a c h e t) (29), (B i e l s c h o w s k y) (24).
- I. Pierwsza wspomniana grupa enzymów nosi charakter zupełnie hipotetyczny; w teorii, rozpad heteropolarnych wiązań kwasów nukleinowych z białkami może zachodzić bez udziału enzymów, a tylko wprost przez zmianę stężeń elektrolitów; nie wykluczony jest jednak udział enzymów w wypadku możliwych wiązań homeopolarnych.
  - II. Prawdopodobnym, choć również niestwierdzonym, jest istnienie enzymów depolimeryzujących złożone kompleksy (t. zw. żelatynujące  $\alpha$  kwasy tymononukleinowe) na tetranukleotydy ( $\beta$  kwasy, nieżelatynujące) np. nukleozelaza Feulgena (67), tembardziej, że Torrell przypuszcza krańcową polimeryzację rodzimych kwasów nukleinowych w kompleksy, co do wielkości co najmniej odpowiadające cząsteczkom białka.
  - III. Zupełnie stwierdzonym jest istnienie polinukleotydaz (nukleinaz, dwufosfataz, nukleofosfataz). Najsilniejszą nukleinazę tego typu, jakoby specyficznie nastawioną na rozkład tetranukleotydów dezoksyrybo-

zowych (tymonukleinazę) wykryli ostatnio w śluzówce jelita *Thannhauser* i *Klein* (208). Pojawienie się, lub ogromne zwiększanie działania polinukleotydz w komórkach nowotworowych, względnie tkankach organizmu dotkniętego nowotworem zaobserwowali *Edlbacher* i *Kutscher* (53, 53a), *Dmochowski* (47) badając fosfatazę (w tem i polinukleotydzę) moczową nie stwierdzał w moczu rakowatych żadnych wybitnych zmian.

Polinukleotydaza jest, albo tylko specyficznie nastawioną monofosfatazą (przyjmując teorię *Levene'a* estrowych połączeń w tetranukleotydach), albo enzymem rozbijającym dodatkowe wiązania z drugorzędowymi grupami fosforanowymi — (dwufosfataza) (*Takahashi*) (206), w każdym razie nie jest identyczna z nukleotydażą. *Thannhauser* (207) i *Klein* (102b) nie uważają jej nawet za fosfatazę, a raczej za pirofosfatazę.

- IV. Nukleotydyzy (oraz pironukleotydyzy) — są to enzymy typu fosfataz, odczepiających grupę fosforanową, względnie pirofosforanową od mononukleotydów (lub pironukleotydów); według *Levene'a* i *Dillon*a (110) a także *Kay* (99) nukleotydaza nie różni się w swem działaniu od jakiegokolwiek fosfatazy (glicero-fosfatazy, heksozodwufosfatazy i t. p.) natomiast *Reis* (181a) stwierdza wybitną specyficzność nukleotydyzy mięśnia sercowego (5-nukleotydyzy), nastawionej specjalnie na rozkład nukleotydów typu kwasu adenilowego mięśniowego; *Myrbäck* (160a) zaś podnosi specyficzność nukleotydyzy nerkowej przy rozkładzie kozymazy.

Nukleotydyzy są niezmiernie rozpowszechnione; znaleziono je przede wszystkim w nerkach, jelitach, śluzówce i soku jelitowym, w tkance kostnej, wątrobie, śledzionie, dalej w plazmie, w krwinkach, mięśniach, moczu i t. p. Nukleotydaza moczowa nie wykazuje specyficzności (*Dmochowski*).

Naogół nukleotydyzy tkanek zwierzęcych wykazują op-

timum działania w pH około 9 (krwinek — pH 6,5, R o c h e (184) mocz — 5,5 D e m u t h (45), D m o c h o w s k i (47), natomiast fosfatazy roślinne w pH — 5.

Ostatnio B a m a n n i R i e d e l (6,6a) stwierdzili obecność fosfatazy o pH optimum 5,5 w nerkach i wątrobie.

B. silne zwiększenie działania nukleotydz, jak i wszystkich fosfataz znaleziono również w tkance nowotworowej: (D m o c h o w s k i). Istnieją fosfatazy nastawione specyficznie na odczepienie grupy pirofosforanowej od pironukleotydów; dotychczas stwierdzono w wątrobie i oddzielono od innych fosfataz adenilopirofosfatazę, inaczej zwaną adenozyntotrójfosfatazą (J a c o b s e n) (90), B a r r e n s c h e e n i L a n g (18). Fosfatazę (prawdopodobnie cały zespół fosfataz) znaleziono ostatnio w bakteriofagach (S c h ü l e r) (192a).

- V. *Nukleozydazy*, rozkładające nukleozydy są również b. rozpowszechnionymi enzymami komórkowymi (nie znaleziono ich tylko w soku jelitowym); pH optimum około 7,5 (L e v e n e) (109), E u l e r i B r u n i u s (64), 6,5 według K l e i n a (102a).

Daleko idące zróżniczkowanie działania enzymów nukleoklastycznych zauważono także i w grupie nukleozydaz; naogół są to enzymy nastawione tylko na rozkład nukleozydów, nie należą więc do  $\beta$ , bądź  $\alpha$  glukozydaz, pozatem np. nukleozydaza nerkowa rozkłada najszybciej rybonukleozydy purynowe (L e v e n e), nukleozydaza szpiku kostnego specjalnie silnie dezoksynukleozydy pirymidynowe D e u t s c h i L a s e r (43), sprawa ta jeszcze nie jest dostatecznie zbadana, choć krańcowa specyficzność jest b. prawdopodobna.

K l e i n (102a) w ostatniej pracy nad nukleozydami przyjmuje również istnienie odrębnej purynonukleozydazy (jednakowej dla wielu organów jak śledziona, nerka) i pirymidynonukleozydazy, przyczem dezoksyrybozydy pirymidynowe rozpadają się trudniej.

- VI. Bardzo złożoną jest grupa dezaminaz nukleinowych; występują tutaj: 1) polinukleotydodezaminazy, 2) szereg mononukleotydodezaminaz, jak dwie adenilodezaminazy, gwanilodezaminaza (Schmidt) (189) i t. d. 3) nukleozydodezaminazy: adenozy-no, - cytydino - dezaminazy (rybo, a prawdopodobnie i odrębne dezoksyrybozowe), Bielschowsky i Klemperer (25), wreszcie 4) puryno i pirymidyno dezaminazy, jak gwanaza, adenaza (b. rzadko) — najdawniej poznane i w dawnej literaturze podawane jako jedyne dezaminazy nukleinowe. Ilości dezaminaz w różnych tkankach są różne np. w mięśniu szkieletowym przeważa ogromnie adenilodezaminaza, (Reis (181), w jelitach — adenozy-no i dezoksyadenozynodezaminaza (Klein).
- VII. Oksydazy purynowe i pirymidynowe będą rozpatrywane dokładniej w artykule o przemianie purynowej, tutaj nadmienimy tylko, iż w dziale oksydaz specyficzność enzymów jest słabiej zaakcentowana, niż w dziale dezaminaz. Jedynym przykładem, świadczącym o możliwości utleniania puryn związanych jeszcze z grupą węglowodanową jest obecność rybozydu kwasu moczowego we krwi wielu zwierząt i ludzi (Benedict) — zatem, być może, odkrycie krotonozydu przez Cherbuliez i Bernharda.
- VIII i IX. Urikaza i allantoinaza będą również omawiane przy przemiany purynowej.
- X. Enzymy, katalizujące przemiany węglowodanowych składników kwasów nukleinowych i ich pochodnych nie zostały dotychczas wykryte, tem niemniej istnienie ich wydaje się b. prawdopodobnem; szczególnie badania Brachet nad przemianą polirybonukleotydów w polidezoksyrybonukleotydy w jajach zapłodnionych jeźowców jest faktem przemawiającym za możliwością enzymatycznych przemian jednych tetranukleotydów w drugie, prawdopodobnie przez stadja mononukleotydów lub nukleozydów; dodatkowem zagadnieniem było

by metylowanie grupy uracylowej na tyminę kwasu dezoksyrybozowego.

## FIZJOLOGJA NUKLEOTYDÓW I NUKLEOZYDÓW.

Szybki rozwój chemji kwasów nukleinowych i poznanie szczegółów budowy nukleotydów i nukleozydów doprowadziło w ostatnim dziesięcioleciu do znacznego rozszerzenia i pogłębienia poglądów na rolę fizjologiczną, bądź poszczególnych składników polinukleotydów, bądź bezpośrednich ich pochodnych.

Okazało się, że, podobnie jak i przy metabolizmie innych wielkocząsteczkowych składników komórkowych, tak i w wypadku kwasów nukleinowych organizm żywy nadzwyczaj sprawnie wykorzystuje poszczególne ogniwa przemiany rozkładowej, spożytkowując je dla najbardziej nieoczekiwanych regulacji najrozmaitszych procesów biochemicznych o charakterze enzymatycznym.

Jednoczesna obecność składników azotowych z charakterystycznym nagromadzeniem najczynniejszych grup chemicznych (aminowych, iminowych) dalej składników węglowodanowych w nietrwalej, a czynnej postaci furanoz, wreszcie grup fosforanowych, wspólnych tytu biologicznie ważnym związkiem chemicznym — wszystkie te fakty warunkują i tłumaczą wybitny udział pochodnych kwasów nukleinowych w najbardziej podstawowych procesach biochemicznych.

Zakres tych procesów zwiększa się nieomal, że z każdym rokiem, obejmując już dzisiaj najważniejsze ogniwa zjawisk skurczu mięśniowego, tlenowego i beztlenowego rozpadu węglowodanów, regulacji funkcji serca i naczyń krwionośnych, a w ostatnich czasach nawet działania witamin grupy B i wreszcie pewnych składników tuberkuliny (Kallos i Hoffman n) (98), (M o n a - S p i e g e l Adolf i Seibart) (157).

Obecnie przejdziemy do przeglądu faktów i pewnego usystematyzowania naszych wiadomości o udziale kwasów nukleinowych we wspomnianych procesach.

Jedną z największych zdobyczy w dziedzinie fizjologii kwasów nukleinowych było stwierdzenie w ostatnim dziesięcioleciu nukleotydowej budowy t. zw. kofermentów fermentacji alkoholowej i kwasomlekowej węglowodanów.

H a r d e n i Y o u n g jeszcze w 1905 r. stwierdzili obecność w drożdżach kofermentu, niskocząsteczkowego i ciepłoodpornego, nieodzownie potrzebnego dla działania całego kompleksu enzymów drożdżowych objętego nazwą zymazy; stąd późniejsza nazwa kozymazy (E u l e r i M y r b ä c k). E u l e r i jego współpracownicy w latach 1923—1933 r. izolowali kozymazę i stwierdzili, że jest ona jakimś izomerem kwasu adenilowego mięśniowego (adenozyno-5-fosforowego), być może z dodatkową grupą azotową (M y r b ä c k) (162).

M e y e r h o f w 1918 r. (147, 147a, 148—150) wykrył kozymazę w mięśniach oraz stwierdził, że fermentacja kwasomlekowa, podobnie jak alkoholowa przebiega tylko w obecności jakiegoś kofermentu. Przez długi czas zdawało się, że oba kofermenty są identyczne, dopiero najnowsze badania M e y e r h o f a i L o h m a n n a (153) wykazały pewne różnice; właściwym kofermentem glikolizy jest mianowicie pironukleotyd adeninowy (kwas adenilopirofosforowy), ponadto, niezbędną jest obecność fosforanów i jonu Mg" (L o h m a n n) (143).

Nie jest naszym zadaniem szczegółowe przedstawienie biochemicznego rozkładu węglowodanów; na tem miejscu ograniczymy się do podania poznanych faktów i współczesnych teorii związanych ściśle z chemią i fizjologią nukleotydów i pironukleotydów; ciała te wykazują działanie kofermentów przy enzymatycznym rozpadzie cukrów, lub też odgrywają rolę ogniwa przemian energetycznych zjawisk skurczu mięśniowego.

Biochemiczny rozkład węglowodanów jest w chwili obecnej przedmiotem wyieżonych badań chemików i biochemików całego świata, nic dziwnego więc, że najbardziej podstawowe poglądy na mechanizm tego procesu ulegają zasadniczym zmianom, co parę lat, a nieraz co kilka miesięcy.

Niniejszy przegląd ma za zadanie zdać sprawę ze współczesnego stanu badań i umożliwić czytelnikowi dalsze pogłębienie wiadomości przez śledzenie prac oryginalnych, podawanych

w pismach fachowych. Jak już wspomnieliśmy, fermentacja alkoholowa i kwasomlekowa (glikoliza) jest zespołem licznych kolejnych procesów enzymatycznych. Istotnymi etapami tego rozpadu są, według najnowszych prac Nilssona (165), Embdena (57) Meyerhofa i Kiesslinga (152, 152-a) 1<sup>o</sup>) fosforylacja heksoz na estry jedno (?) i dwufosforowe, 2<sup>o</sup>) procesy oksydo-redukcji związane z jednoczesnym rozpadem tych estrów heksozowych na 2 estry triozowe (fosfodwuoksyaceton) (Embden, Meyerhof), lub częściowo, w niektórych tkankach, na triozy (może metyloglioksal) (Nilsson (165), Euler (63), Barrenschneen i Beneschowsky (11), 3<sup>o</sup>) dalsza dysmutacja 2-ch powstałych cząsteczek estrów triozowych, aldoz lub ketoz, według typu reakcji Canizzaro na fosforylowaną glicerynę (kwas glicerofosforowy, fosfoglicerol) i takież kwas (kwas fosfoglicerynowy), 4<sup>o</sup>) defosforylacja wyższego stopnia utlenienia t. j. kwasu fosfoglicerynowego występującego w dwóch formach, zależnie od przyłączenia reszty fosforanowej (Meyerhof i Kiessling) (152b) poprzez etap kwasu fosfopirogronowego na kwas pirogronowy — ten centralny etap rozpadu węglowodanów, 5<sup>o</sup>) dalsze procesy oksydoredukcji albo:

a) kwasu pirogronowego z glicerofosforowym (przy glikolizie), albo

b) powstałego przez odczepienie CO<sub>2</sub> z kwasu pirogronowego aldehydu octowego z estrami fosforowymi trioz (przy fermentacji alkoholowej). W pierwszym przypadku (glikozy) — powstaje kwas mlekowy, w drugim — alkohol etylowy.

Widzimy, że w rozpadzie alkoholowym i kwasomlekowym węglowodanów przeważają procesy oksydoredukcji, katalizowane przez enzymy oksydo-reduktazy (mutazę, dehydrazę).

Euler i jego współpracownicy (63) stwierdzili, że kozymaza jest typowym koenzymem oksydoredukcji i to nawet przy wszelkich innych dysmutacjach (np. aldehydów). Przy odwodowaniu błękitem metylenowym wielu kwasów organicznych np. mlekowego, do stadij ketokwasów, również obecność kozymazy jest niezbędna (Szent-Györgyi) (200), tak, iż kozymaza staje się typową kodehydrazą (komutazą).

Brak kozymazy, albo niedostateczna jej ilość stanowi najczęściej czynnik ograniczający natężenie procesów oksydoredukcji, szczególnie w komórkach roślinnych. (A n d e r s o n) (1).

Ostatnio S z e n t - G y ö r g y i i B a n g a (201—2) izolowali kozymazę jako koenzym reakcji utleniania kwasu mlekowego na pirogronowy w mięśniu sercowym. Obecność kozymazy stwierdzono przedewszystkiem w tkankach i mikroorganizmach, gdzie rozpad węglowodanów idzie przez stadium fosforylacji, natomiast brak jej w mikroorganizmach o przewodze tlenowych procesów rozpadu. (V i r t a n e n) (222).

Co się tyczy chemizmu kozymazy, to jak już wspomniano, nie została ona dotychczas otrzymana w stanie krystalicznym i jest jakąś pochodną azotową kwasu adenilowego mięśniowego, przy czem zarówno kozymaza czynna, jak i zinaktywowana przez długie ogrzewanie z wodą jednakowo dezaminuje się na kwas inozynowy.

Dezaminacja chemiczna i enzymatyczna, oraz odczepienie grupy fosforanowej przez fosfatazę, również inaktywuje kozymazę, przyczem, zdaje się, że istnieje pewna specyficzność w działaniu fosfataz różnego pochodzenia (specyficzna nukleotydaza).

Aktywność kozymazy zależy więc z jednej strony od obecności grupy  $\text{NH}_2$  i  $\text{H}_2\text{PO}_3$ , z drugiej od nieznaney, nietrwałey struktury w cząsteczce kwasu adenilowego; pewne przypuszczenie co do wpływu odległości grup  $\text{NH}_2$  i  $\text{H}_2\text{PO}_3$ , może w zależności od izomerji (7) lub (9) adenozyiny, dałoby się może wyjaśnić przez oznaczenie stałej dielektrycznej różnych nukleotydydów.

Co się tyczy samego mechanizmu działania kozymazy, jako kofermentu, to, podobnie jak o działaniu kofermentów wogóle, nie wiemy o nim nic określonego. Jedyłą sformułowaną teorią jest teoria B a r r e n s c h e e n a (8) oparta na badaniach Z u c k e r k a n d l a i M e s s i n e r (227, 228) przypisująca pierwszorzędną rolę grupie iminowej (6) adeniny; grupa ta miałaby za zadanie dehydratację cząsteczki heksozy z jednoczesną zamianą  $\text{NH}_2$  na  $\text{OH}$ ; doświadczalne uzasadnienie tej hipotezy nie zostało jednak przeprowadzone.

Ostatnio A u h a g e n (5) stwierdził dość nieoczekiwanie istnienie kokarboksylazy, czyli kofermentu karboksylazy katalizującej rozpad kwasu pirogronowego w drożdżach na aldehyd

octowy i  $\text{CO}_2$ ; próby izolowania kokarboksylazy doprowadziły do otrzymania kwasu adenilowego, różnego od kozymazy; ślady kokarboksylazy znaleziono i w tkankach zwierzęcych.

Dokładne poznanie kofermentu glikolizy zostało dopiero umożliwione przez izolowanie z tkanek i płynów zwierzęcych nukleotydu adeninowego izomerycznego z mononukleotydem z kwasu nukleinowego drożdżowego (Hoffmann) (88) (krew), Embden i Zimmernan (62) (mięśnie) oraz rozpoznanie w nim źródła amoniaku mięśni i krwi Parnasi Mozłowski (173) (Embden i Schmidt) (59), Parnas (170, 170a), Mozłowski (158), Mroczkiewicz (159).

Dalsze wykrycie obecności pirofosforanów w mięśniach przez Lohmanna (140) umożliwiło izolowanie pironukleotydu adeninowego (Lohmann) (141), Fiske i Subarrow (72) i zidentyfikowanie go z kofermentem glikolizy. Całkowitym układem aktywatorów glikolizy jest według Lohmanna (143) zespół fosforanów, jonów  $\text{Mg}^{++}$  i kwasu adenilopirofosforowego, właściwym kofermentem jest jednak ten ostatni. Podobne stosunki znaleziono we krwi (Meyerhof) (151). Kozymaza chociaż obecna w niewielkich ilościach w mięśniach (szczególniej w sercowym) nie jest w stanie zastąpić działania kofermentu glikolizy; naodwrot, również w drożdżach, przy fermentacji alkoholowej, pironukleotyd działa znacznie słabiej od kozymazy (153). Zresztą i w drożdżach znaleziono kwas adenilowy mięśniowy Lindner (137), a więc możliwą jest obecność pironukleotydu gdyż, jak wiadomo, dodany do wyciągu z mięśni kwas adenilowy (być może także i kozymaza) syntetyzuje się na pironukleotyd (Lehnartz) (107), Lohmann (145a).

Dla zupełnego zobrazowania komplikacji stosunków nadmienimy, że, Neubergowi i Auhagenowi (164) udało się przez proste dodanie glutationu zamienić fermentację alkoholową drożdży w kwasomlekową.

Kwas adenilpirofosforowy dezaminuje się na inozynopirofosforowy (Lohmann) (144), Mozłowski (158b), również czynny jako koferment glikolizy, czemu przeczy jednak Barrerenscheen (12), przyjmując inną budowę pironukleotydu (patrz część pierwsza).

Dalszą komplikacją jest występowanie jeszcze innych form pironukleotydów *Barrenschenn* (16) otrzymał bowiem 2 formy kwasu adenylozotriofosforowego z których jedna jest jakoby czynniejsza jako koferment od drugiej (19) (patrz część pierwsza).

*Lohmann* (143) i *Embden* (56) zauważyli w mięśniu sercowym obecność związku o typie dwuadenilopirofosforanu (izolowany w 1933 przez *Osterna*) (167), podobnie obserwacje *Feinschmidta* i *Dmitrenki* (66) przemawiają za istnieniem innych pironukleotydów, niż kwas adenylozotriofosforowy. Mechanizm koenzymatycznego działania pironukleotydów, podobnie jak i mechanizm działania kozymazy, nie jest nam znany.

Wydaje się, że pironukleotyd adeninowy jest kofermentem bardziej przystosowanym do wyspecjalizowanej funkcji mięśni, gdzie spełnia on również ważną rolę ogniwa sprzęgającego energetycznie ważne procesy rozpadu i resyntezy fosfagenu (kwasu kreatynofosforowego) oraz także procesy rozpadu i resyntezy glikogenu.

Rola właściwego kofermentu glikolizy (w dawnym sensie umożliwiania czy też przyspieszania jednej lub kilku reakcji chemicznych z długiego szeregu etapów glikolizy) nie wyczerpuje znaczenia pironukleotydu adeninowego.

Zawdzięczając ostatnim pracom *Meyerhoffa* i *Lohmanna* (154, 145a) sądzimy dzisiaj, że procesem energetycznym najbliższym związanym ze skurczem mięśnia jest proces rozpadu i resyntezy pironukleotydu adeninowego; resynteza ta jest procesem endotermicznym, umożliwiającym jedynie przez jednoczesny egzotermiczny rozpad fosfagenu, resynteza zaś tego ostatniego, przez glikolityczny rozpad glikogenu na kwas mlekowy. Prace *Meyerhoffa* i *Lohmanna* rzuciły wiele światła na ów skomplikowany przebieg trzech enzymatycznie sprzężonych procesów rozpadu i resyntezy przebiegających nawet *in vitro*, w odwirowanym wyciągu mięśniowym.

Szczególniej rzucało się w oczy wzajemne sprzężenie syntez związków, z których każdy jest estrem fosforowym, i nasuwało się przypuszczenie upatrywania roli kofermentu w wędrówce

grup fosforanowych między pironukleotydem, a heksozami, bądź triozami.

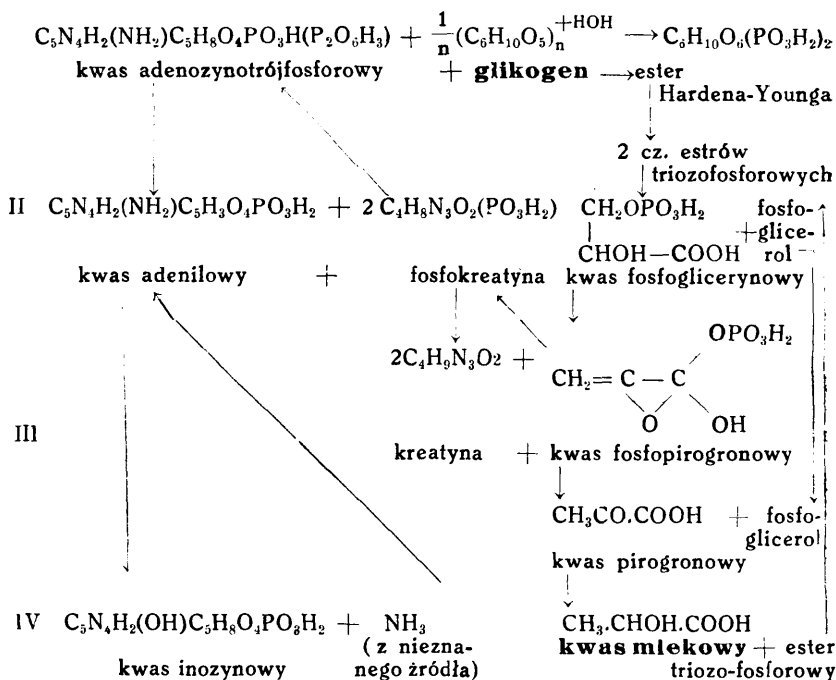
Idąc po linii tego rozumowania Parnas i Ostern (175), podali śmiałą koncepcję ujęcia wszystkich znanych już procesów chemicznych w mięśniu w jedną logiczną całość. Wychodząc z obserwacji nad przejściowym zahamowaniem procesu dezaminacji enzymatycznej pironukleotydu adeninowego w miążdże mięśniowej przez dodanie fosforanów, zauważyli oni, że zahamowanie to daje się znieść przez wszelkie znane czynniki wstrzymujące którykolwiek z kolejnych etapów glikogenolizy (fluorki, siarczyny, kwas jednonoślowy); dalej okazało się, że dodanie niektórych produktów pośrednich glikolizy np. kwasu fosfoglicerynowego, lub pirogronowego i fosforanów, (przy zatruciu flucrkowem) w zupełności zastępuje wstrzymaną glikogenolizę w sensie ponownego zahamowania dezaminacji pironukleotydu w miążdże mięśniowej. Jasnym było, że glikogenoliza, a raczej obecność końcowych jej produktów (np. kwasu fosfopirogronowego) wystarcza dla uchronienia pironukleotydu od trwałego rozpadu na kwas adenilowy, połączonego z nieuchronną dezaminacją na kwas inozynowy.

Parnas, Ostern i Mann (175b) przyjmują więc ściśle sprzężenie wszystkich 3-ch procesów z tem, że pironukleotydy przerzuca swoją grupę pirofosforanową na glikogen, zamieniając ten ostatni na ester Hardena-Younga (fruktozo-dwufosforowy); powstały kwas adenilowy jest fosforylowany dwiema cząsteczkami fosfagenu, kreatyna zaś powstała z rozpadu fosfagenu fosforyluje się końcowymi, fosforanowymi produktami rozpadu estru Hardena-Younga (prawdopodobnie kwasem fosfopirogronowym) z jednoczesną zamianą tychże na kwas mlekowy. Jedynym więc rezultatem tego cyklu jest rozpad glikogenu na kwas mlekowy.

Rola pironukleotydu adeninowego polegałaby na katalitycznym przerzucaniu reszt fosforanowych na glikogen; z glikogenu powstawałby przytem związek zdolny do szybkiego rozpadu aż do stadjum kwasu mlekowego, a oddający znowu swoją resztę fosforanową do syntezy fosfagenu, ten ostatni znowu, do syntezy pironukleotydu z kwasu adenilowego i t. d.

Dezaminacja kwasu adenilowego na inozynowy miałyby za zadanie zupełne wykluczenie działania kofermentu z cyklu obiegowego na czas resyntezy glikogenu z nieutlenionego kwasu mlekowego (reakcja *Pasteura - Meyerhoffa*). Nieco odmienne stosunki przy glikolizie w krwinkach znajduje ostatnio *Dische* (44a).

**SCHEMAT Parnasa, Osterna i Manna**  
(nieco uproszczony)



*Meyerhoff* i *Lohmann* (156) w swojej najnowszej pracy (1934) umiejscowiają działanie kofermentu (pironukleotydu + Mg) w enzymatycznej hydrolizie kwasu fosfopirogronowego na kwas pirogronowy i fosforowy. Według schematu *Parnasa* i *Osterna* dotyczyłoby to reakcji przerzucania reszty fosforanowej na fosfagen.

Dalsze badania wyjaśnią prawdopodobnie tę sprawę bliżej, nadmienimy tutaj, że i działanie obwodowe insuliny upatrują

niektórzy w jednym z końcowych etapów rozpadu estrów fosforowych węglowodanów (L a u g h t o n) (106).

W ten sposób rola całego zespołu związków fosforowych sprowadzałaby się do wysoce ekonomicznego zużytkowania energii spalania węglowodanów, z wyposażeniem tkanki mięśniowej w niezwykle precyzyjnie działający aparat regulacyjny wzajemnych resyntez, dostosowanych do chwilowych zadań pracującego, lub odpoczywającego mięśnia; w jaki sposób przebiega jednak zamiana energii wolnej pierwszego z całego cyklu procesów chemicznych t. j. fosforylacji glikogenu przez pironukleotyd na energję napięcia mięśni, to pozostaje dotychczas zagadką.

Że nukleotydy, względnie pironukleotydy nie są tylko zwykłymi kofermentami reakcyj enzymatycznych w mięśniu, to wynika chociażby z ogromnych ilości, jakie znajdujemy w tej tkance.

D m o c h o w s k i (46b, 46c) oznaczając ilości azotu purynowego wyciągowego w mięśniach królików i kur znajdował stale około 45 mg % Np. (azotu purynowego), z czego ponad  $\frac{3}{4}$  we frakcji nukleotydowej (głównie nukleotydu adeninowego), podobne liczby otrzymał O s t e r n (166) u żab i królików, natomiast np. w mózgu wołu, gdzie P o h l e (177) znalazł również kwas adenilowy i gdzie występuje prawdopodobnie kozymaza (S y m) (205) znaleziono tylko b. małe ilości Np frakcji nukleotydowej — 2,8 mg. %, w czem azotu adeniny zaledwie 1,1 mg. % (A s s e n h a j m) (4). Ta niewielka ilość nukleotydów stoi być może z odmienną przemianą węglowodanową (A s h f o r d i H o l m e s) (2, 2a, 3, 3a), — (B u m m i F e h r e n b a c h) (34, 35) ale może też być spowodowana obecnością silnej specyficznej fosfatazy (5-nukleotydazy), znalezionej w mózgu przez R e i s a (181). Łatwy rozpad nukleotydu (vel pironukleotydu) byłby przyczyną odmiennego przebiegu rozpadu węglowodanów. Kwas adenilowy znaleziono też i w żółci (R o t h m a n n) (185a).

Czy inne formy pochodnych kwasów nukleinowych, oprócz nukleotydowej są obecne i odgrywają jakąś rolę w mięśniu lub w innych organach?

Co się tyczy mięśni, to bezpośrednia analiza wykazała obec-

ność puryn wyciągowych, nienukleotydowych tylko w b. małych ilościach.

D m o c h o w s k i (46c) znalazł w mięśniach królików i kur 7—13 mg. % azotu purynowego w tej frakcji, przyczem hipoksantyna była zawsze obecna, natomiast adeninę znaleziono tylko w niektórych wypadkach, w innych nie było jej ani śladu.

Podobne ilości azotu purynowego znajdowali dawniej G u d z e n t i K e e s e r (79) natomiast P a r n a s i O s t e r n ( ) upatrują raczej w tej frakcji resztek niestrąconych całkowicie z frakcji nukleotydowej. Również P o h l e (176) z pracowni E m b d e n a znajdował około 7 mg. % Np w świeżych mięśniach, natomiast kilkakrotnie większe ilości w miazdze mięśniowej po kilku godzinach autolizy.

Dodanie kwasu adenilowego mięśniowego do miazgi jeszcze bardziej zwiększało azot purynowy frakcji nienukleotydowej — stąd wniosek, że kwas adenilowy (względnie pironukleotyd adeninowy) jest źródłem produktów rozpadu (nukleozydów, bądź wolnych puryn), nieobecnych w świeżym mięśniu, a powstających w znacznie większych ilościach dopiero przy autolizie tkanki.

W nowszych czasach sprawa ta została dokładniej oświetlona przez badania K e r r a (100) (u E m b d e n a), który stwierdził b. znaczne zwiększenie się frakcji nienukleotydowej (czyli frakcji strącającej się octanem ołowiu dopiero po dodaniu amoniaku) w rezultacie wyczerpującej pracy mięśni; u żaby wzrost wynosił od średniej spoczynkowej wartości 2—3 mg. % Np aż do 8 mg. Np (po pracy).

Wyniki K e r r a stałyby w związku z obserwacjami E m b d e n a i L e h n a r t z a (58) dotyczącymi zwiększania się ilości t. zw. pentozy rozpuszczalnej w alkoholu, w czasie pracy mięśnia. Jako przyczynę tych wszystkich faktów K e r r uważa rozpad produktu dezaminacji kwasu adenilowego t. zn. kwasu inozynowego na dalsze ułamki (np. inozynę lub dalej na hipoksantynę) w czasie wyczerpującej pracy, uniemożliwiającej normalną reaminację kwasu inozynowego (E m b d e n, P a r n a s).

Hipotezę tę potwierdzałoby stałe występowanie t. zw. karbony (t. zn. związku inozyny z hipoksantyną) w mięśniach i ogromne zwiększanie się jej przy autolizie (P o h l e) (176).

Karninę znaleziono również i w moczu jako składnik normalny, co świadczy, że rozpad nukleotydów do nukleozydów jest stałym procesem (co najmniej w samym moczu, dzięki obecności fosfatazy) (D m o c h o w s k i) (47).

W moczu znaleziono (niezawsze) także i inny nukleozyd — adenozyne, Calvery (37), a obserwacja ta jest o tyle ciekawa, że normalny mocz zawiera wogóle adeninę (suma wszystkich frakcji) tylko w minimalnych ilościach, natomiast po wielkich wysiłkach mięśniowych np. w moczu lekkoatletów ilość adeniny wzrasta kilkudziesięciokrotnie (K u t s c h e r) (105); zmiany ilości adeniny zauważono również i po skutecznej terapii tyroksynowej w wypadkach hipotyreozy (Flössner i K u t s c h e r) (74) — ilość adeniny spada dziesięciokrotnie.

Ze względu na to, że adenina jako taka, jest dla organizmu ludzkiego produktem obcym, na co wskazuje również i brak enzymu adenazy w organizmie człowieka (J o n e s) (94) zwiększenie adeniny moczowej należałoby, zdaje się, choćby częściowo położyć na karb zwiększonej ilości adencyny, lub kwasu adenilowego; ten ostatni nie występuje nigdy w moczu, co jest zrozumiałe ze względu na obecność w nim nukleotydazy a braku nukleozydazy (D m o c h o w s k i) (47a). Prace nad wyjaśnieniem tych stosunków są podjęte przez nas w Zakładzie Chemii fizjologicznej U. W.

Znaczne ilości nukleozydów znalazł Assenhajm (4); w mózgu bydłęcym, stosunkowo mała ilość wykrytej adeniny jest jednak prawdopodobnie wynikiem działania adenozyndeaminazy — stąd znaczne ilości hipoksantyny (inozyny).

Nadmienić tutaj należy, że dotychczas ilościowe oznaczenie t. zw. wolnych puryn w obecności nukleozydów w t. zw. frakcji nienukleotydowej w różnych organach nie było możliwym do przeprowadzenia; dopiero Grynberg (78) w Zakł. Chemii fizjologicznej U. W. opierając się na utlenianiu przez podjodyn gwaniny, ksantyny, oraz kwasu moczowego podał metodę oznaczania tych 3-ch wolnych puryn obok gwanozyny i ksantozyny; wobec odporności adeniny i hipoksantyny na podjodyn, a identycznego zachowania się gwaniny i ksantyny co do ilości wiążanego jodu mamy poraz pierwszy możliwość oznaczania całkowitej ilości gwaniny tkankowej na drodze czysto chemicznej

(nie enzymatycznej) — patrz S c h m i d t (189—190); ma to ważne znaczenie dla określenia t. zw. istotnych puryn jądrowych (niewyciągowych), zawartych w nukleoproteidach tkankowych.

Odróżnienie adenozyiny od adeniny w wyciągach tkankowych jest jednak, jak dotąd, możliwe jedynie na drodze farmakologicznej (działanie nasercowe.)

Metoda jodometryczna została świeżo zastosowana przez D m o c h o w s k i e g o, Z a j d e n m a n a i R a b a n o w s k ą (48) do oznaczania gwaniny mięśni. Uzyskano (11—14 mg. % gwaniny), liczby potwierdzające dane D m o c h o w s k i e g o (46c), który u królika znajdował do 4,6 mg. % azotu gwaniny, czyli około 10 mg. % gwaniny w przeciwieństwie do S c h m i d t a (189—190) uzyskującego 26 mg. % gwaniny metodą enzymatyczną (gwanazą). Liczby te są zgodne z wartościami t. zw. „phosphore nucleique“ (91—92) (J a v i l l i e r).

Jednocześnie D m o c h o w s k i, Z a j d e n m a n i R a b a n o w s k a nie wykluczają występowania w mięśniu jeszcze innych nieznanych bliżej puryn, które stwierdził i izolował jeszcze w 1929 r. D m o c h o w s k i (46c) (w postaci siarczanów i pikrynjanów), a które noszą charakter oksypuryn (różnych od hipoksantyny, ksantyny, oksyadeniny i kwasu moczowego).

Puryny te zyskują obecnie na znaczeniu wobec najnowszych badań nad t. zw. liochromami, albo flawinami tkankowymi (E l l i n g e r i K o s c h a r a (55), K u h n, W. J a u r e g g i G y ö r g i).

Nie wchodząc w mechanizm działania tych związków, czy to w postaci t. zw. „żółtego fermentu“ W a r b u r g a i C h r i s t i a n a, czy też witaminy B<sub>2</sub>, zajmiemy się tutaj raczej dotychczasowymi badaniami nad chemją tych ciał i ich związkiem z ciałami purynowymi i pirymidynowymi.

Najdalej posuniętymi badaniami w tym kierunku są badania K u h n a i W e y g a n d a. Otrzymali oni syntetycznie najpierw t. zw. lumiflawinę (104), to jest azotowy produkt rozpadu laktoflawiny, (witaminy B<sub>2</sub>), a następnie samą laktoflawinę (104b). Lumiflawina, otrzymana również przez proste naświetlanie laktoflawiny, posiada skład odpowiadający wzorowi C<sub>13</sub> H<sub>12</sub> N<sub>4</sub> O<sub>2</sub> i jest 6, 7, 9, trójmetylo-izo-alloksazyną.

Flawiny ( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ), są to połączenia dwumetylo pochodnych izo-alloksazyny z pentytami, budowa ich przypomina więc budowę nukleozydów.

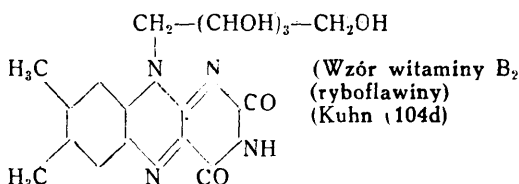
Flawiny występują w tkankach zwierzęcych zarówno w stanie wolnym, jak i w połączeniu z kolloidami (np. w „żółtym fermentie” *W a r b u r g a*).

Ostatnio *K u h n i R u d y* (104a) stwierdzili, że przez esteryfikację flawiny z kwasem fosforowym otrzymuje się związek typu „nukleotydu” analogiczny do t. zw. grupy czynnej „żółtego fermentu”, izolowanej przez *T h e o r e l l a* (214, 214a).

Laktoflawina  $C_{17}H_{20}N_4O_6$  wykazuje pełne własności witaminy  $B_2$ , znikające po odczepieniu grupy węglowodanowej, natomiast pozostała lumiflawina zachowuje własności oksydo-redukcyjne (przenoszenia wodoru od donatora do akceptora, którym jest tlen).

Z badań tych wynika, że witamina  $B_2$  jest materiałem do budowy grupy czynnej jednego z enzymów oksydoredukcyjnych.

Wzór laktoflawiny według *K u h n a* (otrzymana ostatnio syntetycznie przez *K u h n a* i *W e y g a n d a* (104b, 104c)



Ze układ purynowy wchodzi w skład flawin, przynajmniej niektórych z nich, to świadczy pozytywna reakcja mureksydowa (np. t. zw. laktoflawiny a, b i c). (55).

Nietylko jednak witamina  $B_2$  zawiera układ pirymidynowy, ale mamy wszelkie dane do przypuszczania, że i izolowana przez *W i n d a u s a* (219, 219a) i współpracowników witamina anti-neurytyczna  $B_1$  ( $C_{12}H_{17}N_3OS$ ), lub przez *J a n s e n a* i *D o n e t h a* w 1926 (v. *V e e n*) (221) posiada, sądząc z widma absorbcyjnego, w cząsteczce również układ pirymidynowy (izolowany już przez *W i n d a u s a*) (219a).

Izolowana przez *B a r n e s a* i *R e a d e r a* (6, 7) kryształiczna witamina  $B_4$  okazała się prawie czystą adeniną (*T s c h e s c h e*) (217), natomiast syntetyczna adenina jest nieczynna. Cie-

kawa obserwacja G u h a i C h a k r a w o r t h y (80) nad rzekomą zamianą adeniny przez fotoaktywację na witaminę B<sub>1</sub>, skorygowana później (80a), że chodzi o witaminę B<sub>2</sub> wskazuje jednak raczej, że chodzi o witaminę B<sub>4</sub> (S c h u l t z i L a q u e r) (193), a w takim razie podobieństwo witaminy B<sub>4</sub> z adeniną miałyby swoje uzasadnienie.

W każdym razie widzimy, że powoli cała grupa witamin B przechodzi do kategorii kompleksów purynowych lub pirymidynowych, a więc pochodnych kwasów nukleinowych; nie jest przytem wykluczone, że mogą wchodzić w grę nieizolowane dotychczas, lub mało poznane oksypuryny, mogące dawać, jak to wykazują ostatnie badania, związki o typie nukleozydów (C h e r b u l i e z) (39, 39a) lub skondensowane w wyższe kompleksy (W i e l a n d i współpracownicy) (218).

#### *Nasercowe działanie nukleozydów i nukleotydów.*

Pozostała do omówienia jeszcze jedna dziedzina fizjologicznego działania pochodnych nukleinowych, odkryta b. niedawno, a udostępniona ścisłym badaniom dzięki gruntownemu poznaniu szczegółów struktury nukleotydów i nukleozydów.

Chodzi tu o nasercowy efekt tych substancji, wykryty w 1929 r. przez S z e n t - G y ö r g i e g o i D r u r y ' e g o (203, 204), na sercu zwierząt stałocieplnych, zbadany następnie przez D r u r y ' e g o (51), R o t h m a n a (185), R i e g l e r a i S c h a u m a n a (182), na sercu zaś zmiennocieplnych przez O s t e r n a i P a r n a s a (174, 174a). Okazało się, że wszystkie pochodne adeninowe — adenozyne, adenylocymetylopentozyna G a r d (76), oba znane mononukleotydy adeninowe, koenzym A (G a r d) (76), pironukleotyd adeninowy (kwas adenilopirofosforowy) (174b) oraz specyficzny pironukleotyd sercowy wykryty przez L o h m a n a, E m b d e n a, a izolowany przez B e a t t i e, M i l r o y i S t r a i n a (20) oraz O s t e r n a (167) w postaci złożonego dwunukleotydu (kwasu dwuadenozy-nopentafosforowego) dalej oksyadeninorybozyd (krotonozyd) (P a r n a s i O s t e r n) (174b) wszystkie one wywierają potężny efekt nasercowy.

Po dodaniu minimalnych ilości tych związków 10 — 100 (dla serca żabiego bijącego na kanali S t r a u b a) następuje

czasowy blok serca, ustępujący następnie normalnemu rytmowi skurczów.

Pomiędzy poszczególnymi substancjami istnieją pewne różnice w działaniu ilościowym (szczególniej zależne od obiektu t. j. serca stało lub zmiennocieplnych) zasadniczej różnicy jednak niema.

Tylko pochodne adeninowe (z wyjątkiem samej adeniny) wykazują to działanie, przyczem obserwujemy zarówno dezaminację, jak i defosforylację, a charakter działania nukleozydów i nukleotydów wykazuje wybitnie na działanie jadu potencjalnego (przemijającego, z chwilą wyrównania stężeń). Ostatnio *Thannhauser* (207) podaje, że czynne są również pochodne dezoksyrybozy dezoksygwanozyna i dezoksyinozyna.

Chemizm działania, jak dotychczas, jest nieznany, dezaminacja jednak nie stanowi istoty działania (*Parناسи Osterн*) (174) chociaż zachodzi przy następczym rozkładzie substancji dodanej do serca.

Skomplikowany obraz budowy pironukleotydu sercowego, wskazuje na adaptację dla specjalnych celów w mięśniu sercowym (może nastawienie na udział w zużytkowaniu wprost glukozy zamiast glikogenu) (*Strain*) (20).

Przez rozszerzenie naczyń wieńcowych otrzymuje się spadek ciśnienia w aorcie. To obniżenie ciśnienia obserwowali już dawniej inni autorzy jako wynik stosowania wyciągów z wielu organów; obecnie działanie to dało się przeważnie sprowadzić do działania pochodnych adeninowych (*Zipf*) (223—6), a współczesna chemoterapia stosuje te związki w szerokiej mierze w wielu wypadkach np. przy dusznicy bolesnej.

W handlu istnieje już cały szereg preparatów, bądź zawierających roztwory czystych substancji, bądź wyciągi z różnych tkanek z mięśni prądkowanych, lub mięśnia sercowego. *Lakarnol* np. jest roztworem adenozyiny (*Joss*) (96, 96a), (*Parناسи Osterн*) (174b), *Myoston* — kwasu adenilowego mięśniowego. *Angioksyl*, *Eutonon*, *Padutina* nie zawierają, ani nukleozydu, ani nukleotydu adeninowego; działanie rozszerzające tych preparatów należy więc przypisać innym substancjom wyciągowym, choć nie jest wykluczona obecność w nich innych pochodnych nukleinowych.

Rozszerzenie naczyń obwodowych przy zapaleniach miejscowych, przy wyczerpanej pracy mięśniowej, blok serca po silnych oparzeniach i t. p. objawy odnoszą niektórzy autorowie np. Z i p f (226) również do nadmiernej ilości kwasu adenilowego, bądź adenozyiny, pojawiających się w narządach krążenia, wskutek rozpadu pironukleotydów mięśni.

Nie będziemy tutaj omawiali wszystkich objawów działania pochodnych adeniny (i oksyadeniny) na narządy krążenia, a są one nader różnorodne; odsyłamy czytelnika do prac cryginalnych np. do prac F e l i x a (65) ogłoszonych w języku polskim, (badania nad działaniem lakarnolu, miostriatolu, (D a d l e z i K o s k o w s k i) (40), kwasu adenozyinofosforowego (mięśniowego?), adenozyiny, nadmienimy tylko że niektóre preparaty polskie wyciągów mięśniowych najzupełniej odpowiadają najlepszym preparatom zagranicznym a nawet je przewyższają. Nadmienić należy, że zarówno nukleozy jak i nukleotydy nie są ciałami b. trwałymi i w roztworach wodnych ulegają powolnej hidrolizie, odczepiając wreszcie adeninę lub też dezaminując się na pochodne hipoksantyny.

Skonstatowano również korzystny wpływ zastrzyków nukleotydów w wypadkach agranulocytarnej reakcji organizmu (T h a n n h a u s e r) (207).

## R É S U M E

Ce travail a pour but de donner une idée exacte de l'état actuel de la chimie et de la physiologie des acides nucléiques et de leurs dérivés (à l'exception du métabolisme purique).

Nous avons insisté tout spécialement sur les résultats des travaux entrepris pendant la dernière dizaine d'années ainsi que sur ceux qui ne figurent dans aucune des monographies de J o n e s, F e u l g e n, L e v e n e e t B a s s, ou qui y sont mentionnés plus superficiellement que ne le mérite leur importance pour la physiologie et la médecine.

Nous avons pris en considération la littérature complète du sujet, telle qu'elle a paru jusqu'à la fin de l'année 1934) quelques cas exceptionnels appartiennent à l'année 1935).

---

REDAKTOR Dr. S. OTOLSKI

Wydawca: Przemysłowo-Handlowe Zakłady Chemiczne Ludwik Spiess i Syn, Sp. Akc. — Warszawa

---