

BIOLOGJA LEKARSKA

Wydawana pod kierunkiem Dr. S. OTOLSKIEGO

Rok XIV. — Nr. 4

Kwiecień 1935

O WSPÓŁCZESNYM STANIE CHEMJI I FIZJOLOGJI KWASÓW NUKLEINOWYCH.

DOC. DR. ANTONI DMOCHOWSKI

CZEŚĆ PIERWSZA:

CHEMJA KWASÓW NUKLEINOWYCH.

Biochemja jest dzisiaj obok fizyki jedną z najpiękniej i najszybciej rozwijających się gałęzi nauk przyrodniczych. Stojąc na pograniczu nauk biologicznych i t. zw. nauk ścisłych, upatruje ona swe zadanie w wyczerpującem wyjaśnieniu procesów chemicznych i fizyko - chemicznych zachodzących w ustrojach żywych. Materiałem do badań biochemicznych są realne zagadnienia biologiczne, metody pracy — to ścisłe metody fizyki i chemji. Genezą jakiegokolwiek grupy zagadnień biochemicznych jest zawsze pewien fakt biologiczny, natury czy to morfologicznej, czy to fizjologicznej. Dane zagadnienie przechodzi do rąk chemika; dąży on przedewszystkiem do otrzymania w stanie czystym określonych związków chemicznych i dokładnego poznania ich budowy i własności chemicznych; dalszym etapem jest zbadanie zachowania się tych ciał w określonych warunkach, możliwie zbliżonych do warunków panujących w ustroju żywym; ostatecznym celem jest zrozumienie roli, jaką odgrywają one w strukturze substancji żywej, lub danym procesie fizjologicznym.

Wspaniałały rozwój biochemji w ostatnich dziesiątkach lat, współczesne zdobycze enzymologii, endokrynologii, dietetyki, fizjologii mięśni, przemiany węglowodanowej i t. d. to przede-

wszystkiem rezultaty pionierskiej pracy biochemików XIX wieku — Hoppe — Seylera, Mieschera, Voita, Rubnera, Nenckiego, E. Fischera i wielu, wielu innych.

Wszyscy ci chemicy - biologowie, to wyznawcy tego kierunku biologji, który uważa, że jedynie tylko jak najdokładniejsze poznanie składu chemicznego i procesów chemicznych zachodzących w komórkach ustrojów żywych może doprowadzić do częściowego, choćby, zrozumienia istoty procesów życiowych.

Jak już nadmieniliśmy, współczesny stan rozwoju którejkolwiek z gałęzi biochemji, to owoc nieprzerwanych, niejednokrotnie stuletnich wysiłków biochemików i fizjologów nad oświetleniem pewnego określonego zagadnienia biologicznego.

Jednym z najjaskrawszych przykładów takiej zbiorowej pracy paru pokoleń badaczy jest dzisiejszy stan wiedzy o budowie chemicznej i roli fizjologicznej pewnej grupy ciał, objętych nazwą kwasów nukleinowych.

Kilka wzorów chemicznych na jednej stronie druku streszcza dzisiaj cały zasób naszych wiadomości o strukturze kwasów nukleinowych, ale te wzory to rezultat badań rozpoczętych odkryciem kwasu moczowego przez Scheelego w 1776 r. a kontynuowanych przez Fourcroy, Prouta, Wöhlera, Liebiga, Bayera, E. Fischera, Horbaczewskiego, dalej Mieschera i Kossela, z nowszych zaś przez Levene'a, Feulgena, Jonesa, Steudela, Thannhausera, Embdena, Eulera, Lohmana, Parnasa — że wymienię tutaj tylko najwybitniejszych badaczy w tej dziedzinie.

A każdy nowy fakt, jak pisze jeden z czołowych badaczy kwasów nukleinowych, był niejednokrotnie okupiony grubemi błędami, które skolei stawały się zarodkiem nowych dróg i nieoczekiwanych zdobyczy.

Chemja kwasów nukleinowych liczy więc sobie już przeszło 150 lat, biochemiczna forma całego zagadnienia występuje jednak dopiero w 100 lat po odkryciu Scheelego, a mianowicie w 1871 r.

W tym to roku ukazały się w pracowni Hoppe - Seylera dwie prace młodego uczonego Mieschera. „O składzie che-

nicznym ciałek ropnych" i „O substancji jądrowej żółtka jaja kurzego”.

Genezą tych biochemicznych prac były badania morfologiczne. Pod wpływem znanego anatoma Hisa, Miescher starał się zastąpić niedokładne metody histologiczne metodami chemicznymi, a niezwykła ostrożność i wybitny zmysł krytyczny pozwoliły mu osiągnąć, jak na owe czasy, godne podziwu wyniki.

Na czym polegała doniosłość wyników badań Mieschera?

Postawiwszy sobie za zadanie wykrycie i zbadanie charakterystycznej substancji jąder komórkowych, Miescher trawił ropę z opatrunków chirurgicznych sokiem żołądkowym, a otrzymaną pozostałość nazwał nukleina.

Nukleina ta miała dziwne własności — nie była ona zwykłym białkiem, rozpuszczała się w roztworach zasad i strącała się kwasami — posiadała więc własności kwasowe, a co najważniejsza, zawierała fosfor.

Kontrolując wyniki Mieschera, Hoppe - Seyler otrzymał identyczną nukleinę z drożdży, z krwinek ptasich i z kazeiny.

Kontynuując badania na nowym materiale, izolował Miescher w 1874 r. z główek plemników łososi, stanowiących przekształcone jądra komórkowe, zupełnie ściśle określony związek chemiczny — sól zasady o charakterze białkowym (t. zw. protaminy) z kwasem nukleinowym (zwanym jeszcze wówczas nukleina).

Pierwsza analiza elementarna kwasu nukleinowego była zaskakująco zgodną z dzisiejszymi poglądami na budowę tego związku.

Skład nukleiny w/g Mieschera	Skład kwasu nukleinowego dezoksyrybozowego według wzoru $C_{39}H_{51}O_{25}N_{15}P_4$
C — 36,11%	C — 37,55
H — 5,15	H — 3,99
N — 13,09	N — 16,76
P — 9,59	P — 9,89

Analiza kwasu nukleinowego, stwierdzenie obecności w nim

zasad purynowych (początkowo gwaniny i hipoksantyny), wprowadzenie nazwy kwasu nukleinowego przez A l t m a n a w 1889 roku i opracowanie metody otrzymywania z drożdży zamyka ten *pierwszy* okres badań.

Kwas nukleinowy zostaje wyodrębniony w jednostkę „*sui generis*”, a śmiała próba rozstrzygania zagadnień biologicznych zapomocą metod chemicznych zostaje uwieńczona rzetelnym sukcesem.

Drugim etapem rozwoju zagadnienia kwasów nukleinowych są badania szkoły K o s s e l a.

Hidroliza kwasu nukleinowego drożdżowego prowadzi w 1896 r. do wykrycia nowych składników — aminopuryn — gwaniny ($C_5 H_5 N_5 O$) i adeniny ($C_5 H_5 N_5$) oraz węglowodanu, zaliczonego dzięki dodatniej reakcji furfurolowej do pentozy; pentoza ta znacznie później zostaje rozpoznana przez L e v e n e'a i J a c o b s a jako d-ryboza ($C_5 H_{10} O_5$).

Skolei izolowano zasady pirymidynowe - uracyl ($C_4 H_4 N_2 O_2$) i cytozynę ($C_4 H_5 N_3 O$), a wykryte pierwotnie oksypuryny - hipoksantyna ($C_5 H_4 N_4 O$) i ksantyna ($C_5 H_4 N_4 O_2$) okazały się wtórnymi produktami hidrolitycznej dezaminacji aminopuryn. Obecność zasad purynowych i pirymidynowych charakteryzuje przytem prawdziwe nukleiny odróżniając je od t. zw. pseudonuklein (z kazeiny, z żółtka jaja kurzego). Natura tych ostatnich wyjaśnia się dopiero w ostatnich latach, gdy L e v e n e i S c h o r m ü l l e r (124—7) L i p m a n n i L e v e n e (139) oraz L i p m a n n (138) otrzymują syntetycznie estrы fosforowe oksyaminokwasów i izolują odpowiednie peptydy fosforylowane z kazeiny i witelliny S c h m i d t (192), L e v e n e i H i l l (114).

Kwas nukleinowy z tkanek zwierzęcych — t. zw. kwas grasicowy (tymononukleinowy) dał nieco inne produkty hidrolizy, zamiast uracylu — metylouracyl ($C_5 H_6 N_2 O_2$) — tyminę, zamiast pentozy zaś kwas lewulinowy ($CH_3-CO-CH_2-CH_2-COOH$) — znany produkt rozpadu heksoz; rezultatem tego był błędny pogląd o zawartości w cząsteczce kwasu nukleinowego, t. zw. zwierzęcego, jakiejś heksozy.

Drugi okres chemji kwasów nukleinowych kończy się więc podziałem ich na dwie grupy - kwasy nukleinowe roślinne

i zwierzęce; w ogólnym rezultacie prac szkoły Kossela występuje już pewien zarys budowy tych złożonych związków; dalsze prace podkreślają rodzimy charakter wszystkich znalezionych prostych składników, jak również równocząsteczkowy ich stosunek.

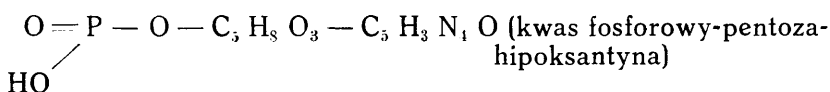
Trzeci okres, trwający po dziś dzień — to okres stopniowego wyświetlania wszystkich szczegółów budowy obu kwasów, przechodzący w ostatnich latach w nową fazę — zastosowania wiadomości o strukturze oddzielnych ułamków tych wielkich cząsteczek do wytłumaczenia roli fizjologicznej, jaką odgrywają one w organizmach żywych.

O ile pierwsze dwa okresy były związane z nazwiskami Mieschera i Kossela o tyle ten trzeci łączy się przede wszystkim z nazwiskiem amerykańskiego chemika — Levene'a.

Levene kontynuował badania Haisera i innych nad t. zw. kwasem inozynowym, wykrytym w mięśniach jeszcze w 1847 r. przez Liebiga.

Haiser w 1895 r. stwierdził w kwasie inozynowym hipoksantynę i kwas fosforowy, a Bauer w 1907 r. zaproponował następujący wzór budowy:

HO



Dopiero jednak Levene i Jacobs wykazali w 1909 r., że kwas inozynowy jest najprostszym związkiem typu kwasu nukleinowego — t. zw. *mononukleotydem*, a właściwe kwasy nukleinowe (polinukleotydy) są zasadniczo kompleksem 4-ch cegiełek tego rodzaju — 2-ch jednonukleotydów purynowych i 2-ch pirymidynowych.

W 1908—11 r. Levene i Jacobs otrzymali w stanie krystalicznym pentozę kwasu inozynowego i zidentyfikowali ją z d-rybozą.

Stosując naprzemian hydrolizę 1) alkaliczną i 2) kwaśną, otrzymano dwojaki rozpad kwasu inozynowego: 1) wiązanie glukozy-

dowe pomiędzy węglowodanem, a puryną pozostało nietknięte, odcepiła się jedynie reszta fosforanowa, 2) estrowe wiązanie węglowodanu z kwasem fosforowym okazało się trwalszym — odcepiła się przeważnie hipoksantyna.

W ten sposób otrzymano bądź związek o typie glukozydu, t. zw. inozynę ($C_{10} H_{12} N_4 O_5$), bądź ester fosforowy d-rybozy — kwas d-rybozofosforowy ($C_5 H_{11} O_8 P$).

inozyna (hidroliza alkaliczna)

Kwas fosforowy — d-ryboza — hipoksantyna

kwas d-rybozofosforowy (hidroliza kwaśna).

Związki o typie inozyny zostały otrzymane również przez *Levene'a*; przez odpowiednią hidrolizę kwasu nukleinowego drożdżowego otrzymano w stanie krystalicznym gwanozynę ($C_{10} H_{13} N_5 O_5$) i adenozyne ($C_{10} H_{13} N_5 O_4$) — związki gwaniny i adeniny z d-rybozą, dalej urydynę ($C_9 H_{12} N_2 O_6$) i cytydynę ($C_9 H_{13} N_3 O_5$) — związki uracylu i cytozyny z rybozą. Nazwano je *nukleozydami*, podkreślając ich charakter glukozydowy i wartość zasad nukleinowych; estry fosforowe nukleozydów otrzymały nazwę *nukleotydów*.

Dla dokładnego poznania struktury kwasów nukleinowych, izolowanie nukleozydów rybozowych było nadzwyczaj ważne; rozstrzygało od razu sporne poglądy na kolejność wiązań pomiędzy zasadami nukleinowymi, rybozą i kwasem fosforowym i umożliwiło otrzymanie przez łagodniejszą hidrolizę rybozy w stanie wolnym.

Dalszym etapem było izolowanie w 1918—20 r. wszystkich 4-ch mononukleotydów rybozowych (*Jones i Kennedy, Levene, Thannhauser*). Otrzymano w stanie krystalicznym kwas adenilowy ($C_{10} H_{14} O_7 N_5 P$), gwanilowy ($C_{10} H_{14} O_8 N_5 P$) cytozylowy ($C_9 H_{14} O_8 N_3 P$) i uracylowy ($C_9 H_{13} O_9 N_2 P$), natomiast rzekome dwu i trójnukleotydy otrzymane przez *Jonesa* oraz *Thannhausera* okazały się tylko mieszaniną mononukleotydów (*Levene* 108, 108a).

Teoria *Levene'a* tetranukleotydowej budowy kwasu nukleinowego rybozowego została więc najzupełniej potwierdzona przez izolowanie wszystkich możliwych ułamków w ilościach róż-

wnoważnych. Znacznie wolniej posuwało się badanie struktury kwasu nukleinowego, typu t. zw. grasicowego, otrzymywanego ze wszystkich tkanek zwierzęcych.

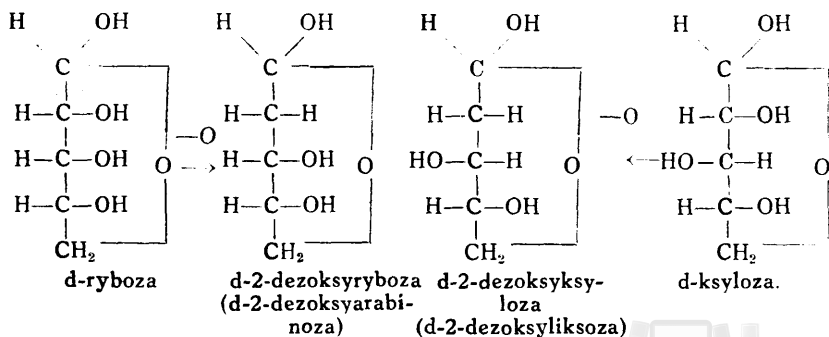
Szczególne trudności nastroczało izolowanie i zbadanie węglowodanu. Węglowodan ten był tak nietrwałym, że rozkładał się przy najłagodniejszej hydrolizie, dając kwas lewulinowy; Feulgen (67) stwierdzał, że daje on typowe reakcje aldehydowe, jak Schiffa z fuksyną, oraz pyrolową (zielone zabarwienie z drzazgą jodłową).

Cała sprawa została wyjaśniona dopiero w 1929 r. gdy Levene i London (117, 117a) zastosowali do rozkładu kwasu grasicowego, nową, oryginalną, a coraz częściej stosowaną obecnie metodę rozkładu enzymatycznego.

Działając sokiem jelitowym, zawierającym enzymy rozkładające polinukleotydy na mononukleotydy i dalej, odszczepiające kwas fosforowy (fosfatazy), otrzymali oni po raz pierwszy typowe nukleozydy z kwasu grasicowego, z nich zaś przez bardzo łagodną hydrolizę 0,01 n HCL ów nietrwały węglowodan nazwany *tyminozą* o składzie dezoksy-pentozy ($C_5 H_{10} O_4$); tyminoza dawała wszystkie reakcje 2-dezoksyheksoz (odkrytych jeszcze przez Kilianiego w 1895 r.).

Levene i Mori (119, 120) oraz Levene, Mikeska i Mori (118) otrzymali syntetycznie obie możliwe 2-dezoksy-pentozy — jedną z d-rybozy, względnie z d-arabinozy, drugą z d-ksylozy, względnie d-liksozy i zidentyfikowali tyminozę z *d-2-dezoksyrybozą* (d-2-dezoksyarabinozą).

Poniższy schemat ilustruje te przemiany polegające na redukcji grupy OH węgla (2).



Tyminoza (2-dezoryboza) dawała przytem wszystkie reakcje węglowodanu kwasu grasicowego, wytwarzając przy hidrolizie kwas lewulinowy.

Co się tyczy nukleotydów z kwasu dezoksyrybozowego, to już w 1909—12 r. *Levene* (108b) (109) otrzymał sole barowe nukleotydów pirymidynowych i to nie tylko jednofosforowe, ale także i dwufosforowe, co, jak zobaczymy następnie, dało pewne wskazówki co do struktury kwasu grasicowego.

Otrzymanie krystalicznych nukleotydów purynowych i pirymidynowych udało się jednak dopiero w 1933—4 r. *Thannhauserowi* i *Kleinowi* (209, 210, 210a, 211).

Zastosowali oni b. pomysłową metodę dla zatrzymania enzymatycznego rozkładu kwasu grasicowego na stadjum mononukleotydów, a to przez zahamowanie działania mononukleotydu (fosfatazy), obecnej w wyciągu ze śluzówki jelita, zapomocą dodatku arsenianów; ponieważ działanie enzymu depolimeryzującego tetranukleotyd (polinukleotydu) nie uległo osłabieniu, otrzymano w rezultacie mieszaninę mononukleotydów dezoksyrybozowych, a w końcu izolowano wszystkie cztery w stanie krystalicznym.

W ten sposób teoria *Levene'a* tetranukleotydowej budowy obu kwasów nukleinowych — rybozowego i dezoksyrybozowego została ostatecznie potwierdzona.

Teoria ta nie wyczerpuje jednak całości zagadnienia struktury chemicznej tych kwasów. Dla zupełnego wyświeślenia wszystkich szczegółów budowy związków o tak wielkiej cząsteczce (ciężar cząsteczkowy tetranukleotydu rybozowego o wzorze $C_{38}H_{49}N_{15}O_{29}P_4$ wynosi 1303,5, dezoksyrybozowego $C_{39}H_{51}N_{15}O_{25}P_4$ — 1253,5) i osiągnięcia ostatecznego celu — syntezy, niezbędne jest wyjaśnienie jeszcze wielu zasadniczych kwestji, z których niektóre znalazły już swe rozwiązanie, inne są dopiero przedmiotem wyteżonych badań i gorących sporów.

W szczególności chodziłoby o wyjaśnienie następujących zagadnień:

1. charakteru pierścienia tlenowego pentoz (izomerja pierścienia oksycyklicznego)

2. rodzaju odmian mutamerycznych tychże;
3. „ wiązania pentoza — puryna
4. „ „ „ — pirymidyna;
5. „ „ „ — kwas fosforowy
6. „ wiązań mononukleotydów pomiędzy sobą;
7. stopnia polimeryzacji tetranukleotydów;
8. form występowania w ustrojach żywych.

Wszystkie te zagadnienia rozpatrzemy dokładnie przy szczegółowym przeglądzie kwasów nukleinowych i wszystkich ich składników prostych i złożonych, a więc węglowodanów, zasad purynowych i pirymidynowych, kwasu fosforowego i jego estrów, nukleozydów oraz nukleotydów; do przeglądu tego przechodzimy obecnie.

*

**

*

Nie jest naszym zadaniem szczegółowe rozpatrywanie własności chemicznych prostych składników kwasów nukleinowych. Ogólne wiadomości o tych związkach można znaleźć w każdym podręczniku chemii organicznej, a dokładne przedstawienie znajdzie czytelnik w monografiach o kwasach nukleinowych: 1) Feulgena (67) (w języku niemieckim), 2) Jonesa (94) i 3) Levene'a i Bassa (109) (w języku angielskim); w języku polskim doskonałym wstępem do studiów nad kwasami nukleinowymi będzie rozdział o kwasach nukleinowych w podręczniku prof. J. Parnasa. (169).

Niniejszy przegląd chemii i fizjologii kwasów nukleinowych ma raczej za zadanie zaznajomienie czytelnika ze współczesnym stanem (do końca roku 1934) całego zagadnienia, przez uwzględnienie zdobyczy ostatniego dziesięciolecia, bądź jeszcze zupełnie nie podanych w dotychczasowych monografiach, bądź podanych zbyt powierzchownie, niżby wynikało ze względu na ich znaczenie nie tylko dla chemii, ale dla fizjologii i medycyny.

Dzisiejszy stan naszych wiadomości wynika jednak ściśle z historycznego rozwoju tej gałęzi biochemii, zarówno jak i z całokształtu faktów ustalonych przez poprzednie badania; niezbędnym więc było dla należytego zrozumienia dzisiejszego stanu wiedzy podanie zarówno krótkiego szkicu historycznego, jak

i treściwego przeglądu znanych już faktów z dziedziny chemii kwasów nukleinowych.

Ograniczając się więc tylko do przypomnienia wzorów strukturalnych podstawowych składników tych skomplikowanych związków, omówimy nieco dokładniej bardziej złożone ułamki cząsteczek kwasów nukleinowych t. j. nukleozydy i nukleotydy, te bowiem związki okazały się w ostatnich czasach zupełnie niespodziewanie rodzimymi składnikami ustrojów żywych, wysuwając się na pierwszy plan przy badaniu podstawowych procesów biochemicznych w substancji żyjącej.

PODZIAŁ KWASÓW NUKLEINOWYCH I ICH POCHODNYCH.

A. Związki jednoskładnikowe:

I. Węglowodany:

- 1) d-ryboza, 2) d-2-dezoksyryboza (rybodezoza), 3) tiometylopentoza, 4) d-glukoza.

II. Pochodne pirymidyny:

- 1) cytozyna, 2) uracyl, 3) tymina, 4) 5-metylocytozyna, 5) diwicyna.

III. Pochodne puryny:

- 1) adenina, 2) gwanina, 3) oksyadenina (izogwanina), 4) hipoksantyna, 5) ksantyna, 6) kwas moczowy, 7) nieokreślone bliżej oksypuryny.

IV. Kwas fosforowy:

- 1) ortofosforowy, 2) pirofosforowy.

B. Związki dwuskładnikowe:

I. Nukleozydy: a) rybozydy:

- a₁) pirymidynowe: 1) cytydyna, 2) urydyna
- a₂) purynowe: 1) adenozyzna, 2) gwanozyna, 3) oksyade-

nozyna, 4) hipoksantozyna (inozyna), 5) ksantozyna, 6) rybozyd kwasu moczowego.

b) dezoksyrybozydy:

b₁) pirymidynowe: 1) dezoksycytydyna, 2) tymozyna.

b₂) purynowe: 1) dezoksygwanozyna, 2) dezoksyinozyna, 3) dezoksyadenozyna.

c) tiometylopentozyd adeniny

d) wicina (glukozyd diwicyny) i konwicina

e) syntetyczne nukleozydy (np. rybozyd teofyliny)

f) witamina B₂? (laktoflawina).

II. Estry fosforowe pentoz: a) rybozy:

1) 3-fosforyboza, 2) 5-fosforyboza

b) dezoksyrybozy: 1) 3-fosfodezoksyryboza (fosforybo-dezoza)

C. Związki trójskładnikowe.

I. Nukleotydy rybozowe:

a) Purynowe: 1) kwas adenilowy drożdżowy (nukleotyd adeninowy, 3-fosfoadenozyna) 2) kw. adenilowy mięśniowy (5-fosfoadenozyna) 3) kozymaza (komutaza), 4) kw. hipoksantylowy (3-fosfoinozyna), 5) kw. inozynowy (5-fosfoinozyna), 6) kw. gwanilowy, 7) kw. ksantylowy

b) pirymidynowe: 1) kw. cytozylowy, 2) uracylowy (3-fosfourydyna), 3) 5-fosfourydyna.

II. Nukleotydy dezoksyrybozowe:

a) purynowe: 1) kw. dezoksygwanilowy, 2) kw. dezoksyadenilowy

b) pirymidynowe:

b) jednofosforowe: 1) kw. dezoksycytydynofosforowy
2) dezoksytymidynofosforowy

b) dwufosforowe: 1) kw. dezoksycytydynodwufosforowy
2) kw. dezoksytymidyndwufosforowy.

III. Pironukleotydy:

- 1) kw. adenilopirofosforowy (adenozynotrójfosforowy, pironukleotyd z mięśni, 2) pironukleotyd z serca (kw. dwuadenozynopentafosforowy).

D. Polinukleotydy:

i. Tetraribonukleotydy:

- 1) kwasy nukleinowe z roślin np. drożdżowy, lub z tkanek zwierzęcych np. z trzustki.

II. Tetradezoksyrbonukleotydy:

- 1) kwas grasicowy, z plemników i t. d. (a-kwas) spolimerizowany,
- 2) kwas grasicowy (b-kwas) zdepolimerizowany,
- 3) kwas tyminowy (bezpurynowy)

III. Polinukleotydy wyższego rzędu (penta, hekza i t. d. nukleotydy)

IV. Polinukleotydy o odmiennych składnikach (np. z prątków gruźliczych).

A. Jednoskładnikowe ułamki kwasów nukleinowych.

I. Węglowodany.

Zasadniczym rodzajem węglowodanów, wchodzących w skład kwasów nukleinowych, a ściślej mówiąc, tworzących z pochodniami puryny lub pirymidyny naturalne związki o charakterze glikozydów, jest pentoza; w ogromnej większości wypadków pentozą tą jest d-ryboza, lub d-2-dezoksyrboza, w jednym wypadku tiometylopentoza (z odpowiedniego nukleozydu adeninowego z drożdży), d-glukoza w wicynie.

1) D-ryboza $C_5H_{10}O_5$.

Obecność d-rybozy w kwasie inozynowym i kwasie nukleinowym drożdżowym została, jak wiadomo, stwierdzona przez L e-

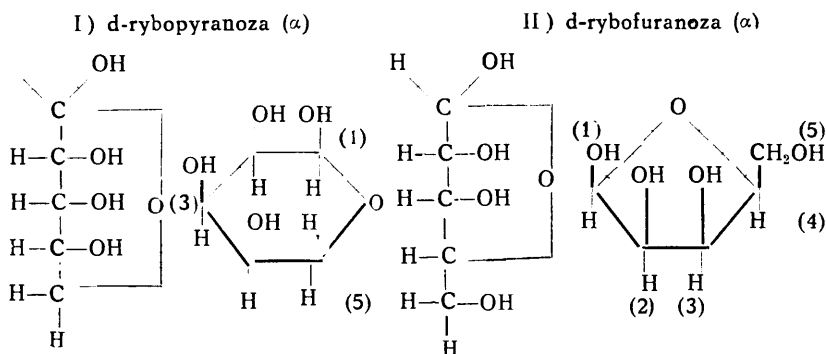
ven'e'a w 1909 r. W naturze spotykamy tylko jedną formę enantjomorficzną t. j. d-rybozę (lewoskrętną) i, jak dotychczas, tylko w formie związanej w nukleozydach lub nukleotydach.

Przypuszczenie powstawania d-rybozy z innych pentoz w czasie procesu izolowania przez t. zw. „odwrócenie Waldenowskie“ (Robinson) (183, 183a) zostało przez Leven'e'a (122—3) obalone.

Nie udało się jeszcze ustalić formy mutamerycznej naturalnej d-rybozy (α czy β), wydaje się jednak, że mamy do czynienia z jedną i tą samą formą, prawdopodobnie β , niezależnie od pochodzenia (Bredereck) (31).

W ostatnich latach wyjaśniony został b. ważny szczegół budowy d-rybozy jako składnika naturalnych nukleozydów.

Według znanych poglądów Hawth'a (84, 220) należało się liczyć z dwiema możliwymi formami występowania d-rybozy — trwałej rybopyranozy o sześcioczłonowym pierścieniu tlenowym i nietrwałej rybofuranozy (pierścień pięcioczłonowy); ośóż furanozową budowę rybozy wchodzącej w skład nukleozydów purynowych (adenozyny i gwanozyny) stwierdzili Leven'e i Tipson (132—3), a pirymidynowych (urydyny i cytydyny) Bredereck (30, 30a, 32), wobec czego wszystkie naturalne rybozydy posiadają w swym składzie pierścień furanowy i otrzymały nazwę furanorybozydów.



2) D-2-dezoksypentoz. $C_5H_{10}O_4$

D-2-dezoksypentoz (tyminoza), otrzymana w stanie krystalicznym przez Leven'e'a i Londona (117a) w 1929 r.

wchodzi w skład wszystkich kwasów nukleinowych typu kwasu grasicowego.

Charakter pierścienia tlenowego (pyranoza, furanoza) i odmiany (α , β) jeszcze nie ustalony, natomiast stwierdzona identyczność z syntetyczną d-2-dezoksyrybozą.

Tyminoza, jak wszystkie dezoksycukry, jest b. nietrwała, daje wszystkie reakcje aldehydowe, a na reakcji z fuksyną polega słynna próba *Feulgen*a.

Nie wyjaśniona jest dotychczas sprawa izolowania obok tyminozy jeszcze innego cukru dającego reakcję orcynową (*Biel-schowsky*) (24), prawdopodobnie mamy do czynienia z produktem pracownianym, powstałym z tyminozy.

3) *Metylotiopentoza* ($C_6H_{12}O_4S$).

Węglowodan zawierający siarkę otrzymano przez hidrolizę odpowiedniego nukleozydu izolowanego z drożdży. *Levene* i *Sobotta* (128—9) stwierdzili budowę ketonową.

4) *D-glukoza* $C_6H_{12}O_6$

D-glukoza dotychczas została wykryta w glukozydzie pirymidynowym-wicynie.

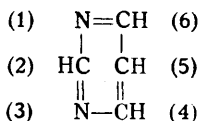
II. *Pochodne pirymidyny.*

5 pochodnych pirymidyny znaleziono dotychczas w naturze jako składniki kwasów nukleinowych i ich pochodnych, są to:

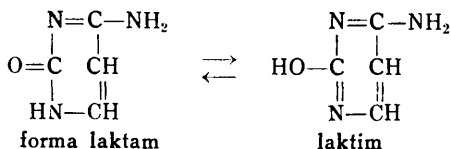
- 1) cytozyna ($C_4H_5N_3O$) — 2-oksy-6-aminopirymidyna,
- 2) uracyl ($C_4H_4N_2O_2$) — 2,6-dwuoksypirymidyna,
- 3) tymina ($C_5H_6N_2O_2$) — 2,6-dwuoksy-5-metylopirymidyna,
- 4) metylocytozyna ($C_5H_7N_3O$) — 2-oksy-5-metylo-6-aminopirymidyna.
- 5) diwicyna ($C_4H_5N_4O_2$) — 2,5-dwuamino-4,6-dwu-oksy-pirymidyna.

Wszystkie powyższe związki mogą występować w dwóch formach: laktam (keło) i laktim (enol).

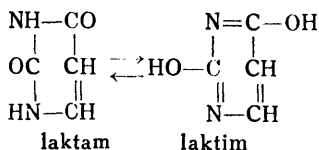
Pirymidyna



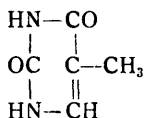
1) Cytosyna



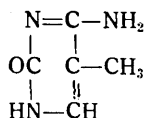
2) Uracyl



3) Tymina (metylo-uracyl)



4) Metylocytosyna



Z tych pięciu pochodnych pirymidynowych cytosyna i uracyl występują jako składniki kwasu nukleinowego rybozowego, cytosyna i tymina — kw. dezoksyrybozowego, metylocytosyna została wykryta przez Johnsona i Coghill (93) w kwasie nukleinowym z prątków gruzliczych, wreszcie diwicyna jest składnikiem glukozydu — wicyny. Nader prawdopodobnem jest pirymidynowa budowa witaminy B₁.

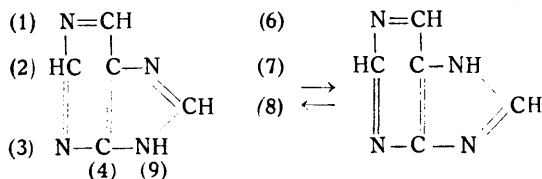
III. Pochodne puryny.

6 pochodnych purynowych zidentyfikowano dotychczas jako bezpośrednie, lub pośrednie składniki kwasów nukleinowych

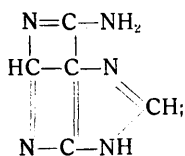
- 1) adenina (C₅ H₅ N₃) — 6-aminopuryna
- 2) gwanina (C₅ H₅ N₅ O) — 2-amino-6-oksypuryna
- 3) oksyadenina (C₅ H₅ N₅ O) — 2-oksy-6-aminopuryna (izogwanina)
- 4) hipoksantyna (C₅ H₄ N₄ O) — 6-oksypuryna
- 5) ksantyna (C₅ H₄ N₄ O₂) — 2,6-dwuoksypuryna
- 6) kwas moczowy (C₅ H₄ N₄ O₃) — 2, 6, 8-trójoksypuryna

Podobnie jak pochodne pirymidynowe, tak i purynowe występują w formach laktamowej i laktimowej, ponadto sama puryna, a więc i jej pochodne wykazują izomerję spowodowaną połączeniem jednego atomu wodoru w pierścieniu imidazolowym z atomem azotu w położeniu (7) lub (9).

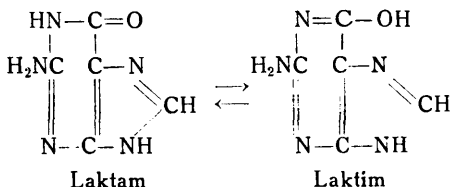
Puryna



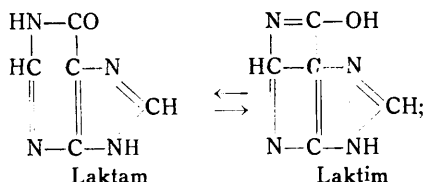
Adenina



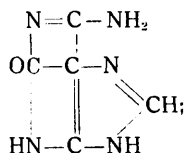
Gwanina



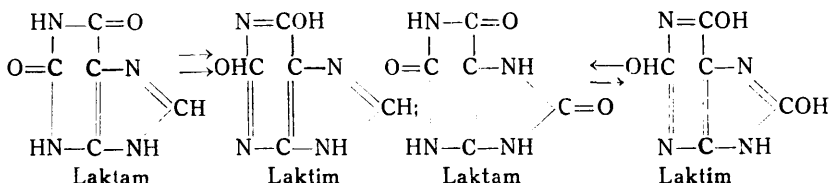
Hipoksantyna



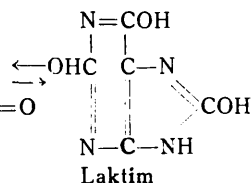
Oksyadenina



Ksantyna



Kwas moczowy



Obie aminopuryny — adenina i gwanina są składnikami obu kwasów nukleinowych — rybozowego i dezoksyrybozowego, adenina ponadto występuje w kwasie adenilowym mięśniowym i pironukleotydzie adeninowym, kozymazie i adenilotiometylopentozie.

Oksyadenina (izogwanina) została izolowana z krwi wieprzo-

wej przez P. Buell i Perkins (33) i R. Boivin (27) oraz z nukleozydu (krotonozydu) przez Cherbuliez i Bernharda (39, 39a) przyczem obie nie są identyczne, a oksyadenina Buell i Perkins jest inną oksypuryną, nie dającą się utlenić na gwanidynę. Ostatnio Schütz (194) (u Parnasa) nie mógł izolować z krwi świńskiej rzekomej oksyadeniny i twierdzi, że oksypuryny otrzymane przez Buell i Perkins oraz Cherbuliez i Bernharda w każdym razie nie są identyczne z syntetyczną oksyadeniną.

Hipoksantyna nie występuje w naturze jako składnik tetranukleotydu, a tylko jednonukleotydu — kwasu inozynowego (produktu dezaminacji kwasu adenilowego mięśniowego), natomiast może występować w przejściowych stadiach przy dezaminacji produktów rozpadu obu tetranukleotydów. Podobnie ksantyna występuje jako produkt zupełnego rozpadu i dezaminacji wyższych kompleksów i dotychczas nie została wykryta w stanie związanym, a tylko wolnym, jako jeden z ostatnich etapów rozkładu kwasów nukleinowych.

Kwas moczowy — ostatni etap rozkładu u człowieka i małych czelakokształtnych, znaleziony został jednak i w postaci rybozydu moczowego (Benedict) (41). W ostatnich czasach b. prawdopodobnem staje się obecność w naturze innych oksypuryn lub oksyaminopuryn, nieotrzymanych jeszcze syntetycznie. Ellinger i Koschara (55), Wagner — Jauregg i Kuhn zgodnie stwierdzają pochodną purynową w niektórych flawinach, Wieland (218) izoluje aminooksypurynę z barwika skrzydeł motyli.

Dmochowski (46b, 46c) już w 1929 r. stwierdził obecność nieznaney oksypuryny w mięśniach królika; izolowana w postaci pikrynjanu i siarczanu była różna od wszystkich znanych puryn, nie wyłączając oksyadeniny.

IV. Kwas fosforowy.

Kwas fosforowy występuje w mononukleotydach i polinukleotydach jako zwykły kwas ortofosforowy, zesteryfikowany z grupami wodorotlenowemi rybozy i dezoksyrybozy, ponadto w t. zw. pironukleotydach w postaci grupy pirofosforanowej. Miejsce do-

czepienia tej ostatniej nie jest jeszcze w zupełności stwierdzone.

B. Związki dwuskładnikowe.

1. Nukleozydy.

Izolowanie przez Levene'a związków rybozy z zasadami azotowymi było właściwym początkiem racjonalnego badania struktury kwasów nukleinowych. Nietylko stało się możliwym wyjaśnienie rodzaju wiązań i miejsca przyłączenia cukru do zasady nukleinowej, ale także uzyskano podstawy do stopniowej syntezy związków typu kwasów nukleinowych; próby w tym kierunku doprowadziły już do otrzymania ciał o charakterze nukleozydów i nukleotydów.

Co się tyczy izolowania nukleozydów, to, zależnie od rodzaju zasady i węglowodanu, postępowanie jest nieco odmienne.

Nukleozydy rybozowe purynowe otrzymujemy przez silną hidrolizę alkaliczną, np. w 5% amoniaku, przez 3—4 godziny w 180°; nukleozydy pirymidynowe, b. trwałe, przez silną hidrolizę kwaśną, rozkładającą nukleozydy purynowe; nukleozydy dezoksyrybozowe otrzymuje się najłatwiej na drodze rozkładu enzymatycznego.

Niektóre nukleozydy izolowano z drożdży np. adenilotiometylopentozyd, wreszcie nukleozydy syntetyczne otrzymano zwykłymi metodami chemii organicznej.

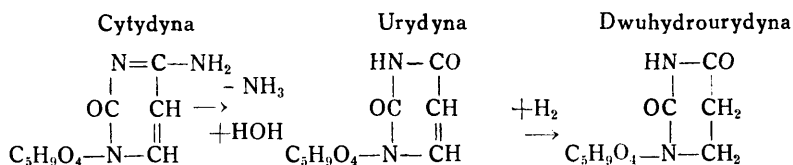
Klasyfikację nukleozydów możemy oprzeć na różnicy grup węglowodanowych, zarówno jak i zasadowych; wobec faktu występowania tylko 2-ch pentoz w ogromnej większości naturalnych związków, wygodniejszy jest pierwszy podział.

Rozpatrzmy następujące nukleozydy:

a₁) rybozydy pirymidynowe:

- 1) cytydyna (C₉ H₁₃ N₃ O₅) — cytozynorybozyd (3 - cytozynorybofuranozyd)
- 2) urydyna (C₉ H₁₂ N₂ O₆) — uracylorybozyd (3-uracylorybofuranozyd)

oba otrzymane dotychczas tylko przez hidrolizę kwasu nukleinowego rybozowego.



Cytydyna daje się z łatwością dezaminować na urydynę, ta ostatnia zaś zredukować na dwuhydrourydynę; przez uwodrobowanie, urydyna przechodzi ze związku b. trwałego w nietrwały, odczepiający łatwo rybozę i dający reakcję orcynową, a więc upodabnia się do nukleozydów purynowych. Fakt ten stoi prawdopodobnie w związku z fizjologiczną rolą pirymidyn.

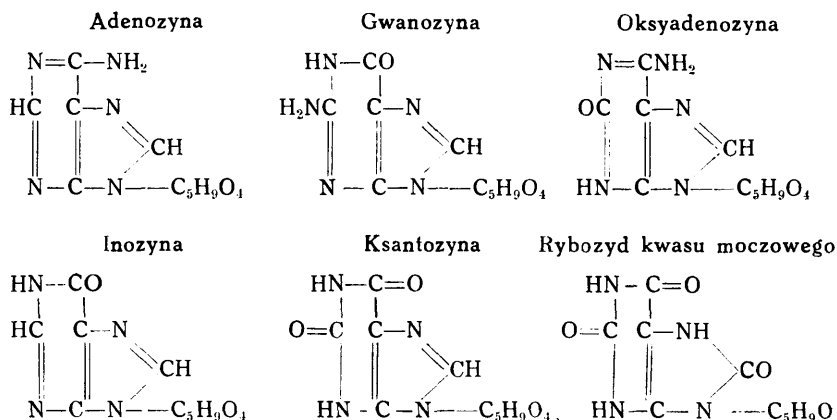
a₂) rybozydy purynowe:

- 1) adenozyina ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_1$) — adeninorybozyd (9-adeninorybofuranozyd)
- 2) gwanozyna ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$) — gwaninorybozyd (9-gwaninorybofuranozyd)
- 3) oksyadenozyina ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$) — oksyadeninorybozyd, izogwaninorybozyd
- 4) inozyina ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$) — hipoksantynorybozyd.
- 5) ksantozyna ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_6$) — ksantynorybozyd
- 6) rybozyd kwasu moczowego ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_7$)

Z pośród powyższych rybozydów, adenozyinę i gwanozynę otrzymano przez hidrolizę alk. kwasu nukleinowego rybozowego oraz przez hidrolizę enzymatyczną; adenozyinę izolowano również z moczu (Calvery) (37), gwanozynę znaleziono dawniej w roślinach (wernina);

Oksyadenozyinę (izogwanozynę) izolowali Cherbuliez i Bernhard (39, 39a) w 1933 r. jako krotanozyd. Inozynę i ksantozynę otrzymuje się przez dezaminację adenozyiny i gwanozyny; inozynę i równocząsteczkowe połączenie inozyiny z hipoksantyną (karnina) znaleziono w mięśniach i w moczu, wreszcie rybozyd kwasu moczowego izolowali Davis, Newton i Benedict (41) w 1922 r. z krwi wołu.

Furanozowa budowa nukleozydów została stwierdzona przez Levene'a i Tipsona (132—3) oraz Brederecka (30—31). Prawdopodobieństwo przyłączenia rybozy do azotu (9) puryn będzie omówione nieco później.



b₁) dezoksyrybozydy pirymidynowe:

- 1) dezoksycytydina ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$)
- 2) tymozyna ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$)

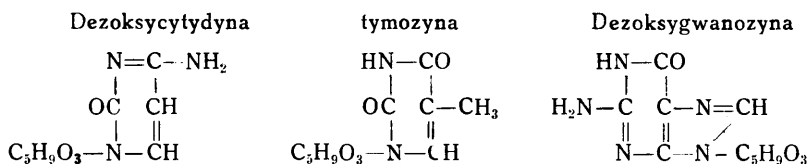
Budowa obu nukleozydów jest prawdopodobnie identyczna z budową analogicznych nukleozydów rybozowych, gdyż hydrolizują się również dość trudno. Otrzymano oba na drodze enzymatycznej, działaniem enzymów soku jelitowego na kwas nukleinowy grasicowy

b₂) dezoksyrybozydy purynowe:

- 1) dezoksygwanozyna ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$)
- 2) dezoksyhipoksantozyna ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4$)

Oba otrzymano przez rozkład enzymatyczny kwasu grasicowego; dezoksyrybozyd hipoksantyny jest bezwątpienia produktem wtórnym jednoczesnej dezaminacji nukleozydu adeninowego.

Otrzymane nukleozydy są b. nietrwałe, dają reakcję orcynową, są źródłem otrzymywania dezoksyrybozy.



c) tiometylopentozyd adeniny ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$)

Nukleozyd ten został izolowany z drożdży w 1912 r. ale dopiero w 1924 r. Suzuki, Odake i Mori (195) wykryli obecność siarki i grupy metylowej w jakiejś pentozie, którą Levene i Sobotka (129) uważają za ketopentozę.

Ciekawem jest, że nukleozyd ten stale towarzyszy kozymazie (w drożdżach lub mięśniu sercowym) (patrz część II-a); *adenilotiometylopentozyd* jest prawdopodobnie ketopentofuranosem

d) Wicyna ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7$) — glukozyd diwicyny

Jedyny glukozyd pochodnej pirymidyny znaleziono dotychczas w przyrodzie; ostatnio znaleziono drugi — konwicynę (Fischer i Johnson (73)

e) syntetyczne nukleozydy pirymidynowe i purynowe.

Z wielu otrzymanych związków typu nukleozydów wspomniemy tutaj o trzech najbardziej zbliżonych do naturalnych rybozydów:

- 1) rybozyd teofyliny (1,3-dwumetyloksantyny), który Levene i Sobotka (128) uważają za identyczny z dwumetylowaną ksantozyną i
- 2) 3-glukozydouracyl Hilberta i Johnsona (87) — wykazujący największe podobieństwo do urydyny.
- 3) teofylino-ramnozyd Levene'a i Muskata (121) pierwszy nukleozyd synt. o budowie furanozowej.

f) szereg substancji izolowanych z tkanek i soków ustrojów żywych posiada prawdopodobnie budowę nukleozydową, lub też nukleozydy są ich częścią składową, budowa ich jednak nie jest ustalona; będą one omówione obszerniej w części II-ej. Należą tutaj.

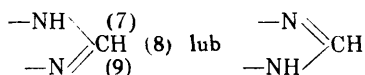
- 1) nukleozyd pirymidynowy z krwi (Hunter i Eagles) (89),
- 2) nukleozydy Doyon i Viala (49, 50)

3) witamina B₁

4) witamina B₂

Podane wzory strukturalne nukleozydów wymagają pewnego uzasadnienia. Co się tyczy miejsca przyłączenia węglowodanów do pochodnych puryny, to sprawa ta, zdaje się, jest rozwiązana.

Nie wchodząc w szczegóły nadmienimy, że z 7 możliwych połączeń — pozycje (1), (2), (3), (6) są wykluczone ze względu na budowę adeniny i obecność grup NH₂ w nukleozydach, pozycja (8) wobec nietrwałości wiązania, pozostają pozycje (7) i (9) — równoważne, wobec istnienia 2-ch form tautomerycznych pierścienia imidoazolowego w purynie



Ostatnio Gulland i Holiday (80b), badając widma absorbcyjne metylo-pochodnych ksantyny, zauważyli różnice zależnie od zastąpienia wodoru w pozycji (7) lub (9). Naturalne nukleocydy posiadają zdaje się budowę (9), syntetyczne, o ile posiadają połączenie przez azot — budowę (7). Sprawa ta nie jest jeszcze zupełnie jasna, tembardziej, że Levene i Sobotta (128) otrzymali przez metylowanie ksantozyny (z gwanozyny) rybozyd teofylinowy, identyczny jakoby z syntetycznym (jednakowa szybkość hydrolizy).

Co do budowy nukleozydów pirymidynowych, to największe podobieństwo 3-glukozydouracylu do urydyny przemawiało za pozycją (3). Levene i Tipson (134) definitywnie wykluczyli budowę (1).

Budowa dezoksyrybozydów jest zdaje się identyczna z budową rybozydów — oba dają barwniki dwuazowe, wskazujące na połączenie z azotem (7) lub (9) Levene (109).

II. Estry fosforowe pentoz.

Oprócz nukleozydów znane są obecnie i inne, dwuskładnikowe ułamki nukleotydów; są to estry fosforowe rybozy i dezoksyrybozy.

Dobrze poznane są—1) 5-fosforyboza otrzymana jeszcze w 1912 roku przez Levene'a i Jacobsa z kwasu inozynowego, otrzymana syntetycznie przez Levene'a i Stillera (130) oraz 2) 3-fosforyboza otrzymana z kwasu ksantylowego w 1932 r. (Levene i Harris) (112) oraz z kwasu hipoksantylowego (Levene i Harris) (112a).

Powstawanie odpowiedniego estru fosforowego dezoksyrybozy obserwowali już Levene i Jacobs w 1912 r., ale otrzymali go dopiero Klein i Thannhauser (210) przez łatwe odczepienie gwaniny od kwasu dezoksygwanilowego. Mamy tu do czynienia prawdopodobnie z 3-dezoksyrybozą.

Cała sprawa wymaga jednak dalszych badań.

C) Związki trójskładnikowe

I. Nukleotydy rybozowe.

Nukleotydami Levene nazwał estry fosforowe nukleozydów. Dzielimy je podobnie jak nukleozydy na rybozowe i dezoksyrybozowe, a następnie według zawartości różnych puryn i pirymidyn. Na tem nie kończy się jednak różnorodność form występowania nukleotydów; obserwujemy występowanie izomerji uwarunkowanej miejscem przyłączenia grupy kwasu fosforowego do odpowiedniego węglowodanu. Dla nukleotydów rybozowych ilość możliwych izomeronów wynosi 3, dezoksyrybozowych 2, dla pironukleotydów z dodatkową grupą pirofosforanową ilość kombinacji wzrasta oczywiście bardzo znacznie.

Otrzymane dotąd mononukleotydy rybozowe z polinukleotydów rybozowych zawierają kwas fosforowy przyłączony do węgła rybozy, oznaczanego zazwyczaj liczbą (3); dla nukleotydów dezoksyrybozowych sprawa ta nie jest jeszcze rozstrzygnięta, prawdopodobnie jednak mamy również do czynienia z 3-fosfodezoksyrybozydami.

Ogólna metoda otrzymywania mononukleotydów z polinukleotydów rybozowych polega na ostrożnej hidrolizie alkalicznej tych ostatnich (NH_3 w 115° lub NaOH w temp. pokojowej, lub podwyższonej). Nukleotydy pirymidynowe, b. trwałe, otrzymuje się również przez umiarkowaną hidrolizę kwasami; podobnie je-

dno i dwufosforowe nukleotydy pirymidynowe dezoksyrybozowe, natomiast dezoksyrybozowe purynowe otrzymano tylko na drodze enzymatycznej.

Monorybonukleotydy purynowe, izomeryczne z poprzednimi (dotychczas 5-fosforybozydy) zostały izolowane zarówno z tkanek roślinnych, jak zwierzęcych, bądź jako wolne, bądź jako pironukleotydy.

Poniżej podajemy wszystkie znane dotychczas mononukleotydy rybozowe:

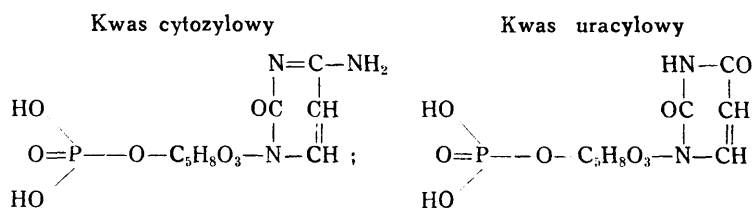
a) mononukleotydy pirymidynowe:

- 1) kwas cytozylowy (cytydino-3-fosforowy)
— $C_9H_{14}N_3O_8P$
- 2) kwas uracylowy (urydino-3-fosforowy)
— $C_9H_{13}N_2O_9P$;
- 3) kwas urydino-5-fosforowy

1) i 2) otrzymano tylko z polinukleotydu rybozowego; hydrolizują się b. trudno i dają b. słabą reakcję orcynową.

Jeszcze trudniej ulega hydrolizie kwas urydino-5-fosforowy otrzymany ostatnio syntetycznie przez *Levene'a* i *Tipsona* (135).

Kwas cytozylowy znaleziono w sercu krowiem (*Duray*) (52)

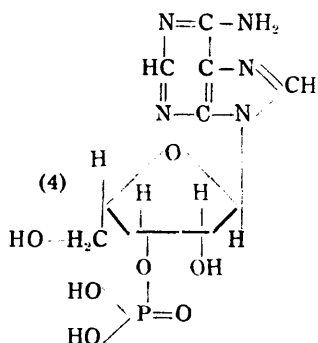


b) mononukleotydy purynowe:

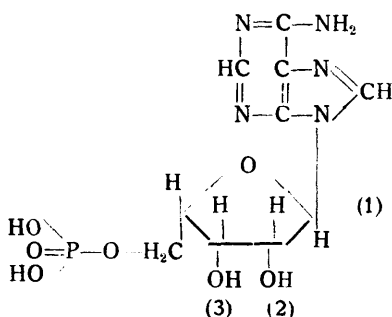
1) kwas adenilowy drożdżowy $C_{10}H_{14}O_7N_5P$, (adenozyno-3-fosforowy) nukleotyd adeninowy według terminologii *Parnasa* (171), synadenilowy według *Lindnera* (137) krystaliczny, p. t. około 200°C ; otrzymany z polinukleotydu rybozowego, potem izolowany z trzustki (95), embrjonów kurzych (*Calvery*) (36) i t. d.

Budowa jego została ostatecznie stwierdzona przez *Levene'a* i *Harrisa* (113) w 1933 r.; jest to adenino-3-fosfor-rybofuranozyd (prawdopodobnie ryboza przyłączona do puryny w pozycji (9), (80b). Nukleotyd odczepia łatwo kwas fosforowy, daje silną reakcję orcynową i dezaminuje się HNO_2 na kwas hipoksantylowy ($\text{C}_{10} \text{H}_{13} \text{O}_8 \text{N}_4 \text{P}$), różny od inozynowego.

Kwas adenozyno-3-fosforowy



Kwas adenozyno-5-fosforowy.

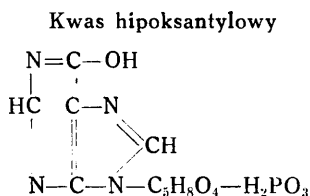


2) Kwas adenilowy mięśniowy — $\text{C}_{10} \text{H}_{14} \text{O}_7 \text{N}_5 \text{P}$ (adenozyno-5-fosforowy, adenilowy według *Parnasa*, ergadenilowy według *Lindnera*) krystaliczny, p. t., 195°C otrzymywany z tkanek zwierzęcych, ale i z drożdży (*Lindner*) (137), hydrolizuje się trudno, daje b. słabą reakcję orcynową, dezaminuje się łatwo na kwas inozynowy, szczególnie na drodze enzymatycznej.

3) Kozymaza — nukleotyd adeninowy izomeryczny z poprzedniemi, izolowany z drożdży (*Euler* i *Myrbäck*) i tkanek zwierzęcych (*Szent-Györgyi* i *Banga*) (201, 202), dotychczas nie otrzymany w stanie krystalicznym, dezaminuje się na kwas inozynowy (*Myrbäck*) (160), podobnie jak kwas adenozyno-5-fosforowy. Kozymaza jest kofermentem enzymów dysmutujących (komutaza). Dotychczas nie wyjaśniono szczegółów struktury kozymazy warunkującej działanie jej jako kofermentu. Możliwe jest, obok tautomerji wiązania (7) lub (9) dodatkowe sprzężenie kwasu fosforowego z grupą OH rybozy lub NH_2 adeniny (*Barrenschneider*) ale także i istnienie dodatkowej grupy azotowej (*Myrbäck*) (161, 162).

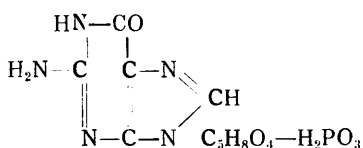
4) Kwas inozynowy — $C_{10} H_{13} O_8 N_4 P$ (inozyno-5-fosforowy) izolowany dotychczas tylko w postaci krystalicznej soli barowej, produkt dezaminacji kw. adenilowego mięśniowego.

5) Kwas hipoksantozyno-3-fosforowy — izomer kwasu inozynowego otrzymany w postaci soli przez dezaminację kwasu adenilowego drożdżowego (Levene i Harris) (113), metodą Levene'a i Dmochowskiego (111).

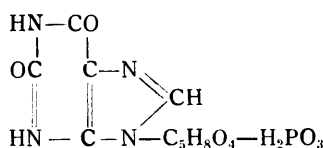


6) Kwas gwanilowy — $C_{10} H_{14} O_8 N_5 P$ (kwas gwanozyno-3-fosforowy) otrzymany w stanie krystalicznym przez Levene'a przez hidrolizę kwasu nukleinowego rybozowego, zarówno jak i z trzuskki.

W przeciwieństwie do kwasu adenilowego nie wykazuje izomerji; hidrolizuje się b. łatwo, dezaminuje się na kwas ksantylowy.



Kwas gwanilowy



Kwas ksantylowy

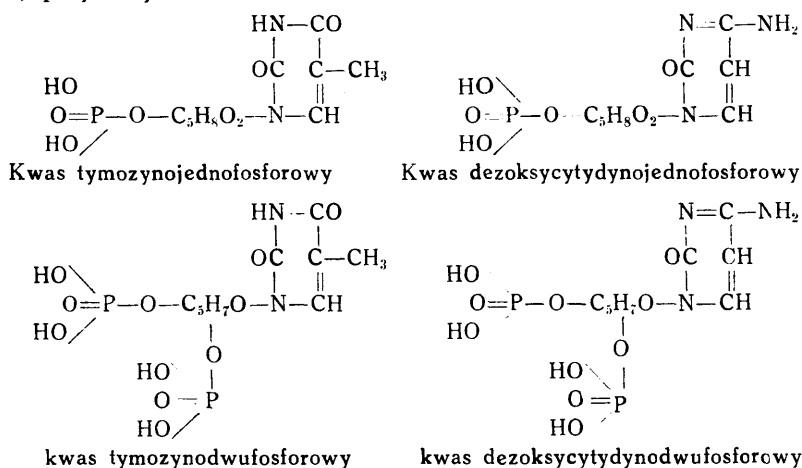
7) Kwas ksantylowy — $C_{10} H_{13} O_9 N_4 P$ (kwas ksantozyno-3-fosforowy) otrzymany w 1931 r. w postaci pseudokrystalicznej przez dezaminację kwasu gwanilowego zapomocą kwasu azotowego (Levene i Dmochowski) (111), najsilniejszy kwas z pośród nukleotydów wskutek obecności dwóch grup CO; odegrał zasadniczą rolę przy wyjaśnieniu zagadnienia miejsca przyłączania kwasu fosforowego w nukleotydach.

8) Bardzo prawdopodobnem jest istnienie jeszcze innych mononukleotydów, gdyż np. oksyadenina (względnie jakaś inna

aminooksypuryna) została izolowana ze krwi z frakcji strącającej się octanem uranilu (B u e l l i P e r k i n s) (33), który to odczynnik, podobnie jak i octan ołowiu, strąca wszystkie nukleotydy, jako związki fosforanowe.

II. Nukleotydy dezoksyrybozowe.

a) pirymidynowe



Oba nukleotydy dezoksypirymidynowe t. j. dezoksycytynyjodwufosforowy i tymozynofosforowy zostały otrzymane w postaci soli (L e v e n e) (109), (T h a n n h a u s e r i O t t e n s t e i n) (212) zarówno w postaci pochodnych jednofosforowych, jak i dwufosforowych (L e v e n e); te ostatnie są pewną wskazówką dla wyjaśnienia struktury kwasu nukleinowego grasicowego (polinukleotydu dezoksyrybozowego). Ostatnio oba nukleotydy jednofosforowe zostały otrzymane w stanie krystalicznym przez K l e i n a i T h a n n h a u s e r a (211).

b) purynowe

Oba te nukleotydy dezoksypurynowe znamy dzisiaj w stanie krystalicznym; kwas dezoksygwanilowy $\text{C}_{10} \text{H}_{14} \text{O}_7 \text{N}_5 \text{P}$ (T h a n n h a u s e r i K l e i n) (210); jest b. nietrwały — odłącza łatwo gwaninę, pozostawiając trwalszy kwas dezoksyrybozofosforowy, dający reakcję na wolną grupę aldehydową; ulega nadzwyczaj łatwo rozpadowi enzymatycznemu na kwas fosforowy i dezoksygwanozynę.

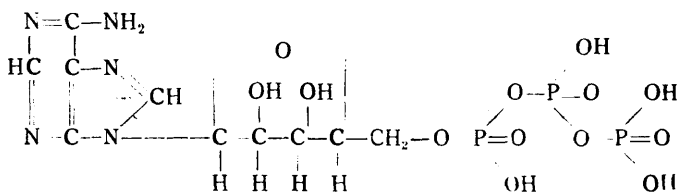
III. Pironukleotydy.

Z grupy nukleotydów sprzężonych dodatkowo z grupą pirofosforanową znany jest dotychczas w postaci soli pirorybonukleotyd adeninowy $C_{10} H_{16} O_{13} N_5 P_3$ (kwas adenilopirofosforowy, adenozyntrojfosforowy) i produkt dezaminacji tego związku (zapomocą HNO_2) — *kwasy inozynopirofosforowe* ($C_{10} H_{15} O_{14} N_4 P_3$).

Pironukleotyd adeninowy został izolowany w 1929 r. przez Lohmanna (141) oraz Fiske i Subarrow (72) z mięśni szkieletowych; w mięśniu sercowym występuje prawdopodobnie nietrwały kompleks dwuadenilotrojfosforowy (Embden) (60); Ostern (167).

Budowa pironukleotydów nie jest jeszcze zupełnie wyjaśniona. Lohmann (143) z jednej strony, Barrenscheen i Filtz (16, 17) z drugiej, podali wzory różniące się od siebie.

Pironukleotyd adeninowy według Lohmanna

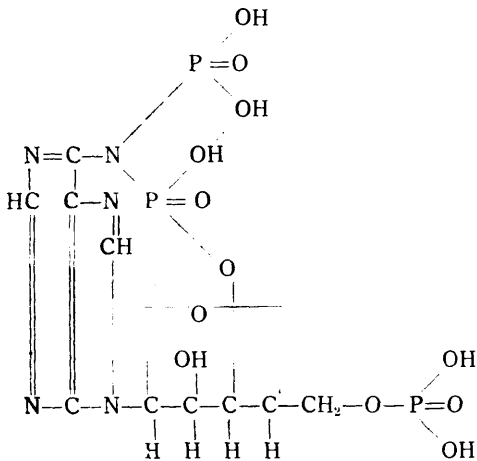


Barrenscheen i Filtz, negując możliwość otrzymania kwasu inozynopirofosforowego, przyjmują istnienie dwóch form pironukleotydu adeninowego otrzymanych przez nich w postaci soli srebrnych o 3-ch, lub 4-ch atomach srebra; 3-Ag-sól jest solą rodzimego kwasu z mięśni, o budowie następującej: $C_{10} H_{11} O_{12} N_5 P_3 Ag_3$ (wzór na str. 167).

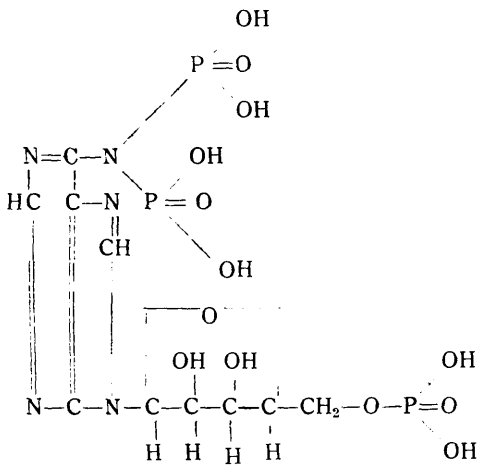
4-Ag-sól zaś $C_{10} H_{12} O_{13} N_5 P_3 Ag_4$, solą kwasu, który jest wtórnym produktem poprzedniego, natomiast występuje w krwinkach.

Możliwości połączenia grupy pirofosforanowej z grupą aminową przeczą Lohmann (145) oraz Mozłowski i Sobczuk (158b), wobec otrzymania kwasu inozynopirofosforowego (tylko na drodze dezaminacji chemicznej).

Pironukleotyd pierwotny



Pironukleotyd wtórny



Cała sprawa struktury pironukleotydów nie jest jeszcze należycie wyświetlona. Jeśli się weźmie pod uwagę, że pironukleotyd adeninowy pełni rolę koenzymu enzymu glikolitycznego (a raczej jednego z enzymów kompleksu glikolitycznego), kozymaza zaś jest koenzymem w kompleksie zymazy i że zarówno kozymaza, jak i pironukleotyd adeninowy daje się ostatecznie deaminować na kwas inozynowy (hipoksantozyno-5-fosforowy), to

wysuwa się przypuszczenie, że już w budowie samego mononukleotydu adeninowego muszą istnieć cechy warunkujące czynność fizjologiczną.

Możliwe jest, że ważną rolę odgrywa wzajemna odległość grup polarnych NH_3^+ i PO^- na tle izomerji (7,9); oznaczenie stałej dielektrycznej różnych nukleotydów, być może, rzuci nieco światła na to zagadnienie.

Oprócz mononukleotydów naturalnych, bądź ich pochodnych, znane już są i syntetyczne. Jeden z nich, dość trwały kwas teofylinoglukofosforowy, został otrzymany przez E. Fischera w stanie krystalicznym.

Drugi-5-fosfourydyna otrzymana przez Levene'a i Stillera (130), oraz Levene'a i Tipsona (135).

BUDOWA NUKLEOTYDOW.

Rozpatrując budowę poszczególnych mononukleotydów, zaznaczyliśmy, że izolowano dwie grupy izomeronów, różniących się miejscem przyłączenia reszty fosforanowej do pentozy. Dokładne określenie tego miejsca było zadaniem niezwykle trudnym i wymagało (dla nukleotydów z kwasu drożdżowego) przeszło 20 lat pracy wielu badaczy, i to pomimo stosowania wszelkich możliwych metod współczesnej chemii organicznej, fizycznej i biologicznej.

Rezultaty tych drobiazgowych prac nad rozwiązaniem tak pozornie specjalnego i małoważnego zagadnienia nie dały jednak czekać na siebie zbyt długo.

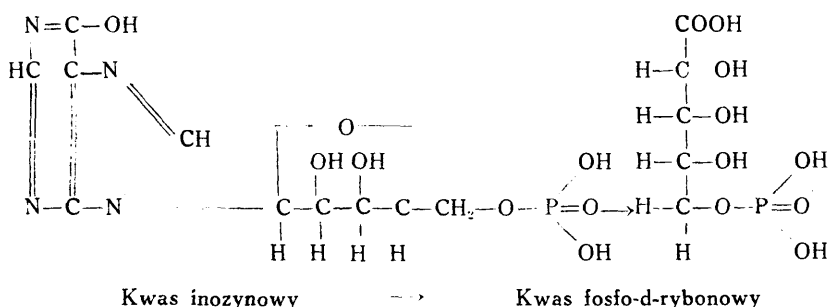
Rzadko w którym wypadku badań biochemicznych wystąpiło na jaw tak ściśle uzależnienie zrozumienia istoty określonych procesów biologicznych od gruntownego poznania struktury związków biorących udział w mechanizmie tych procesów, jak właśnie w cytowanym przez nas wypadku. Tylko dzięki wyjaśnieniu najdrobniejszych szczegółów budowy udało się, choćby częściowo, zrozumieć mechanizm pewnych skomplikowanych zjawisk fizjologicznych. Rozpatrzeniem tych procesów zajmiemy się w drugiej części naszego przeglądu, tutaj podamy tylko historję badań i ostateczny efekt badań chemicznych, osobisty zaś

udział autora w pomyślnym rozstrzygnięciu omawianego zagadnienia umożliwia dokładniejsze rozważenie całej kwestji.

Już w 1909 — 12 roku *Levene* i *Jacobs* zauważyli odrębność budowy dwóch znanych wówczas mononukleotydów — kwasu inozynowego i gwanilowego.

Utleniając ostrożnie kwasem azotowym kwas rybozofosforowy otrzymany przez ostrożną hidrolizę kwasu inozynowego, otrzymano jako rezultat utlenienie grupy aldehydowej związanej rybozy na grupę kwasową; otrzymany związek okazał się pochodną kwasu czwórhydroksywalerjanowego — estrem fosforowym kwasu d-rybonowego (analogonu np. kwasu glukonowego), t. zw. kwasem fosfo-d-rybonowym, w którym grupa fosforanowa musiała być związana z (5) skrajnym węglem rybozy.

Drugi dowód budowy kwasu inozynowego podali w 1929 r. *Levene* i *Mori* (119) śledząc polarymetrycznie szybkość powstawania laktonu (zamknięcia pierścienia pomiędzy grupą kwasową — COOH, a hydroksylową — CHOH) w kwasie fosfo-d-rybonowym; mianowicie lakton ten tworzył się powoli, co wobec znanego faktu powolnego wytwarzania laktonu (1,4) w słonsku do laktonu (1,5) przemawiało definitywnie za pierwszym, a więc — za zajęciem węgla (5) przez grupę fosforanową



Nie tak łatwo poszło wyjaśnienie budowy mononukleotydów otrzymywanych z polinukleotydów rybozowych, np. kwasu gwanilowego.

W wieloletnich badaniach nie udało się odczepić grupy purynowej bez jednoczesnego rozpadu estru rybozofosforowego, próbowano więc pośrednio wyciągać wnioski co do różnic w budowie

omawianych nukleotydów. *Levene i Yamagawa* (136) oraz *Levene i Jorpes* (115) oznaczali szybkość hydrolizy (w 0,1 n H_2SO_4) różnych nukleotydów i różnych znanych estrów heksozofosforowych.

Wyniki ich wykazały wyraźnie istnienie różnic strukturalnych i pozwoliły na wyodrębnienie pewnych typów wiązań.

TAB. 1 (*Yamagawa 1920*)

Szybkość hydrolizy nukleotydów: $K_{mon} \times 10^5$

Kwas nukleinowy drożdżowy	— 130
„ gwanilowy	— 177
„ adenilowy	— 166
„ uracylowy	— 48
„ inozynowy	— 47
„ tymozynodwufosforowy	— 73

TAB. 2 (*Jorpes 1929*)

Odczepianie zasady w % i PO_4 w %

Kwas adenilowy	80,4	72,8
„ gwanilowy	84,5	74,8
„ cytozylowy	9,9	10,6
„ dwuhydrocytozy-		
lowy	71,3	67,5
„ inozynowy	95,1	4,1

Nukleotydy drożdżowe purynowe odczepiały łatwo jednocześnie purynę i kwas fosforowy, pirymidynowe hydrolizowały się b. powoli; kwas inozynowy odczepiał szybko purynę w przeciwieństwie do kwasu fosforowego. Początkowo przypuszczano, że budowa nukleotydów pirymidynowych jest podobna do budowy kwasu inozynowego, niestety, proste uwodorowanie podwójnego wiązania (4,5) w pirymidynie zrównało trwałość nukleotydów pirymidynowych z purynowymi i znowu otrzymanie odpowiedniego kwasu rybozofosforowego okazało się niemożliwym.

Embden i Schmidt (61) skonstatowali również większą łatwość hydrolizy kwasu adenilowego drożdżowego, niż mięs-

W tem stadjum badań *Levene* i *Dmochowski* (111) próbowali do otrzymania z nukleotydów drożdżowych upragnionego kwasu rybozofosforowego zastosować metody enzymatyczne.

Opierając się na fakcie odczepiania jakiegoś skrajnego składnika, niezależnie od związanych z nim pozostałych ugrupowań (n. p. w dwu i trój-sacharydach) zapomocą tego samego enzymu, próbowali oni oddzielić grupę purynową, działając na mononukleotydy nie nukleotydazą t. j. fosfatazą odłączającą grupę fosforanową, ale nukleozydazą, rozkładającą nukleozydy.

Trudności polegały z jednej strony na dokładnem uwolnieniu nukleozydazy od nukleotydazy, z drugiej na otrzymaniu dostatecznie silnego preparatu nukleozydazy — tylko w tych warunkach bowiem były pewne szanse otrzymania wolnego kwasu rybozofosforowego. Niestety próby te nie dały pożądanego rezultatu: różne preparaty nukleozydaz, bądź odczepiały równolegle grupy purynowe i fosforanowe, zawierały więc jeszcze nukleotydazę, bądź były zupełnie nieczynne względem nukleotydów; potwierdzało to poglądy *Helfericha* (85), który w esteryfikacji glukozydów upatrywał ochronę przed działaniem enzymów — glukozydaz. Odporność nukleotydów na działanie nukleozydazy stwierdził również i *Klein* (102a).

Jako przykład przytoczę tutaj jedno z doświadczeń *Levena* i *Dmochowskiego* nad rozkładem kwasu gwanilowego zapomocą b. silnego preparatu nukleozydazy nerkowej.

TAB. 3.

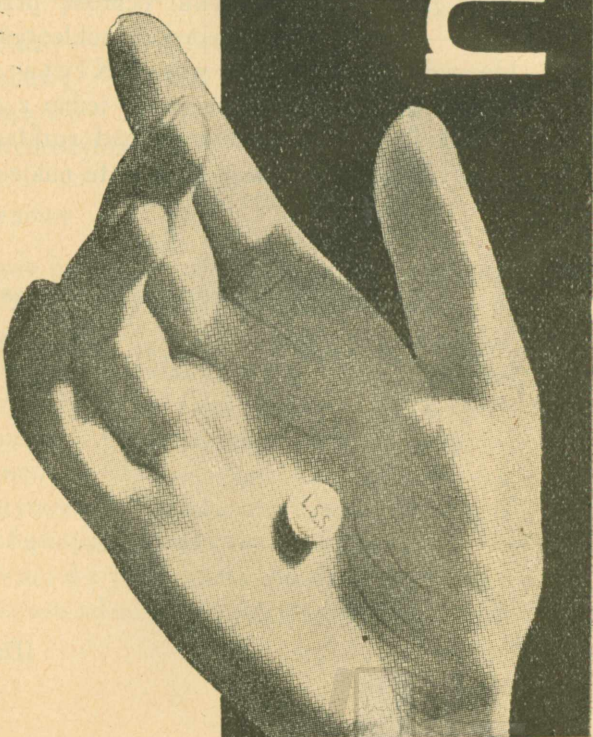
Działanie nukleozydazy na kwas gwanilowy

Czas w godzinach	% wolnej rybozy	% odczepionych grup PO_4
0	—	—
4	7,8	7,2
22	78,0	73,6
42	98,0	85,6

(Dalszy ciąg nastąpi).

brak snu

wywołany
bólami

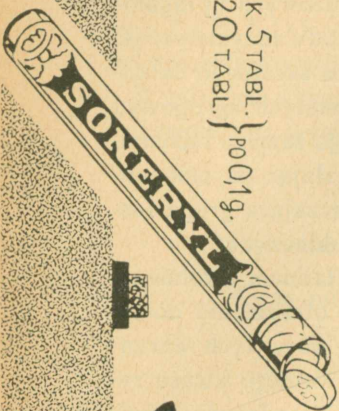


USUNIE

Rp SONERYL
1-2-3 tabletki na noc

NAJLEPIEJ ROZGRZYĆ I POPIC WODĄ

KARTONIK 5 TABL. } po 0,1g.
RURKA 20 TABL. }



SONERYL SPIESS

BIOLOGICZNE METODY WCZESNEGO ROZPOZNAWANIA CIAŻY

WSKAZÓWKI PRAKTYCZNE.

podali

DR. P. REMLINGER

Kierownik Instytutu Pasteura w Tangerze

i

DR. I. BAILLY.

1-o. — OGÓLNE POJĘCIA O HORMONACH PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI MÓZGOWEJ I ŁOŻYSKA.

Zarówno klinika jak i medycyna sądowa, w wielu razach przywiązuje dużą wagę do wczesnego rozpoznania ciąży.

Do ostatnich czasów wczesne i pewne rozpoznanie ciąży opierało się na dwóch niezaprzeczalnych oznakach: na czynnych ruchach płodu i na odgłosach serca płodu, czyli dopiero w 4, względnie 4 $\frac{1}{2}$, miesiącu ciąży. Rentgenografia niezaprzeczenie posunęła naprzód zagadnienie powyższe, jednak pomimo rentgenogramów płodu, a raczej niektórych jego części już przy końcu 2-go miesiąca, dla uzyskania zupełnej pewności, płód musi być 15 — 16 tygodniowy. Przy pomocy metod biologicznych otrzymano wyniki wyraźniejsze i bardziej praktyczne. Odczyn A b d e r h a l d e n a, który wykorzystał własności czynników obronnych, tworzących się przeciwko białku łożyska, trudny do wykonania, dający conajmniej 40% błędnych odpo-

wiedzi, posiada obecnie wartość raczej teoretyczną i historyczną.

Obecnie mówiąc o odczynach biologicznych ciąży, ma się na myśli wyłącznie badania nad zawartością we krwi, a zwłaszcza w moczu, kobiety ciężarnej pewnych ciał stymulujących, czyli hormonów. W stanie zwykłym ciała te znajdują się w cieczach humoralnych ustroju zaledwie w nieznacznych ilościach. Podczas ciąży ciała te znajdują się w dużych ilościach i są łatwe do wykrycia.

Przed 3000 lat, w starożytnym Egipcie umiano rozpoznawać wczesny okres ciąży przez badanie moczu. *Multa renascentur quae jam cecidere...*

Hormony ciąży stymulują czynności płciowe, wyrażające się u samiczek dziewiczych, rozwarciem pochwy i obecnością w wydzielinie pochwowej komórek zrogowaciałych, charakterystycznych dla ruji. W jajniku występują pęcherzyki krwiste i żółte ciała. U samców hormony te wywołują przerost jąder, gruczołu krokowego i woreczków nasiennych, dając się stwierdzić mikroskopowo i wagowo.

Jakież to są zasady, zawarte w moczu w okresie ciąży, które pobudzają czynności płciowe. Według jednych autorów jest to wyłącznie hormon przedniego płata przysadki mózgowej. Według innych, źródłem ich jest łożysko. Jest to zwłaszcza opinia Kleina i Maxa Arona, oparta na odmiennym działaniu na tarczycę hormonu przedniego płata przysadki mózgowej i hormonu zawartego w moczu ciężarnych. Według Philipsa hormony zawarte w moczu dostają się doń z przysadki mózgowej w ciągu pierwszych miesięcy ciąży, poczynając od 5-go miesiąca hormony pochodzą z łożyska. Być może, że hormony te składają się ze wszystkich hormonów płciowych, t. j. folikuliny, luteiny, hormonów przysadki, t. j. prolanu A i prolanu B. Do tego mogą dojść hormony łożyska, gruczołu o złożonym wydzielaniu wewnętrznym, produkującego folikulinę, emeninę, prolan A, prolan B, wzmacniające lub zastępujące czynność stałych gruczołów płciowych, jak jajnik i przysadka mózgowa. Odnalezienie w moczu tych hormonów dla celów rozpoznawczych ciąży jest zależne od 3-ch warunków:

1-o Zwiększenie się ilości hormonu w okresie ciąży winno być wczesne.

2-o Poza okresem ciąży nie może zachodzić żadna przyczyna fizjologiczna lub patologiczna, która mogłaby wpłynąć na zwiększenie się ilości danego hormonu.

3-o Niezbędne jest posiadanie takiego odczynnika laboratoryjnego, któryby pozwolił na łatwie i pewne wykrycie hormonu.

Z powyższych przyczyn poszukiwanie we krwi lub w moczu folikuliny lub hormonu żółtego ciała, nie stanowi wygodnej metody rozpoznawczej. Dotyczy to zwłaszcza metody poszukiwania folikuliny (odczyn *M a z e r-H o f f m a n n a*, wywołanie ruji u myszki trzebionej), prowadzące do wyników błędnych, gdyż na początku ciąży jest zbyt mało folikuliny do wywołania należytego odczynu.

Wynik dwóch czynności, działających w jednym kierunku, t. j. hormonu przedniego płata przysadki mózgowej i folikuliny, czyli odczyn *A s c h h e i m-Z o n d e k a* oraz inne odczyny pokrewne prowadzą również do błędów, gdyż jeden z hormonów przedniej przysadki mózgowej, prolan A, występuje niekiedy w moczu kobiet nie ciężarnych, a w pewnych przypadkach braku miesiączki lub w okresie przekwitania. Prolan B tylko w wyjątkowych razach znajduje się w moczu kobiet nieciężarnych. Mocz kobiet ciężarnych zawiera duże ilości tego hormonu od pierwszych dni ciąży. Pod wpływem prolanu B następuje zwiększenie się objętościowe woreczków nasiennych u samców; jest to jeden z lepszych odczynów typu *B r o u h a - S i m o n n e t*. Pojęcia powyższe posiadają wartość głównie teoretyczną. Zagadnienie wczesnego rozpoznawania ciąży jest obecnie w okresie dysput fizjologicznych i dotychczas niema decydującego doświadczenia, któreby stwierdziło rodzaj i pochodzenie zasad pobudzających, na których opiera się biologiczne rozpoznawanie ciąży.

Z punktu widzenia praktycznego, wystarczy wiadomość, że mocz kobiet ciężarnych zawiera ciała, które posiadają niezależny wpływ na układ płciowy męski lub żeński. Należy więc znaleźć takie odczyny, które chociaż nie posiadają jeszcze

wy tłumaczenia teoretycznego, dają najmniejszą ilość błędów i są łatwe do wykonania.

2-o. — WAŻNIEJSZE ODCZYNY BIOLOGICZNE.

Odczyny, które mają na celu wczesne rozpoznanie ciąży, a nawet określenie płci, są liczne.

Różnice między ważniejszymi odczynami wykazuje tablica umieszczona na str. 177.

3-o. — UJEMNE STRONY ODCZYNÓW NA MYSZACH, ŚWINKACH MORSKICH I NA SAMCACH WOGOLE.

Badanie porównawcze różnych odczynów wykazuje, że zarówno znaczenie jak i ich wartość praktyczna są różne.

1-o. Odczyny na myszach, są słabsze od odczynów u królików. Dla zebrania 6-ciu myszek niedojrzałych, ważących 6 — 8 g, potrzebnych do odczynu *Aschheim-Zondek*a, niezbędne jest wyhodowanie kilku setek myszy. Hodowla taka wymaga ścisłej kontroli. Myszki muszą być niedojrzałe płciowo. Dojrzałość występuje około 38-go dnia życia, przyczem niema współzależności między dojrzałością, a wagą myszy. Zazwyczaj stosuje się 6 — 10 wstrzyknień w ciągu 3-ch dni. Śmiertelność wśród zwierząt inokulowanych jest dosyć duża. Nieznaczone zwiększenie się objętości macicy i wydzielina z pochwy, obfitująca w komórki zrogowaciałe, cechujące ruję, mogą wystąpić nie tylko pod wpływem folikuliny pochodzącej z moczu kobiety ciężarnej, lecz i folikuliny, znajdującej się w moczu, w niektórych przypadkach patologicznego braku miesiączki.

Jedynie swoiste są odczyny jajnikowe.

Wystarczy jeden punkt krwotoczny lub tylko jedno żółte ciało, aby ustalić diagnozę. W połowie przypadków objawy powyższe nie zawsze są widoczne gołym okiem.

Konieczne jest przygotowanie skrawków i badanie mikroskopowe. Stanowi to dużą niewygodę. Odpowiedź może być udzielona dopiero po upływie stu godzin, co często stanowi zbyt długi okres oczekiwania.

Odczyn *Hirschman*na jest szybszy, wymaga mniejszej ilości zwierząt i wynik może być otrzymany już po

TABLICA SYNTETYCZNA WAŻNIEJSZYCH ODCZYNÓW BIOLOGICZNYCH CIAŻY.

Nr. kolejny	AUTOR I NAZWA ODCZYNNU	Rodzaj zwierzęcia	Płeć	Stopień dojrzalości płciowej	Wstrzyknięte ciało	Hormon upatrzony	Cel odczynu
1	Aschheim-Zondek	mysz	samica	niedojrzała	mocz	Hormony przedniego płata przysadki mózgowej i folikulina. Prolan B	rozpoznanie ciąży
2	Hinglais, Brouha i Simonet	mysz	samiec	dojrzały lub niedojrzały	mocz	Hormony przedn. płata przysad. mózg. i folikulina	id.
3	Friedman Brouha	królik	samica	dojrzała lub od 30-tu dni oddzielona od samca	mocz lub surowica krwi	Hormony przedn. płata przysad. mózg. i folikulina	id.
4	Meguini i Andreani	świnia morska	samiec	niedojrzały	mocz	Prolan B	id.
5	Brown i Brindeau-Hinglais	królik	samica	dziewicza lub 30-tu dni oddzielona od samca	surowica krwi	Hormony przedn. płata przysad. mózg. i folikulina	id.
6	Bourg	szczur	samica	niedojrzała	mocz	Różne hormony	id.
7	Hirsch-Hoffmann	mysz	samica	w okresie uślenia dojrzałości	mocz	Horm. przedn. płata przysad. mózg. i folikulina	id.
8	Mazer-Hoffmann	mysz	samiec	wytrzebiona	mocz	?	id.
9	Dorn i Sugarmann	królik	samiec	niedojrzały	mocz	?	rozpoz. płci

3-ch dniach. Badanie mikroskopowe jajników jest niezbędne: stanowi to dużą niewygodę.

Odczyn Brouha-Hinglais-Simonnet może być dokonany przy użyciu małej ilości zwierząt. W ostateczności można użyć tylko jednego zwierzęcia i w razie konieczności zwierzęciem tem może być mysz-samczyk, który przekroczył wiek dojrzały. Nie nadają się do badań jedynie zwierzęta wagi powyżej 20 g. Wstrzykiwanie moczu musi być dokonywane w ciągu 8 — 10 dni, w ilości 0,1 — 0,4 cm³ dzienne.

Chociaż Gernez twierdzi, że własności hormonalne moczu nie ulegają zmianie po 10-ciodniowym trzymaniu w próbówce, oraz że dodanie do moczu trójkresolu ¹⁾ lub roztworu jodo-jodowego ²⁾ nie wpływa ujemnie na wynik, tem niemniej często zachodzi konieczność wielokrotnego sprowadzania do pracowni osoby badanej.

Nawet stosując świeży mocz często spostrzegano zejścia śmiertelne zwierząt. Jadowitość moczu starano się zmniejszyć przez zakwaszanie go i zadziaływanie eterem, jednak strata hormonu przy tych obróbkach nie jest wyrównana przez niewielki zysk. Pozatem odpowiedź nie może być dana wcześniej niż przed upływem 10 dni, gdyż badanie makroskopowe (przerost jąder, gruczołu krokowego a zwłaszcza pęcherzyków nasiennych) nie jest dostateczne i wymaga potwierdzenia przez badanie drobnovidzowe, które również niekiedy daje wyniki wątpliwe. Zdaniem naszym, biorąc to wszystko pod uwagę, należy podkreślić, że odczyny Aschheim-Zondeka i Hinglais-Brouha i Simonnet przedstawiają dużą wartość teoretyczną, jednak pod względem praktycznym można im postawić jednakowej wartości zarzuty. Ostatni odczyn może oddać pewne usługi, jak to niżej zobaczymy, jako odczyn kontrolny u zwierzęcia rodzaju męskiego dla odczynu uzyskanego u zwierzęcia rodzaju żeńskiego.

Dokonałismy szeregu badań ze świnkami morskimi rodzaju żeńskiego, zarówno dojrzałymi jak i niedojrzałymi. Badania te zostały przeprowadzone według techniki podanej przez Joela

¹⁾ 1 kropla na każde 25 cm³ moczu.

²⁾ 5 cm³ roztworu jodo-jodowego na każde 100 cm³ moczu.

Mequina i panią Andreani. Niedojrzałem samczykowi świnki morskiej wstrzykiwano 2 cm³ badanego moczu do lewej komory; następnego dnia wstrzyknięto jeszcze podskórnie trzy centymetry sześciennie moczu; 4-go dnia zwierzę było dysekowane. Nie stwierdziliśmy w żadnym z tych przypadków przerostu organów rozrodczych, pęcherzyków nasiennych lub nadmiaru plemników w zmazkach z jąder, opisanych przez powyższych autorów. Według tychże autorów pęcherzyki nasienne były trzy lub czterokrotnie większe od swej pierwotnej objętości, bardzo napięte i z głębi nacięcia wydzielala się żelatynowata treść. W naszych spostrzeżeniach faktów powyższych nie stwierdziliśmy i doszliśmy do wniosku, że świnka morska jest mało wrażliwa na zadrażniające działanie hormonów, zawartych w moczu kobiet ciężarnych i dlatego nie nadaje się do biologicznego określania ciąży.

Pojedyncze doświadczenia z innymi odmianami zwierząt, jak młodym kotem, szczeniakiem oraz z kurczakiem, również nie dały zadowalających wyników. Receveur stwierdził, że nie można przewidzieć działania wyciągów przedniopłatowych na ptaki, że wyciągi te działają bardzo różnorodnie, zwłaszcza, że wyciąg z przysadki mózgowej ssaków nie posiada wpływu na koguta. W Ameryce Północnej i w Brazylii uzyskano bardzo ciekawe wyniki z niektórymi odmianami ryb. Są one dobrym materiałem badawczym, gdyż życie płciowe ryb wykazuje pewną kolejność, t. j. fazy aktywności i spokoju. Nam jednak, nie udało się dokonać odnośnych doświadczeń z rybami.

Odczyny uzyskane u samic są znacznie lepsze od odczynów uzyskanych u samców, nie tylko pod względem szybkości, która u samic stanowi godziny (wystarczy nawet jedno wstrzyknięcie), a nie dni (przyczem konieczne są liczne szczepienia), ale i pod względem wyrazistości odczynu. „Wstrzyknięcie moczu kobiety ciężarnej młodej myszce-samczykowi, wywołuje szybkie dojrzewanie płciowe tego zwierzęcia: wywołuje ono nadmierny rozwój jąder, a zwłaszcza pęcherzyków nasiennych, które wypełniają część jamy brzusznej”. Opis ten jest zdaniem naszym przejawem rzadko i nie zgadzamy się, aby przerost pęcherzyków nasiennych „pewniej i wygodniej można było

stwierdzić makroskopowo niż zmiany jakie zachodzą w jajnikach niedojrzałych płciowo samiczek". Zaznaczymy również, że Bauer i Borrier stwierdzili u samczyków mysich daleko posunięty przerost pęcherzyków nasiennych w kilku przypadkach, w których nie stwierdzono w następstwie ciąży. Autorzy ci radzą, aby unikać „błędnych” odpowiedzi, posługiwać się kilkoma myszami, co w sumie nie upraszcza odczynu. Z punktu widzenia teoretycznego, odczyny występujące u zwierząt rodzaju męskiego usuwają błędy, wywołane przez folikulinę, gdyż ta ostatnia zamiast pobudzać, wywołuje zjawiska raczej, regresywne w organach płciowych samczych. Dodatnia ta strona odczynu w zupełności równoważy inne jego niedogodności, o których wyżej wspominaliśmy.

Po tych zastrzeżeniach, co do używania do doświadczeń samców myszy i świnki morskiej, pozostaje nam jedynie samiczka królicza, zalecana przez Friedmana od roku 1929, następnie przez panią Brouha od roku 1931. Do podobnych wniosków doszli również Brindeau, H. Hinglais i M. Hinglais, którzy w 140 doświadczeniach porównywali osiągnięte wyniki z samiczką mysia, z samczykiem mysim i z samiczką króliczą. Do podobnych wyników doszli Voron, Pigeaud i szereg innych autorów.

W dalszym ciągu niniejszej pracy zajmiemy się rozpatrzeniem odczynu Friedmana zwracając uwagę na kilka szczegółów.

4-o. — SZCZEGÓŁOWY OPIS ODCZYNU FRIEDMANA.

A. — *Zasady odczynu.*

W odróżnieniu od innych zwierząt używanych do doświadczeń laboratoryjnych, samiczka królicza nie wykazuje okresowego dojrzewania jajników i okresowej ruji. W każdej porze roku jajniki samiczki króliczej, oddzielonej od samczyka, mogą dojrzewać pod wpływem przyczyny zadrażniającej. Dzięki tej swoistości Friedman miał szczęśliwą myśl użycia samiczki króliczej jako odczynnika. Na równi z odczynem Aschheim-Zondeka, Friedman używa do swego odczynu własności,

jakie posiada mocz kobiet ciężarnych wywoływania zmian w jajnikach: powstawania pęcherzyków krwotocznych i żółtych ciąlek.

B. — Wybór samiczki króliczej.

Do badań używa się dziewicze samiczki królicze lub też samiczki dojrzałe, lecz oddzielone od samczyków i od samiczek przez przeciąg conajmniej 30 dni. Należy unikać zwierząt zbyt młodych lub też zbyt dojrzałych, przyczem wiek królic można poznać po długości pazurów. Do badań najbardziej nadają się królice wagi od 1500 do 1800 g. Królice, które rodziły, w przeciwieństwie do tego co możnaby przypuszczać, nadają się również do doświadczeń, pod warunkiem jednak, że nie karmiły. Okres ten nadaje się nawet dobrze do doświadczeń, gdyż sprzyja występowaniu pęcherzyków krwotocznych pod wpływem zadrażnienia hormonalnego. Ciąża nie jest przeciwskazaniem i w braku innego materiału, można do badań używać kotne królice. Jednak dają one wyniki dodatnie tylko przy zastosowaniu moczu kobiet niezapłodnionych. Przy badaniu posmiertnem lub przy pomocy laparotomji należy w tych razach zachować pewną ostrożność w wyprowadzaniu wniosków. Odczyny ujemne w tych razach zachowują swoją wartość rozpoznawczą.

Mocz badany należy wstrzykiwać do jednej z żył na powierzchni ucha. Naszem zdaniem bardziej do tego nadaje się *vena marginalis interna* od zewnętrznej, która jest zbyt drobna, lub od żyły środkowej, która znajduje się w tkance zbyt luźnej i przez to przy nakłuciu ucieka. To ostatnie naczynie jest prawie zawsze większe od żyły bocznej i przy ogolonem uchu jest bardziej widoczne. Nie należy się dać wyprowadzić w pole, gdyż naczynie to jest daleko trudniej nakłuć wskutek większej jego ruchomości, pozatem naczynie to jest bardzo delikatne i wystarczy nieco silniejszy nacisk na tłok strzykawki, aby wywołać pęknięcie naczynia i podskórne rozlanie się moczu do tkanki łącznej. W tych razach następuje prawie zawsze obrzęk całego ucha, który utrudnia następne wstrzykiwanie dożylnie.

Przy wstrzykiwaniu konieczna jest pomoc jednej osoby. Po-

mocnik przytrzymuje tylne łapki królicy między swemi kolanami, lewą ręką chwyta przednie łapy, a prawą ręką przytrzymuje pyszczek i górną część czaszki. Zwykłe ogolenie wystarczy, aby żyły wystąpiły wyraźnie i z pewnem napięciem, dostatecznem dla dokonania nakłucia. Lekkie potarcie skóry ksylolem zwiększa rozszerzenie żył. Igłę należy włożyć jednocześnie przez skórę do naczynia, unikając tunelizacji podskórnej. Płyn należy wstrzykiwać bardzo wolno przy bardzo słabem ciśnieniu.

C. — Stosowanie.

Zazwyczaj stosujemy dwa wstrzyknięcia dziennie, za wyjątkiem specjalnych przypadków. Jedno wstrzyknięcie dokonujemy rano, drugie wieczorem. Każdorazowo wstrzykujemy 7 cm^3 czyli razem 28 cm^3 moczu. Po trzech dniach zwierzę zostaje zabite i odpowiedź może być już podana w 24 godziny potem. Wyniki dodatnie mogą być w niektórych razach, o których później będzie mowa, uzyskane przy dawkach daleko mniejszych i w okresie daleko mniejszego czasu. Nieraz wystarczy jedno tylko wstrzyknięcie dożylnie i odpowiedź można dać już w 24 godziny po niem.

Verdeuil radzi wstrzyknąć królicy 20 cm^3 moczu rano za jednym razem: 5 cm^3 do żyły usznej i 15 cm^3 po skórę, w okolicę lędźwiową. W 24 godziny później zwierzę zostaje zabite.

D. — Odczytywanie wyników.

Jakie wyniki daje badanie pośmiertne doświadczalnych zwierząt? W przypadkach odczynu ujemnego nie stwierdza się zmian w jajnikach, które w niczem nie różnią się od jajników normalnych. Są one małe, wielkości ziarnka pszenicy, wagi około $0,22\text{ g}^3$). Jajniki te mają powierzchnię gładką, barwę jednolicie jasno żółtą lub szaro różową. Na powierzchni niema uwypukleń ani chropowatości. Z widokiem normalnego jajnika należy się

³⁾ Średnia z 24 spostrzeżeń.

uprzednio dobrze zapoznać, aby w przyszłości uniknąć pomyłek rozpoznawczych.

W przypadku dodatnim, objętość jajnika jest większa, przeciętnie mają one 2 cm. długości i około $1\frac{1}{2}$ cm. grubości, waga ich wynosi od 0,40 do 0,60 g (średnio 0,44 g)⁴⁾. Zabarwienie jajników jest różowe, spostrzegane przy nacieczeniach. Jajniki takie posiadają charakterystyczne pęcherzyki krwotoczne. Są to małe torbiele, barwy ciemno czerwonej, niekiedy prawie czarne, wypukłe, błyszczące, kuliste, żywo odbijającej od jasnego tła tkanki jajnika. Wielkość tych torbielei jest zbliżona do wielkości główki szpilki. Zazwyczaj jest ich 4 do 8 sztuk, lecz spostrzega się i większą ich ilość. Niekiedy jest ich tak duża ilość, że jajnik przypomina kształtem owoc morwy. Rozpoznanie jest względnie łatwe, gdyż pęcherzyki krwotoczne występują bardzo wyraźnie i są od razu widoczne, zwracając na siebie uwagę. W niektórych razach pęknięcie jednego lub kilku tych torbielei prowadzi do krwotoku dootrzewnowego, wywołując wysięk różowawy. Potwierdzenie ciąży rzuca się w oczy od razu po otwarciu jamy brzusznej i często laborant stawia rozpoznanie zanim przybędzie badacz. Obok pęcherzyków krwotocznych stwierdza się również żółte ciała, które łatwo jest odróżnić od pęcherzyków i które są równie swoiste przy tym odczynie. Jednocześnie stwierdza się obfite przekrwienie ścian macicy. Słuszne jest powiedzenie, że królicą zupełnie znosi „współczynnik osobowy” badacza w wynikach doświadczenia.

E. — Uwagi.

Odczyn powyższy nasuwa kilka uwag:

1-o. Hormony o których mowa w odczynie Friedmanna znajdują się nie tylko w moczu. Spotyka się je również w ślinie, w skórze, w mleku, w płynie mózgowo-rdzeniowym, w przesączach, płynach znajdujących się w bąblach po nałożeniu wezykatorji, a zwłaszcza w surowicy. Surowica zawiera znacznie większą ilość hormonów niż mocz, niekiedy dochodzącą do po-

⁴⁾ Średnia z 14 spostrzeżeń.

dwójnej ilości. Z tej też racji stosuje jej się daleko mniej, a wynik może być uzyskany daleko szybciej.

2-o. Surowica posiada tę niedogodność, że jest bardziej toksyczna od moczu. *Verdeuil* radzi pobierać surowicę naczczo, albo conajmniej w 4 godziny po ostatnim posiłku. Jeżeli surowicę pobierać po południu to wyniki będą gorsze niż zazwyczaj. Surowica częściej niż mocz może wywołać nagłe śmiertelne zejście podczas wstrzykiwania lub zaraz po nim. Czynnikiem, które wywołują nagłe zejście, wprawdzie rzadko spostrzegane, pomimo bardzo powolnego wprowadzania surowicy są: jadowitość wstrzykiwanego produktu i indywidualna odporność zwierzęcia. Spostrzega się przypadki, że wstrzyknięcie moczu zabija jedną królicę, podczas gdy innej nie szkodzi; w innych przypadkach zejście śmiertelne następuje dopiero po drugim lub trzecim wstrzyknięciu moczu. Królik jest bardziej odporny od myszy na jadowitość moczu.

3-o. Lepiej jest wstrzykiwać mocz ranny. Stwierdzono, że mocz kobiet ciężarnych, cierpiących na nerwowy częstomocz, daje wyniki ujemne. We wszystkich przypadkach, gdzie mieliśmy do wyboru, stosowaliśmy raczej mocz ranny. Często jednak zmuszeni byliśmy wstrzykiwać mocz dostarczony do pracowni w ciągu dnia, w tych jednak razach odczyny również były wyraźne. Zaleca się również, aby osobnik badany nie przyjmował uprzednio wyciągów z łożyska lub z przedniego płata przysadki mózgowej, co mogłoby dać błędną odpowiedź; w tej dziedzinie jednak nie posiadamy osobistych spostrzeżeń. Należy podkreślić, że w niektórych przypadkach chorobowych (*morbus Brighti*) mocz zawiera bardzo małą ilość hormonów.

4-o. U niektórych dziewiczych królic spostrzega się, przed wstrzyknięciem hormonów, pęcherzyki krwotoczne. Z tej racji niektórzy autorzy radzą dokonywać uprzedniego badania jajników przy pomocy laparotomji. Według naszego zdania, zabieg ten jest poważnem powikłaniem, którego można uniknąć przez dokładne oddzielenie królic nie tylko od samczyków, ale i od samic. Niezależnie od stosunku, najmniejsze zadrażnienie pochwy może wywołać owulację; wystarczy pocieranie się samic między sobą w okresie ruji.

5-o. Dla odczytania wyniku niekonieczne jest zabicie królicy. Stan jajników można stwierdzić przez otwarcie jamy brzusznej. Jeżeli odczyn jest ujemny, to zwierzę może służyć do następnego badania. Jeżeli odczyn jest dodatni, to następne wstrzyknięcie może być dokonane dopiero po dwóch miesiącach. W przypadkach wątpliwych można dokonać jeszcze dwóch dodatkowych wstrzyknięć moczu, poczem dokonać powtórnej laparotomji lub też zwierzę zabić. Musimy zaznaczyć, że nie mieliśmy nigdy wątpliwości w ustaleniu odczynu dodatniego lub ujemnego.

6-o. Mocz może być przechowany przez kilka dni w chłodni bez obawy fermentacji. Mocz taki przed wstrzyknięciem należy lekko ogrzać.

5-o. — ODCZYNY ILOŚCIOWE.

W wyżej podawanych przypadkach wyniki badań były albo dodatnie albo ujemne. Wynik jest niezależny od tego czy mamy do czynienia z ciążą normalną, w przeddzień rozwiązania, czy z ciążą zatrzymaną, czy z zaśnięciem wodunkowym, czy też z nabłoniakiem kosmkowym lub t. p. Dzięki pracom Brindeau, H. i M. Hinglais pojęcia jakościowe hormonów zostały zamienione na pojęcia ilościowe, przyczyniając się do dużego postępu w dziedzinie odczynów biologicznych. Autorzy ci określają wyniki w „jednostkach króliczych”, wygodniejszych od jednostek mysich samiczych lub jednostek mysich samczych. Jednostką króliczą jest najmniejsza dawka hormonu, która wstrzyknięta jednorazowo dożylnie królicy wagi 2 kg wywołuje w 48 godzin później conajmniej jeden punkt krwotoczny na conajmniej jednym jajniku.

Ilość hormonu ulega wahaniom w szerokich granicach, w zależności od warunków w jakich ocena ta została dokonana. Tak na przykład surowica normalnej kobiety ciężarnej może zawierać od 1000 do 4500 jednostek króliczych, przyczem liczba ta jest większa w początku ciąży, niż przy jej końcu. W związku ze zwiększonym działaniem łożyska, surowica kobiet ciężarnych, cierpiących na wymioty niepowstrzymane zawiera 7000 do 13000

jednostek. Liczba ta może spaść do 500, do 50 jednostek, a niekiedy nawet i do 0 u kobiet noszących w łonie martwy płód; natomiast w przypadkach zaśniadu wodunkowego i nabłoniaka kosmkowego ilość ta zwiększa się do 30000, 50000, 100000 a nawet i więcej jednostek. W 3 do 4 dni po rozwiązaniu lub po poronieniu, odczyn jest ujemny. Brindeau, H. i M. Hinglais stwierdzili, że hormon ciąży znika wolniej z moczu kobiety ciężarnej w przypadku zamarcia płodu i pozostawienia go w macicy, niż po normalnem wydaleniu dojrzałego płodu. Stałość wydzielania hormonu, która może trwać wiele tygodni a nieraz i wiele miesięcy, związana jest z obecnością kosmków łożyska, które są czynne przez dłuższy czas po zamarcu płodu. Odnośne badania wykazują, że w tych razach można stale znaleźć hormon ciążowy i we krwi, skąd może być pobrany każdej chwili. Ranna porcja moczu, to jest moczu z nocy, zawiera w przybliżeniu te same ilości hormonów co i surowica krwi. Niekiedy w moczu jest go nawet więcej. W ciągu dnia ilość hormonu ulega dużym wahaniom i nieraz mocz zawiera dwa razy mniej hormonów niż surowica. Spostrzeżenie to nie wpływa na odczyn jakościowy, gdyż ilości wstrzykniętego moczu są zazwyczaj większe od ilości granicznych. Z powyższego widać jak duże znaczenie praktyczne posiada ilościowe określenie hormonów. W wielu przypadkach nie wystarczy samo tylko określenie odczynu ujemnego, lecz wskazane jest jeszcze określenie jego natężenia i wyrażenie w liczbach jednostek króliczych. Ilość i określenie hormonu w surowicy jest częściej stosowane w klinikach; określenie ilości hormonu w moczu ma większe znaczenie w praktyce prywatnej, pozaszpitalnej. Wyniki otrzymane przez Brindeau, H. i M. Hinglais rozkładają się dosyć regularnie między 0 a 10.000 jednostek, tworząc trzy wyraźne grupy: pierwsza grupa, od 0 do 500 jednostek króliczych, grupa martwego płodu, przyczem martwota płodu jest pewna lub możliwa; w drugiej grupie mieszczą się wartości od 1000 do 4500 jednostek króliczych (J. K.), jest to grupa biologicznie normalnej ciąży, wreszcie trzecia grupa, od 30.000 do 100.000 J. K. lub więcej, to grupa zwyrodnienia zaśniadowego z jego powikłaniami. Jak widać grupy te nie posiadają ostrych granic; między grupami są wolne przestrzenie, czyli grupy przejściowe większe

lub mniejsze. Grupy przejściowe odpowiadają różnym warunkom patologicznym, lepiej lub mniej określonym, znaczącym przejście od stanu normalnego do wyraźnie patologicznego. Tutaj należy zaliczyć przypadki wymiotów niepohamowanych, lub też w odwrotnym kierunku, zmiany w łożysku, które powiększając się lub przedłużając, prowadzą do zamarcia płodu i t. p. Brindeau, H. i M. Hinglais nie wskazali dawek surowicy (lub moczu) wstrzykiwanej, któreby odpowiadały jednostce króliczej. Wobec powyższego zmuszeni byliśmy określić w przybliżeniu, dla celów praktycznych, najmniejszą ilość moczu rannego, która wstrzyknięta dożylnie jednorazowo, królicy wagi od 1 do 1,5 kg wywołuje w ciągu 48 godzin odczyn dodatni.

Dokonywamy tego w sposób następujący: sześć królic jednokowej wagi, ściśle oddzielonych od siebie w ciągu co najmniej jednego miesiąca, otrzymuje do żyły usznej 0,4 moczu (1 cm³ moczu rannego rozcieńczonego do $\frac{1}{10}$); 0,3, 0,75, 2,5 i 20 cm³ czystego moczu. W 48 godzin później zwierzęta zostają zabite. Otrzymane wyniki, umieszczone w poniższej tablicy, zawierają grupy przejściowe, analogiczne do grup zawartych w tablicy Brindeau, H. i M. Hinglais, wyrażonych w jednostkach króliczych. Nie ulega wątpliwości, że liczby te podlegają dużej krytyce, jeżeli je rozpatrywać z punktu widzenia naukowego, lecz w praktyce, zdaniem naszym, mogą one oddać pewne usługi.

	Królica 1	Królica 2	Królica 3	Królica 4	Królica 5	Królica 6
Ilość moczu (minim.)	20 cm ³	2,5 cm ³	0,75 cm ³	0,3 cm ³	1 cm ²	0,4 cm ³
					mocz rozcieńczony	
Jednostki królicze	> 0	500	1000	4500	30.000	100.000
	płód martwy		normalna ciąża		zaśniedział lub t. p.	

(Dokończenie nastąpi).

REDAKTOR Dr. S. OTOLSKI

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

Zakł. Druk. F. Wszyński i S-ka, Warszawa, Warecka 15

PROPIDEX

SZCZEPIONKA PROPIDONOWA PROF. DELBETA

W POSTACI MAŚCI DO STOSOWANIA NASKÓRNEGO.

**Szybko wyjąławia miejsca zakażone,
działa przeciwzapalnie i kojąco –**

przy

**ropnych zapaleniach skóry, owrzodze-
niach, ranach zakażonych, czyrakach,
oparzeniach, zderciach naskórka i t. p.**

**Okłady z maści PROPIDEX zmieniać
2 razy dziennie – bandażować.**

TUBY PO 30 GR I PO 10 GR.

P.-H. Z. CH. LUDWIK SPIESS I SYN S. A. WARSZAWA