

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr Janina Opieńska-Blauth

Maria SZWAJ

**Porównanie wpływu aminokwasów i ich pochodnych na zawartość  
1-<sup>14</sup>C-glicyny w komórkach raka Ehrlicha**

**Сравнение влияния аминокислот и их производных на содержание  
1-<sup>14</sup>C-глицина в клетках рака Эрлиха**

**A Comparison of the Influence of Various Amino Acids and Their  
Derivatives on the Content of 1-<sup>14</sup>C-Glycine in Ehrlich Ascites  
Tumour Cells**

Problem transportu aminokwasów oraz ich akumulacji wewnątrzkomórkowej jest od dawna przedmiotem licznych prac doświadczalnych (7, 10, 11, 3, 18, 4, 12, 20, 9, 17, 6, 21). Przy przechodzeniu aminokwasów przez błonę komórkową obserwuje się zjawisko kompetycji (19, 5, 7). Uwarunkowane ono jest prawdopodobnie podobieństwem strukturalnym aminokwasów (1, 5, 8, 13, 16) i powinowactwem grup aminokwasów do jednego z układów przenoszących (19, 13).

Celem mojej pracy było wykazanie zmian zawartości 1-<sup>14</sup>C-glicyny rozpuszczalnej i związanej w komórkach raka Ehrlicha po dodaniu aminokwasów o różnej strukturze i własnościach, amin, acetylowych pochodnych i fosfoseryny oraz porównanie roli struktury badanych substancji.

**CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA**

**I. Materiał**

**Комórki nowotworowe**

Do badań użyto myszy białych, szczepu A-Strong, płci obojga, w wieku 2—3 mies., o wadze 20—25 g. Komórki raka Ehrlicha uzyskano z Zakładu Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Lublinie. Do przeszczepiania pobierano 0,2 ml płynu wysiękowego. Po 8 dniach rozwoju nowotworu myszy zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego, a pobrany płyn wysiękowy umieszczano w łaźni z lodem.

## Przygotowanie zawiesiny komórek RWE (RWE: komórki raka wysiękowego Ehrlicha)

Otrzymany płyn wysiękowy rozcieńczano 20-krotnie zimnym ( $0^{\circ}\text{C}$ ) 0,9% NaCl i wirowano w wirówce chłodzonej przy 3000 obrotów/min. Przemycanie powtórzono celem usunięcia supernatantu i krwinek czerwonych. Następnie zmierzono objętość komórek RWE przez wirowanie ich w próbówce kalibrowanej w ciągu 5 minut przy 3000 obrotów/min. Upakowane komórki rozcieńczano 12-krotnie zimnym płynem KRP (płyn KRP: płyn Krebsa-Ringera zbuforowany fosforanem do pH 7,4). 2 ml tej zawiesiny dodawano do 6 ml inkubacyjnego środowiska.

## Substancje stosowane do badań

Glicyna radioaktywna (C-14), produkcji radzieckiej, piętnowana w grupie karboksylowej, otrzymywana z Instytutu Badań Jądrowych w Warszawie. Próbkę glicyny rozpuszczano w 0,9% NaCl i rozcieńczano nieradioaktywną glicyną w ten sposób, aby w 0,2 ml próbki pobieranej do inkubacji znajdowało się 16  $\mu\text{moli}$  glicyny. Aktywność tak przygotowanego roztworu wynosiła  $5.10^5$  imp/min/ml.

## Aminokwasy i ich pochodne

1. Aminokwasy (DL): glicyna (J. D. Riedel), alanina (BDH), leucyna (Fluka), norleucyna (Light), seryna (Schuchardt), cysteina HCl (import Francja), kwas glutaminowy (Fluka), lizyna (import USA), fenylalanina (ch. cz. Gliwice), tryptofan (import Anglia).

2. Aminy: cysteamina (dar z Anglii), tryptamina HCl (Light).

3. Acetylowe pochodne: acetyloalanina, kwas acetyloglutaminowy — otrzymane syntetycznie przez dr E. Gąsiora w Katedrze Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie.

4. Ester fosforowy seryny otrzymany syntetycznie przez mgr J. Zająca w tymże Zakładzie.

## II Metody analityczne

Pomiaru radioaktywności próbek dokonywano przy pomocy licznika Geigera-Millera, typ AAH o grubości okienka  $1,5 \text{ mg/cm}^2$ . Wydajność licznika 5%. Aktywność próbek określano w suchej warstwie. Oznaczanie białka przeprowadzano wg metody Lowry i wsp. (15). Próbki roztworu w kwasie mrówkowym rozcieńczano 45 razy wodą destylowaną i zobojętniano 1 N NaOH. Do oznaczenia pobierano 1 ml tak przygotowanego roztworu. Dalszy tok postępowania jak w opisie metody (15). Absorbencję świetlną odczytywano w fotokolorymetrze Havemanna stosując filtr 665.

## Odczynniki stosowane do badań z inkubacją

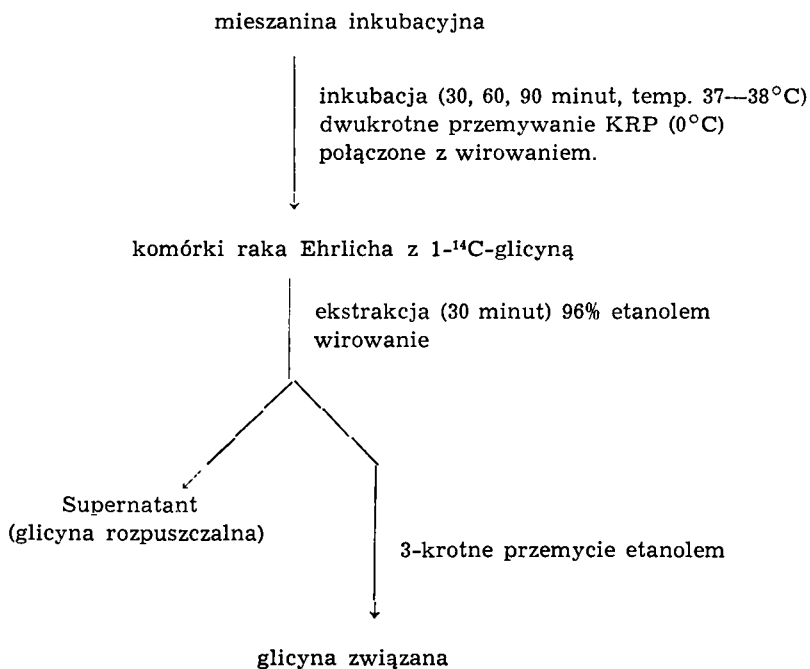
0,9% NaCl; płyn Krebsa-Ringera; 145 mM NaCl; 5,8 mM KCl; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; bufor fosforanowy pH 7,4; 0,11 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,11 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; płyn Krebsa-Ringera zbuforowany moderatorem fosforanowym do pH 7,4; 10 mM glukoza; 2 mM  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glicyna; 5 mM roztwory aminokwasów i ich pochodnych; 96% alkohol etylowy; kwas mrówkowy stężony.

## Technika inkubacji

Doświadczenia prowadzono wg Johnstone i Scholefielda (14) z nieznaczną modyfikacją — osad pozostały po etanolowej ekstrakcji komórek RWE rozpuszczano w stężonym kwasie mrówkowym.

Środowiskiem inkubacyjnym był płyn Krebsa-Ringera buforowany fosforanem o pH 7,4. Mieszanina inkubacyjna składała się z 2 ml zawiesiny komórkowej, 16  $\mu\text{moli}$   $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glicyny (ok.  $10^5$  imp), 40  $\mu\text{moli}$  aminokwasu lub jego pochodnej. Końcowa objętość wynosiła 8 ml.

## SCHEMAT DOŚWIADCZENIA



Mieszaninę wytrząsano w erlenmeyerkach o objętości 25 ml (ilość wychyleń 120/min.), przy 37—38°C (termostat wodny). Aminokwasy lub ich pochodne dodawano w ilości 40  $\mu$ moli (rozpuszczone w 0,1 ml KRP). Związki trudno rozpuszczalne dodawano w stanie stałym. Inkubacja trwała 90 minut. Na początku doświadczenia dodawano 16  $\mu$ moli glicyny radioaktywnej i inkubowano 30 minut. Następnie dodawano aminokwasy lub ich pochodne i inkubowano przez dalsze 30 minut. Po 60 minutach inkubacji dodawano 40  $\mu$ moli glukozy (rozpuszczone w 0,05 ml KRP) i inkubowano znowu 30 minut. Po każdym 30-minutowym okresie inkubacji pobierano z poszczególnych erlenmeyerok po 2 ml zawiesiny inkubacyjnej do oznaczenia glicyny „rozpuszczalnej” i „związanej”.

Glicyna rozpuszczalna w alkoholu („glicyna rozpuszczalna”: termin ten określa wolną glicynę i jej metabolity rozpuszczalne w etanolu). Pobrane 2 ml próbki dodawano do 3 ml zimnego (0°C) KRP i wirowano przy 3000 obrotów/min. w wirówce chłodzonej. Osad komórkowy odmywano ponownie 5 ml zimnego KRP. Ekstrakcję komórek etanolem i pomiar radioaktywności glicyny rozpuszczalnej przeprowadzano wg Johnstone i Scholefielda (14). Uzyskaną ilość impulsów przeliczano na 1 ml upakowanych komórek.

Glicyna związana („glicyna związana”) stanowi glicynę i jej metabolity związane z frakcją stałą; w tym część zinkorporowana do białka komórek RWE. Charakteryzuje się brakiem rozpuszczalności w etanolu. Pozostały osad komórkowy rozpuszczano w 1 ml stężonego kwasu mrówkowego. Otrzymane roztwory służyły do oznaczenia białka i pomiaru radioaktywności tzw. „glicyny związanej”. Ilość impulsów przeliczano na 1 mg białka. Wyliczoną ilość impulsów  $^{14}\text{C}$ -glicyny rozpuszczalnej i związanej wyrażono w procentach. Próbę kontrolną stanowiła próbka inkubowana tylko z glicyną, której ilość impulsów przyjęto za 100%.

### III Wyniki

Przebadano wpływ szeregu aminokwasów, amin, acetylowych pochodnych i fosfoseryny na zawartość glicyny rozpuszczalnej i związanej w komórkach raka Ehrlicha. Uzyskane wartości przedstawione są w tab. 1. Stanowią one średnie 5 analogicznych pomiarów.

Jak widać z tabeli po wprowadzeniu obojętnych aminokwasów do środowiska inkubacyjnego obserwuje się największy wpływ glicyny z komórek RWE w obecności cysteiny, alaniny, seryny i metioniny. W tych samych warunkach inkubacji norleucyna i metionina nie wykazują żadnego wpływu na inkorporację glicyny do frakcji nierozpuszczalnej. Należy podkreślić, że fosfoseryna nie wywierała działania na

zawartość glicyny rozpuszczalnej, ale nieznacznie obniżała jej inkorporację. Acetyloalanina wywiera niewielki wpływ na zawartość glicyny rozpuszczalnej — wyraźny dopiero po godzinie inkubacji. Dodany kwas glutaminowy powodował niewielkie obniżenie glicyny rozpuszczalnej w komórce, a nie wykazywał żadnego wpływu na jej inkorporację. Obecność kwasu acetyloglutaminowego w środowisku zewnętrznym nie zmieniała zawartości glicyny komórkowej rozpuszczalnej i związanej. Podobne działanie wykazywała lizyna.

Tab. 1. Wpływ dodawanych związków na zawartość glicyny w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha

Effect of various compounds on the content of glycine in Ehrlich ascites cells

Dodawany związek	% glicyny rozpuszczalnej		% glicyny związanej	
	Czas inkubacji w min.			
	30	60	30	60
Alanina	45,4	39,4	90,7	79,1
Leucyna	77,3	89,8	85,7	85,6
Norleucyna	68,2	70,3	99,3	99,2
Seryna	50,6	46,1	81,7	58,5
Fosfoseryna	96,3	97,2	96,0	85,1
Cysteina	42,2	25,8	60,2	48,8
Metionina	48,6	38,9	99,7	96,4
Acetyloalanina	98,6	93,8	94,8	89,9
Kwas glutaminowy	94,6	89,9	97,8	98,8
Kwas acetyloglutaminowy	92,6	101,5	93,8	97,9
Fenylalanina	92,8	105,5	97,4	81,3
Tryptofan	97,3	95,0	90,3	95,3
Lizyna	97,5	97,5	96,5	96,5
Cysteamina	85,8	88,3	80,8	68,6
Tryptamina	39,1	31,2	59,5	41,4

Warunki doświadczalne: mieszanina inkubacyjna jak w opisie metody. Inkubacja w temperaturze 37–38°C, warunki aerobowe, preinkubacja z 1-<sup>14</sup>C-glicyną w ciągu 30 minut. Stężenie glicyny i dodawanych związków podano w tekście. Liczbę impulsów na minutę prób kontrolnych przyjęto za 100%

Experimental conditions: incubation mixture as described under analytical methods. Aerobic conditions, temperature 37–38°C, preincubation with 1-<sup>14</sup>C-glycine during 30 minutes. Concentration of both glycine and added compounds is given in the text. Counts per minute of control samples taken as 100%

Fenylalanina obecna w środowisku inkubacyjnym wpływa w niewielkim stopniu na zawartość glicyny komórkowej, natomiast tryptofan nie wykazuje żadnego działania na frakcję rozpuszczalną i związaną glicyny komórkowej. Cysteamina wykazywała mniejsze działanie na zawartość glicyny komórkowej niż tryptamina.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Dość wcześnie zaobserwowano, że komórki raka Ehrlicha akumulują glicynę w stężeniu 12-krotnie większym w porównaniu ze środowiskiem otaczającym (5). Zdaniem Zbarskiego i Pieriewoszczykowej (21) maksimum koncentracji glicyny piętnowanej w komórkach raka Ehrlicha osiąga się po upływie 15—30 minut inkubacji; Christensen uważa, że do osiągnięcia stanu równowagi wystarczy 15 minut (2). Zmniejszenie akumulacji glicyny uzyskano przez dodanie do środowiska inkubacyjnego innych aminokwasów (8, 1, 14). A badomi Scholefield oraz Johnstone i Scholefield wykazali, że transport glicyny najbardziej hamują aminokwasy obojętne, podczas gdy aminokwasy kwaśne i zasadowe wykazywały niewielkie lub żadne działanie (1, 14).

Przeprowadzone w mojej pracy doświadczenia wskazują, że wprowadzenie do podłoża inkubacyjnego aminokwasów strukturalnie spokrewnionych z glicyną (alanina, seryna, cysteina) powoduje po 30 minutach inkubacji ustalenie zawartości glicyny wewnątrzkomórkowej na poziomie 40—50% niższym od jej początkowej zawartości. Johnstone i Scholefield w podobnych warunkach doświadczalnych wykazali, że największy wypływ glicyny z komórki raka Ehrlicha zachodzi w obecności aminokwasów zbliżonych budową do glicyny (14).

Dodanie glukozy i dalsza inkubacja tylko w niewielkim stopniu wpływa na zmniejszenie frakcji glicyny rozpuszczalnej. Wyjątek stanowi cysteina, która w obecności glukozy stymuluje zarówno wydalenie glicyny z komórek RWE, jak i hamuje inkorporację glicyny. Obecność metioniny w środowisku inkubacyjnym zmniejsza wewnątrzkomórkową zawartość glicyny w tym samym stopniu jak alanina i seryna, jednakże w mniejszym stopniu oddziaływa na zmniejszenie glicyny inkorporowanej.

Wpływ zbliżony do cysteiny wykazuje tryptamina. Zasługuje na uwagę, że tryptofan w tych samych warunkach niemal nie ujawnia wpływu. Ciekawe, że cysteamina w przeciwieństwie do cysteiny w niewielkim stopniu oddziaływa na zmianę zawartości glicyny rozpuszczalnej, jakkolwiek stosunkowo intensywniej hamuje inkorporację glicyny. Gdyby do uruchomienia dyfuzji wymiennej niezbędne było zachowanie grupy karboksylowej to wpływ tryptaminy zaprzeczałby takiemu twierdzeniu. Na marginesie przytoczonych wyników należy zauważyć, że Riggs i wsp. (18) zaobserwowali większe pobieranie ze środowiska zewnętrznego tryptofanu niż tryptaminy przez komórki RWE.

Kwas glutaminowy, lizyna, fenyloalanina i tryptofan nie mają większego wpływu na wymianę glicyny rozpuszczalnej.

Wpływ pochodnych acetylowych badanych aminokwasów na wewnątrzkomórkową glicynę rozpuszczalną daje się wyraźnie zauważyć

tylko na przykładzie acetyloalaniny: związanie grupy aminowej przez resztę acetylową znosi możliwość wymiany wewnątrzkomórkowej alaniny z glicyną wnętrza komórki. Interesującym jest fakt, że estryfikacja seryny kwasem fosforowym znosi powinowactwo tego aminokwasu do nośnika transportującego glicynę. We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach stopień obniżenia zawartości glicyny związanej pod wpływem dodawanych związków był mniejszy niż stopień obniżenia frakcji glicyny rozpuszczalnej. Jeżeli dodatek glukozy nie wywiera wyraźniejszego wpływu na dynamikę wymiany glicyny rozpuszczalnej, to jej wpływ na zawartość glicyny związanej jest znaczny. Badane substancje zmniejszały zawartość glicyny związanej w porównaniu z próbą kontrolną w następującej kolejności: tryptamina — 41%, cysteina — 48%, seryna — 58%, cysteamina — 69%, alanina — 79%, fenyloalanina — 79%, acetyloalanina — 79%, leucyna — 85%, fosfoseryna — 85%, pozostałe substancje nie wywierały żadnego działania. Jak widać mechanizm regulacji składu wewnątrzkomórkowej puli wolnych aminokwasów, mimo gromadzących się stopniowo faktów, doświadczalnych pozostaje jeszcze niewyjaśniony.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Abadom P. N., Scholefield P. G.: *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, **40**, 1591—1602, 1962.
2. Christensen H. N.: *Symposium of Amino Acids Metabolism*, Baltimore 1955, s. 63—70.
3. Christensen H. N.: *Perspect. Biol. and Med.*, **2**, 228—242, 1959.
4. Christensen H. N.: *Symposia CSAV*, Praha 1961, s. 465—510.
5. Christensen H. N., Riggs T. R.: *J. Biol. Chem.*, **194**, 57—68, 1952.
6. Christensen H. N., Riggs T. R., Ray N. E.: *J. Biol. Chem.*, **194**, 41—51, 1952.
7. Christensen H. N., Riggs T. R., Fisher H.: *J. Biol. Chem.*, **198**, 1—16, 1952.
8. Christensen H. N., Streicher J. A.: *Arch. Biochem.*, **23**, 96—105, 1949.
9. Harris E. J.: *Transport and Accumulation in Biological System*, London Butherworth Scientific Publications, 1956, s. 1—15.
10. Heinz E.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 781—790, 1954.
11. Heinz E., Mariani H. A.: *J. Biol. Chem.*, **228**, 97—111, 1957.
12. Heinz E., Patlak C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 324—340, 1960.
13. Heinz E., Walsch P. M.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1488—1493, 1958.
14. Johnstone R. M., Scholefield P. G.: *Cancer Res.*, **19**, 1140—1149, 1959.
15. Lowry O. H., Rosenbrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
16. Paine C. M., Heinz E.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 1080—1085, 1960.
17. Pieriewoszczykowa K. A.: *Biochimia*, **26**, 366—372, 1961.
18. Riggs T. R., Coyne B. A., Christensen H. N.: *J. Biol. Chem.*, **209**, 395—411, 1954.
19. Scholefield P. G.: *Canad. J. Biochem. Biophys.*, **39**, 1717—1735, 1960.

20. Ussing H. H.: *Metabolic Aspects of Transfer across Cell Membrane*, The University of Wisconsin Press, 1959, s. 39.
21. Zbarskij I. W., Pieriewoszczykowa K. A.: *Biochimia* 25, 808—813, 1960.

Pracę otrzymano 5 III 1965.

### РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние разных аминокислот и их производных на содержание растворимого и связанного  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицина, находящегося в равновесии в клетках асцитного рака Эрлиха мышей.

Отмечено при этом значительное снижение содержания клеточного глицина после добавления следующих аминокислот: цистеина, аланина, серина, метионина, норлейцина и лейцина. Самое большое удаление глицина из клетки вызывал цистеин.

Триптофан, фенилаланин, глютаминовая кислота, лизин, ацетилаланин, ацетилглютаминовая кислота и фосфосерин не имели никакого или имели незначительное влияние на уровень клеточного глицина.

Эффект действия цистамина в сравнении с цистеином был меньший, а триптамин вызывал большее вытекание глицина, чем триптофан.

Табл. 1. Влияние различных веществ на количество глицина в клетках асцитного рака Эрлиха мышей. Условия эксперимента: Смесь всех реактивов описана в методике. Инкубировано при температуре  $37\text{--}38^\circ\text{C}$ , в аэробных условиях; предварительная инкубация с  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицином продолжалась 30 минут. Количество глицина и других веществ описано в тексте. Количество импульсов в минуте в контрольных пробах принято за 100%.

### SUMMARY

The author studies the influence of various amino acids and their derivatives on the content of soluble and bound  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glycine, in a state of equilibrium in ascites tumour cells. A considerable decrease in the content of cell glycine was stated following the addition of such amino acids as cysteine, alanine, serine, methionine, norleucine, and leucine. The greatest efflux of glycine from the cells was caused by cysteine. Tryptophan, phenylalanine, glutamic acid, lysine, acetyloalanine, acetylo-glutamic acid, phosphoserine had no, or only a slight, effect on the level of cell glycine. The influence of cysteamine in comparison with that of cysteine was weaker. However, tryptamine caused a higher efflux of glycine than tryptophan.