

**ANTİBİYOTİKLERDEN AKTİNOMİSİN D (Akt D) NİN
ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Uzm. Dr. Belkıs GÖZEN*
Dr. Güneş YÜREGİR**

Ö Z E T :

Bir protein sentezi inhibitörü olan Akt D nin civciv alkalen fosfatazı (AF) üzerine olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada önce embriyo halinde civcivlere 0.2 µg tek doz antibiyotik uygulanmış, 21. gün sonunda yumurtadan çıkan civcivlerin vücut ağırlıkları, karaciğer (KC) yaş doku ağırlıkları, protein muhtevaları, KC dokusu AF enzim düzeyleri ölçülmüş ve bu değerler serum fizyolojik zerkedilmiş kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Neticede 0.2 µg düzeyinde Akt D nin civciv AF ları üzerinde etkili olduğu ve spesifik aktiviteleri önemli derecede arttırmış olduğu gözlenmiştir $p < 0.001$.

S U M M A R Y :

Effects of Actinomycin D (Akt D) on Alkaline Phosphatase (Alp) Enzyme

Alkaline phosphatases occur in various forms in different tissues. Akt D is an antibiotic useful in several types of biological investigation.

In this paper the effects of Akt D on the chicks embriyos were presented. 0.2 µg single dose was administred to seven days old chick embriyos. After hatching the chick livers were removed and homogenized in bütanol. ALP activity, protein levels were determined in homogenates. Controls were prepared by administrating saline solution.

(*) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Asistanı.

(**) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Profesörü.

The specific activities were higher than control groups. And the differences were found significant. $p < 0.001$.

AF lar alkali ortamlarda fosfomonoesterleri parçalayarak, fosfor açığa çıkaran enzimlerdir. Enzim kemik, KC, böbrek bağırsak, plasenta ve lokositlerde oldukça fazla bulunmaktadır (17). Bazı antibiyotiklerin AF enzimi üzerine olan etkisinin incelenmesi ile çok değişik sonuçlar ortaya çıkmış bulunmaktadır. Yamada ve Clark Akt D nin protein sentezi üzerine olan inhibitör etkisinin kullanılan doza bağlı olduğunu, sıçan jejenumunda vücut ağırlığı başına 1 - 1.5 µg dozda uygulanan Akt D nin sentezde inhibisyon, 0.25 µg dozda Akt D nin ise protein sentezinde artma yaptığını ileri sürmüşlerdir (24).

Grey ve Moog 16 günlük civciv embriyosuna uyguladıkları 5 µg dozda Akt D nin AF aktivitesini normallere nazaran 2 - 3 misli arttırdığını gözlemişler, bu artışı AF ın bir formdan başka bir forma geçişini frenleyen bir repressör proteinin sentezinin inhibisyonuna bağlamışlardır (8).

Pastan ve arkadaşları 0.5 µg dozda Akt D etkisinde civciv embriyo fibroblastlarında, protein sentezinin yanısıra, fosfolipid sentezinin azaldığını gözlemişler, Akt D nin muhtemelen membran oluşumunu önlediğini veya fosfolipid sentezi için gerekli enzimlerin inhibe edilebileceğini düşünmüşlerdir (19).

Şimdiye kadar elde edilen bu bilgilerin ışığında amacımız : Akt D nin embriyo halinde civcivlere uygulanarak bu antibiyotiğin AF enzimini gerek yapısal, gerek kinetik, gerekse elektroforetik olarak ne şekilde etkilediğinin araştırılması olmuştur.

MATERYAL ve METOD :

Deneyler için Kartaş Tavukçuluk araştırma enstitüsünden sağlanan Y₂ hattı tohumluk yumurtalar kullanıldı. Kuluçkaya yerleştirilen yumurtalar 5. günde yumurta lambasında incelenerek dömlü olup olmadıkları kontrol edildi ve ışık yardımıyla hava boşluğu çizilerek işaretlendi. Kuluçkanın 7. gününde dömlü yumurtaların bir kısmı kontrol olarak ayrıldı. Bunlara % 0.9 luk serum

fizyolojik zerkedildi. Diğer kısmının yumurta sarısına ise belirli dozlarda Akt D zerkedilerek (16) civcivlerin en az yarısının canlı çıkabileceği doz saptandı. Aynı miktar dozda 25 yumurtaya enjeksiyon yapılarak 18 civcivin canlı çıkması sağlandı. 15 kontrolden ise 10 civciv canlı olarak çıktı.

İzolasyon ve ekstraksiyon : Yumurtadan canlı çıkan civcivlerin ağırlıkları saptandı. Daha sonra 5 tanesi (1 i kontrol, 4 ü antibiyotikli) ilerde bir diğer çalışmaya esas olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Diğerleri aynı gün eterle bayıltılıp seri halde KC leri çıkartıldı. Derhal buz üzerine yerleştirilen dokunun yaş doku ağırlıkları saptandı. Doku parçalanarak ağırlığının 10 katı mM Tris - HCl eklenere koda ısısında homojenize edildi. 2 ml homojenat aktivite ve protein tayini için ayrıldı. Sonra ilk kaba homojenata doku ağırlığının 10 misli soğuk n - bütanol eklenip buz üzerinde 10 dakika karıştırıldı. 1500 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Gevşek protein kısmı aspirasyonla alındı. Alttaki berrak bütanol fazı hemen toplandı, hemen kullanılmadığı hallerde -20°C de derin dondurucuda saklandı. Enzim aktivitesi Sigma - PNPP metodu ile ölçüldü (22). 1 Sigma ünitesi belirli deney şartlarında 1 saatlik sürede 1 μM PNP açığa çıkartan enzim aktivitesi olarak verildi. Protein tayininde Lowry metodu kullanıldı (10). Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Antibiyotikli ve antibiyotiksiz civcivlere disk jel elektroforezi, sefadeks jel filtrasyonu ve SDS akrilamid jel elektroforezi uygulandı. Antibiyotiksiz civcivlerin bütanol ekstraktları karışımından 45 ml, antibiyotiklilerden ise 80 ml liyofilize edildi. Liyofilizatın aplike edildiği kolon sefadeks G - 200 ile dolduruldu. Sonra pH : 7.4 Tris - HCl tamponu ile dengelendi. Tripsin, fibrinojen, albumin ve gamma globulin ile kolon kalibre edildi. Eluatlar 3'er ml lik toplanarak enzim aktiviteleri 410 nm de, protein değerleri 280 nm de okundu.

Disk jel elektroforezi için % 7.5 luk jel : (pH : 9.5 0.14 M Tris - Borat) tamponu içerisinde hazırlandı. Tampon ayrıca 0.5 mM MgCl_2 ihtiva etmekte idi. Reservar tampon ise (0.05 M Tris - Borat) tamponu idi. pH sı 9.5 olup içerisinde 2mM MgCl_2 ve 5mM NaCl ihtiva etmekteydi. Direk bütanol ekstraktları eşit hacimde % 30 luk sukroz ile karıştırılarak karışımından 100 μl otomatik pipetle aplike edildi (1). 200 voltta soğuk odada 3 saat elektroforeze de-

vam edildi. AF bantlarının tesbiti, jellerin substrat olarak alfa naptol ASMX ile enkübasyonu sonucu açığa çıkan bantların Fast Blue RR ile boyanması ile gerçekleştirildi. Glikoproteinleri boyamak için Pas (periyodik asit Schiff boyası kullanıldı) (20). Protein bantları Commasie Brillant Blue ile boyandı.

SDS akril amid jel elektroforezi : AF enziminin diğer standart proteinlerle mobilitesinin karşılaştırılması, dolayısıyla molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinmek için kullanıldı (23). % 7.5 luk jel % 0.2 SDS ihtiva eden 0.2 M fosfat tamponu içinde hazırlandı. Reservar tampon ise yukarda bahsedilen tamponun 1/2 sulandırılmasıyla elde edildi. Örnekler 1/1 oranında numune tamponuyla karıştırılıp üzerlerine birkaç damla gliserol ilave edildi. Numune tamponu : (1 ml % 10 SDS, 50 ml 0.2 M fosfat tamponu 2 ml β merkaptto etanol, 10 ml gliserol, 2 mg brom fenol blue, 17 ml arık su karışımı olarak hazırlandı). Kaynar suda 10 dakika bekletildi. Soğuduktan sonra 100 μ l lik miktarlarda applike edildi. Tüp başına 8 mA olmak üzere elektroforeze 8 saat oda ısısında devam edildi. Süre sonunda jeller tüpten çıkarılıp protein boyası Commasie Brillant Blue ile boyandı.

Bütanol ekstrelerinin Fishman ve Ghosh metoduna göre ısıya dayanıklılıkları ölçüldü. Homojenat örnekleri her tüpte 0.5 ml olacak şekilde 6 ayrı tüpe paylaştırıldı. Aynı anda 56°C ye ayarlanmış su banyosuna daldırılarak kronometre çalıştırıldı. Örnekler sırasıyla 5, 10, 15, 20, 25 ve 60 dakika enkube edilerek süreleri dolan tüpler sırasıyla buz banyosuna alındılar (5). Bütün tüpler soğuduktan sonra tüplerdeki artık enzim aktiviteleri saptandı.

Enzim aktivitesine bazı inhibitör ve aktivatör maddelerin etkisini saptamak için enkübasyon ortamlarına 5 mM EDTA, 0.4 mM ZnSO₄, 10 mM KCN 10 mM fenil alanin katıldı.

Michaelis —Menten sabitleri için çeşitli substrat konsantrasyonlarında Lineveaver— Burk (1/s e karşı 1/v eğrileri çizildi).

B U L G U L A R :

Normal ve antibiyotikli civcivlerin ilk kaba homojenatlarında ve bütanol ekstrelerinde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aşağıdadır.

1. Normal ve antibiyotikli civcivlerin ilk kaba homojenatlarında ve bütanol ekstralarında elde edilen değerler tablo 1 ve tablo 2 de gösterilmiştir.

TABLO 1 : NORMAL CİVCİVLERİN AKTİVİTE VE PROTEİN DÜZEYLERİ (KC DOKUSUNDA)

Sıra No.	İlk Homojenat			Bütanol Ekstresi		
	Aktivite (Ü/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Akt. (Ü/ml)	Aktivite (Ü/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Akt. (Ü/mg P)
1	20.4	4.6	4.43	22.8	1.83	12.45
2	19.5	3.54	5.50	22.8	1.76	12.9
3	18.0	--	—	56	—	—
4	14	3.2	4.37	27	1.66	16.2
5	9	2.45	3.67	18	0.5	36
6	9	2.56	3.51	15	0.65	23
7	9	2.27	3.96	15	0.56	26
8	9	2.33	3.86	12	0.82	14.6
\bar{x} : 13.48		\bar{x} : 2.99	\bar{x} : 4.18	\bar{x} : 23.57	\bar{x} : 1.11	\bar{x} : 20.16
SD : 5.14		SD : 0.85	SD : 0.67	SD : 14.02	SD : 0.6	SD : 8.67

2. Akt D li civcivlerle normal civcivler ağırlık yönünden fark göstermemişlerdir ($p < 0.05$). Antibiyotikli civcivlerin KC ağırlıkları ise önemli derecede azalmıştır ($p < 0.005$).

3. Protein düzeyleri antibiyotikli civcivde önemli derecede azalmıştır ($p < 0.005$).

4. Spesifik aktivite değerleri antibiyotikli civcivde artmıştır ($p < 0.001$).

5. Sefadex jel filtrasyonda normal civcivlerde 5 pik Akt D lilerde 4 pik gözlenmiştir (Şekil 1). Her ikisinde de ortak olan ana pikin moleküler ağırlığı 70.000 olarak saptanmıştır.

TABLO 2 : ANTİBİYOTİKLİ CİVCİVLERDE SAPTANAN AKTİVİTE VE PROTEİN DÜZEYLERİ (KC Dokusunda)

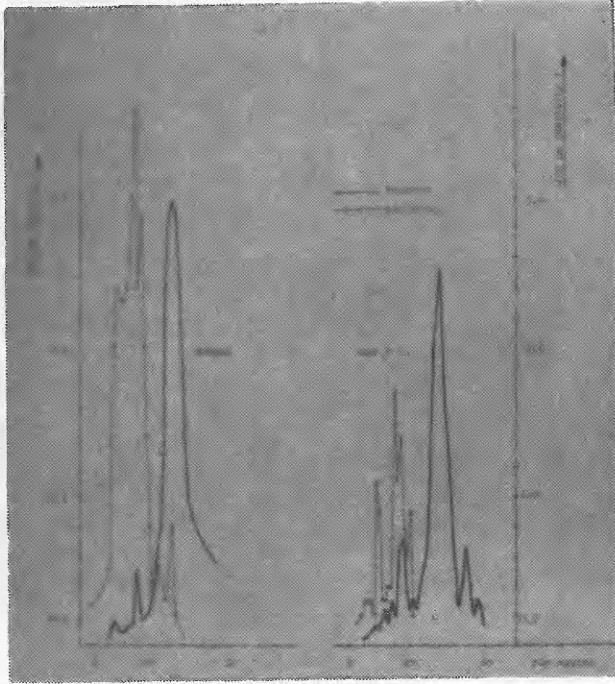
Sıra No.	İlk Homojenat			Bütanol Ekstresi		
	Aktivite (Ü/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Akt. (Ü/mg P)	Aktivite (Ü/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Akt. (Ü/mg P)
1	11	2.3	4.78	20	0.49	40.8
2	11.5	1.15	10	11	0.16	68.7
3	15.6	1.66	9.39	14	0.18	77.7
4	8	0.69	4.34	11	0.15	73.3
5	10	1.05	9.52	11	0.44	28
6	11	1.16	9.48	27.5	0.33	88.3
7	8	1.11	7.20	8	0.12	66.6
8	18	1.77	10.6	10	0.24	41.6
9	11	1.8	6.6	9	0.31	29.3
10	6	1.02	5.88	6.2	0.15	41.3
11	16	1.39	11.5	15.9	0.35	45.4
12	8	1.51	5.29	11	0.3	36.6
13	9	2.56	3.51	12.0	0.17	70.5
14	9	1.83	5.88	11	0.16	68.75
	\bar{x} : 10.86 SD : 3.46	\bar{x} : 1.5 SD : 0.52	\bar{x} : 7.38 SD : 2.61	\bar{x} : 12.68 SD : 5.43	\bar{x} : 0.25 SD : 0.11	\bar{x} : 55.13 SD : 19.19

\bar{x} : Ortalama değer
SD : Standart sapma

6. Disk jel elektroforezinde aralarında fark gözlenmemiştir. (Resim : 1).

7. SDS poli akril amid jel elektroforezinde molekül ağırlığı 70.000 olarak gözlenmiştir.

8. Isı inaktivasyon sonuçları grafikte gösterilmiştir. Antibiyotikli civcivin daha fazla aktivite kaybettiği göze çarpmıştır (Şekil : 2).



Şekil 1 : Antibiyotikli ve normal civcivlerin sefadeks jel filtrasyonu sonuçları.

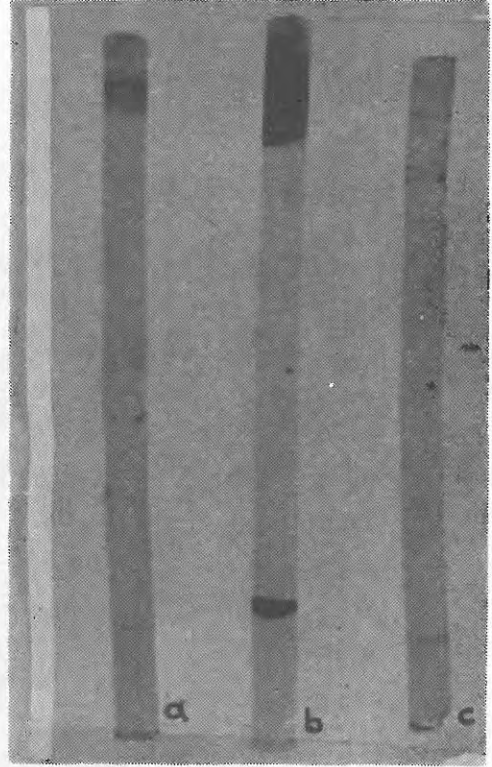
9. Normal ve Antibiyotikli civcivlerin bütanol estrelerinde gözlenen Km değerleri normal için 20×10^{-3} M, antibiyotikli için 40×10^{-3} M olarak tesbit edilmiştir (Şekil : 3), (Şekil : 4).

10. Enzim aktivitesi üzerine bazı maddelerin inhibitör ve aktivatör etkileri (Tablo 3) te gösterilmiştir.

TABLO : 3 AF ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİ EDEN AKTİVATÖR VE İNHİBİTÖR MADDELER :

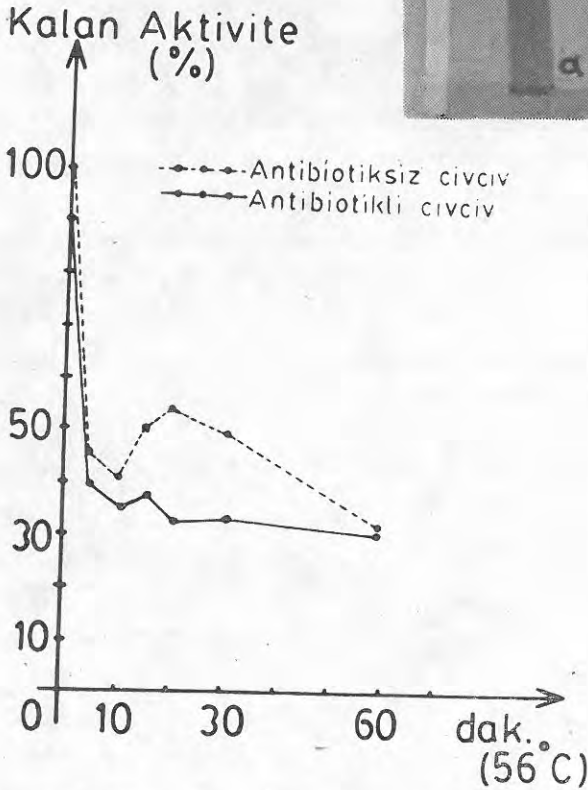
	0.4 mM ZnSO ₄	5 mM EDTA	10 mM KCN	10 mM Fenil Alanin
Antibiyotikli Civciv (Bütanol ekstresi)	5.14*	5.88	169.1	51.4
Normal civciv Bütanol Ekstresi	6.45	3.22	109.6	48.3

(*) Rakamlar başlangıç aktivitesinin % desini olarak geriye kalan aktiviteleri gösterilmektedir.

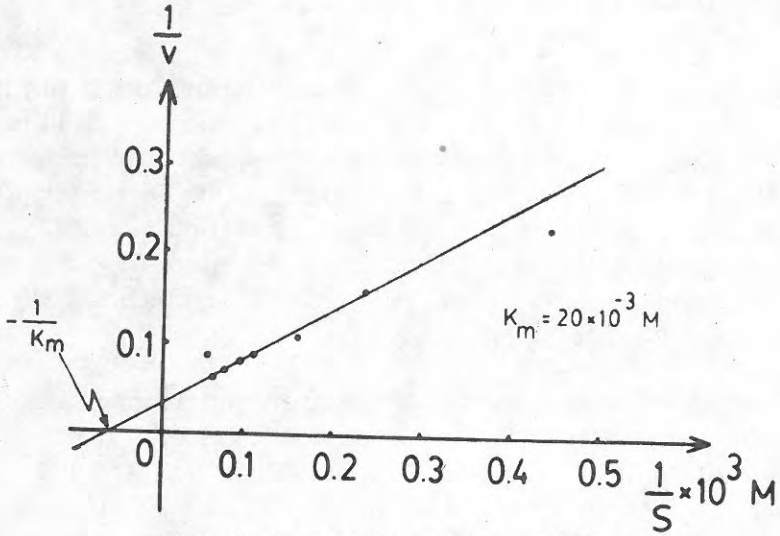


Resim : 1

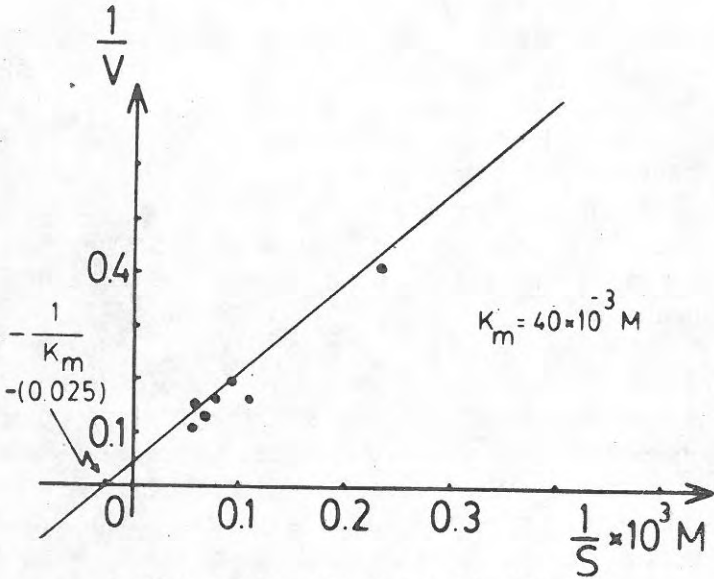
Disk jel elektroforezi sonuçları a) Enzimotik olarak AF enziminin tesbiti, b) Commasie Brillant Blure ile protein bantlarının tesbiti, c) Glikoprotein bantlarının tesbiti.



Şekil 2 : Antibiyotikli ve normal civcivlerin ısı inaktivasyonu sonuçları.



Şekil 3 : Normal cıvıcın K_m değeri



Şekil 4 : Antibiyotikli cıvıcın K_m değeri

TARTIŞMA VE SONUÇ :

İlk olarak 1885 yılında tanımlanan AF enzimleri o tarihten bu yana çok çeşitli araştırmalara konu olmuşlardır. Akt D nin hücre AF na olan etkileri değişik çalışmalarla yayınlanmış bulunmaktadır (2, 8, 18, 19, 24). Öte yandan AF in çeşitli steroid hormonlarla indükte edilebildiği ve Akt D nin steroid hormon seviyelerini yükseltebildiği çeşitli yayınlarla açıklanmış bulunmaktadır (3, 7, 9, 14, 15, 21). Çalışmamızda civcivlerin embriyo halinde 7. günde Akt D verilerek antibiyotığın civciv AF ları üzerinde ne derece etken olduğu incelenmiştir.

Deneyler sonunda bir RNA sentezi inhibitörü olan Akt D nin spesifik aktiviteleri arttırdığı gözlenmiştir. Civcivlerin KC ağırlıklarının da antibiyotik etkisi altında azaldığı göze çarpmıştır. Benzer şekilde Moog farelerde Akt D nin duodenum AF aktivitesini arttırdığını gözlemiştir. Substrat olarak hem fenil fosfatı hem de β -glisero fosfatı kullandığı araştırmasında enzim aktivitesindeki artışa sebep olarak enzimin fenil fosfatı hidroliz edebilme kapasitesinin yükseldiğini (yani fenil fosfat/ β -glisero fosfat) oranının arttığını gözlemiştir (12, 13). Aynı araştırmacı prenatal hayatta 16 günlük civciv embriyosunda 5 μ g Akt D nin benzer şekilde duodenal AF enzimini normallere kıyasla 2, 3 misli arttırdığını, duodenum protein muhtevasını değiştirmedeğini ve herhangi bir gelişme geriliğine sebep olmadığını gözlemiştir (8). Moog yaptığı bu çalışmalar sonucunda AF enzimidaki bu artışın denovo sentezinden ziyade enzimin bir formdan başka bir forma değişmesi sonucu meydana geldiğini ve antibiyotiklerin bu formasyon değişikliğini frenleyen bir repressör proteinin inhibisyonuna sebep olabileceğini ileri sürmüştür.

Garren ve arkadaşları sürrenalileri alınmış erkek sıçanlara 1 mg Akt D zerkederek KC enzimlerindeki değişiklikleri incelemeleri sonucunda induktanla verilen Akt D nin enzim induksiyonunu önlediğini, indüktandan 5 saat sonra verilen Akt D nin ise enzim aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır. Akt D nin RNA sentezini inhibe ettiğini gözlemişlerdir. Bu enzimlere ait m-RNA'nın stabil ve uzun ömürlü olabileceğini repressör moleküllerin ise hızlı bir turnover zamanları olabileceğini ileri sürmüşlerdir (6). Muhtemelen

bizim çalışmamızda da aynı şey meydana gelmiştir. KC ağırlıklarının ve protein muhtevalarının azalmasından da Akt D nin genel olarak protein düzeylerini etkilediği anlaşılmıştır. Sefadeks jel filtrasyonda enzimin elusyon şekilleri farklı çıkmıştır. Fakat her ikisinde de aynı yerde 70.000 molekül ağırlığında bir ana pik gözlenmiştir. Bu rakam SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile de doğrulanmıştır. Disk jel elektroforezinde civcivlerin elektroforetik gücü de değişmemiştir. Enzim 2 ana banta ayrılmış biri orijine yakın kalırken, diğeri 5, 6 cm lik bir mesafe katetmiştir. Bu bantların glikoprotein yapısında oldukları anlaşılmıştır. Enzimin homojen olmayıp iki ana banta ayrıldığı Adeniyi tarafından da gözlenmiştir (1). Bir tek doku içerisinde bile gözlenebilen bu derece belirgin bir heterojenite muhtemelen enzim moleküllerinin modifikasyonu ile meydana gelmektedir.

Aktivatör olarak 0.4 mM ZnSO₄ kullanıldığında AF enziminin aktivite kazandığı çeşitli araştırmacılar tarafından açıklanmıştır (4, 11, 24).

Isı ile denatürasyonda Akt D li civciv AF ı daha fazla aktivite kaybına uğramıştır. Demekki Akt D etkisiyle enzim yapısında Isıya hassas bir bölüm oluşmaktadır. Km değerlerinin farklı bulunması Akt D li ve normal civcivin AF larının kataliz hızlarının farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak, Akt D civciv AF larında bir yapısal değişiklik meydana getirmiş, spesifik aktivitelerin artmasına sebep olmuş ve enzime ait Km değerini yükseltmiştir.

K A Y N A K L A R

- (1) Adeniyi FA, Heaton FW, The effect of Zinc deficiency on alkaline phosphatase and its isoenzymes, Brit. J. Nutr. 43 : 561. 1980.
- (2) Bianchi A, Righetti B, Kaplan MM, Effect of Actinomycin D on Rat liver alkaline phosphatase, Proc. Soc. Exp. Biol and Med. 136 : 491. 1971.
- (3) Cox RP, Maclead CM, Hormonal induction of alkaline phosphatase in human cells in tissue culture, Nature 190 : 85. 1961.

- (4) Debruyne I, Stockx J, Some properties of alkaline phosphatase from the hens egg yolk, Arch. Int. Physiol. Biochim 85 : 1961. 1977.
- (5) Fishman WH, Ghosh NK, isoenzymes of human alkaline phosphatase, Adv. Clin. Chem. 10 : 255. 1967.
- (6) Garren LD, Howell RR, Jomkins GM, A paradoxical effect of actinomycin D : The mechanism of regulation of enzyme synthesis by hydrocortison, Biochemistry 52 : 1121. 1964.
- (7) Ghosh NK, Rukenstein A, Baltimore R, Studies an hormonal induction of alkaline phosphatase in Hela cell cultures. Kinetics, thermodynamics and electrophoretic properties of induced and base level enzymes, Biochim. Biophys. Acta. 286 : 1664. 1972.
- (8) Grey, RD, Moog F, Elevation of alkaline phosphatase activity in the intestine of the chich embriyo by actinomycin D, Nature 211 : 418. 1966.
- (9) Griffin MI, Cox RP, Studies on the mechanism of hormone induction of alkaline phosphatase in human cell cultures, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 56 : 946. 1966.
- (10) Lowry OH, Rosebrough NC, Farr LA, Protein Measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 : 265. 1951.
- (11) Mathies JC, Preparation and properties of highly purified alkaline phosphase from swine kidneys, J. Biol. Chem. 233 : 1121. 1958.
- (12) Moog F, Accelaration of Normal and corticoid Induced Increase of alkaline phosphatase in the duedonum of the nursling mouse by actinomycin D Puromycin, Colchicine and Ethionine, Adv. Enzyme Regulation 3 : 221. 1965.
- (13) Moog, F, The functional differentiation of the small intestine II. The differentiation of alkaline phosphomonoesterase in the duedonum of the mouse, J Exptl. Zool. 118 : 187. 1951.
- (14) Nitowsky HM, Herz F, Hormonal regulation of alkaline phosphatase in dispersed cell cultures, Biochem. Biophys. Res. Commun. 11 : 261. 1966.
- (15) Nose K, Kasuta H, Induction of alkaline phosphatase activity by dibut-ryl adenosine 3'-5' cyclic monophosphate in aneuploid rat liver cells, Exptl. Cell. Research. 87 : 8. 1974.
- (16) Omurtag, CA : Mikrobiyoloji Özel ve genel viroloji. Ankara Fen Matbaası 1973 p. 32.
- (17) Özgüinen, T : Alkalen fosfataz izoenzimlerinin tanı yöntemleri, ihtisas tezi, 1975 Ankara.

- (18) Özgiinen, T. : Hormon enzim etkileşiminin incelenmesinde model olarak notrofil granüllü lokositleri kullanma yöntemi, Doçentlik tezi 1980 Adana.
- (19) Pastan I, Friedman RM, Actinomycin D : Inhibition of phospholipid synthesis in chick embriyo cells, science 160 : 316. 1968.
- (20) Segrest JP, Jackson RL; Molecular weight determination of glycoproteins by poly acrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In Colowick SP, Kapla N.O. (eds) : Methods in enzymology, vol 28, New York Academic press, 1972 p. 54.
- (21) Sela, BA, Sachs L, Alkaline phosphatase activity and the regulation of growth in transformed mammalian cells, J. Cell. Physiol. 83 : 27. 1973.
- (22) Sigma technical bulletin No : 104 Sigma chemical comp. St. Louis, Missouri, USA 1980.
- (23) Weber K, Osborn M, The reliability molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem. 244 : 4406. 1969.
- (24) Yamada, J, Clark AJ, Swendseid ME, Actinomycin D effect on amino acid absorbtion from rat jejunal - Loops, Science 158 : 129. 1967.