

12 1310
P. 939

D90/96

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK



TOM III

1957

ZESZYT 3-4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA

SPIS TREŚCI

Pal Elódi — Über einige mit der Kristalliesierung von Eiweissen zusammenhängende Probleme	241
R. W. Schramm — Chromatografia bibułowa barwików chloroplastów . . .	251
J. Beer — Biosynteza porfiryn	271
I. Geyer - Duszyńska i L. Janota - Bassalik — Wpływ promieniowania na drobnoustroje	289
E. Gąsior i K. Obojska — Przygotowanie ekstraktów bakteryjnych do badań enzymatycznych	309
P. Masłowski — Elektroforeza bibułowa aminokwasów przy zastosowaniu wysokich napięć	335
Wspomnienie pośmiertne	351
SPRAWOZDANIA I RECENZJE	
J. Heller — Sprawozdanie z podróży naukowej do USA	353
J. Krawczyński — Międzynarodowy Kongres Chemii Klinicznej	369
Pięćciolecie Komitetu Biochemicznego PAN	381
IV Sesja Sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego (<i>J. Meduski</i>)	395
VII Krajowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (<i>B. Kozarzewska-Saper</i>)	398
F. M. Burnet — Enzyme, Antigen and Virus (<i>T. Korzybski</i>)	399
KOMUNIKATY	
Międzynarodowa Unia Biochemiczna	401
IV Międzynarodowy Kongres Biochemików	404
Rok Darwinowski w Polsce	404
Konkurs na pracę badawczą z ewolucji organicznej	405

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
K O M I T E T B I O C H E M I C Z N Y

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM III

1957

ZESZYT 3-4

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Józef Heller
Zastępca redaktora nac. — Jerzy Meduski

Adres Redakcji:

INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN
Warszawa, Krak. Przedmieście 26/28, tel. 613-66

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1957

Nakład 824 egz. (741 + 83)	Oddano do składania 8.X.57.
Ark. wyd. 13,5. Ark. druk. 10,5.	Podpisano do druku 21.I.58.
Papier druk. sat. kl. V. 70 g, 70×100	Druk ukończono w styczniu 1958.
Cena zł 40.—	Zam. 1825c/57. B-22

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

PÁL ELÓDI

Über einige mit der Kristallisierung von Eiweissen Zusammenhängende Probleme*

Die Kristallisierung bietet die Möglichkeit Substanzen in reinem Zustand zu gewinnen. Die Kristallisierung und ihre Methoden ergeben, obwohl es sich um chemisches Verfahren handelt, im Zusammenhang mit den Eiweissen auch in biologischer Hinsicht beachtenswerte Tatsachen.

Die Bedeutung der kristallinen Eiweisse ist vom biologischen Gesichtspunkt zweifelhaft, da ja Eiweiss in kristallinem Zustand im Organismus nur vereinzelt vorkommt, wie z.B. das in pflanzlichen Kernen, im Aleuron anzutreffenden sog. Kristalloid oder das in gewissen Anämiefällen sich in den roten Blutkörperchen kristallisierende reduzierte Hämoglobin. Deshalb will ich mich im weiteren mit einigen Eigentümlichkeiten des durch Anwendung verschiedener Isolierungsverfahren gewonnenen, im kristallinen Zustand befindlichen Eiweisses beschäftigen.

Die Herstellung von Eiweissen in kristallinem Zustand gelangt zuerst Hoffmeister im Jahre 1889, als er Eieralbumin aus Hühnereiweiss isolierte. Seither kennen wir mehr als hundert auf diese Weise herstellbare Eiweisse.

Die zur Kristallisierung von Eiweissen angewandten Methoden stimmen sämtlich darin überein, dass die Kristallisation durch die Dehydrationswirkung erfolgt. Die Dehydratation lässt sich durch Salzlösungen verschiedener Konzentration, mit wasserlöslichen Lösungsmitteln (Alkohol, Azeton usw.) oder durch Einstellung des isoelektrischen pH erreichen. Nach unseren bisherigen Kenntnissen sind die Kristallisierungsbedingungen verschieden. Bei einer gegebenen Salz- und Lösungsmittelkonzentration sowie einem bestimmten pH lässt sich im allgemeinen nur ein gewisses Eiweiss kristallin herstellen. Mit anderen Worten: die Qualität des herstellbaren Eiweisses wird durch das Verfahren bestimmt. Wenn das Eiweiss in kristallinem Zustand hergestellt werden kann, ist demnach auch seine Identifizierung leichter.

* Biochemisches Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest.

Ein anderer Vorteil der Kristallisierung bei den Eiweissuntersuchungen besteht darin, dass die Eiweisse nur in nativem Zustand kristallisiert werden. Das kristalline Eiweiss bietet demnach gleichzeitig die Gewähr dafür, dass die Denaturierung im Laufe des Verfahrens vermieden werden konnte.

Bei den chemischen Verfahren wendet man die Kristallisierung zur Herstellung fester Substanzen in möglichst reinem Zustand an. Durch mehrmalige Umkristallisierung kann ein beträchtlicher Teil der Substanzen von den sie verunreinigenden Begleitkomponenten befreit werden. Auch bei einem Teil der Eiweisse wird die Reinheit der Präparate durch die Umkristallisierung erhöht; im Hinblick auf die Labilität der Eiweisse besteht indessen nicht in allen Fällen die Möglichkeit der häufigen Umkristallisierung ohne einer mehr oder minder grossen Denaturierung.

Bei der Reinigung der Eiweisse durch Umkristallisation ergibt sich auch noch eine andere Schwierigkeit. Bekanntlich wurden bei gewissen Präparaten z.B. Fermenten, in kristallinen Präparaten verschiedene Fermentaktivitäten beobachtet. So z.B. bei dem Baranowskichen (3) kristallinen Aldolase-Präparat, welches über Glizerophosphat-Dehydrogenase-Aktivität verfügt, ferner bei dem kristallinen Trypsin, das auch Esterase-Aktivität besitzt, während bei der Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (im weiteren PGAD) Transazetylase- (11) und Acetyl-Phosphatase-Funktion (18) nachgewiesen werden kann usw. Zur Deutung der Erscheinung gibt es zwei Möglichkeiten, die beide als gültig zu betrachten sind:

1. Bei einzelnen Eiweissen — Fermenten — muss ein *polyfunktionaler Charakter* angenommen werden, d.h. das gegebene Ferment kann als Katalysator an verschiedenen Reaktionen teilnehmen. Hierzu gehören Trypsin und PGAD.

2. Die Eiweisse können *Mischkristalle* bilden. Gewisse Eiweisse sind kristallographisch als isomorph zu betrachten, so dass infolge der Kristallisierung an der Gestaltung des Kristalls mehrere Eiweisse teilnehmen können. Zu dieser Gruppe gehört z.B. die Baranowskische Aldolase. Die Aldolase lässt sich auch nach einer anderen Methode, nach Taylor und Mitarbeitern (20) herstellen, doch verfügt dieses Präparat nicht über Glizerophosphat-Dehydrogenase-Aktivität. Die erwähnten Probleme hängen mit der Homogenität der Eiweisse zusammen. In den letzten Jahren führten zahlreiche Untersuchungen zu dem Ergebniss, dass wir unsere Auffassung über den klassischen Begriff der Eiweiss-homogenität revidieren müssen. Früher wurde das Eiweiss als homogen angesehen, welches mit Hilfe der Elektrophorese, durch die Ultrazentrifuge oder mit Löslichkeits- bzw. serologischen Methoden untersucht nur eine Komponente enthält. Nach Anwendung der mit der Entwicklung der Biochemie eingeführten neueren Methoden — Ionenaustausch-Chromatographie, Teilungsanalyse (counter

current) usw. — stellte es sich jedoch von zahlreichen derartigen, als klassisch homogen betrachteten Eiweissen heraus, das sie in mehrere Komponenten geteilt werden können.

Bei den im klassischen Sinne als homogen betrachteten Eiweissen sehen wir demnach die Erscheinung der Mikroheterogenität, was zu bedeuten hat, dass die Moleküle eines gegebenen Proteins nur statistisch als identisch angesehen werden und zwischen den Molekülen kleinere oder grössere Unterschiede bestehen können. Die in dieser Hinsicht in der letzten Zeit erzielten Resultate wurden von *Colvin* (4) zusammengefasst.

Laut *Haurowitz* (12) besteht ein Eiweiss nur im idealen Falle aus völlig identischen Molekülen, ebenso wie „Art“ oder „reiner Stamm“ nicht identisch sind, sondern aus Gruppen sehr ähnlicher Individuen bestehen. Er hält es deshalb für zweckmässig, die Homogenität der Eiweisse nicht den klassischen chemischen, sondern biologisch-chemischen Anforderungen entsprechend festzustellen und spricht daher von Protein-Spezies oder Protein-Familien. Die Variation der individuellen Proteine innerhalb der Gruppe steht mit der Biosynthese der Eiweisse im Zusammenhang.

Die Mikroheterogenität lässt sich auch mit kristallographischen Methoden beobachten. *Perutz* und Mitarbeiter (16, 17) hatten festgestellt, dass das reduzierte menschliche Hämoglobin drei einander ähnliche Kristallformen hat. Die drei Modifikationen können auch mit der Röntgendiffraktionsmethode nachgewiesen werden. Von den drei anderen Modifikationen des Hämoglobins, dem Oxy-, Carboxy- und Methämoglobin, kennen wir weitere drei Formen. Nach unseren Beobachtungen (8) tritt die Kombination der am Aufbau der Argininphosphoferase (Abb. 1. a, b), teilnehmenden elementaren Formen (sechseckiges Prisma, Bipyramide und Basisfläche) (Abb. 1. c,) nicht in gleichem Ausmass in Erscheinung; in gewissen Fällen

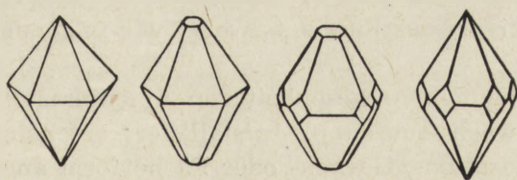


Abb. 1. c. Kristallformen von Krebsmuskel Argininphosphoferase (Kombination der hexagonalen Bipyramid, Prisma und Basisplatte)

dominiert die eine, in anderen Fällen die andere Form. *Haurowitz* (13) vermochte nachzuweisen, dass sich die Kristallformen des embryonalen und postembryonalen menschlichen Hämoglobins unterscheiden.

Vorstehende Fälle des Polymorphismus kann man als natürlichen Polymorphismus bezeichnen, da seine Ursachen mit der Struktur, den Eigentümlichkeiten oder dem funktionellen Zustand des Moleküls zusammenhängen.

Eine andere Form des Polymorphismus, mit der ich mich ausführlicher befassen möchte, ist der künstliche Polymorphismus, für den ich einige Beispiele anführen will: Baranowski und Mitarbeiter (3) gewannen die Aldolase — die sogenannte myogene Aldolase — aus Kaninchenmuskel in Form von Oktaedern. Taylor und Mitarbeiter (20) stellten Aldolase unter Abänderung der Kristallisationsbedingungen in Form von Nadeln, sechseckigen Plättchen und sechseckigen Bipyramiden her. Warburg und Christian (21) aber isolierten aus Rattenmuskel spinselförmige Aldolase-Kristalle.

Aschaffenburg und Drewry (2) stellten von ihrem β -Lactoglobulin-Präparat fest, dass je nach dem angewandten Isolierungsverfahren verschiedene Formen gewonnen werden können. Kendrick und Mitarbeiter (14, 15) konstatierten, dass die Kristallform des aus einer gegebenen Art isolierten Myoglobins auf der Isolierungsmethode beruht. Durch Anwendung einer ähnlichen Methode lässt sich hingegen Myoglobin aus verschiedenen Arten in übereinstimmender Kristallform isolieren.

Sehr interessant sind die mit Lysozym durchgeführten Arbeiten von Alderton und Fevold (1). Sie gewannen das Lysozym in verschiedenen Kristallformen, teils durch Veränderung des pH der Kristallisierung, teils dadurch, dass sie durch Zugabe verschiedener Anionen (Chlorid, Bromid, Jodid, Nitrat, Carbonat) zur Mutterlauge unterschiedliche Lysozym „Salze“ herstellten.

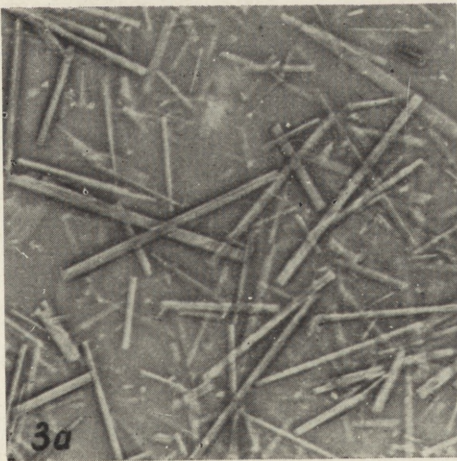
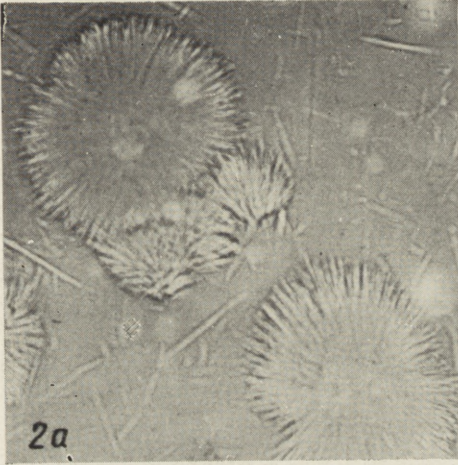
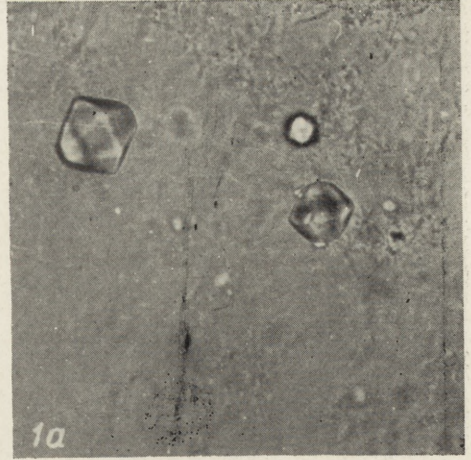
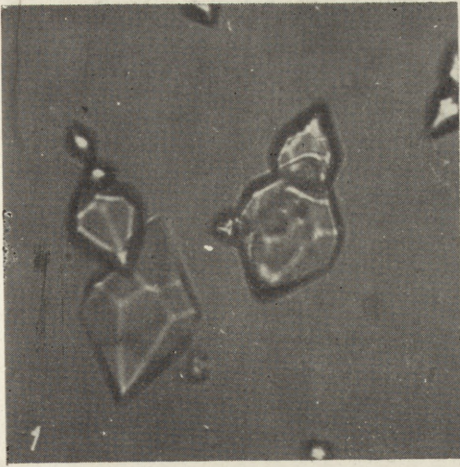
Schliesslich will ich unsere eigenen einschlagigen Untersuchungen kurz berühren. Bei der vergleichenden Untersuchung der aus verschiedenen Säugetieren isolierbaren PGAD beschäftigten wir uns aus mit den Kristallisationsverhältnissen des Ferments wobei wir folgendes feststellten. (9, 19):

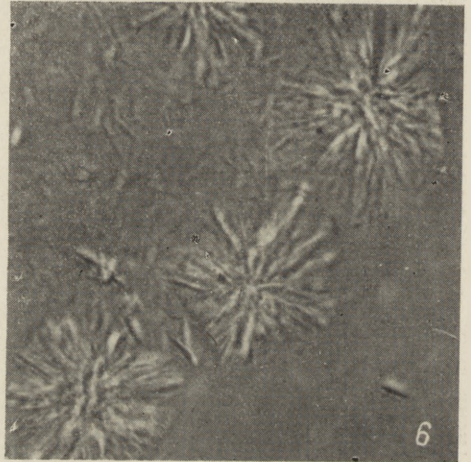
Wird das Ferment in Anwesenheit von Ammoniumsulfat mit 0,7 Sättigungsgrad bei schwach saurem pH kristallisiert, erscheinen anfangs Zwillingformen, in Rosetten-, Garben- oder Fächerform angeordnet. Werden diese Substanzen längere Zeit hindurch im Kühlschrank ruhig gelagert, können diese Formen erhalten bleiben, ja auch weiter wachsen (Abb. 2).

Abb. 1. a, b. Argininphosphoferase aus Krebsmuskel (*Pontambius fluviatilis*)

Abb. 2. Säugemuskel PGAD. Zwillingformen bei schwach saurem pH (5,8—6,0) (aus Kaninchen- und Schweinmuskel)

Abb. 3. Säugemuskel PGAD. Prismaformen bei schwach saurem pH (5,8—6,0) aus Kaninchen- und Rindmuskel)





Um eine bessere Ausbeute zu erzielen, pflegten wir jedoch die Mutterlauge während der Isolierung nach dem Erscheinen der Kristalle bei Zimmertemperatur zu zentrifugieren, wobei die Initialformen verschwanden und sich statt dessen längliche Prismaformen bildeten (Abb. 3). Diese lassen sich ohne besonderen Eingriff nicht in die ursprünglichen Formen zurückgestalten. Geben wir zur Mutterlauge irgendeine SH-Substanz (z.B. Cystein), ein Reduktionmittel (Ascorbinsäure) oder KCN, gewinnen wir durch Umkristallisation den ursprünglichen Formen ähnliche Zwillingsformen (Abb. 4). Ähnliche permanente Formen erhalten wir, wenn während der Isolierung 0,001 M Äthylendiamintetraacetat zur Anwendung gelangt (Abb. 5).

Aus dem Gesagten darf geschlossen werden, dass PGAD im Laufe der Isolierung oxydativ umgewandelt wird. Die oxydierte Form weist andere Kristallgebilde auf als die reduzierte. Der Prozess ist reversibel, durch Wahl entsprechender Bedingungen lassen sich die Formen unbeschränkt ineinander umgestalten.

Unsere Beobachtungen über die Kristallisation wurden auch durch andere Untersuchungsergebnisse gestärkt. Die PGAD-Aktivität ist nämlich — wenn wir die Prismenform untersuchen — nur in Anwesenheit von Reduktionsmitteln (Cystein, Glutathion, Thioglykolsäure, KCN, Ascorbinsäure usw.) 100%-ig. Es bestehen auch Differenzen zwischen dem Molekulargewicht, den serologischen Eigentümlichkeiten usw. der oxydierten und reduzierten Formen (6, 7). Man kann feststellen, dass die erwähnten Unterschiede in der Kristallisation mit dem funktionellen Zustand des Fermentes zusammenhängen.

Das pH hat auf die Entwicklung der Kristallformen ebenfalls Einfluss. Das Protein vermochten wir nicht nur in den erwähnten, in schwach saurem Medium gewonnenen Formen, sondern auch in schwach alkalischem Medium (pH 8,3 — 8,5) zu kristallisieren. Zu Beginn der Kristallisation entstanden in diesem Falle — unabhängig vom Ursprung des untersuchten Fermentes — aus Säugermuskel erst Kristallanhäufungen (Abb. 6), die später zur rhombenformigen Plättchen zerfielen (Abb. 7). Neben diesen gewonnenen D é v é n y i und Mitarbeiter (5) in stärker alkalischen Medium (pH9)

Abb. 4. Reduzierte PGAD aus Rindmuskel in der Anwesenheit von Cystein, KCN bzw. Ascorbinsäure

Abb. 5. Permanente Zwillingsform aus Kaninchenmuskel. Isoliert mit Anwendung von 0,001 M Äthylendiamintetraacetat (Versene)

Abb. 6. Säugermuskel PGAD in schwach alkalischem Medium (pH 8,3—8,5) (aus Schweinemuskel)

Abb. 7. Rhombförmige Plättchen in schwach alkalischen pH (8,3—8,5) (PGAD aus Schweinemuskel)

Abb. 8. Spindelformen in stärker alkalischem Medium (pH9) (PGAD aus Rindmuskel)

Spindelformen (Abb. 8), in stärker sauerem Medium (pH5) garbenförmige Kristalle.

Die letztgenannten Beispiele zählen zur Gruppe des künstlichen Polymorphismus. Die verschiedenen Kristallformen kommen durch Veränderung der Kristallisierungsbedingungen zustande. Die Erscheinung des künstlichen Polymorphismus bietet uns die Möglichkeit zu einigen Bemerkungen über den Kristallisationsmechanismus der Proteine. Die Untersuchung der Kristallformen der Proteine erfolgt durch zahlreiche umfangreiche Forschergruppen (Astbury, Bernal, Bragg, Corey, Crowfoot, Patterson, Pauling, Perutz u.a.). Die Arbeit ist ausserordentlich schwierig und kompliziert. Die Röntgenstrukturuntersuchungen dieser Gruppen befassen sich indessen vor allem mit dem Aufbau der bereits entwickelten Gebilde. Über den Prozess der Entstehung der Kristalle wissen wir jedoch nur wenig. Auf Grund obiger Angabe will ich darzustellen versuchen, wie die Entwicklung des Eiweisskristalls vor sich geht.

Einleitend erwähnte ich bereits, eine gemeinsame Eigenheit des Kristallisationsverfahrens bestehe darin, dass die Eiweissmolekülen dehydriert werden. Die Dehydratation hat zur Folge, dass der Durchmesser der die einzelnen Seitenketten umgebenden, gleichsam eine Schutzwirkung ausübenden Wasserhüllen abnimmt. Zwischen den ihrer schützender Wasserhülle beraubten Seitenkettengruppen können Beziehungen zustande kommen, die zur Aggregation der einzelnen Moleküle führen. Die Stabilität der zwischen den Molekülen entstandenen Beziehung kann in einzelnen Fällen so gross sein, dass sich Kristalle bilden.

Im Zusammenhang mit diesem kurz angedeuteten Prozess ergeben sich verschiedene Probleme. Es muss festgestellt werden, dass sich das Eiweisskristall von den Kristallen anderer Substanzen nicht grundsetzlich unterscheidet: in Röntgendiffraktionsuntersuchungen wurde ermittelt, dass die Kristallstruktur auch hier aus Massenpartikelchen besteht, die sich in bestimmten Punkten und Ebenen des Raumes entsprechend orientieren. Eine Abweichung zeigt sich darin, dass die Proteine kein grosses Kristallisierungsbestreben aufweisen, und die Adhäsionskraft der Moleküle ebenfalls verhältnismässig gering ist, so dass die Eiweisskristalle wenig stabil sind und nur in der Mutterlauge längere Zeit hindurch aufbewahrt werden können, bei der Austrocknung jedoch zugrunde gehen. Schliesslich vermochte man die Eiweisse bisher nur in Form von Mikrokristallen herzustellen, was bei den Röntgen- und polarisationsoptischen Untersuchungen einen ernsthaften Nachteil bedeutet.

Der Mechanismus der Einweisskristallisierung wurde durch die Versuche, die durch Veränderung des Milieus zu abweichenden Kristallfor-

men führten, einer Klärung nähergebracht. Wir hatten vorstehend angenommen, die Kristallbildung finde in der Weise statt, dass durch den Zusammenschluss einzelner Seitenketten supramolekuläre Einheiten entstehen. Die Veränderung des Mediums beeinflusst den Zustand der Seitenketten und bestimmt, welche Seitenketten in aktiven (dissoziierten) Zustand gelangen und welche zur Herstellung der Beziehungen ungeeignet werden.

Die Situation wird weiterhin noch durch den Umstand kompliziert, dass die Verhältnisse des Mediums nicht nur auf die intermolekularen Beziehungen zwischen den Eiweißen eine Wirkung ausüben, sondern auch die intramolekularen Bindungen, die räumliche Orientation des einzelnen Eiweissmoleküls, das Verhältnis zwischen den verschiedenen Seitenkettengruppen und das Drehungsgrad (folding coiling) der Eiweissmoleküle beeinflussen. Die globulären Eiweissmoleküle können sich zu sehr vielen Formen krümmen. Bei gleicher Aminosäurezusammensetzung und Sequenz kann sich daher die Oberfläche ausserordentlich variabel gestalten, d.h. die Konfiguration des Eiweissmoleküls das Zustandekommen der intermolekularen Bindungen beeinflussen. In der Entwicklung der Zusammenschlüsse, der das Kristall zusammenhaltenden Gitterkräfte sind sehr variable Möglichkeiten gegeben, d.h. die Bildung des Kristalls wird durch viele Umstände beeinflusst. Wahrscheinlich ist es darauf zurückzuführen, dass die Herstellung der Kristalle nur unter sehr genau bestimmten Bedingungen möglich ist.

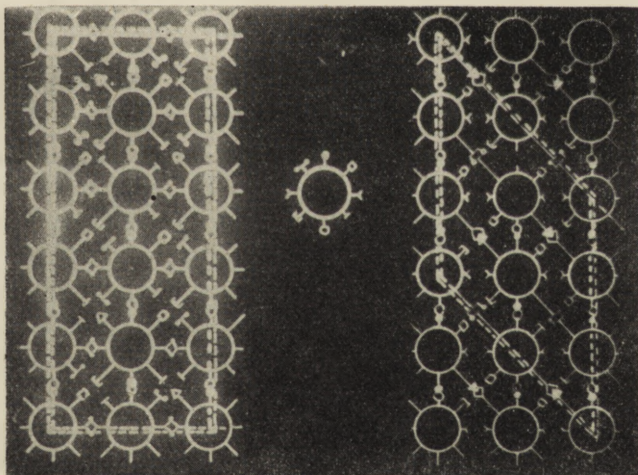


Abb. 9. Bildung der Eiweisskristalle (schematisch)

Die hier dargelegte Hypothese weist mit Anschauungen F r e y - W y s s - L i n g s (10) über die Struktur des Protoplasmas gewisse gemeinsame Züge

auf. Ein Unterschied besteht jedoch darin, dass man sich im Protoplasma — teils im Hinblick auf den dynamischen Zustand der die Zelle aufbauenden Elemente, teils mit Rücksicht auf den hohen Wassergehalt des Protoplasmas — eine ständige intermolekulare Bindung zwischen den Eiweissmolekülen selbst temporär nicht vorstellen kann, während diese Möglichkeit innerhalb der als statisch zu betrachtenden Eiweisskristalle gegeben ist.

Die Bildung der Eiweisskristalle ist in Abb. 9. auf Grund der Erscheinung des Polymorphismus schematisch veranschaulicht. Als Beispiel wählten wir die in schwach saueren bzw. schwach alkalischen Medium wahrnehmbaren PGAD-Formen. Die Eiweissmoleküle stellten wir vereinfacht als Kugel dar, an deren Oberfläche sich in allen Richtungen des Raumes verschiedene Seitenketten befinden. Bei der im schwach saueren Medium entstehenden Form ist anzunehmen, dass sich Seitenketten miteinander verbinden, die zusammen einen rechten Winkel bilden. In einer Richtung des Raumes besteht daher eine sehr ausgeprägte Kristallisationstendenz, wodurch in dieser verlängerte Prismen zustande kommen. Bei der anderen Form bilden nicht sämtliche Bindungen einen rechten Winkel, wodurch die rhombenförmigen Plättchen entstehen.

Auf Grund vorstehender Ausführungen glaube ich, dass es auch durch derartige verhältnismäßig einfache Methoden und Untersuchungen gelingen kann, den komplizierten Eigentümlichkeiten der Eiweisskristalle näherzukommen und gewisse Fragen im Zusammenhang mit den funktionellen und strukturellen Eigenheiten der Proteine zu klären.

Zusammenfassung

Auf Grund der polymorphen Eigenschaften der Eiweisskristalle wurde versucht, einige Eigentümlichkeiten der Proteine und den Entwicklungsprozess der Eiweisskristalle zu klären.

Der Polymorphismus lässt sich bei den Eiweissen auf zwei Ursachen zurückführen. Der natürliche Polymorphismus hängt einerseits mit dem funktionellen Zustand der Proteine, andererseits mit dem Phänomen der Mikroheterogenität zusammen. Der künstliche Polymorphismus steht in Beziehung zu den Isolierungsbedingungen der Eiweisskristalle. Auf dieser Grundlage dürfte die Entstehung der Eiweisskristalle auf folgendem Mechanismus beruhen:

1. Auf Wirkung des dehydratierenden Agens verringert sich die die Seitenketten schützende Hydrathülle, und die Seitenketten werden zur Herstellung intermolekularer Verbindungen geeignet.

2. Es hängt von der Zusammensetzung des Mediums ab, welche Seitenketten intermolekulare Bindungen zustande bringen können; die Verbindung entsteht zwischen den in aktivem Zustand befindlichen Gruppen.

3. Durch die Bindungen entwickeln sich die, das Kristallgitter zusammenhaltenden Kräfte, es entsteht das Kristall.

LITERATUR

1. Alderton, G., Fevold, H. L., *J. Biol. Chem.* **164**, 1, 1946.
2. Aschaffenburg, R., Drewry, J., *Biochem. J.* **65**, 273, 1957.
3. Baranowski, T., Niederland, T. R., *J. Biol. Chem.* **180**, 543, 1949.
4. Colvin, J. R., Smith, D. B., Cook, W. H., *Chem. Revs.* **54**, 687, 1954.
5. Dévényi, T., Pusztai, Á., Sajgó, M., Szörényi, B., *Acta Physiol. Hung. im Druck.*
6. Elödi, P., *Acta Physiol. Hung. im Druck.*
7. Elödi, P., *Acta Physiol. Hung. im Druck.*
8. Elödi, P., Szörényi, E., *Acta Physiol. Hung.* **9**, 367, 1956.
9. Elödi, P., Szörényi, E., *Acta Physiol. Hung.* **9**, 339, 1956.
10. Frey - Wyssling, A., *Submicroscopic Morphology of Protoplasm.* Elsevier Publ. Comp. New York, 1953.
11. Harting, J., Velick, S. F., *J. Biol. Chem.* **207**, 857, 867, 1954.
12. Haurowitz, F., *J. Cell. Comp. Physiol.* **47**, Supl. 1, 1956.
13. Haurowitz, F., *Z. Physiol. Chem.* **183**, 78, 1929.
14. Kendrew, J. C., Parrish, R. G., *Nature* **175**, 264, 1955.
15. Kendrew, J. C., Parrish, R. G., Marrack, J. R., Orleans, E. S., *Nature* **174**, 946, 1954.
16. Perutz, M. F., Trotter, I. F., Howells, E. R., Green, D. W., *Acta Cryst.* **8**, 241, 1955.
17. Perutz, M. F., Liquori, A. M., Eirich, F., *Nature* **167**, 929, 1951.
18. Rafter, G. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 267, 1957.
19. Szörényi, E. T., Elödi, P., *Ukrain. Biochim. Žurn.* **22**, 127, 1950.
20. Taylor, J. F., Velick, S. F., Cori, G. T., Cori, C. F., Slein, M. W., *J. Biol. Chem.* **173**, 619, 1948.
21. Warburg, O., Christian, W., *Biochem. Z.*, **314**, 149, 1943.

RYSZARD WIKTOR SCHRAMM

Chromatografia bibułowa barwików chloroplastów

I. Rys historyczny

Chromatografia, jedna z najpowszechniej dzisiaj stosowanych na świecie metod analitycznych, zawdzięcza swoje powstanie i rozwój badaniom nad barwikami roślinnymi. Ich ogromne znaczenie w świecie organicznym, a równocześnie wielka labilność i związane z tym duże trudności w rozdzieleniu i identyfikacji poszczególnych barwików a nawet grup barwików roślinnych zmuszały badaczy do szukania nowych, delikatnych i skutecznych metod analizy.

Pierwsze próby zastosowania zjawisk kapilarnych do analizy wskazywały raczej na rozwój chromatografii bibułowej. Początków ich należy szukać w pracach Rungego (37, 38) a następnie Schoenbeina (41), a zwłaszcza jego ucznia Goppelsroedera, twórcy tzw. analizy kapilarnej (12, 13, 14, 15, 16, 17). Zasada analizy kapilarnej polegała na adsorpcji substancji znajdującej się w roztworze na pasku bibuły zanurzonym jednym końcem do tego roztworu. W stosunku do obecnej chromatografii bibułowej metoda ta różni się tym, że rozdzielanie barwików następuje wprost z roztworu, bez udziału specjalnego rozwijacza. Początkowo Goppelsroeder nie pracował też w naczyniach zamkniętych, w atmosferze nasyconej parami rozpuszczalnika; dopiero pod koniec swoich prac stosował zamknięte kamery, bardzo podobne do niektórych typów obecnie używanych kamer chromatograficznych. Na skutek ekstrakcji alkoholem Goppelsroeder otrzymywał w roztworze równocześnie barwki soku komórkowego (antocyjany, flawony itp.) oraz barwki plastydowe (chlorofile i karotenoidy), co również zaciemniało mocno obraz.

M. S. Cwiet, uważany za właściwego twórcę chromatografii, opracował swoją metodę kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej, używaną do dziś w zasadniczo nie zmienionej formie, dla rozdzielenia barwików chloroplastów (7, 8, 9). Cwiet znał prace Goppelsroedera i częściowo je powtarzał; podkreślał on trudności wynikające ze swobodnego odparowywania alkoholu i odrzucał działanie zjawiska adsorpcji w analizie kapilarnej, co według obecnych danych, szczególnie w odniesieniu do chromatografii bibułowej barwików chloroplastów, nie jest w pełni słuszne.

Ale i metoda C w i e t a nie prędko zyskała uznanie. Zainteresowali się nią co prawda badacze chlorofilu, a przede wszystkim R. Willstätter, jednakże do badań swoich użył on niefortunnym przypadkiem jako adsorbentu węglanu wapnia, na którym chlorofil ulega rozkładowi. Spowodowany tym brak odpowiednich wyników, poparty ogromnym autorytetem Willstättera, przesądził na przeszło 20 lat o niepowodzeniu metody chromatograficznej, która poszła w zapomnienie. Sam Willstätter próbował ją jeszcze zastosować w swoich badaniach nad enzymami (56), jednak i tym razem bez poważniejszego rezultatu.

Pełny renesans i rozwój metody chromatografii kolumnowej przyniosły dopiero znowu badania nad barwnikami chloroplastów — karotenoidami prowadzone przez szkołę szwajcarską (R. K u h n, E. L e d e r e r, A. W i n t e r s t e i n, P. K a r r e r i i. od 1931 r.). Od tego czasu chromatografia wkroczyła na dobre do pracowni, szczególnie biochemicznych, jako piękna, subtelna i prosta metoda analityczna, dająca wyniki tam, gdzie zawodzą inne metody chemiczne i fizyczne. Była też z powodzeniem używana do rozdziału barwników chloroplastów (47, 43 i i.).

Analiza kapilarna, niemal zarzucona w tym okresie, od czasu do czasu oddawała jednak pewne usługi. W r. 1927 K y l i n (25) przy jej pomocy wykazał obecność chlorofilu c (chlorofucyny) i fukoksantyny w brunatnych algach.

Bibuły jako absorbenta w metodzie chromatograficznej użył znowu W. G. B r o w n (4) do rozdzielania barwników chloroplastów. Zmodyfikował on znacznie metodę kapilarną z której wyszedł, używając krążków bibuły umieszczonych między dwiema płytkami szklanymi, z których górna miała w środku otwór. Przez ten otwór wprowadzał na bibułę wyciąg barwników chloroplastów w dwusiarczku węgla oraz w dalszym ciągu czysty dwusiarek węgla jako rozwijacz. Otrzymał dobry rozdział karotenoidów oraz chlorofili a i b w postaci typowego chromatogramu krążkowego. Jego mało znana ciekawa praca stanowi bezpośrednio ogniwo przejściowe od metody kapilarnej do chromatografii bibułowej w ścisłym tego słowa znaczeniu i jest pierwszą próbą zastosowania chromatografii krążkowej.

Zastosowanie bibuły w kapilarnej analizie adsorpcyjnej barwników omawiał również obszernie R. L i e s e g a n g (27, 28). Tymczasem jednak pojawiła się właściwa chromatografia bibułowa w zastosowaniu do analizy aminokwasów (6), początkowo jako modyfikacja rozdzielczej chromatografii kolumnowej (33), wkrótce rozrastając się niebywale jako specyficzna mikrometoda analityczna.

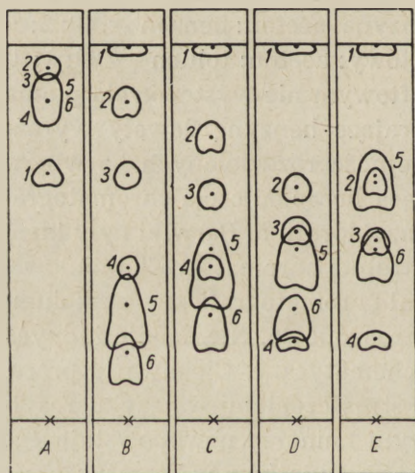
Początkowo chromatografia bibułowa nie znalazła zastosowania w analizie barwników plastydowych. Dopiero w r. 1949 jeden z najwybitniejszych

specjalistów w dziedzinie analizy chromatograficznej, a równocześnie znany badacz chlorofilu, H. H. S t r a i n wspomina, że przy pomocy uwodnionego etanolu można rozdzielić na bibule chlorofile i ksantofile (50). Jednakże już w parę lat później niemal równolegle ukazuje się niezależnie od siebie kilka prac na temat chromatografii bibułowej barwików chloroplastów.

Chronologicznie pierwszymi są doświadczenia L. M a r k u s a, wykonane w roku 1950, referowane w lutym 1951 na sesji Podsekcji Biologicznej IV. Sekcji Węgierskiej Akademii Nauk (31), a ogłoszone drukiem w 1952 (32). M a r k u s prowadził szczegółowe badania nad rozdziałem ekstraktów acetonowych barwików plastydowych z pomidorów (*Solanum Lycopersicum*) i szpinaku (*Spinacea oleracea*) metodą wstępującą i zstępującą używając ośmiu gatunków bibuły (niemiecka, szwedzka i węgierska) oraz kilkunastu rozwijaczy. Z bibuły najlepszą okazała się Schleicher & Schüll 602, niewiele ustępowała jej także bibuła Machery-Nagell 640d. Do rozdzielania używał eteru naftowego, benzyny, benzenu, cykloheksanu, chloroformu, metanolu, n-butanolu, cykloheksanolu, eteru i acetonu, używając mieszanin dwóch lub trzech rozpuszczalników w różnych stosunkach. Najlepszymi okazały się mieszaniny benzyna: aceton: metanol = 30: 1: 0,03, benzyna: aceton: n-butanol = 20: 1: 0,3, benzyna: aceton: benzen = 40: 2: 1, eter naftowy: aceton = 30: 1 oraz eter naftowy: aceton: toluen = 20: 1: 1. Przy użyciu rozpuszczalników z eterem naftowym nie występowała plama feofityn, natomiast rozpuszczalniki zawierające benzynę dawały wyraźnie oddzieloną jedną plamę feofityn. Kolejność rozdzielonych barwików była we wszystkich przypadkach następująca licząc od czoła chromatogramu: karoten, feofityna, ksantofil, chlorofil *a*, chlorofil *b*. Barwiki były identyfikowane przy pomocy równoczesnej kontrolnej chromatografii bibułowej czystych frakcji otrzymanych przez rozdział chromatograficzny na kolumnie z cukrem jako absorbentem, oraz spektroskopowo. Nie podaje żadnych oryginalnych zdjęć ani rysunków, tylko schematyczne. Ciekawa ta praca, ogłoszona po węgiersku (z krótkimi tylko streszczeniami w języku rosyjskim, angielskim i niemieckim) w pierwszym numerze nowopowstającego pisma, pozostała niemal zupełnie nieznana i do wyjątków w literaturze należy cytowanie jej nawet przez najpoważniejszych znawców tematu; nie podaje jej nawet tak specjalny podręcznik jak L i n s k e n s (30).

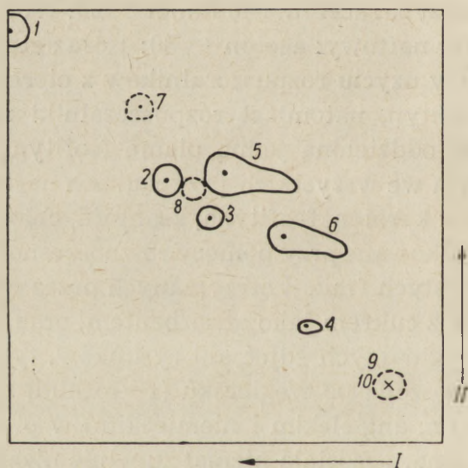
Na krótko przed wydaniem pełnego tekstu pracy M a r k u s a ukazał się artykuł L. B a u e r a (3), stanowiący podstawę wielu późniejszych prac i na ogół uważany za pierwszą poważną pracę z dziedziny chromatografii bibułowej barwików plastydowych. B a u e r rozdzielił barwiki liści trzykrotki (*Tradescantia albiflora*) na bibule Schleicher & Schüll 2043 b suszonej przed użyciem w 105°. Stosował chromatografię wstępującą jedno i dwukierunkową, nanosząc barwiki w postaci surowego roztworu wycis-

niętego z liści. W metodzie jednokierunkowej z kilku prostych rozwijaczy najlepsze wyniki dawał monochlorobenzen oraz — nieco gorsze — toluen; inne rozdzielały słabo. W metodzie dwukierunkowej na arkuszach bibuły o rozmiarach 10×10 cm i większych, stosował Bauer dwie różne mieszaniny rozpuszczalników: I — benzyna specjalna (bliżej nie określona, nie podana nawet t. wrzenia): eter naftowy: aceton = 10: 2,5: 2, II — benzyna specjalna: eter naftowy: aceton: metanol = 10: 2,5: 1: 0,25; ta druga mieszanina na chromatogramach jednokierunkowych dawała tylko większe Rf chlorofili niż mieszanina I, pozostałe barwki rozwijała b. podobnie. Otrzymał następujący rozdział barwików (mniej więcej po przekątnej, licząc od czoła chromatogramu): karoteny, feofityna a, ksantofil, feofityna b, chlorofil a, ksantofil-epoksyd (?), chlorofil b, nieznan (karotenoid), oraz produkty rozkładu chlorofilu (chlorofiliny) na miejscu nałożenia materiału. Zamiast eteru naftowego w obu mieszaninach używał Bauer również monochlorobenzenu lub toluenu, co powoduje pewne przesunięcie na chromatogramie plam barwików chlorofilowych w stosunku do karotenoidów.



Rys. 1a. Chromatogramy jednokierunkowe

A — metanol, B — monochlorobenzen, C — toluen, D — mieszanina I, E — mieszanina II, 1 — karoten, 2 — ksantofil, 3 — ksantofil-epoksyd (?), 4 — ?, 5 — chlorofil a, 6 — chlorofil b. Bauer (3)



Rys. 1b. Chromatogram dwukierunkowy barwików liści *Tradescantia albiflora*

1 — karoten, 2 — ksantofil, 3 — ksantofil-epoksyd (?), 4 — ?, 5 — chlorofil a, 6 — chlorofil b, 7 — feofityna, a, 8 — feofityna b, 9, 10 — chlorofilina a, b. Bauer (2)

W tym samym niemal czasie opublikował wyniki swoich badań M. A s a m i (2), który, nie znając poprzednio omówionych prac, opisał swoją me-

tość bardzo szczegółowo. Jako materiału używał liści koniczyny białej (*Trifolium repens*), z których ekstrahował barwiki mieszaniną metanolu i acetonu 3:1 w ciemności i niskiej temperaturze. Stosował chromatografię wstępującą na bibule Toyo 50 (do chromatografii). Spośród bardzo wielu zbadanych przez niego prostych rozwijaczy najlepsze wyniki dawały węglowodory aromatyczne oraz czterochlorek węgla, i to zarówno bezwodne jak i nasycone wodą. Otrzymał na chromatogramie rozdział następujących barwików: 3 karotenowce (karoten i 2 ksantofile), chlorofil b, chlorofil a oraz brunatno-zielone plamy produktu rozkładu barwików na miejscu naniesienia materiału. W przypadku użycia toluenu (bezwodnego i nasyconego wodą) i bezwodnego ksylenu występowały zawsze po 2 plamy chlorofili a i b. Nie podaje obrazu chromatogramu, tylko tabelę z wartościami Rf (dla 100 μ g nanoszonej substancji, $t = 15 - 22^\circ$).

A s a m i badał również zależność pomiędzy wartością Rf a czasem rozwijania chromatogramu i ilością barwika. Stwierdził, że karotenoidy ulegają rozdziałowi na bibule mniej więcej zgodnie z zasadami chromatografii rozdzielczej (wielkość Rf niezależna od czasu rozwijania i ilości barwika), natomiast chlorofile, rozwijane z początku szybko, po pewnym czasie zwalniają tempo posuwania się za frontem rozpuszczalnika, a w końcu zatrzymują się na pewnej wysokości mimo dalszego przesuwania się czoła rozpuszczalnika. Szybkość przesuwania się plam chlorofili i wartość Rf jaką ostatecznie osiągają są mniej więcej proporcjonalne do stężenia barwika, co przemawia raczej za chromatografią adsorpcyjną.

G r a n g a u d i G a r c i a (18) rozdzielili przy pomocy chromatografii wstępującej na bibule Whatman 1, stosując jako rozwijacz eter naftowy, barwiki karotenoidowe kwiatów *Tecoma radicans*; otrzymali rozdział czterech barwików: 2 żółte i 2 czerwone, z których jeden został zidentyfikowany jako kapsanton.

S p i t e r i i N u n e z (46) badając związki lipofilne rozdzielili na bibule chlorofile i karotenoidy, używając m. i. jako fazy ruchomej alkoholi: metylowego, etylowego i propylowego, zaś jako fazy stacjonarnej trójglicerydów oraz chloro- i bromonaftalenu. Żadnych wyników otrzymanych na bibule nie podają. Stosując w dalszym ciągu chromatografię kolumnową do rozdziału barwików „surowego chlorofilu” (36) otrzymali 8 pasm barwnych, z tego 5 zielonych, co świadczy że w toku pracy chlorofile uległy dużym zmianom.

Dwukierunkową chromatografię bibułową zastosowali znowu L i n d, L a n e i G l e a s o n (29); opierali się oni w zasadzie na pracy B a u e r a, nie znając wyników M a r k u s a, ani A s a m i'e g o. Rozdzielali barwiki liści soi (*Soia hispida*) na arkuszu bibuły Whatman 1 o boku 23 cm prze-mytej w eterze naftowym, przy czym przy pierwszym rozwijaniu stoso-

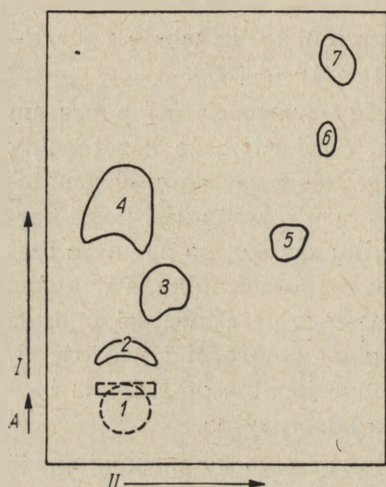
wali kolejno 3 rozwijacze. Krótkie użycie acetonu miało za zadanie zagęścić naniesione w postaci okrągłej plamy barwiki do wąskiego paska; następnie przy pomocy eteru naftowego oddzielali karoteny od chlorofili i wreszcie przy pomocy 1% roztworu n-propanolu w eterze naftowym przeprowadzali pełne rozwinięcie chromatogramu w jednym kierunku. W drugim kierunku rozwijali mieszaniną eteru naftowego i chloroformu 75: 25 otrzymując w rezultacie rozdział barwików przedstawiony na rys. 2.

Niezupełnie zadowolające wyniki rozdziału barwików metodami opisanymi powyżej skłoniły badaczy do szukania sposobów ich ulepszenia.

S t r a i n (51) w swoich badaniach zastosował bibułę (Eaton-Dikeman 301) impregnowaną 10% roztworami wodnymi lub metanolowymi związków poliwdorotlenowych jak glicerol i sorbitol, aby zapobiec dehydracji bibuły oraz sorpcji barwika na włóknach, stwarzając tym samym warunki bardziej odpowiadające czystej chromatografii rozdzielczej. Jako rozwijacza używał eteru naftowego + 0,5% n-propanolu, otrzymując ładny rozdział barwików.

Na bibule nie rozdzielały mu się karoteny oraz luteol i zeaksantol, które np. rozdziela się na tlenku magnezu (49). S t r a i n stosował również chromatografię bibułową z odwróceniem faz, nasycając bibułę 5% roztworem wazeliny w eterze naftowym i rozwijając chromatogram 80% metanolem, jednak wyniki otrzymane tym sposobem nie były lepsze.

Inną drogą poszedł D o u i n (10). Zbadałszy szereg rozwijaczy prostych zatrzymał się na metanolu analizując szczegółowo

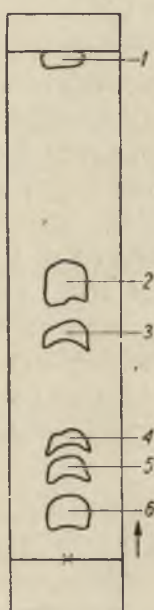


Rys. 2. Chromatogram dwukierunkowy barwików liści *Soia hispida*

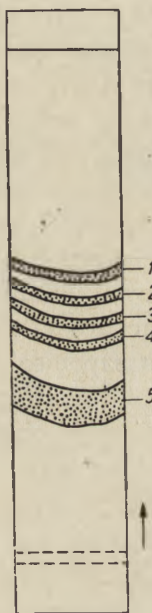
1 — plama na miejscu nałożenia ekstraktu, 2 — ?, 3 — chlorofil b, 4 — chlorofil a, 5 — ksantofile, 6 — ? (fluoryzujący), 7 — karoteny. L a n e, G l e a s o n (29)

jego działanie jako rozwijacza w naczyniu zamkniętym (w atmosferze nasyconej parami metanolu) oraz w naczyniu całkowicie i częściowo otwartym. W rezultacie doświadczeń skonstruował specjalny cylinder chromatograficzny 20 cm długości 4,5 cm średnicy z 36 symerycznie rozmieszczonymi otworami o średnicy 2 mm, dzięki którym nasycenie parami atmosfery wewnątrz cylindra nie było pełne. W swojej pracy używał bibuły Durieux 147, która dawała lepsze rezultaty niż bibuły Whatmana, nasyconej wilgocią w granicach 8 — 15% (przez zawieszenie na 3 — 4 godziny w zamkniętym słoju zawierającym na dnie trochę wody, w t. 5°). D o u i n

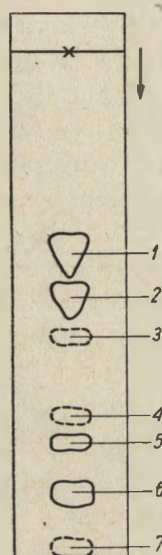
podkreśla znaczenie odpowiedniego uwodnienia bibuły dla dobrego rozdziału mieszaniny barwników przy pomocy stosowanej przez niego metody. Barwniki ekstrahował w t. ok. 5° acetonem, przemywał wodą z dodatkiem siarczanu amonu i podejmował eterem; roztwór barwników nanosił na pasek bibuły w postaci smugi otrzymując na chromatogramie poszczególne barwniki w postaci pasm na całą szerokość paska. Otrzymał następujący rozdział barwników: 2 lub 3 ksantofile (w zależności od gatunku rośliny), chlorofil b, chlorofil a oraz karoteny (jako jedną smugę); czasami między chlorofilami a karotenami pojawiała się smuga szarawa (feofityny?).



Rys. 3



Rys. 4



Rys. 5

Rys. 3. Chromatogram jednokierunkowy

1 — karoteny, 2 — luteol-zeaksantol, 3 — chlorofil, 4 — wiolaksantol, 5 — chlorofil b, 6 — neoksantol. Strain (51)

Rys. 4. Chromatogram jednokierunkowy barwników liści *Tilia silvestris*

1 — ksantofil, 1, 2 ksantofil 2, 3 — chlorofil, b, 4 — chlorofil, a, 5 — karoten Douin (10)

Rys. 5. Chromatogram jednokierunkowy

1 — chlorofil b, 2 — chlorofil a, 3 — epoksyd, 4 luteina, 5 — feofityna b, feofityna a, 7 — karoteny. Sironval (45)

C. Sironval opierał się w swoich pracach na metodzie Bauera, którą poddał pewnym drobnym modyfikacjom. Rozdzielał barwniki chloroplastów bądź to z rozgniatanych wprost na bibule krążków świeżej tkanki liściowej (44), przy czym jednorazowe naniesienie materiału obejmowało 4 — 6 krążków o powierzchni 0,25 cm² każdy, bądź z ekstraktu acetonowego (45), stosując chromatografię zstępującą w słoju nasyconym parami eteru

naftowego oraz używając jako rozwijacza zmodyfikowanego roztworu I z metody dwukierunkowej B a u e r a o składzie benzen: eter naftowy lekki: aceton = 10: 2,5: 2. Rozdzielając barwiki świeżej tkanki otrzymał na chromatogramie (licząc od czoła rozpuszczalnika): karoteny (nie rozdzielające się), 2 lub 3 (w zależności od rodzaju materiału) dobrze rozdzielone ksantofile, chlorofil *a* i chlorofil *b*. Z ekstraktów acetonowych poza wymienionymi rozdzielał również feofityny, powstające już to samorzutnie w czasie preparatyki w kwaśnych ekstraktach naturalnych (np. z młodych liści *Pelargonium*), bądź też przy dodaniu drobnych ilości kwasu do surowego roztworu. W dostatecznym stężeniu feofityny widoczne są jako plamy barwne, w mniejszym występują dopiero w świetle UV.

Poszczególne barwiki chlorofilowe oznaczał ilościowo w absorpcjometrze Hilgera-Spekkera wycinając plamy z chromatogramu i eluując chloroformem lub eterem etylowym oraz wykorzystując odpowiednie maksima absorpcji: 665 m μ dla chlorofilu *a*, 645 m μ dla chlorofilu *b* oraz 500 — 540 m μ dla feofityn (w roztworze eterowym). Metody swojej używał z powodzeniem do oznaczania aktywności chlorofilazy (45).

Bibule impregnowanej użyli znowu S p o r e r, F r e e d i S a n c i e r, (48) do rozdziału chlorofili. Stosowali oni bibulę Whatman 1 nasyconą 18% wodnym roztworem cukrozy (sacharozy) i suszoną następnie w 100°. Impregnacja bibule cukrozą miała zapobiec rozkładowi chlorofili, co udało się w pewnym stopniu. Metodą chromatografii wstępującej w atmosferze azotu, w ciemności i temperaturze 5° przy pomocy *n*-heksanu + 0,5% *n*-propanolu rozdzielili chlorofil *a* i *b* (*b* + *b'*).

Same karotenoidy z czystych preparatów rozdzielał N u n e z (35) na bibule impregnowanej trójglicerydami (np. oliwą z oliwek) używając jako rozwijacza metanolu, etanolu, butanolu lub mieszaniny poszczególnych alkoholi z pirydyną.

C h i b a i N o g u c h i (5) opierając się na pracy A s a m i'e g o (nie cytują żadnych innych autorów) w dalszym ciągu rozdzielał chlorofile z liści koniczyny białej (*Trifolium repens*) wyekstrahowane przy pomocy eteru. Chromatogram rozwijali na bibule Toyo 50 metodą wstępującą, w ciemności, przy pomocy mieszaniny toluenu i 95% etanolu 20: 0,1, która okazała się lepsza niż czysty toluen. Dla porównania używali jako standardu czystego chlorofilu *a* wyizolowanego z krystalicznej chloroplastyny (chlorophyll-lipoprotein) otrzymanej z liści koniczyny białej przy pomocy zmodyfikowanej metody T a k a s h i m y (55). Podobnie jak A s a m i stwierdzili zwiększenie się wartości *R_f* chlorofili ze stężeniem barwika oraz zmniejszanie z upływem czasu; wyraźnym okazał się tu również wpływ rozwijacza: czysty toluen dawał różnice znacznie większe niż mieszanina toluenu i etanolu 20: 0,1.

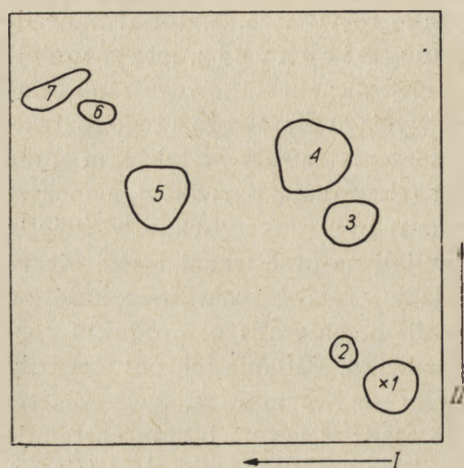
Przy pomocy chromatografii bibułowej (bliższe szczegóły nie są podane przez autorów) oraz spektrofotometrii udało się Harderowi i Kocchowi (22) wykazać obecność chlorofilu *a* i *b* u *Pedinomonas tuberculata*.

Lefort i Signol (26) przystosowali metodę chromatografii bibułowej do szybkiego rozdzielania bardzo małych ilości barwników chloroplastów rzędu miligramu. Stosowali metodę jednokierunkową wstępującą używając bibuły Whatman 1 oraz mieszaniny eteru naftowego lekkiego (t. wrzenia 36 — 42°), acetonu i benzenu w stosunku 17: 2: 1 (objętościowo), wybranej spośród wielu próbowanych, jako rozwijacza. Materiał наносили bądź w postaci wycinanych krążków (według Sironvala, lecz w mniejszej ilości 1 — 2 krążków) bądź w postaci ekstraktu acetonowego z materiału roślinnego zamrożonego w t. — 80° lub wyciągu eterowego z tego roztworu, przy czym wszystkie trzy sposoby nanoszenia dawały im taki sam obraz chromatograficzny. Wszystkie czynności (ekstrakcja barwników, nanoszenie na bibułę i rozwijanie chromatogramu) były dokonywane w świetle silnie przyćmionym. Chromatogram rozwijali na przestrzeni 18 cm otrzymując (z liścieni pomidorów) następujący rozdział barwników: karoten, feofityna, luteina, wiolaksantyna, chlorofil *a*, chlorofil *b*, produkty rozkładu chlorofili w miejscu naniesienia barwniku. Badania ich potwierdziły spostrzeżenia poprzedników o zwiększaniu się wartości *R_f* ze stężeniem chlorofili, z czego wyciągają wniosek, że rozdział ich na bibule następuje na drodze rzeczywistej adsorpcji. Podkreślają, że dla uzyskania ściśle reprodukowanych wyników trzeba zachować stałość warunków, tj. długości rozwijanych chromatogramów oraz stężenia (małego) barwników. Przy rozwijaniu chromatogramu na dłuższej przestrzeni można tą metodą wydzielić jeszcze foefitynę *b* i feoforbid.

Do metody dwukierunkowej powrócili znowu Sapoznikow, Bronstein i Krasowskaja (39). Chromatogram rozwijali na bibule Whatman 1 o rozmiarach 16 × 16 cm. Barwniki наносили w postaci ekstraktu etanolowego, etanolo-acetonowego 1: 3 lub w eterze naftowym, przy czym wszystkie ekstrakty dawały według nich tak samo dobre wyniki. Jako rozwijaczy używali: I — benzen z eterem naftowym 3: 1 (obj.), II — eter naftowy z 96% etanolem 14: 1 (obj.). Otrzymali następujący rozdział barwników: karoteny, feofityna, ksantofile (wiołaksantol + luteol), chlorofil *a*, chlorofil *b*, neoksantol.

Inna metoda tych autorów, opracowana przy współpracy Majewskiej (40), służy przede wszystkim do analizy karotenoidów. Pełną analizę przeprowadzają na dwóch chromatogramach dwoma rozwijaczami. Przy pomocy pierwszego, którym jest benzen z eterem naftowym 3: 1 (obj.) rozdzielają karoten, luteinę i wiołaksantynę od nierozdzielonych chlorofili; na osobnym chromatogramie przy pomocy drugiego rozwijacza, którym

jest mieszanina benzenu, eteru naftowego i 96% etanolu 18: 6: 1 oddzielają neoksantynę od nierozdzielonej mieszaniny innych karotenoidów i chlorofili. W tej pracy roztwór barwików наносили na bibułę w postaci smugi otrzymując odpowiednio na chromatogramach pasma poszczególnych barwików. W obu pracach oznaczali następnie ilościowo karoten, a w drugiej także inne karotenoidy, kolorymetrycznie, eluując je z chromatogramu mieszaniną etanolu i acetonu 1:3.

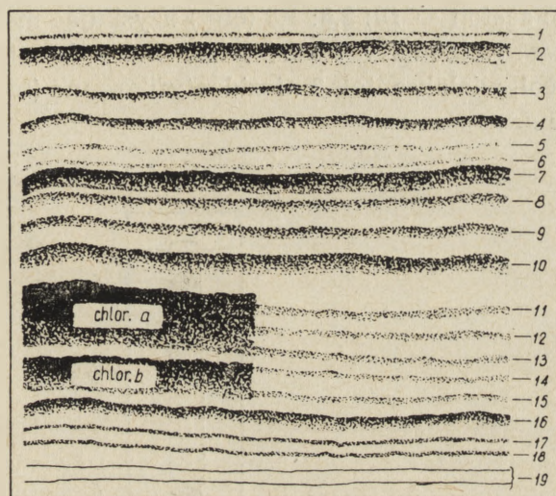


Rys. 6. Chromatogram dwukierunkowy
1 — plama na miejscu nałożenia ekstraktu,
2 — neoksantol, 3 — chlorofil b, 4 — chloro-
fil a, 5 — luteol, 6 — feofityna, 7 — karo-
teny. Sapożnikow, Bronsztein,
Krasowskaja (39)

Osobny rozdział w chromatografii bibułowej barwików plastydowych stanowią prace Hagera (20, 21). Analizując szereg prac poprzednich badaczy stwierdził on, że stosowane przez nich metody chromatografii bibułowej nie dają zadowalających wyników i nie pozwalają na dokładniejszy rozdział składników niż dawne metody klasyczne. W szczególności jeśli chodzi o karotenoidy, a zwłaszcza ksantofile, stosowane dotychczas metody jednokierunkowe pozwalają rozbić je na dwie, maksimum trzy plamy. Nieco lepsze wyniki daje metoda dwukierunkowa, jednak nadaje się tylko do bardzo małych ilości barwików, co z kolei nie pozwala później na ich wymycie i oznaczenie ilościowe.

Hager wprowadził w swojej metodzie cały szereg szczegółów, mających na celu wyeliminowanie szkodliwych i zmieniających obraz wpływów zewnętrznych. Chloroformowy wyciąg, uzyskany na drodze homogenizacji materiału roślinnego, nanosi w kształcie smugi na całą szerokość (ok. 50 cm) arkusza bibuły Schleicher & Schüll 2071 dobrze wysuszonego w t. 50°, zwiniętego w kształcie walca i umieszczonego w specjalnej kamery cylindrycznej odpowietrzonej i nasyconej parami rozwijacza. Rozwijając chromatogram na długości ponad 50 cm (czas trwania ok. 24 godz.) przy pomocy mieszaniny benzyna: benzen: chloroform: aceton: izopropanol = 50: 35: 10: 0,5: 0,17, bez dostępu powietrza i światła, uzyskał bardzo piękny rozdział barwików w postaci wyraźnie oddzielonych pasm, niekiedy pokrytych przez szerokie pasma barwików występujących w specjalnie dużym stężeniu (chlorofil a i b). Z poszczególnych grup barwików

udało mu się wydzielić cztery karoteny (β -karoten, β -karoten-dwu-epoksyd i 2 niezidentyfikowane), 10 ksantofili (luteol, wiołaksantol, neoksantol, zeaksantol, ksantofil-epoksyd, chryzantemaksantol, flawoksantol i 3 niezidentyfikowane), chlorofil *a*, chlorofil *b* oraz produkty ich rozkładu: feofityny *a* i *b*, feoforbidy *a* i *b* i wreszcie chlorofilidy na miejscu nałożenia roztworu. W innym wypadku przy zastosowaniu benzyny jako rozwijacza (specjalnie dla karotenoidów) otrzymał 17 odrębnych pasm o barwach od żółtej do czerwonej. Do identyfikacji barwików i oznaczeń ilościowych poszczególne paski wycinał z chromatogramu, suszył pod próżnią i eluował.



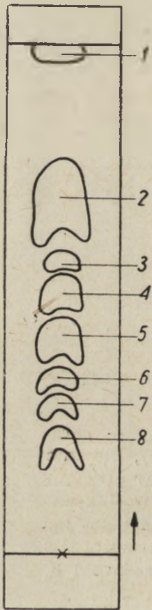
Rys. 7. Chromatogram jednokierunkowy barwików liści rośliny obficie naświetlonej

1 — karotenowiec bezbarwny, fluoryzujący (max. 271 μg w heksanie), 2 — karoten, 3 — mieszanina karotenowców (max. 455, 484,5 μg w chloroformie), głównie karoten-dwu-epoksyd, 4 — feofityna *a*, 5 — ksantofil *o* (max 411, 466 μg w etanolu) 6 — feofityna *b*, 7 — luteol, 8 — zeaksantol, 9 — ksantofil-epoksyd, 10 — wiołaksantol, 11 — chryzantemaksantol, 12 — flawoksantol, 13 — ksantofil 1 (max. 431, 466 μg w etanolu), 14 — ksantofil 2 (max. 430,5, 468 μg w etanolu), 15 — ksantofil 3 (max. 450 μg w etanolu), 16 — neoksantofil, 17 — feoforbid *a*, 18 — feoforbid *b*, 19 — chlorofilidy (w miejscu nałożenia ekstraktu). Hager (20, 21)

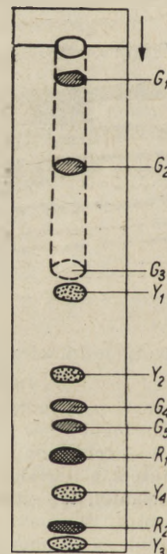
Metoda ta daje bez wątpienia najlepsze wyniki, o ile chodzi o rozdział barwików, jednakże nie nadaje się do prac szybkich i seryjnych ze względu na skomplikowaną aparaturę i procedurę, długi czas trwania rozwijania jednego chromatogramu oraz potrzebną stosunkowo dużą ilość materiału (co najmniej 2 g masy roślinnej).

Na zastosowanie chromatografii bibułowej do badań seryjnych barwików chloroplastów zwrócili uwagę Schramm i Organiściak (42), którzy przeprowadzili szereg analiz 21 gatunków roślin rozwijając barwiki

bądź to bezpośrednio ze świeżej tkanki (wycinki rozgniatane na bibule), bądź też z ekstraktów. W związku z koniecznością dokonywania badań porównawczych w czasie zwrócili uwagę na konserwację barwników w roztworach. Ekstrakcję barwników przeprowadzali mieszaniną etanolu z acetonem 2: 1, następnie ekstrakt suszyli pod próżnią i podejmowali rozpuszczalnikiem, w którym barwniki były dalej przechowywane. Najlepszym do tego celu okazał się chlorobenzen; podobne właściwości wykazywały chloroform i eter naftowy, jednakże ich duża lotność powodowała szybkie zmiany roztworu przy pobieraniu próbek. Do badań używali bibuły Whatman 1 oraz rozwijacza benzyna (t. wrzenia 60°): eter naftowy (t. wrzenia 48°): aceton = 10: 2,5: 1,5 (obj.) uzyskując metodą wstępującą jednokierunkową następujący rozdział barwników: karoten, feofityna a, feofityna b, luteol, wiolaksantol, 2 niezidentyfikowane (feoforbidy?), chlorofil b, chlorofil a.



Rys. 8.
Chromatogram jednokierunkowy barwników liści *Vesbasicum thapsiforme*
1 — karoten, 2 — feofityna a, 3 — feofityna b, 4 — luteol, 5 — wiolaksantol, 6 — ?, 7 — ?, 8 — chlorofil b.
Schramm, Organistciaak (42).



Rys. 9.
Chromatogram jednokierunkowy barwników gytji interglacjalnej rozpuszczalnych w eterze
G — barwniki zielone, Y — barwniki żółte, R — barwniki czerwone. Andersen, Gundersen (1)

Chromatografia bibułowa barwników plastydowych znalazła wkrótce praktyczne zastosowanie w różnego typu badaniach. Netien i Lacharme (34) śledzili przy jej pomocy wpływ terramycyny na tworzenie się barwników u rzodkiewki, niosząc acetonowy wyciąg w postaci pasma i stosując chromatografię zstępującą w t. 4° na bibule Whatman 4 w atmosferze eteru naftowego. Przy użyciu rozwijacza Bauera I rozdzielili następujące barwniki: karoteny, oksyksantofile, ksantofile, karotenole, chlorofil a, chlorofil b. Stwierdzili tą metodą, że pod wpływem terra-

mycyny spada zawartość chlorofilu *a* i karotenu, natomiast wzrasta ilość barwików flawonowych.

W bardzo ciekawej pracy Andersen i Gundersen (1) stosując metodę Sironvala rozdzielili barwiki plastydowe występujące w pokładach gyttyj interglacjalnej liczących ok. 100 000 lat. Wyodrębnione przez nich barwiki zielone (produkty rozkładu chlorofilu fitoplanktonu) nie dały się zidentyfikować spektroskopowo z żadnymi znanymi obecnie; z karto-noidów obok szeregu niezidentyfikowanych znaleźli luteol, fukoksantol i β -karoten.

Gundersen i Friis (19) wykazali obecność chlorofilu w rdzeniu i promieniach rdzeniowych kilku gatunków drzew (*Fagus silvatica*, *Salix caprea*, *Corylus avellana*) i oznaczyli przy pomocy chromatografii bibułowej stosunek chlorofilu *a* do *b*, który okazał się najmniejszym z dotychczas stosunek w tkankach roślinnych (w granicach 1,1 — 1,9).

II. Zagadnienia metodyczne

Zastosowanie chromatografii bibułowej do analizy barwików związanych ze strukturami plazmatycznymi komórek roślinnych napotyka na liczne i duże trudności. toteż prace z tej dziedziny przeważnie ciągle jeszcze borykają się z zagadnieniami metodycznymi. Interpretacja wyników musi być bardzo ostrożna oraz uwzględniać szereg czynników związanych z postępowaniem analitycznym.

Podstawową trudnością, dającą o sobie znać na każdym kroku, jest równoczesne występowanie w analizowanym materiale dwóch zupełnie odmiennego typu grup barwików: chlorofili i ich pochodnych oraz karotenowców (beztlenowych i tlenowych), które różnią się między sobą szeregiem zasadniczych właściwości (rozpuszczalnością, zdolnością adsorpcji itp.).

Pierwszą trudnością metodyczną, z jaką stykamy się w analizie barwików chloroplastów, jest ich dobre wyizolowanie z materiału roślinnego. Barwiki chloroplastów wykazują różny stopień lipofilności (hydrofobowości) — najsilniej karoteny, mniej ksantofile, jeszcze mniej chlorofile, które obok własności lipofilnych spowodowanych obecnością reszty fitolu wykazują równocześnie wyraźne cechy hydrofilne, wynikające z obecności dodatkowego hydrofilnego pięcioczłonowego pierścienia w rdzeniu porfirynowym; niektóre pochodne chlorofili pozbawione fitolu (np. chlorofilidy) nie wykazują w ogóle własności lipofilowych. Stąd też dobór rozpuszczalnika ekstrahującego w pełni wszystkie barwiki plastydowe nie jest łatwy. Różni badacze polecają różne rozpuszczalniki względnie ich mieszaniny, stosowane ogólnie do ekstrakcji barwików plastydowych. Z czystych rozpuszczalników najczęściej stosowanym jest i najlepsze wyniki daje aceton, zwykle 80—90% (stężenie końcowe) (10, 18, 26, 32, 34, 45, 46 i i.), który

szczególnie dobrze ekstrahuje chlorofile. Rzadziej stosowane i mniej dogodne są alkohole. Dosyć dobrą ekstrakcję daje metanol, szczególnie o ile chodzi o ksantofile. Etanol, najdawniej używany (7—9, 12—17) i jeszcze do dziś niejednokrotnie polecany (21, 25, 36, 39), ekstrahuje słabiej chlorofile a zwłaszcza feofityny (42), które prawdopodobnie zawsze w drobnych ilościach występują w liściach, zwłaszcza feofityna *a* (21), a szczególnie łatwo powstają z chlorofili w większych ilościach właśnie w roztworach alkoholowych (21), a także karoteny. Dobre wyniki daje chloroform (20, 21), rzadko zresztą stosowany, aczkolwiek pochodne chlorofili mogą tworzyć z nim cząstki krystaliczne. Inne rozpuszczalniki są stosowane tylko w sporadycznych wypadkach: dwusiarczek węgla (4), eter etylowy (1, 5, 10), eter naftowy (29, 39), a ich przydatność do pełnej ekstrakcji, zwłaszcza ostatniego, bywa kwestionowana (21). Najdokładniejszą wydaje się ekstrakcja rozpuszczalnikami mieszanymi, przy czym w zasadzie podawane są dwa typy tego rodzaju mieszanin: eter naftowy (względnie benzyna): alkohol [np. eter naftowy: metanol = 3 : 7 — (43, 51)] oraz aceton: alkohol (np. aceton: metanol = 1 : 3 (2), aceton: etanol 3 : 1 (39, 40), 2 : 1 (42)).

Przy większej ilości materiału zachodzi konieczność rozdrobnienia go celem możliwie dokładnego wyekstrahowania barwików. Zwykle rozciera się w tym celu materiał roślinny w moździerzu z piaskiem kwarcowym przez 15—30 minut, jednakże takie postępowanie nie wystarcza do pełnego wyekstrahowania, a długi czas jego trwania w połączeniu z działaniem tlenu powietrza, światła oraz kwasów organicznych soku komórkowego sprzyja zmianom barwików, szczególnie chlorofilu *a* oraz niektórych ksantofili. W żadnym wypadku nie można rozdrabniać materiału roślinnego na sucho przy wolnym dostępie powietrza; zawsze rozcierana masa musi być zalana dostateczną ilością rozpuszczalnika. Znacznie dokładniejszą wydaje się być ekstrakcja w homogenizatorze (21), którą można przeprowadzić w kilka minut, jednak przy bardzo intensywnym mieszanii zachodzą tu szczególnie dogodne warunki utleniania barwików, toteż tego rodzaju ekstrakcja powinna być przeprowadzona w atmosferze gazu obojętnego (np. azotu).

Dla uniknięcia niedogodności związanych z ekstrakcją barwików niektórzy autorzy stosują nanoszenie ich na bibułę w postaci soku wyciśniętego z miazgi roślinnej (3) lub przez rozgniatanie wprost na bibule krążków wyciętych z liści (26, 42, 44). Chromatogramy uzyskane w ten sposób różnią się dosyć znacznie od chromatogramów ekstraktów, zwłaszcza konserwowanych (42), na których występują zawsze w sporej ilości produkty rozkładu chlorofili, przede wszystkim feofityny; jednakże występująca na miejscu rozgniatania krążka brunatna plama chlorofilidów oraz częste występowanie plam feoforbidów świadczy, że i w ten sposób nie unika się

w pełni rozkładu chlorofili, chociaż przebiega on nieco inaczej (odszczępienie fitolu).

Wszystkie barwiki plastydowe, a w szczególności chlorofile, są związkami mocno labilnymi, łatwo ulegającymi zmianom pod działaniem czynników chemicznych i fizycznych, co stwarza szczególnie duże trudności w ich analizie metodą chromatograficzną. Spośród czynników powodujących zmiany barwików trzeba brać pod uwagę w pierwszym rzędzie tlen, dalej stężenie jonów wodorowych (pH), obecność innych jonów, stężenie samego barwika, rodzaj rozpuszczalnika, wreszcie wpływ enzymów, światła i temperatury.

Tlen i alkalia zmieniają chlorofile *a* i *b* w kilka chromatograficznie jednolitych barwików, spektroskopowo podobnych do barwików macierzystych (53). Wyodrębniane przez niektórych badaczy tzw. chlorofile *a'* i *b'* są izomerami, tj. odwracalnymi produktami alteracji zwykłych chlorofili. Inne, tzw. chlorofile *a''* i *b''*, uważane też przez niektórych autorów (11) za produkty izomeryzacji, mimo że nie dadzą się przeprowadzić z powrotem w chlorofile, są produktami allomeryzacji spowodowanej utlenieniem (52, 53) prawdopodobnie labilnego atomu H przy węglu w położeniu 10 (w pierścieniu pięciocłonowym) (21). Związki te, których nie powinno się właściwie nazywać chlorofilami, mogą występować w drobnych ilościach jako naturalne składniki u roślin (53). Szczególnie wrażliwe są chlorofile, zwłaszcza chlorofil *a*, na działanie kwasów. Już niewielkie ilości słabych kwasów, np. występujące w soku komórkowym, odszczepiają z chlorofili Mg przeprowadzając je w feofityny a dalej nawet w feoforbidy (odszczępienie fitolu); jednakże zarówno feoforbidy jak i feofityny występują prawdopodobnie zawsze obok chlorofili w stanie naturalnym w tkankach roślinnych w pewnych ilościach, feofityna *a* nawet niekiedy w dość dużych (21, 45). Johnston i Watson (24) badali szczegółowo spektrofotometrycznie zależność autooksydacji chlorofilu (allomeryzacji) od rodzaju rozpuszczalnika, stężenia barwika i obecności soli w roztworze. Stwierdzili np., że w acetonie nie następuje allomeryzacja, tylko powolny rozkład chlorofilu, w alkoholach natomiast występuje zawsze zarówno degradacja jak i wyraźna allomeryzacja, przy czym w miarę zmniejszania się ciężaru cząsteczkowego w szeregu homologicznym alkoholi (od oktanolu do metanolu) zmniejsza się rozkład, natomiast silnie wzrasta allomeryzacja. Sole przyspieszają allomeryzację, przy czym działa głównie kation; wpływ soli jest też związany z rodzajem rozpuszczalnika. W roztworach rozcieńczonych powstaje jeden produkt utleniania, w stężonych zachodzi reakcja drugorzędowa i powstają dwa inne.

Światło bez wątpienia działa na szereg barwików plastydowych wywołując i katalizując różnego typu reakcje fotochemiczne, przede wszystkim

izomeryzacji, jednakże uchwytność tych zmian przy pomocy metody chromatograficznej nie została zbadana i wydaje się, że jest poza zasięgiem dokładności dotychczas stosowanych prostych metod (42). Temperatura działa prawdopodobnie głównie katalitycznie i w granicach stosowanych normalnie przy izolacji barwików oraz rozwijaniu chromatogramów nie powoduje większych zmian (2, 10), aczkolwiek podwyższona dostrzegalnie sprzyja izomeryzacji chlorofili (10, 53, 54). Wpływ enzymów obecnych w tkankach roślinnych na zmiany barwików plastydowych w toku preparatyki nie był również badany, chociaż właśnie chromatografii bibułowej użył *Sironval* z powodzeniem do oznaczania aktywności chlorofilazy (45); nie można go jednak w zupełności pominąć.

Przedstawiony wyżej obszerny zespół trudności związanych z ekstrakcją i chromatografią barwików plastydowych praktycznie jest niełatwy do rozwiązania. Wielu autorów stosuje większą lub mniejszą osłonę przed światłem w czasie preparatyki barwików i rozwijania chromatogramów (2, 3, 20, 21, 26, 39, 40, 48, 51 i in.), znacznie mniej stosuje przy rozwijaniu atmosferą gazu obojętnego (48) lub par rozwijaczy po uprzednim usunięciu tlenu (21). Tlen zresztą wydaje się wywierać największy wpływ już w toku ekstrakcji barwików a następnie dopiero przy suszeniu chromatogramu, natomiast w czasie rozwijania w atmosferze wilgotnej zmiany powodowane działaniem tlenu są niedostrzegalne (42). Niektórzy badacze prowadzą ekstrakcję w obniżonej temperaturze, zwykle $4 - 5^{\circ}$ (2, 10), a czasami również i rozwijanie chromatogramu (34, 48). Dla inaktywacji enzymów stosuje się niekiedy ekstrakcję acetonową z materiału zamrożonego w stałym dwutlenku węgla (26, 40). Dla zobojętnienia kwasów organicznych soku komórkowego praktykuje się dodawanie przy rozcieraniu materiału w czasie ekstrakcji drobnych ilości alkalizatora, najczęściej węglanu wapnia, rzadziej węglanu sodu lub związków organicznych jak dwumetylo-anilina (54).

Zachowanie maksimum ostrożności pożądaných przy ekstrakcji barwików oraz rozwijaniu chromatogramu spotyka się wyjątkowo i wymaga specyficznej i skomplikowanej aparatury (20, 21). Sprawa ta odgrywa oczywiście zasadniczą rolę, gdy chodzi o możliwie dokładny rozdział i identyfikację wszystkich barwików i izomerów; w badaniach porównawczych, gdzie zwykle chodzi o stosunki pomiędzy podstawowymi barwikami plastydowymi a nawet ich grupami, tak dalece idąca ostrożność nie musi być zachowana, a zmiany wywoływane czynnikami zewnętrznymi nie grają specjalnie istotnej roli, ważną natomiast, a wcale nie łatwą rzeczą jest utrzymanie stałości warunków pomiarów porównawczych (42), komplikujące się już chociażby wskutek różnego składu i pH ekstraktów roślinnych.

Ważną rzeczą w badaniach porównawczych jest dobór odpowiedniego środka konserwującego barwki. W najczęściej stosowanych rozpuszczalnikach (aceton, alkohole) następują z czasem daleko idące zmiany barwików, w szczególności chlorofili, objawiające się zarówno spektroskopowo (24) jak i chromatograficznie (42). Dobrymi rozpuszczalnikami konserwującymi są takie, w których nie tyle nie zachodzą w ogóle zmiany barwików, ile barwki rozpuszczone czy to w stanie pierwotnym, czy zizomeryzowane lub zallomeryzowane nie ulegają w czasie dalszym widocznym zmianom. Takimi okazały się eter naftowy, chloroform i chlorobenzen, jednakże dwa pierwsze ze względu na swą dużą lotność i związane z tym zmiany stężenia barwika w roztworze nie nadają się do porównawczych pomiarów ilościowych (42).

Identyfikacja barwików rozdzielonych na chromatogramie na ogół nie napotyka na większe trudności. Poszczególne grupy barwików różnią się między sobą kolorem i często bywają określane po prostu jako barwki czerwone (karoteny), żółte (ksantofile) i zielone (chlorofile). W grupie chlorofili poszczególne barwki różnią się między sobą i mogą być identyfikowane według odcieni. Bardzo wielu autorów podaje wartość R_f plam barwików na uzyskiwanych przez siebie chromatogramach, jednak nie mogą one służyć jako zupełnie obiektywny sprawdzian, gdyż zmieniają się w zależności od stężenia poszczególnych barwików oraz od czasu rozwijania chromatogramu (2, 5, 42 i i.). Często stosowana i bez wątplenia najdokładniejsza jest identyfikacja spektrometryczna (1, 20, 21, 29, 32, 39, 40, 51 i i.). Ultrafiolet może służyć do wykrywania i — łącznie z innymi czynnikami, szczególnie położeniem plam — identyfikacji feofityn, feoforbidów i niektórych karotenoidów (21, 34, 45). Pomocne mogą być również pewne reakcje chemiczne, rzadko zresztą stosowane (34, 51), oraz zastosowanie chromatografii kontrolnej czystych preparatów barwików (5, 32).

Sporadyczne oznaczenia ilościowe opierają się w zasadzie na eluowaniu plam (pasm) i określaniu stężenia na drodze absorpcyjometrycznej (44, 45) lub kolorymetrycznej (39, 40). W analizach porównawczych przybliżone wnioski ilościowe można wyciągać z położenia (R_f), wielkości i natężenia barwy plam (42).

Teoretyczne wytłumaczenie zasad chromatografii bibułowej barwików chloroplastów jest szczególnie trudne. Otrzymywanie chromatogramów zarówno w atmosferze nasysonej parami rozwijacza jak i przy niepełnym nasyceniu, powodującym zmiany składu rozwijacza w bibule, przy pomocy rozwijaczy hydrofobowych, bezwodnych, jak i hydrofilowych i zawierających wodę, na bibule specjalnie suszonej lub właśnie specjalnie nawilżonej, impregnowanej lub przemywanej, świadczy o tym że zachodzi tu, może nawet równocześnie, szereg różnych procesów i jeszcze długo chro-

matografia bibułowa barwików plastydowych będzie się opierać wyłącznie niemal na eksperymencie.

Przy rozwijaniu z zastosowaniem parującego rozpuszczalnika, w atmosferze częściowego tylko nasycenia, Douin (10) przyjmuje kolejne osadzanie się barwików na bibule w miarę spadku stężenia rozpuszczalnika (metanolu) mieszającego się stopniowo przy wznoszeniu się z zaadsorbowaną na celulozie wodą, w zależności od ich rozpuszczalności. W podobny sposób wyjaśniał Cwiet (8) analizę kapilarną Goppelsroedera. Douin odrzuca możliwość zachodzenia adsorpcji barwików na bibule przy użyciu rozwijaczy hydrofilowych (metanol), natomiast uważa, że rzeczywista adsorpcja zachodzi przy stosowaniu rozwijaczy hydrofobowych, które wskutek tego nie dają — jego zdaniem — dobrych wyników.

W normalnie stosowanych warunkach w stałym nasyceniu parami rozwijacza takie tłumaczenie odpada. Wielu autorów (2, 3, 20, 21, 25, 41, 43) obserwuje rozwijanie się chromatogramu na bibule zgodnie z zasadami chromatografii adsorpcyjnej; dotyczy to szczególnie chlorofili, przy niektórych pochodnych chlorofili i karotenoidach sprawa nie jest tak jasna.

Wydaje się jednak, że nie można wykluczyć zupełnie, przynajmniej w stosunku do niektórych barwików i niektórych rozwijaczy, procesów rozdzielczych. Niektórzy badacze z teoretycznego punktu widzenia podkreślają bardzo małe prawdopodobieństwo zachodzenia procesów adsorpcyjnych na bibule w czasie rozwijania chromatogramu, zwłaszcza gdy w fazie stacjonarnej znajduje się woda (23). Ci sami autorzy udowodnili zresztą, że nie tylko woda, ale i rozpuszczalniki organiczne mogą być związane przez celulozę i tworzyć z nią fazę stacjonarną. Z drugiej strony dane przemawiające za chromatografią adsorpcyjną przynajmniej pewnych barwików wydają się niezbite. Podkreślana już podstawowa trudność wynikająca z obecności w analizowanym materiale różnego typu związków i tutaj daje o sobie znać. Wydaje się, że postęp w tłumaczeniu chromatografii bibułowej barwików plastydowych będzie możliwy tylko na podstawie szczegółowych prac nad poszczególnymi ich frakcjami.

LITERATURA

1. S. Andersen, K. Gundersen, *Experientia* **11**, 345, 1955.
2. M. Asami, *Bot. Magaz. (Tokyo)*, **65** 771, 1952.
3. L. Bauer, *Naturwiss.* **39**, 88, 1952.
4. W. G. Brown, *Nature* **143**, 377, 1939.
5. X. Chiba, I. Noguchi, *Cytologia* **19**, 41, 1954.
6. R. Conden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin, *Biochem. J.* **38**, 224, 1944.
7. M. S. Cwiet, *Trudy Warsz. obszcz. jestestwoispyt., otd. bioł.* **14**, 20, 1903.
8. M. S. Cwiet, *Ber. d. bot. Ges.*, **24**, 384, 1906.

9. M. S. Cwiet, *Chromofily w rastitielnom i ziwotnom mirie*, Warszawa 1910.
10. R. Douin, *Rev. Gen. Bot.* **60**, 777, 1953.
11. S. Freed, K. M. Sancier, A. H. Sporer, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 6006, 1954.
12. F. Goppelsroeder, *Verhandl. d. Naturforsch. Ges. Basel* **3** (2), 268, 1861.
13. F. Goppelsroeder, *Mitteil. d. K. K. Technol. Gewerbemuseums Wien, Sekt. Chem. Gew. Neue Folge* **2** (3, 4), 86, 1888; **3** (1, 2, 3, 4), 14, 1899.
14. F. Goppelsroeder, *Ueber Capillaranalyse und ihre verschiedenen Anwendungen, sowie ueber das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen*, Muelhausen 1889.
15. F. Goppelsroeder, *Capillaranalyse*, Basel 1901.
16. F. Goppelsroeder, *Anregung zum Studium der Kapillaranalyse*, Basel 1906.
17. F. Goppelsroeder, *Kolloid Z.* **4**, 23, 94, 191, 236, 312, 1909.
18. R. Grangaud, I. Garcia, *C. R. Soc. Biol. France* **146**, 1577, 1952.
19. K. Gundersen, J. Friis, *Bot. Tidsskr.* **53** (1), 60, 1956.
20. A. Hager, *Z. f. Naturforsch.* **106**, 310, 1955.
21. A. Hager, *Planta* **48**, 592, 1957.
22. E. Harder, W. Koch, *Arch. Mikrobiol.* **21** (1), 1, 1954.
23. L. Horner, W. Emrich, A. Kirschner, *Z. f. Elektrochem.* **56**, 987, 1952.
24. L. G. Johnston, W. F. Watson, *J. Chem. Soc.* **5**, 1203, 1956.
25. K. Kylin, *Hoppe-Seylers. Z.* **166**, 39, 1927.
26. M. Lefort, M. Signol, *Rev. gen. Bot.* **62**, 683, 1955.
27. R. E. Liesegang, *Naturwiss.* **31**, 348, 1943.
28. R. E. Liesegang, *Z. Anal. Chem.* **126**, 172, 1943.
29. E. F. Lind, H. C. Lane, L. S. Gleason, *Plant. Physiol.* **28**, 325, 1953.
30. H. F. Linskens, *Papierchromatographie in der Botanik*, Berlin 1955. (H. Pigmente).
31. L. Markus, *Akademiai Értesitö LVIII* **487**, 281, 1951.
32. L. Markus, *Agrokémia és Talajtan* **1**, 291, 1952.
33. A. J. P. Martin, R. L. M. Syngé, *Biochem. J.* **35**, 91, 1358, 1941.
34. G. Netien, J. Lacharme, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**, 643, 1955.
35. G. Nunez, *Bull. Soc. Chim. biol.* **36**, 411, 1954.
36. G. Nunez, J. Spiteri, *C. R. Acad. Sci.* **236**, 488, 1953.
37. F. F. Runge, *Zur Farbenchemie*, Bd III, **15**, Berlin, 1850.
38. F. F. Runge, *Der Bildungstrieb der Stoffe. Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern*. Berlin 1855.
39. D. I. Sapożnikow, I. A. Bronsztein, T. A. Krasowskaja, *Biochimia* **20**, 286, 1955.
40. D. I. Sapożnikow, I. A. Bronsztein - Popowa, T. A. Krasowskaja, A. N. Majewska, *Fizjologia rast.* **3**, 487, 1956.
41. Ch. F. Schoenbein, *Verhandl. d. Naturforsch. Ges. Basel* **3**, 249, 1861.
42. R. W. Schramm, *S. Organiściak-Matuszak w druku*.
43. A. Seybold, K. Egle, *Planta* **29**, 114, 1939.
44. C. Sironval, *Arch. Internat. Physiol.* **61**, 563, 1953.
45. C. Sironval, *Physiol. Plant.* **7**, 523, 1954.
46. J. Spiteri, G. Nunez, *C. R. Acad. Sci.* **234**, 2603, 1952.
47. H. Spohn, *Planta* **23**, 657, 1935.
48. A. H. Sporer, S. Freed, K. M. Sancier, *Science* **119**, 68, 1954.

49. H. H. Strain, *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 588, 1948.
50. H. H. Strain, *Anal. Chem.* **21**, 75, 1949.
51. H. H. Strain, *J. Physic. Chem.* **57**, 638, 1953.
52. H. H. Strain, *Agricultural and Food Chem.* **2**, 1222, 1954.
53. H. H. Strain, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5195, 1955.
54. H. H. Strain, W. M. Manning, *J. Biol. Chem.* **146**, 275, 1942.
55. S. Takashima, *Nature* **169**, 182, 1952.
56. R. Willstätter, *Untersuchungen ueber Enzyme*, Berlin 1928,

JANUSZ BEER

Biosynteza porfiryn

Porfiryny spełniają w organizmach żywych bardzo różnorodne i ważne funkcje jako składniki szeregu biokatalizatorów.

Chlorofil — akceptor energii świetlnej w procesie fotosyntezy, hemoglobina i hemocyjanina — przenośniki tlenu, cytochromy, oksydazy cytochromowe, katalazy i peroksydazy-koenzymy enzymów oddechowych oraz witamina B₁₂ — są to substancje o pierwszorzędym znaczeniu dla organizmów żywych. Nic więc dziwnego, że biosynteza porfiryn stała się tematem szczególnie interesującym od czasu ostatecznego ustalenia budowy grupy prostetycznej barwnika krwi i zielonego barwnika roślin, tj. od tego okresu, w którym badania Nenckiego, Marchlewskiego i Willstättera zostały potwierdzone w szkole Hansa Fischera przez syntezę.

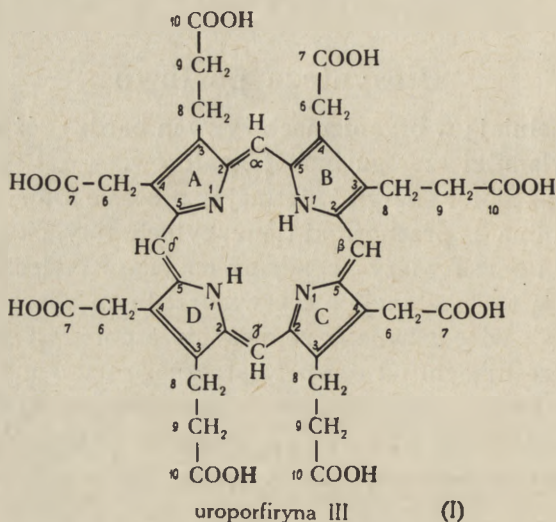
W ciągu ostatnich dziesięciu lat w kilku laboratoriach przeprowadzono badania nad biosyntezą hemu i chlorofilu. Wyniki tych badań można traktować jako podstawę obecnych poglądów na mechanizm biosyntezy wszystkich związków porfiryńowych syntetyzowanych przez organizmy zwierzęce i roślinne.

Badania nad biosyntezą hemu umożliwiło doniosłe odkrycie dokonane przez Shemina i współpracowników w 1948 r., że erythrocyty ptaków zachowują zdolność do syntetyzowania hemoglobiny nie tylko w krążącej krwi, lecz także, przez pewien okres czasu, *in vitro* (49, 50). Stwierdzono, że synteza przebiega również w hemolizatach krwi ptaków. Ta właściwość pozwala w znacznym stopniu uprościć doświadczenia, przy czym otrzymywane wyniki łatwiej zinterpretować ze względu na zahamowanie *in vitro* wielu procesów biochemicznych przebiegających w żywych organizmach. Jak wiadomo, synteza hemoglobiny u ssaków zachodzi w młodych erythrocytach znajdujących się w szpiku kostnym, erythrocyty dojrzałe krążące we krwi zdolności do syntetyzowania barwnika nie posiadają.

Badania Shemina i Wittenberga nad biosyntezą hemu prowadzone były przy użyciu krwi kaczek, którą inkubowano po dodaniu substratów znaczonych ¹⁴C względnie ¹⁵N. W takich warunkach tworzyła się znaczona hemoglobina, którą następnie poddawano rozszczepieniu na pro-

ste związki aż do oddzielenia poszczególnych atomów szkieletu porfirynowego (62, 55). Rozszczepienie to miało na celu ustalenie pozycji, w których lokują się znaczone atomy użytych do biosyntezy substratów.

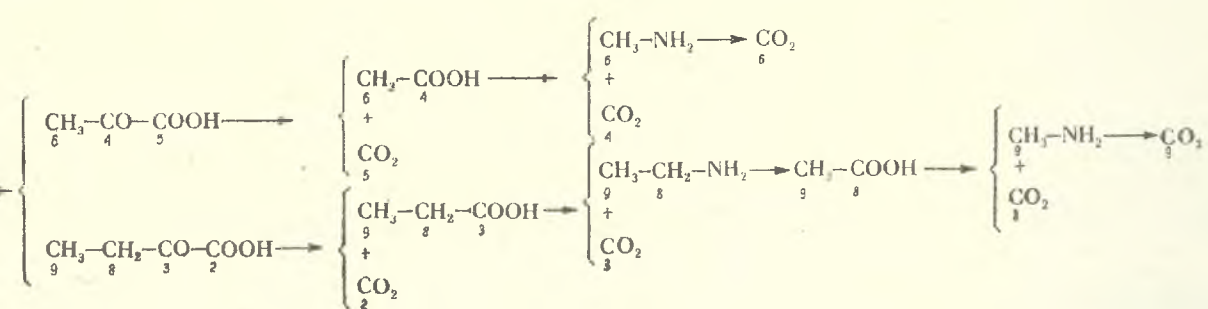
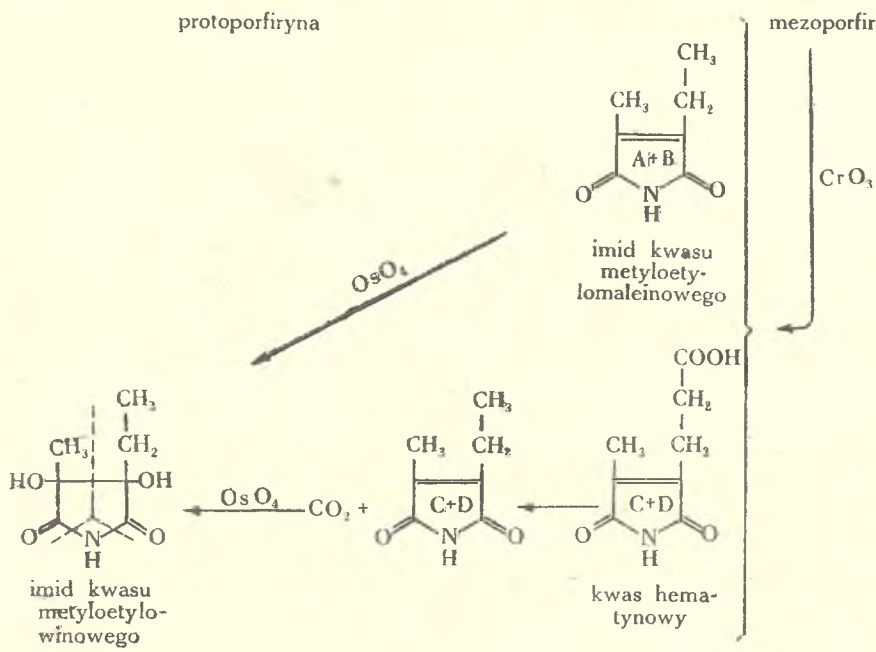
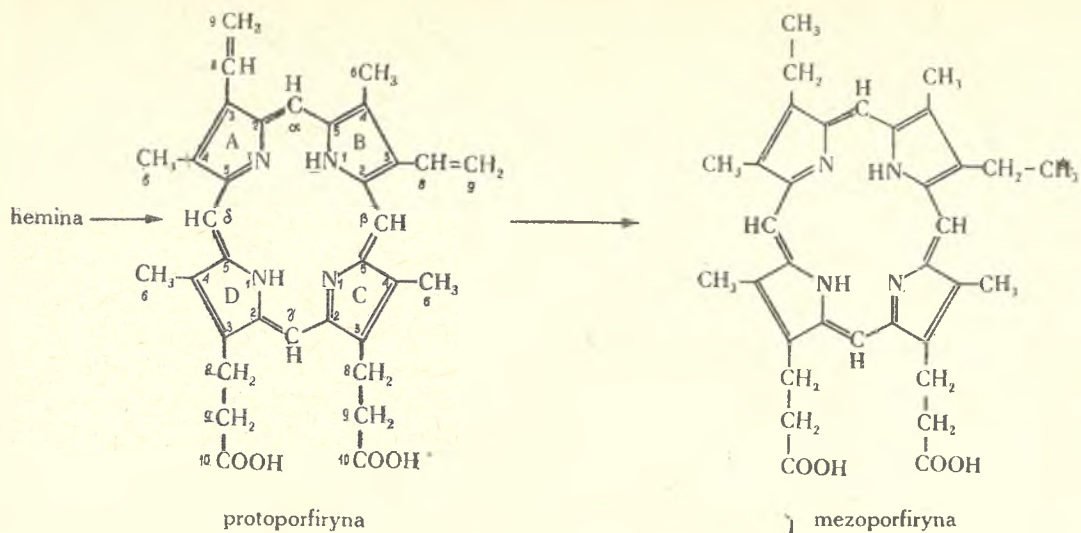
We wzorze I podano numerację pierścieni i poszczególnych atomów uroporfiryny III, naturalnej porfiryny o największej ilości atomów węgla.



Pierścienie pirolowe oznaczono literami A, B, C, D, atomy w każdym z układów pirolowych ponumerowano od azotu w kierunku dłuższego podstawnika, atomy reszty kwasu octowego oznaczono liczbami 6, 7, atomy reszty kwasu propionowego liczbami 8, 9, 10, atomy węgla mostków metinowych literami greckimi α , β , γ , δ . Degradację pierścienia porfirynowego otrzymanej z heminy protoporfiryny przeprowadzano w następujący sposób:

W wyniku redukcji otrzymano mezoporfirynę, która pod działaniem kwasu chromowego ulega rozszczepieniu na imid kwasu metyloetylomaleinowego (z pierścieni A i B), oraz kwas hematynowy (z pierścieni C i D). Atomy węgla stanowiące mostki metinowe w wyniku rozszczepienia tworzą dwutlenek węgla, którego czynność promieniotwórcza nie była jednak oznaczana ze względu na obecność domieszek — produktów reakcji ubocznych.

Kwas hematynowy poddawano dekarboksylacji, przy czym powstawał imid kwasu metyloetylomaleinowego i dwutlenek węgla z atomów grup karboksylowych porfiry C10 i D10. Obie frakcje kwasu metyloetylo-



Schemat rozszczepienia cząsteczki heminy
(II)

<http://rcin.org.pl>

maleinowego były oddzielnie utleniane czterotlenkiem osmu do imidu kwasu metyloetylowinowego, który po utlenieniu kwasem jodowym daje kwasy pirogronowy i α -ketomasłowy. Ketokwasy te rozdzielano chromatograficznie i przekształcano w 2,4-dwunitrofenylohydrazony. Hydrazony poddawano oksydatywnemu rozszczepieniu odpowiednio do kwasu octowego i dwutlenku węgla (atomy A5, B5, C5, D5) oraz do kwasu propionowego i dwutlenku węgla (atomy A2, B2, C2 i D2). Kwas octowy i kwas propionowy poddawano reakcji Schmidta i rozszczepiano przeprowadzając kolejno wszystkie atomy węgla w dwutlenek węgla. Takie postępowanie pozwoliło nie tylko na wydzielenie poszczególnych atomów węgla, lecz również na porównanie sumarycznej czynności promieniotwórczej atomów znaczonej w produktach rozszczepienia z promieniotwórczością w cząsteczkach wyjściowych (55).

Badania nad biosyntezą hemu wykazały, że wszystkie cztery układy pirolowe tworzą się wg jednego i tego samego mechanizmu. Już w r. 1945 stwierdzono, że jednym z substratów w syntezie porfiryny jest glicyna (51,52). Nie ustalono jednak, czy glicyna jest substratem budującym każdy z pierścieni pirolowych porfiryny. Ze względu na to, że dwa pierścienie protoporfiryny mają jako podstawniki grupę metylową i winylową, a dwa inne — grupę metylową i resztę kwasu propionowego, można było przypuszczać, że mechanizm powstawania tych niejednakowych układów pirolowych jest różny. W celu wyjaśnienia tego zagadnienia wprowadzono glicynę zawierającą ^{15}N do organizmu człowieka i kaczki. Powstający znaczony hem rozszczepiono i oddzielono związki zawierające pierścienie A i B od związków zawierających pierścienie C i D. Okazało się, że zawartość ^{15}N w pierścieniach A, B i C, D była jednakowa (35, 61).

Tabela 1

Rozmieszczenie ^{15}N w porfirynie syntetyzowanej z glicyny znaczonej ^{15}N (in vivo) (61 wg 56)

	Zawartość atomów ^{15}N w %		
	w porfirynie	w pierścieniach A i B	w pierścieniach C i D
kaczka	0,293	0,292	0,295
człowiek	0,113	0,112	0,113

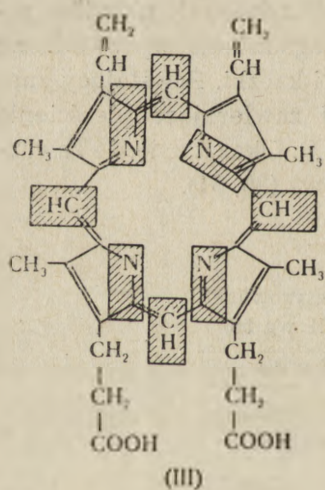
Wyniki tych doświadczeń wskazywały, że w syntezie biologicznej porfiryn powstaje prawdopodobnie najpierw układ zawierający jeden pierścień pirolowy, a następnie z czterech takich układów tworzy się pierścień porfirynowy. Późniejsze doświadczenia, jak to zostanie przedstawione, wykazały słuszność takiej hipotezy.

Po stwierdzeniu, że do biosyntezy układu porfiryнового wykorzystywany jest atom azotu glicyny, należało oczekiwać, że wbudowują się do niego również atomy węgla tego aminokwasu.

W celu sprawdzenia przeprowadzono badania przy użyciu glicyny znaczonej azotem ^{15}N i radioaktywnym węglem ^{14}C bądź w grupie karboksylowej, bądź w metylenowej.

W doświadczeniach z $\text{H}_2^{15}\text{NCH}_2^{14}\text{COOH}$ stwierdzono, że do cząsteczki porfiryny nie wchodzi atomy węgla grupy karboksylowej glicyny (28, 29, 40, 41). Natomiast podczas inkubacji erytrocytów kaczki $\text{H}_2^{15}\text{N}^{14}\text{CH}_2\text{COOH}$ powstawał hem zawierający dwa razy większą liczbę atomów ^{14}C niż ^{15}N (40). Wskazywało to, że do cząsteczki hemu zostaje wbudowane osiem atomów węgla grupy metylenowej glicyny (1, 37, 41).

Należało stwierdzić, które pozycje w cząsteczce porfiryny zajmują te atomy węgla. W tym celu przeprowadzono syntezę hemoglobiny przy użyciu glicyny — $\text{H}_2\text{N}^{14}\text{CH}_2\text{COOH}$ (1). Wydzielona hemina została poddana rozszczepieniu wg podanego wyżej wzoru II w celu oznaczenia promieniotwórczości każdego z atomów. Połowę aktywności znaleziono w pierścieniach pirolowych a połowę w cząstkach metinowych (tabela 2). Stwierdzo-



Zakreskowane części cząsteczki pochodzą z glicyny

Tabela 2

Rozmieszczenie promieniotwórczego węgla w protoporfirynie syntetyzowanej z glicyny znaczonej ^{14}C (62)

	imp/min
porfiryna	5236
pierścienie A i B	1290
pierścienie C i D	1324
A + B + C + D	2614
reszta (mostki metinowe)	2620

no, że czynność promieniotwórcza frakcji tworzących się z pierścieni A i B była równa, czynności frakcji powstających z pierścieni C i D oraz, że cała promieniotwórczość tych frakcji przechodzi do kwasu α -ketomasłowego. Rozszczepienie tego kwasu wykazało, że ^{14}C znajduje się w jego grupie karboksylowej, tzn. że w każdym z pierścieni pirolowych znaczony węgiel zajmuje położenie "2".

W ten sposób wyjaśniono pochodzenie 4 atomów azotu i 8 atomów węgla cząsteczki porfiryny.

W 1945 r. Bloch i Rittenberg (3) stwierdzili, że hemina wyodrębniona po podawaniu szczurom kwasu deuteriooctowego (CD_3COOH) zawierała ciężki wodór. Badania te potwierdzili w r. 1948 Shemin i wsp. (49). Wyniki te wskazywały, że przynajmniej niektóre atomy łańcuchów bocznych porfiryny powstają z metylowych grup kwasu octowego.

W celu wyjaśnienia roli octanu w biosyntezie hemu przeprowadzono doświadczenie porównawcze inkubując krew kaczek z octanem $^{14}\text{CH}_3\text{COO}^-$ lub z octanem $\text{CH}_3^{14}\text{COO}^-$ (35, 36, 37, 41). Dla sprawdzenia, czy te doświadczenia są porównywalne, dodawano również $\text{H}_2^{15}\text{NCH}_2\text{COOH}$. W obydwu próbkach zawartość ^{15}N była jednakowa.

Otrzymywaną heminę poddawano rozszczepieniu, tak jak w poprzednio omawianych doświadczeniach i badano czynność promieniotwórczą poszczególnych produktów. Wyniki podane są w tabelach 3 i 4.

Tabela 3
Czynność promieniotwórcza poszczególnych części cząsteczki protoporfiryny (55)

	imp/min	
	doświadczenie z octanem znaczącym C^{14}	
	w grupie metylowej	w grupie karbonylowej
porfiryna (mezoporfiryna)	23770	2910
pierścienie A i B (imid kwasu metyloetylomaleinowego)	11620	456
pierścienie C i D (kwas hematynowy)	11840	2620*
pierścienie A+B+C+D (imid kwasu metyloetylomaleinowego i kwas hematynowy — suma)	23460	3080

* Czynność imidu kwasu metyloetylomaleinowego otrzymanego z kwasu hematynowego przez dekarboksylację wynosiła 450 imp/min.

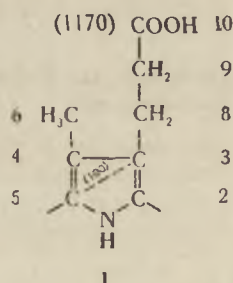
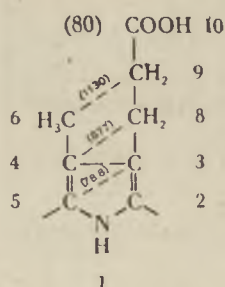
Jak wynika z tabeli 3, octan nie bierze udziału w tworzeniu mostków metinowych; zarówno w doświadczeniu z octanem znaczącym w grupie metylowej jak i w doświadczeniu z octanem znaczącym w grupie karbonylowej cała czynność promieniotwórcza substratów łąkowała się w pierścieniach i ich podstawnikach.

Do szczególnie ciekawych wniosków prowadzi analiza wyników dalszego rozszczepienia (tabela 4 i zestawienie IV).

Tabela 4

Czynność promieniotwórcza fragmentów pierścieni pirolowych (41 wg 56)

	imp/min	
	doświadczenie z octanem znaczoneym ^{14}C	
	w grupie metylowej	w grupie karboksylowej
pierścienie A i B	11620	456
kwas pirogronowy	5440	206
kwas α -ketomasłowy	5560	208
kwas pirogronowy i kwas α -ketomasłowy (suma)	11000	414
pierścienie C i D (bez grup karboksylowych)	11840	450
kwas pirogronowy	5500	204
kwas α -ketomasłowy	5480	190
kwas pirogronowy i kwas α -ketomasłowy (suma)	10980	394



doświadczenie z $^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$ doświadczenie z $\text{CH}_3^{14}\text{COOH}$
(IV)

Jak widać z tabeli 4, czynność promieniotwórcza kwasu pirogronowego ze wszystkich pierścieni jest odpowiednio równa czynności kwasu α -ketomasłowego.

W zestawieniu podano wyniki pomiarów radioaktywności poszczególnych atomów węgla w postaci indeksów przy odpowiednich atomach.

Po wprowadzeniu $^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$ we wszystkich pierścieniach czynność promieniotwórcza atomów węgla grupy metylowej jest równa czynności atomów węgla 9 grupy winylowej względnie odpowiednich atomów łańcucha reszty kwasu propionowego; czynność atomów oznaczonych numerem 4 była równa czynności atomów oznaczanych numerem 8 itd. Po wprowadzeniu $\text{CH}_3^{14}\text{COOH}$ cała radioaktywność lokowała się w węglu 10. Podane przy liniach przerywanych liczby oznaczają ilość impulsów na minutę rejestrowanych przez licznik Geigera.

Z podanych wyników wysnuto następujące wnioski:

1) wszystkie atomy węgla w cząsteczce porfiryny — wyłączając te, które pochodzą z glicyny (atomy 2 i atomy mostków metinowych) mogą pochodzić z kwasu octowego,

2) atomy 4, 6, 8, 9 przy biosyntezie porfiryn pochodzą z grupy metylowej kwasu octowego,

3) atomy 3 i 5 pochodzą głównie z grupy metylowej,

4) atomy 10 głównie z grupy karboksylowej,

5) „część winylowa” pierścieni A i B (atomy 3, 8, 9) jest tego samego pochodzenia co „część propionowa” pierścieni C i D (atomy 3, 8, 9, 10),

6) atomy 3, 8 i 9 części „winylowej” „propionowej” i atomy 5, 4 i 6 części „metylowej” pierścieni pirolowych są tego samego pochodzenia.

7) części „winylowa”, „propionowa” i „metylowa” tworzą się z czterolub trójwęglowego związku, który powstaje w organizmie z kwasu octowego.

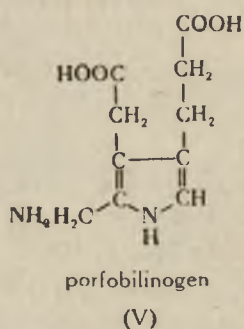
Zbadaniem, czy związek, który reagując z glicyną tworzy „cegiełkę pirolową” jest cztero- czy też trójwęglowy, zajęli się *B u f t o n*, *B e n t l e y* i *R e m i n g t o n* (8) oraz *S h e m i n* i wsp. (41). Oznaczając czynności promieniotwórcze poszczególnych atomów porfiryny syntetyzowanej ze znaczonego kwasu octowego wykazali, że radioaktywność atomu 9 po podaniu $^{14}\text{CH}_3\text{COOH}$ (1130 imp/min) jest w granicach błędu równa czynności atomu 10 po podaniu $\text{CH}_3^{14}\text{COOH}$ (1170 imp/min). Jest to dowodem, że węgiel 10 wbudowywany jest razem z węglem 9 (oba doświadczenia są, jak to wyżej wspomniano, porównywalne), a co za tym idzie związek syntetyzujący „cegiełkę pirolową” jest czterowęglowy. Gdy zawierał on tylko trzy atomy węgla, wówczas wytworzenie grupy karboksylowej wymagałoby włączenia CO_2 , a co zatem idzie ilość atomów znaczonych 10 byłaby znacznie niższa niż 9.

Doświadczenia przeprowadzone z $^{14}\text{CO}_2$ wykazały, że dwutlenek węgla nie włącza się do cząsteczki porfiryny oraz że po podaniu octanu zna-

czonego w grupie karboksylowej wydziela się promieniotwórczy dwutlenek węgla (8, 41).

Dalsze badania miały na celu identyfikację jednostki czterowęglowej. W r. 1949 Lemberg i Legge (31, 38, 37) wyrazili przypuszczenie, że jest nią kwas α -ketoglutaryny. W r. 1951 Shemin i Wittenberg (55) wskazali na możliwość powiązania biosyntezy porfiryn z cyklem kwasów trójkarboksylowych, przy czym związkiem czterowęglowym byłby sukcynylo-koenzym A.

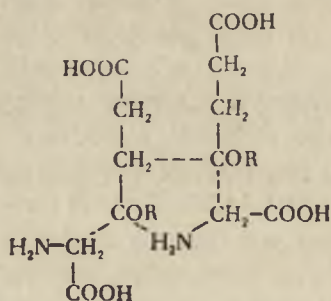
Przypuszczenie to potwierdziły całkowicie doświadczenia przeprowadzone z kwasem bursztynowym-1,4- ^{14}C (48), kwasem cytronowym-1,5- ^{14}C , kwasem α -ketoglutarynowym-5- ^{14}C i kwasem α -ketoglutarynowym-1,2- ^{14}C (7, 32, 63, 64).



Do dalszego wyjaśnienia mechanizmu biosyntezy porfiryn przyczyniły się badania nad porfobilinogenem (PBG) otrzymanym w r. 1939 przez Waldenström i Vahlquist'a z moczu chorych na ostrą porfirię (59). W latach późniejszych zbadano ten związek dokładniej (30, 60) a w r. 1953 ustalono jego budowę (9, 10, 11).

PBG podczas ogrzewania w 0,3 — 0,5 n HCl wytwarza uroporfirynę III. W warunkach zbliżonych do tych, w jakich zachodzi biologiczna synteza porfiryn, np. inkubowany w bezkomórkowym wyciągu z erytrocytów kaczki PBG przechodzi w hem (4, 5, 44).

W związku z omawianymi wyżej pracami Shemina i Wittenberga, Cookson i Rimington wskazali na to, że PBG może



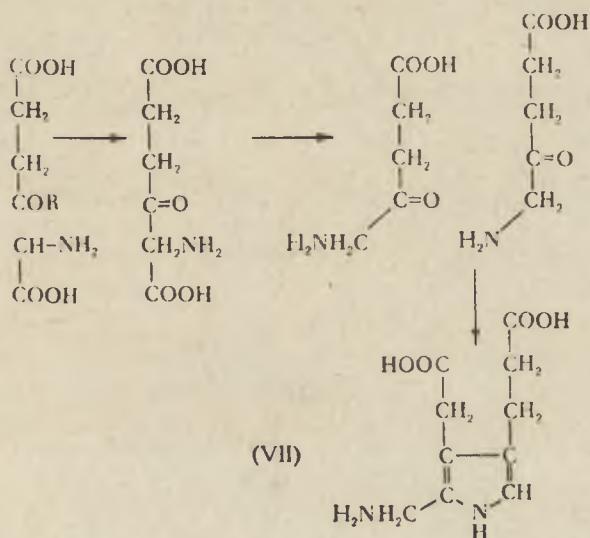
R — reszta koenzymu

(VI)

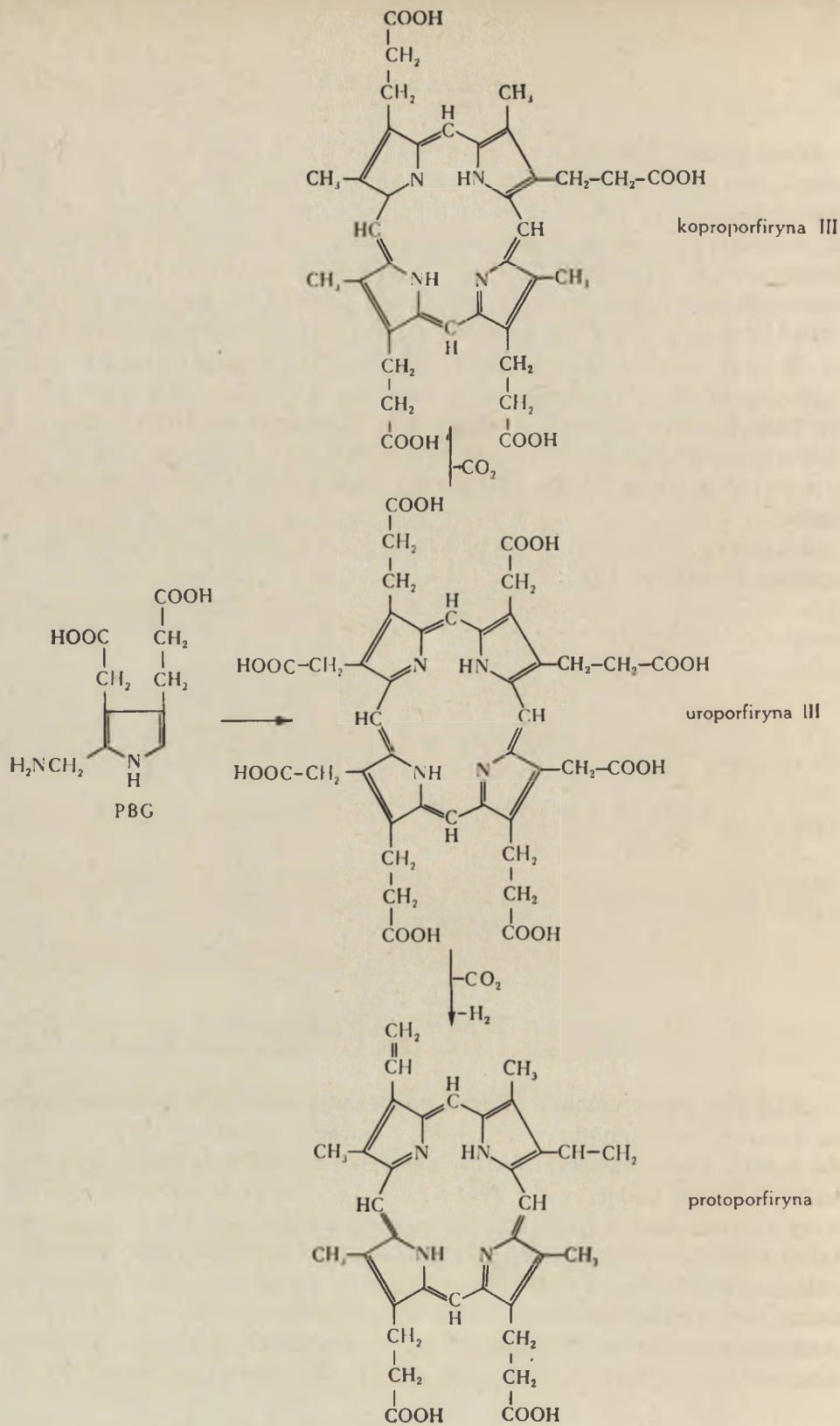
być „cegiełką pirolową”, z której powstają w warunkach biologicznych porfiryny i zaproponowali następujący schemat powstawania tej cegiełki:

Nieco później S h e m i n i R u s s e l (53, 47) stwierdzili, że w syntezie hemu „aktywny bursztynian” i glicyna mogą być zastąpione przez kwas δ -aminolewulinowy (δ AL). Dodanie niepromieniotwórczego δ AL do układu, w którym prowadzona jest synteza hemu z glicyny- ^{14}C i kwasu bursztynowego ^{14}C powoduje spadek czynności promieniotwórczej porfiryny o 80—90%. Natomiast synteza hemu przy użyciu δ AL znaczonego ^{15}N i ^{14}C w połączeniu 5 — prowadzi do otrzymania porfiryny zawierającej 66 razy większą ilość atomów ^{14}C aniżeli porfiryra otrzymywana z glicyny-2- ^{14}C (54). Stwierdzono również, że homogenaty erytrocytów kaczek, które nie mają zdolności syntetyzowania porfiryn z glicyny i bursztynianu mogą syntetyzować hem z δ AL. Te i inne dane (33) wskazują wyraźnie na to, że δ AL jest prekursorem porfiryn w syntezie biologicznej.

S h e m i n, R u s s e l i A b r a m s k y (54) przyjmują następujący przebieg biosyntezy PBG:



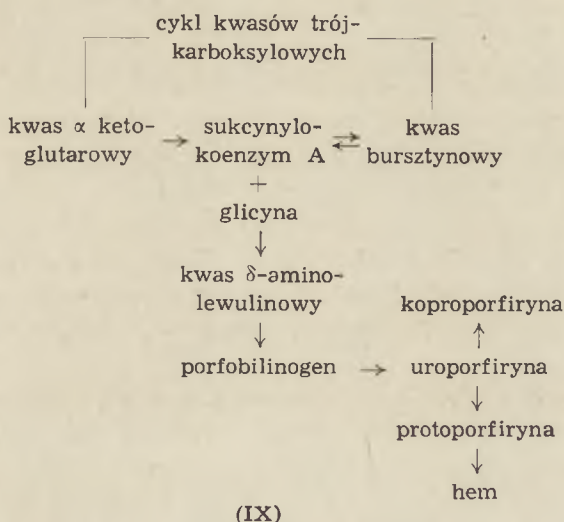
„Aktywny bursztynian” i glicyna kondensują się z wytworzeniem kwasu α -amino- β -ketoaldolowego, który tracąc cząsteczkę CO_2 przechodzi w δ AL. Dwie cząsteczki δ AL w następnej reakcji dają jedną cząsteczkę PBG. Trzeba dodać, że w r. 1955 S c h m i d i S h e m i n (44) wydzielili z erytrocytów kaczek frakcję białkową mającą wszelkie cechy enzymu katalizującego tę ostatnią reakcję. Pewne światło na dalsze przemiany PBG rzucają badania F a l k a, D r e s s e l a i R i m i n g t o n a (15, 16) prowadzone przy użyciu hemolizatu krwi kurcząt. Stwierdzili oni, że przy przepuszczaniu powietrza PBG przechodzi w hemolizacie w mieszaninę uro-, kopro- i protoporfiryny, przy czym wydajność tej ostatniej sięga 60%.



Przy przepuszczaniu azotu w analogicznych warunkach otrzymuje się tylko uro- i koproporfirynę. Pierwsza z nich w obecności powietrza przechodzi w protopirynę, podczas gdy koproporfiryna pozostaje niezmienną. Również dodana bezpośrednio do hemolizatu krwi kurcząt uroporfiryna przy przepuszczaniu powietrza przechodzi w protoporfirynę (wydajność do 50%), a koproporfiryna, jak można było oczekiwać, nie ulega przemianie. Podobne wyniki uzyskali *Neuberger i Scott* (38), używając jako substratu δ AL.

Badania te wyjaśniły mechanizm syntezy od stadium δ AL czy PBC do porfiryn oraz ustaliły genetyczne zależności między trzema podstawowymi porfirynami. Związkiem pierwotnym jest uroporfiryna. Przez dekarboksylację i odwodorowanie w warunkach aerobowych powstaje z niej protoporfiryna. Przez samą dekarboksylację tworzy się koproporfiryna, którą należy uznać za produkt uboczny biosyntezy hemu.

Schemat IX przedstawia proponowany mechanizm biosyntezy hemu:

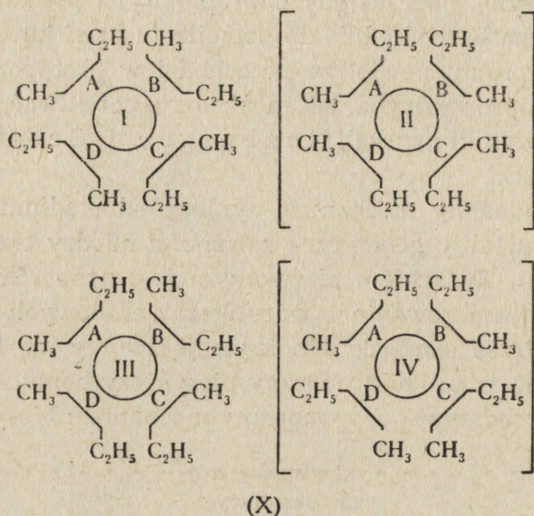


Nie wszystkie przejścia są już dokładnie zbadane, nie wiadomo również, dlaczego w wyniku syntezy biologicznej powstają w wielkiej przewadze izomery III porfiryn.

Wszystkie możliwe ze względu na kolejność podstawników przy pierścieniach pirolowych izomery uro- kopro- i protoporfiryny można przez dekarboksylację i uwodornienie łańcuchów bocznych sprowadzić do czterech izomerycznych etioporfiryn. Na wniosek *Hansa Fischera* oznacza się je rzymskimi liczbami — I, II, III, IV (wzór X)

Grupy metylowe w cząsteczce etioporfiryny odpowiadają grupom metylowym kopro- i protoporfiryny i resztom kwasu octowego uroporfiryny,

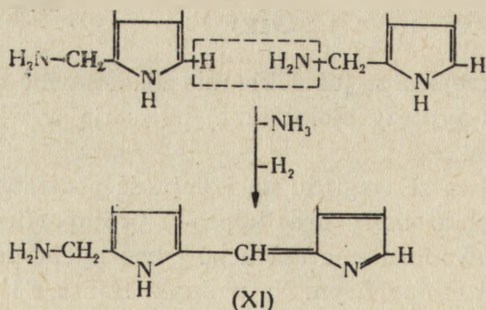
a grupy etylowe — resztom kwasu propionowego wszystkich trzech porfiryn i grupom winylowym protoporfiryny.



W organizmach żywych syntetyzowane są wyłącznie porfiryny typów I i III (protoporfiryna tylko typu III) ze znaczną przewagą ilościową porfiryn typu III — stosunek porfiryn typu III do porfiryn typu I wynosi 1500 : 1 (14).

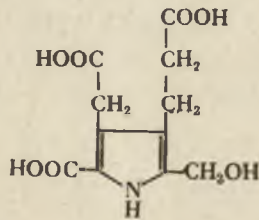
Na pytanie, jaki jest mechanizm tworzenia się czteropirolowego układu i w jaki sposób reagują ze sobą cząsteczki porfobilinogenu, nie można dziś jeszcze udzielić jednoznacznej odpowiedzi. Istnieje jednak szereg hipotez.

Według Z e i l e'g o (65) powstawanie cząsteczki porfiryny związane jest z wydzieleniem amoniaku i odwodorowaniem wg następującego schematu:



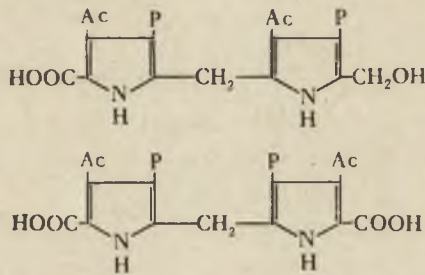
Sprzęgnięcie się wszystkich czterech pierścieni w reakcjach powyższego typu prowadziłoby jednak wyłącznie do powstawania porfiryny typu I.

Według Treibsa i Otta (57), którzy przeprowadzili badania nad syntezą uroporfiryny z pirolowego hydroksykwasu o wzorze XII i otrzy-



(XII)

mywali uroporfirynę III, reakcja przebiega w dwóch etapach. Najpierw zachodzi łączenie się jednostek pirolowych po dwie, przy czym podstawniki przy węglu 2 ($-\text{CH}_2\text{OH}$) i przy węglu 5 ($-\text{COOH}$) mogą tak samo szybko reagować. W ten sposób powstają w równych ilościach dwa pirylometany:

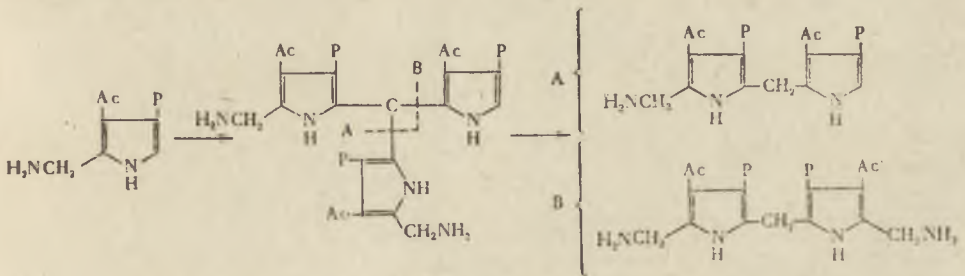


gdzie: Ac - reszta kwasu octowego
P - reszta kwasu propionowego

(XIII)

W drugim etapie zachodzi kondensacja pomiędzy tymi związkami, w wyniku której otrzymuje się uroporfirynę III.

Według Shemina i wsp. (54) oraz Corwina i wsp. (12, 2) w pierwszym stadium trzy cząsteczki pochodnej pirolu tworzą cząsteczkę trójpierolową

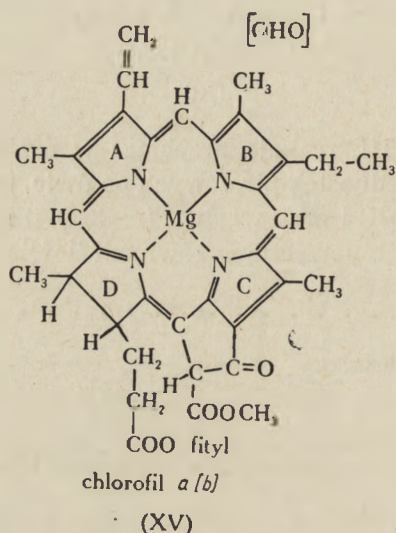


(XIV)

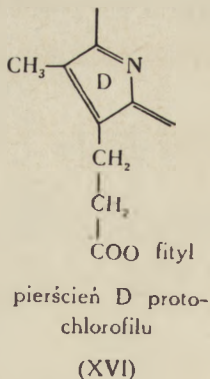
gdzie: Ac - reszta kwasu octowego
P - reszta kwasu propionowego

z wydzieleniem aldehydu mrówkowego. Związek trójpirolowy ulega rozpadowi na dwu- i jednopierścieniowy. W zależności od miejsca pęknięcia (na schemacie linie przerywane) powstają dwa różne pirylometany (A i B), które sprzęgając się tworzą cząsteczkę typu III.

Wiele danych wyjaśniających poszczególne stadia biosyntezy porfiryn przyniosły badania nad powstawaniem zielonego barwnika roślin (chlorofilu *a* i *b*) wzór XV.



Jeszcze przed potwierdzeniem budowy chlorofilu w r. 1939 przez szkołę Hansa F i s c h e r a (22) na drodze syntezy, poznano związek mogący być produktem pośrednim biosyntezy tego barwnika. Jest nim protochlorofil wyodrębniony w r. 1893 przez M o n t e v e r d e g o (34) z roślin kiełkujących w ciemności. Budowę protochlorofilu (wzór XVI) ustalono w latach 1939—1940 (19, 20)



— różni się on od chlorofilu obecnością jednego podwójnego wiązania w pierścieniu D.

W ostatnich latach badania nad biosyntezą chlorofilu w jednokomórkowym zielonym glonie *Chlorella vulgaris* prowadzone są przez badaczy amerykańskich Altmana i Salomona oraz Granicka. Wykazano, że homogenaty *Chlorella* mogą syntetyzować protoporfirynę z PBG (5). Zdolność roślin do syntetyzowania tego układu znana jest od dawna (17, 18, 21, 42, 45, 58).

Hodując *Chlorella vulgaris* na pożywce zawierającej octan i glicynę znaczone ^{14}C stwierdzono, że glon syntetyzuje promieniotwórczy chlorofil (13), przy czym niewykorzystywany przy biosyntezie hemu węgiel karboksylowy glicyny włącza się do cząsteczki chlorofilu. Tworzy on metyl estrowy przy grupie karboksylowej pierścienia izocyklicznego. Pomiarzy czynności promieniotwórczej poszczególnych atomów pozwoliły na stwierdzenie, że dawniejsza hipoteza, według której chlorofil b powstaje z chlorofilu a, jest niesłuszna, gdyż zawartość promieniotwórczego węgla w obydwu barwnikach była jednakowa. Gdyby chlorofil b powstawał z a, musiałby być zaobserwowany efekt „rozcieńczenia”.

Granick pod wpływem naświetlania promieniami Röntgena lub pozafiołkowymi otrzymał mutanty *Chlorella*, w których proces tworzenia się chlorofilu był przerywany przez zablokowanie pewnych stadiów łańcucha reakcji enzymatycznych.

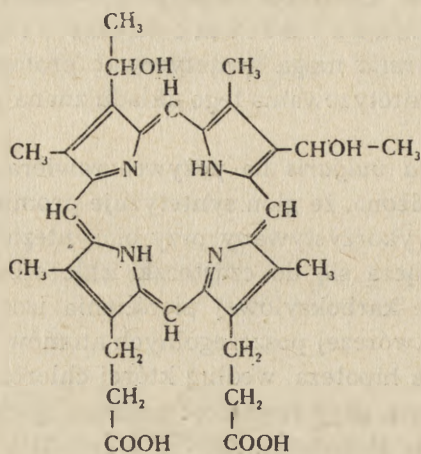
Jeden z tych mutantów oznaczony symbolem W_5B , mający komórki 2—3 razy większe niż normalny glon, wytwarzał brązowy barwnik, który okazał się protoporfiryną (23).

Z mutantu W_5B pod działaniem promieni pozafiołkowych otrzymano nowy, jasnobrązowy mutant oznaczony symbolem W_5B17 (6), z którego wyekstrahowano mieszaninę porfiryń. Po rozdzieleniu metodami chromatografii bibułowej i rozdziłu przeciwpądowego znaleziono porfiryń zawierające 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 grup karboksylowych (29, 39). W przeważającej ilości występowały związki o dwóch grupach karboksylowych z jedną, dwiema i bez grup winylowych w cząsteczce. Ostatni z nich okazał się hematoporfiryną (wzór XVII) (27).

Przeście od reszty kwasu propionowego uroporfiryny do grupy winylowej protoporfiryny zachodzi prawdopodobnie na drodze β -oksydacji zgodnie ze wzorem XVIII.

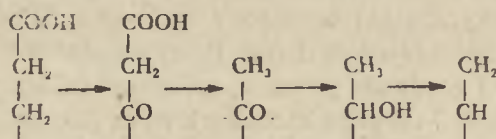
Wyniki badań zarówno nad biosyntezą układu hemowego jak i chlorofilowego wskazują na to, że mechanizm biosyntezy tych związków jest do stadium protoporfiryny wspólny. Przy biosyntezie hemu po utworzeniu się protoporfiryny pozostaje tylko wbudowanie żelaza, w syntezie chlorofilu musi mieć miejsce jeszcze kilka przemian. Kolejność niektórych z nich

ustalono przy pomocy mutantów. Z mutantu 60 wydzielono magnezoproporfirynę wykazując, że następnym stadium po wytworzeniu się proporfiryny jest wbudowanie metalu (24). Z jasnozielonego mutantu 31 a wy-



dzielano magnezowinylofeoporfirynę a5 (25). Przejście od magnezoproporfiryny do magnezowinylofeoporfiryny a5 zachodzi prawdopodobnie w czterech stadiach:

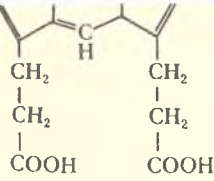
- 1) uwodornienie jednej z grup winylowych do grupy etylowej,
- 2) utlenienie łańcucha kwasu propionowego przy pierścieniu C,
- 3) estryfikacja grupy karboksylowej przy pierścieniu C metanolem i
- 4) zamknięcie pierścienia cyklopentanonowego.



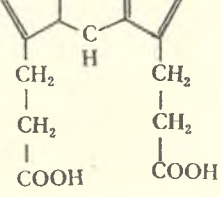
Stwierdzono (25), że w mutancie 31a w temperaturze wyższej niż 6°C powstaje chlorofil, tzn. że magnezo-winylofeoporfiryna ulega estryfikacji fitelem i uwodornieniu pierścienia D. W temperaturze poniżej 6°C estryfikacja nie zachodzi i magnezo-winylofeoporfiryna a5 ulega rozkładowi pod wpływem światła.

Przebieg biosyntezy chlorofilu a z glicyny i kwasu octowego podany jest na schemacie XIX.

Tworzenie się grupy aldehydowej chlorofilu b pozostaje dotychczas niewyjaśnione.

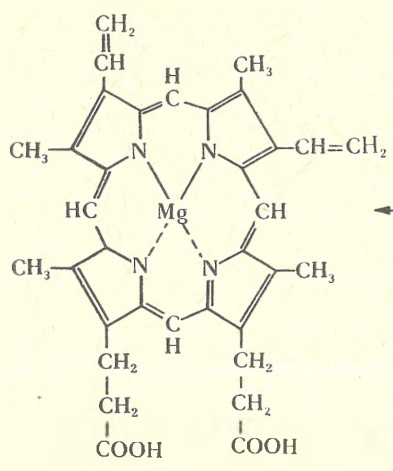


uroporfiryna III i porfiryny zawierające 7, 6, 5, 4, 3 i 2 grupy karboksylowe



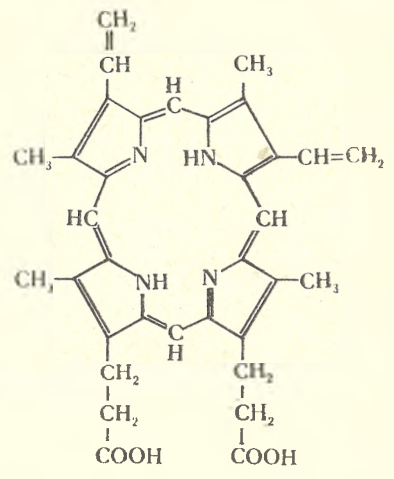
hematoporfiryna

Chlorella W₃B



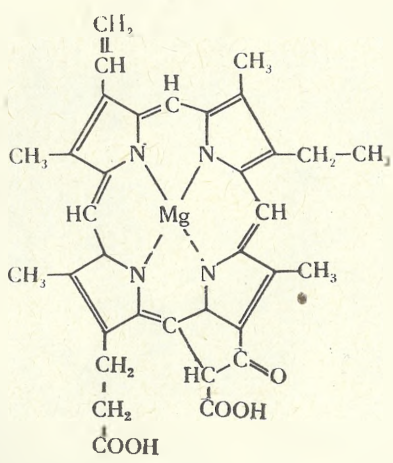
magnezo-protoporfiryna

Chlorella 60



protoporfiryna

Chlorella 31a



magnezo-winylofeoporfiryna a₅



Schemat biosyntezy chlorofilu a

(XIX)

Badania nad biosyntezą chlorofilu nie tylko potwierdziły dawniejsze przypuszczenia wspólnego mechanizmu powstawania „barwnika roślin” i „barwnika krwi”, lecz również wniosły wiele ciekawych przesłanek pozwalających dokładniej zrozumieć przebieg niektórych reakcji. Tak dokładne wniknięcie w mechanizm biosyntezy związków porfirynowych stało się możliwe dzięki zastosowaniu metody izotopowej.

LITERATURA

1. Altman K. I., Casarett G. W., Masters R. E., Noonan T. R., Salomon K., *J. Biol. Chem.* **176**, 319, 1948.
2. Andrews J. S., Corwin A. H., Sharp A. G., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 491, 1950.
3. Bloch K., Rittenberg D., *J. Biol. Chem.* **159**, 45, 1945.
4. Bogorad L., *Science*, **121**, 878, 1955.
5. Bogorad L., Granick S., *Proc. Nat. Ac. Sci.* **39**, 1176, 1953.
6. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* **202**, 793, 1953.
7. Buchanan J. M., Hastings A. B., *Physiol. Rev.*, **26**, 120, 1946.
8. Bufton A. W. J., Bentley R., Rimington C., *Biochem. J.* **43**, XLIX, 1948.
9. Cookson G. H., *Nature*, **172**, 457, 1953.
10. Cookson G. H., Rimington C. *ibid.* **171**, 875, 1953.
11. Cookson G. H., Rimington C., *Biochem. J.* **57**, 476, 1954.
12. Corwin A. H., Andrews J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1973, 1937.
13. Della Rosa R. J., Altman K. I., Salomon K., *J. Biol. Chem.* **202**, 771, 1953.
14. Drabkin D. L., *Physiol. Rev.* **31**, 345, 1951.
15. Dressel E. I. B., Falk J. E., *Nature* **172**, 1185, 1953.
16. Falk J. E., Dressel E. I. B., Rimington C., *ibid.* **172**, 292, 1953.
17. Fischer H., Fink H., Hoppe-Seylers *Z. physiol. Chem.* **140**, 57, 1924.
18. Fischer H., Hilmer H., *ibid.*, **153**, 167, 1926.
19. Fischer H., Mittenzwei H., Oestreicher A., *ibid.*, **257**, IV, 1939.
20. Fischer H., Oestreicher A., *ibid.* **262**, 243, 1940.
21. Fischer H., Schwerdtel F., *ibid.*, **159**, 120, 1926.
22. Fischer H., Wenderoth H., *Ann.*, **537**, 170, 1939.
23. Granick S., *J. Biol. Chem.*, **172**, 717, 1948.
24. Granick S., *ibid.*, **175**, 333, 1948.
25. Granick S., *ibid.*, **183**, 713, 1950.
26. Granick S., Bogorad L., *ibid.*, **202**, 781, 1953.
27. Granick S., Bogorad L., Jaffe H., *ibid.*, **202**, 801, 1953.
28. Grinstein M., Kamen M. D., Moore C. V., *ibid.*, **174**, 767, 1948.
29. Grinstein M., Kamen M. D., Moore C. V., *ibid.*, **179**, 359, 1949.
30. Hawkinson V. H., Watson C. J., *Science*, **115**, 496, 1952.
31. Lemberg R., Legge J. W., *Hematin Compounds and Bile Pigments*, New York 1949.
32. Lorber V., Utter M. V., Rudney H., Cook M., *J. Biol. Chem.*, **185**, 689, 1950.
33. Mauzerall D., Granick S., *ibid.* **219**, 435, 1956.
34. Monteverde N. A., *Scripta horti Petropol.* **13**, 201, 1893 .

35. Muir H., Neuberger A., *Biochem. J.* **45**, 163, 1949.
36. Muir H. M., Neuberger A., *ibid.* **45**, XXXIV, 1949.
37. Muir H. M., Neuberger A., *ibid.*, **47**, 97, 1950.
38. Neuberger A., Scott J. J., *Nature*, **172**, 1093, 1953.
39. Nicholas R. E. H., Rimmington C., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1**, 12, 1949.
40. Radin N. S., Rittenberg D., Shemin D., *J. Biol. Chem.*, **184**, 745, 1950.
41. Radin N. S., Rittenberg D., Shemin D., *ibid.*, **184**, 755, 1950.
42. Richmond J. E., Solomon K., *Bioch., Bioph. Acta*, **17**, 48, 1955.
43. Richmond J. E., Solomon K., Caplin S., *Nature*, **174**, 34, 1954.
44. Schmid R., Shemin D., *J. Am. Soc.* **77**, 506, 1955.
45. Schumm O., *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **152**, 147, 1926; **154**, 171, 1926; **158**, 77, 1926.
46. Siedel W., *Angew. Chem.*, **66**, 735, 1954.
47. Shemin D., Abramsky T., Russel Ch. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1204, 1954.
48. Shemin D., Kumin S., *J. Biol. Chem.* **198**, 827, 1952.
49. Shemin D., London J. M., Rittenberg D., *ibid.* **173**, 799, 1948.
50. Shemin D., London J. M., Rittenberg D., *ibid.* **183**, 757, 767, 1950.
51. Shemin D., Rittenberg D., *ibid.* **159**, 567, 1945.
52. Shemin D., Rittenberg D., *ibid.* **166**, 621, 1946.
53. Shemin D., Russel C., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4873, 1953.
54. Shemin D., Russel Ch. S., Abramsky T., *J. Biol. Chem.* **215**, 613, 1955.
55. Shemin D., Wittenberg J., *ibid.*, **192**, 315, 1951.
56. Shemin D., Wittenberg J., artykuł w zbiorze „Isotopes in Biochemistry”, New York 1951.
57. Treibs A., Ott W., *Naturwiss.*, **40**, 476, 1953.
58. Virtanen A. I., *Angew. Chem.* **65**, 1, 1953.
59. Waldenström I., Wahlquist B., *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **260**, 184, 1939.
60. Westall R. G., *Nature* **170**, 614, 1952.
61. Wittenberg J., Shemin D., *J. Biol. Chem.*, **178**, 47, 1949.
62. Wittenberg J., Shemin D., *ibid.*, **185**, 103, 1950.
63. Wood H. G., Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology **13**, 201, 1948.
64. Wriston J. C. j. v., Lack L., Shemin D., *J. Biol. Chem.*, **215**, 603, 1955.
65. Zeile K., *Angew. Chem.* **66**, 729, 1954.

J. GEYER-DUSZYŃSKA i L. JANOTA-BASSALIK

Wpływ promieniowania na drobnoustroje

Naświetlanie organizmów żywych promieniowaniami jonizującymi jak promienie Roentgena, cząstkami α , β czy też promieniami ultrafioletowymi wywołuje powstanie całego szeregu różnorodnych, nieraz skomplikowanych zaburzeń dotyczących zarówno funkcji całego organizmu jak i struktury poszczególnych jego składników.

Rozróżniamy następujące efekty działania promieniowania: 1) efekt ogólnobiologiczny, 2) wywoływanie pęknięć i zmian strukturalnych w chromosomach, 3) indukowanie mutacji genowych. Pomimo iż efekty te są ściśle ze sobą związane, zwykle wyodrębnia się je ze względu na specyficzną metodykę badań, właściwą dla każdego z nich. Efekt biologiczny badany jest głównie w oparciu o metody biochemii i fizjologii, przy badaniu uszkodzeń powstających w chromosomach pomocną jest metoda cytologiczna, natomiast mutagennym działaniem promieniowań zajmuje się specjalna gałąź genetyki, tzw. genetyka promieniowania. Jednak dopiero zestawienie wyników uzyskanych przy pomocy wszystkich metod daje nam pełny obraz wpływu promieniowania na organizm.

W pierwszym okresie badań nad wpływem promieniowania głównym obiektem były organizmy wyższe, zarówno roślinne jak i zwierzęce. Dopiero w ostatnich latach rozwinęły się bardzo intensywnie prace nad mikroorganizmami, gdyż okazało się, iż są one z różnych względów niezmiernie dogodnym do tego celu materiałem. Najczęściej używane do naświetlań były drożdże, pleśnie *Neurospora*, *Penicillium* i *Aspergillus*, oraz bakterie *Staphylococcus aureus*, *Bacterium prodigiosum*, *Escherichia coli*. Ostatnio Nybom (22) wykazał, że równie dobrym materiałem do naświetlań są jednokomórkowe glony, jak np. *Chlamydomonas eugametos*.

Scharakteryzujemy pokrótce zasadnicze typy efektów działania promieniowania znane dla organizmów wyższych, aby zorientować się na czym one polegają i na tym tle dopiero zastanowimy się, jak przejawiają się one u mikroorganizmów.

U organizmów wyższych efekt biologiczny uzewnętrznia się najjaskrawiej w doświadczeniach, w których cały organizm jest poddawany długo-

trwałemu, stałemu działaniu promieni o słabej intensywności, lub jest naświetlany krótkotrwałymi lecz bardzo dużymi dawkami dla ustalenia letalnej dozy promieniowania. Jednak zachodzące przy tym przemiany są tak różnorodne, że zwykle trudno jest ustalić, co było bezpośrednią przyczyną śmierci organizmu, czy też zorientować się w poszczególnych procesach zachodzących w naświetlanych tkankach. Dlatego dużo częściej badany jest wpływ pewnych określonych nieletalnych dawek promieniowania, przy czym naświetlany jest albo cały organizm, albo tylko poszczególne jego części. Częstym obiektem badań są hodowle tkanek zwierzęcych, stożki wzrostu korzeni i pyłki roślin względnie komórki rozrodcze lub zarodki zwierząt, jako systemy szybko dzielące się i dogodne zarówno dla przeprowadzenia eksperymentu jak i analizy zachodzącym zmian. Typowymi objawami występującymi po naświetlaniu są: czasowe zahamowanie aktywności mitotycznej komórek i zaburzenia w przebiegu obserwowanych po tym okresie podziałów. Zaburzenia te wyrażają się w występowaniu tzw. lepkości chromosomów spowodowanej prawdopodobnie nagromadzeniem się na ich powierzchni nadmiaru zdepolimeryzowanych kwasów nukleinowych i pojawieniu się pęknięć w chromosomach, co powoduje z kolei wysoce nienormalny przebieg podziału, szczególnie jego anafazy i telofazy, oraz nierównomierny rozdział chromosomów do jąder potomnych. Komórki powstałe w wyniku tych nienormalnych podziałów często giną. O silnym zakłóceniu metabolizmu komórki świadczy również występujący niekiedy wzrost jej objętości jak również zaobserwowane w niektórych doświadczeniach z kulturami tkankowymi (10) zwiększenie stężenia kwasów rybonukleinowych w protoplazmie, oraz wzrost wymiaru jąderek.

W badaniach nad mikroorganizmami natomiast najłatwiej uchwycić jest właśnie efekt letalny, toteż interesowano się tutaj przede wszystkim, jeśli chodzi o efekt biologiczny naświetlania, działaniem letalnym. Badano związek pomiędzy procentową ilością przeżywających komórek a wysokością zastosowanej dozy promieniowania, jej intensywnością, frakcjonowaniem. Badano również wpływ temperatury, ilości tlenu oraz innych dodatkowych czynników na przebieg krzywej przeżywalności, oraz zależność jej kształtu od zastosowanego rodzaju promieniowania. Drugim znanym typem efektu działania promieniowania u organizmów wyższych jest pojawienie się pod wpływem naświetlania pęknięć w chromosomach. Następnie występuje zjawisko rekombinacji uszkodzonych powierzchni i powstają chromosomowe zmiany strukturalne. Zmiany takie powstają zarówno w komórkach somatycznych jak i płciowych, gdy powstaną w komórkach płciowych w potomstwie naświetlanych osobników, występują tzw. strukturalne mutacje chromosomowe. W następstwie tych mutacji może pojawić się cały szereg zmian dziedzicznych w cechach organizmu. Głównym obiektem ba-

dań nad chromosomowymi zmianami strukturalnymi była *Drosophila melanogaster* ze względu na obecność olbrzymich chromosomów śliniankowych umożliwiających zaobserwowanie najdrobniejszych nawet zmian w strukturze chromosomów i ściśle powiązanie ich ze zmianami w genotypie. Do takich badań nadają się jedynie te organizmy, u których zmiany strukturalne w chromosomach są łatwe do zaobserwowania. Z roślin dogodna jest np. *Zea mais*, *Tradescantia*. Mikroorganizmy do tego typu badań całkowicie się nie nadają, trudno jest tu bowiem stwierdzić cytologiczne występowanie jakichkolwiek zmian w chromosomach.

Trzeci typ efektu działania promieniowania na organizm, czyli tzw. efekt genetyczny, jest to powstawanie mutacji genowych pod wpływem naświetlania. Powstawanie mutacji genowych opisywane było u wielu organizmów, zarówno zwierząt jak i roślin oraz mikroorganizmów. Tutaj właśnie mikroorganizmy jak np. *Escherichia* czy *Neurospora* stały się szczególnie w ostatnich latach częstym obiektem badań. Dają one bowiem w porównaniu z organizmami wyższymi dużo większe możliwości otrzymania olbrzymiego ilościowo materiału w bardzo krótkim czasie przy ścisłej kontroli warunków doświadczenia tak ważnych jak np. chemizm środowiska zewnętrznego. U mikroorganizmów wywołano działając promieniami wiele mutacji dotyczących kształtu, barwy, wielkości kolonii lub komórek, oraz zmian w systemie enzymatycznym prowadzących do zmian w zdolności do syntez biochemicznych. Ostatnia grupa mutacji, tzw. mutanty biochemiczne, jest szczególnie ważna, gdyż wielokrotnie pozwala na analizę przebiegu skomplikowanych cykli metabolicznych. Badania powyższe wykazały na drodze fizjologicznej, iż u mikroorganizmów istnieją określone jednostki dziedziczne identyczne z genami organizmów wyższych i że są one ułożone liniowo i sprzężone ze sobą w grupy analogiczne do grup sprzężenia organizmów wyższych (18, 19).

W celu zilustrowania tego zagadnienia przytoczymy szczegółowy przykład z prac *L e d e r b e r g a* i *T a t u m* z 1947 r. (17) Naświetlając *Escherichia coli* otrzymywali oni różne biochemiczne mutanty. Niekiedy powstawały szczepy wykazujące jednocześnie kilka mutacji. Otrzymali np. szczep, który utracił zdolność do syntetyzowania biotyny i metioniny i na skutek tego nie mógł rosnąć na pożywce nie zawierającej tych substancji. Inny szczep z tej samej serii doświadczeń utracił zdolność do syntetyzowania proliny i treoniny. Żaden z nich nie mógł rosnąć na minimalnej pożywce. Gdy szczepiono oba podwójne mutanty razem, normalnie nie używano również ich wzrostu. Jednak w niezmiernie rzadkich przypadkach pojawiały się kolonie, które rosły w tych warunkach zupełnie dobrze. Częstość ich występowania wynosiła ok. 10^{-7} . Komórki uzyskanej hodowli zdolne były syntetyzować biotyne, metioninę, prolinę i treoninę. Pomiędzy

dwoma komórkami dwóch podwójnych mutantów zaszła wymiana odpowiednich czynników genetycznych. Jeżeli oba podwójne mutanty hodowane we wspólnej płynnej pożywce rozdzielć filtrem uniemożliwiającym zetknięcie się komórek, zjawisko wymiany czynników dziedzicznych nigdy nie zachodzi (8). Mamy więc tu do czynienia z procesem wymiany zachodzącej w trakcie łączenia się komórek, a nie ze zjawiskiem tzw. transformacji. Powyższe potwierdza fakt, że w mieszanej hodowli kilku podwójnych mutantów wymiany czynników dziedzicznych występują tylko pomiędzy dwoma typami mutantów, co wskazuje, że zawsze biorą w niej udział jedynie dwie komórki. Badania z podwójnymi i wielokrotnymi mutantami wykazały, że nie zachodzi tu całkowicie przypadkowa wymiana czynników, lecz są one sprzężone w grupy. Jedna z takich grup sprzężenia obejmuje np. piętnaście czynników. W dalszych badaniach nad czynnikami dziedzicznymi stwierdzono, że są one ułożone liniowo, zupełnie analogicznie jak geny w chromosomach organizmów wyższych.

Obserwacje % crossing over dla poszczególnych par czynników umożliwiły skonstruowanie u *E. coli* dla niektórych grup czynników genetycznej mapy (19, 29).

Podobne prace prowadzone były i nad wieloma innymi mikroorganizmami. Uzyskano tu również identyczne wyniki. Badania nad indukowaniem mutacji u mikroorganizmów umożliwiły w wielu przypadkach przeprowadzenie dokładnej analizy ich systemu genetycznego i tym samym w dużym stopniu przyczyniły się do wybuchowego rozwoju genetyki mikroorganizmów w ostatnim dziesięcioleciu.

Jednym z zasadniczych problemów dotyczących wpływu promieniowania na wszystkie organizmy jest mechanizm ich działania. Główną podstawą teoretycznych rozważań były prace dotyczące mutagennego działania promieni jonizujących u organizmów wyższych i mikroorganizmów oraz letalnego u bakterii, wirusów i bakteriofagów. Oba te efekty wykazują prawidłowości i mogą być ujęte w postaci zależności matematycznych. Częstość występowania zarówno mutacji jak i zmian letalnych jest proporcjonalna do zastosowanej dozy promieniowania. Zmieniając różne warunki naświetlania można badać wpływ tych zmian na przebieg indukowanego procesu, co z kolei pozwala na określenie jego charakteru. Można również przeprowadzić porównanie pomiędzy wydajnością różnych rodzajów promieniowania. Dozę promieniowania wyraża się w roentgenach. Przyjmuje się, że przy naświetlaniu jednym roentgenem sześciennego mikrona wody względnie żywej tkanki zostaną w tej objętości wywołane dwie jonizacje. Model działania promieni jonizujących na tkankę został skonstruowany na podstawie analogii do działania ich na wodę względnie roztwory wodne różnych substancji. Naświetlenie wywołuje w roztworach dwa efekty:

1) pierwotny, tzw. bezpośredni, a mianowicie jonizację, 2) wtórny, pośredni — pobudzenie cieplne.

W odniesieniu do materiału biologicznego została wysunięta przez Mullera (20), Timoféeffa - Resso夫斯基ego i Zimmera (28) Lea (16) i innych teoria „trafiań” (ang. target theory, niem. Treffer Theorie). Teoria ta przyjmuje, że przyczyną zmian genetycznych indukowanych naświetlaniem jest jedynie efekt bezpośredni promieni tzn. jonizacja, natomiast pobudzenie cieplne pozostaje bez wpływu. Mutacja w genie powstanie wtedy jedynie, gdy cząstka promieniowania trafi i wywoła jonizację w obrębie jego objętości wrażliwej, tzw. „sensitive volume”. Jeżeli ilość jonizacji na tym odcinku drogi cząstki czy fotonu, który przetnie chromosom, będzie dostatecznie duża, w chromosomie powstanie pęknięcie. Np. dla chromosomów *Tradescantia* Lea na podstawie danych eksperymentalnych i rozważań teoretycznych obliczył, że dostateczna ilość jonizacji dla wywołania pęknięcia wynosi 15 do 20. Dowód, że działanie promieni wywołane jest pojedynczą jonizacją, oparty został na następujących faktach: 1) wydajność zmian jest wprost proporcjonalna do dozy; 2) dla danej dozy efekt niezależny jest od czasu naświetlania, znaczenie ma jedynie ogólna ilość zastosowanych jednostek promieniowania tzn. roentgenów, intensywność, czyli ich ilość na minutę pozostaje bez wpływu. Frakcjonowanie również nie odgrywa roli; 3) wydajność danego rodzaju promieni jonizujących jest związana z gęstością jonizacji, stąd przyjmuje się, że pojedyncza jonizacja lub wiązka jonizacji wytworzonych przez pojedynczą pierwotną cząstkę jonizującą jest czynnikiem wywołującym zmianę. Całokształt doświadczeń przeprowadzonych do lat czterdziestych wskazywał również na to, że efekt promieniowania jest niezależny od temperatury, w której prowadzimy naświetlanie, oraz od stanu fizjologicznego badanego organizmu.

Związek pomiędzy gęstością jonizacji a wydajnością promieniowania wymaga bliższego omówienia. Gęstość jonizacji wzrasta dla poszczególnych rodzajów promieniowania w następującym porządku: promienie γ , promienie X, neutrony, cząstki α . Ny b o m (23) podaje, że na torze jonizującej cząstki powstaje w tkance dla promieni γ około 8 jonizacji na mikron drogi. Dla promieni X około 100, dla neutronów od 500 do 2000 w zależności od ich energii, dla cząstek α zaś od 2000 do 10000. (Na torze promieni X jonizacje rozłożone są rzadko. Jedynie na końcu toru znajdujemy w nich duże zagęszczenie. Na torze neutronu zagęszczenie jonizacji jest duże, na torze cząstki α jonizacje ułożone są jeszcze gęściej). Przy wywoływaniu mutacji genowych promienie X są o wiele wydajniejsze niż neutrony czy cząstki α . Natomiast przy wytwarzaniu pęknięć w chromosomach sprawa przedstawia się odwrotnie.

Przy zastosowaniu identycznej dozy dużo większa ilość rozsianych pojedynczych jonizacji wywołanych promieniami X trafia w objętość wrażliwą różnych genów niż w przypadku skupionych jonizacji wywołanych przebiegiem cząsteczek α . Stąd większa wydajność tych pierwszych jako czynnika mutagennego. Aby powstało pęknięcie w chromosomie, musi zajść w tym punkcie kilkanaście jonizacji. Tu więc z kolei skuteczniejszym jest uderzenie np. cząsteczki α . Z doświadczeń tego typu można zorientować się w kształcie i wielkości celu, który naświetlamy. Na tej podstawie obliczano np. objętość wrażliwą genu, określano wielkość i kształt wielu bakterii i wirusów. Jeżeli wydajność dla wszystkich typów promieniowania jest dla danego obiektu stała, wskazuje to, że mamy do czynienia z celem kulistym. Wzrost wydajności w miarę wzrostu gęstości jonizacji jest wskazówką, że mamy do czynienia z celem podłużnym, lub że celi tych jest kilka i zjawisko wywołane promieniowaniem ma więcej niż jedną przyczynę. Przy inaktywacji wirusów i bakteriofagów jednym z głównych sposobów rozróżniania, czy przyczyną jej była pojedyncza mutacja genu, czy też mamy do czynienia z biologicznym działaniem letalnym na cały mikroorganizm, było właśnie to kryterium. Drogą porównania wyników z naświetlania promieniowaniami o różnej gęstości jonizacji często określano średnicę organizmów submikroskopowych. Np. Le a (16) podaje, że średnica faga dezynтерии *S 13* wynosi około 16 μ . Ocena ta pokrywa się z obserwacjami nad wymiarami faga przeprowadzonymi metodą filtrów kolodionowych.

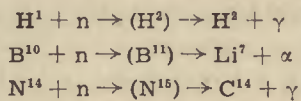
Jeśli chodzi o ocenę teorii trafień, to należy podkreślić wielką rolę, którą odegrała ona pozwalając na ścisłe, matematyczne ujęcie całego szeregu zjawisk i wykrycie licznych ogólnych prawidłowości. Okazała się ona jednak zbyt dużym uogólnieniem, gdyż wysunęła na plan pierwszy tylko jeden z mechanizmów działania promieni, a mianowicie działanie bezpośrednie przez wywoływanie jonizacji. Już żeby objąć promienie ultrafioletowe, które, pomimo iż nie są jonizującymi, działają zupełnie w podobny sposób na organizmy, wywołując mutacje genowe, pęknięcia chromosomów, inaktywacje mikroorganizmów itp., musiano uczynić pewne dodatkowe założenia. Promienie ultrafioletowe działają jedynie na drodze pobudzania cząsteczek, które je absorbują. Jak wiadomo, określone związki chemiczne absorbują promienie o ściśle określonej długości fali, np. kwasy nukleinowe wykazują maksimum absorpcji dla promieni o długości 2600 Å, białka dla długości fali — 2800 Å itp. Następuje wtedy ich rozkład przez rozerwanie pierścieni zasad purynowych i pirymidynowych. Aktywność mutagenna promieni ultrafioletowych w dużym stopniu jest zależna od długości fali. Największą aktywność mutagenną wykazuje ultrafiolet o długości fali od 2500 do 2800 Å z tym, że dla różnych organizmów

maksima wydajności są różne. Już powyższe fakty wskazują na istnienie jakiegoś pośredniego mechanizmu działania promieni, gdyż trudno jest wyjaśnić działanie promieni ultrafioletowych przyjmując za podstawę teorię trafiań pojedynczymi kwantami energii w określone cele. Odkrycie mutagennego działania całego szeregu związków chemicznych stworzyło nowe możliwości teoretyczne dla wyjaśniania działania czynników mutagennych. Pierwszym związkiem chemicznym, którego mutagenne działanie zbadali w latach czterdziestych A u e r b a c h i R o b s o n, był iperyt. Wywoływał on mutacje zarówno u *Drosophila* jak i wyższych roślin, oraz bakterii. W krótkim czasie okazało się, że bardzo duża ilość związków chemicznych jest zdolna indukować mutację. Związki te nie mają żadnej wspólnej i charakterystycznej cechy chemicznej, należą do różnych grup, niekiedy są nimi substancje bardzo proste i często spotykane w warunkach naturalnych (1, 2, 29, 31). Mutagenne działanie zostało wykazane dla wody utlenionej, różnych nadtlenków związków organicznych, chlorków żelaza, manganu i glinu, fenoli, formaliny, uretanu, rozmaitych substancji rakotwórczych itp. Niektóre z nich odznaczają się pewną specyficznością, tj. są mutagenne tylko w stosunku do określonych organizmów. I tak iperyt i formalina wywoływały mutacje u wszystkich badanych organizmów, woda utleniona u *Neurospora* i bakterii, fenol i uretan u *Drosophila*, roślin wyższych i bakterii. Niektóre z tych związków działają mutagenie tylko wtedy, gdy zostaną zastosowane w pewnym ściśle określonym stadium cyklu życiowego organizmu. Przyczyną różnic w działaniu związków chemicznych na różne organizmy mogą być różnice w ich przenikaniu do komórek względnie specyficzne warunki tam panujące. Np. gdy w komórce znajduje się większa ilość katalazy rozkładającej wodę utlenioną, mutagenne działanie tej ostatniej nie występuje.

Na ogół wydajność mutagennego działania związków chemicznych jest mniejsza niż promieniowania. K ö l m a r k i W e s t e r g a a r d (14) przeprowadzili szczegółowe badania dla porównania wydajności mutagennego działania różnorodnych związków chemicznych i promieniowań u *Neurospora crassa*. Wyniki ich potwierdzają wspomnianą powyżej regułę, jednakże bywają wyjątki, a mianowicie 1:2, 3:4-diepoksybutan indukował 20, 30 razy więcej mutacji niż ultrafiolet, promienie X i iperyt. Autorzy ci wykazali również, że różne geny są w różnym stopniu uczulone na działanie różnych czynników mutagennych. Wszystkie te badania przyczyniły się do zwrócenia uwagi na procesy chemiczne zachodzące pod wpływem naświetlania. Stało się jasnym, że nie można przeceniać bezpośredniego wpływu pojedynczych kwantów energii czy cząstek promieniowania, lecz należy uwzględnić w co najmniej równym stopniu możliwe znaczenie efektów pośrednich. Doświadczenia S t o n e, W y s s a, H a a s a nad *Staphy-*

lococcus aureus (26) oraz Wagnera, Haddoxa, Fuersta, Stone (30) nad *Neurospora* dostarczyły rozstrzygającego dowodu, że pośredni efekt naświetlania może również wywołać powstawanie mutacji. W obu przypadkach do naświetlanej uprzednio promieniami ultrafioletowymi pożywki wprowadzono nienaświetlane mikroorganizmy. U *Staphylococcus aureus* powstała w tych warunkach duża ilość mutantów odpornych na streptomycynę, penicylinę lub niezdolnych do fermentowania manitolu. Ilość znalezionych mutacji u *Neurospora* była nieco mniejsza. Autorzy uważają, że czynnikiem mutagennym była tu woda utleniona lub nadtlenki związków organicznych, które utworzyły się w pożywce pod wpływem naświetlania. Jak wiemy, pod wpływem działania promieni X również powstają w roztworach wodnych różne czynne rodniki jak OH, H, HO₂, oraz H₂O₂ i one to właśnie mogłyby być odpowiedzialne za większość pośrednich działań w odniesieniu do materiału biologicznego. Tak więc znaleziony został wspólny mianownik dla działania mutagennego i promieniowania i związków chemicznych. Jednak dalsze doświadczenia wskazują, że w szczególach pośrednie działanie czynników mutagennych może wykazywać znaczne różnice.

Warto zaznaczyć, że na podstawie porównania biologicznego działania promieni α czy neutronów z jednej strony, a promieni X i γ z drugiej niektórzy autorzy dochodzą do wniosku, że już nawet model pośredniego działania promieni jonizujących jest pomimo zasadniczo identycznego wyniku nieco odmienny. Neutrony i cząstki α działają jak gdyby bardziej bezpośrednio i dają niekiedy efekt większy niż spodziewany dla danej dozy, z tym, że zwyczajki tej nie da się wytłumaczyć większą gęstością jonizacji. Na podstawie obserwacji nad wywoływaniem pęknięć w chromosomach, w mikrosporach *Tradescantia Conger* i *Gilles* (4) stwierdzają, że neutrony są „wychwytywane” przez pewne atomy w tkance i powodują ich promieniotwórczy rozpad. Atomami wychwytywanymi neutrony są ich zdaniem atomy azotu, wodoru i boru, wydzielają one przy tym proton czy cząstkę α . Autorzy przypuszczają, że zachodzą tu następujące reakcje:



Wydzielane w tych reakcjach protony czy cząstki α działałyby z kolei jonizująco dalej, zwiększając efekt danej dozy neutronów. Hipotezę powyższą potwierdzają doświadczenia Congera z 1953 r. (5), w których naświetlał on tkanki *Tradescantia* wzbogacone w bor przez uprzednie nasycenie ich bardzo aktywnym w odniesieniu do neutronów jego izotopem, a mianowicie B¹⁰. Conger zaobserwował duży wzrost wydajności dla danej dozy neutronów. Ilość zmian strukturalnych w chromosomach wzrosła

w tkankach nasyconych uprzednio borem 4 do 5 razy w porównaniu do ilości uszkodzeń, które zanotowano w nienasyconej borem tkance. Wzrost powyższy należy więc przypisać działaniu cząstek wybitych z atomu boru przy radioaktywnej ich przemianie w L_1^7 po połączeniu się z neutronem. Słuszność hipotezy co do odmiennego mechanizmu pośredniego działania promieni X i neutronów potwierdza fakt, że przy naświetlaniu promieniami X zawartość boru w tkankach nie ma żadnego wpływu na ilość uszkodzeń powstających w chromosomach.

Dla teoretycznych rozważań dotyczących modelu pośredniego działania promieni jonizujących zjawiska występujące po naświetlaniu w wodzie mają duże znaczenie. Woda jest objętościowo głównym składnikiem komórki, toteż wyniki uzyskane dla wody są niezmiernie pomocne przy zrozumieniu mechanizmu pośredniego działania promieni w odniesieniu do materiału biologicznego. Pomimo że były one przedmiotem bardzo intensywnych badań, procesy zachodzące pod wpływem działania promieniowania w tak prostym układzie jak woda nie zostały jeszcze dostatecznie wyjaśnione. W związku z zaobserwowanymi różnicami w działaniu różnych typów promieniowania na organizmy żywe warto wspomnieć, że występują również różnice w ich działaniu na wodę. Np. cząstki α wytwarzają H_2O_2 działając na czystą wodę. Natomiast pod wpływem promieni X czy γ H_2O_2 powstanie jedynie wtedy, gdy w wodzie rozpuszczone są duże ilości tlenu.

Duże znaczenie teoretyczne mają również badania nad działaniem promieniowania na roztwory. Przy naświetlaniu roztworów cały szereg czynników może mieć wpływ na końcowy efekt naświetlania. Pośredniość działania polega tu na tym, że energia promieniowania pochłonięta jest przy jonizacji rozpuszczalnika, którego zjonizowane lub pobudzone cząsteczki następnie dopiero reagują z ciałem rozpuszczonym. Bellamy (13) uważa, że każdy czynnik wpływający na wydajność przenoszenia energii z rozpuszczalnika na ciało rozpuszczone, będzie miał wpływ na skuteczność promieniowania. M. in. właśnie Bellamy prowadził doświadczenia nad wpływem promieniowania na wyizolowane z komórek określone substancje chemiczne. Badany był wpływ promieniowania na aktywność szeregu enzymów jak: pepsyny, karboksypeptydazy, trypsyny, tyrozynazy; na poszczególne aminokwasy i kwasy nukleinowe. W doświadczeniu z pepsyną obniżono temperaturę roztworu poniżej punktu zamarzania. Okazało się, że inaktywacja enzymu wywołana promieniowaniem spada gwałtownie od 90 do 100 procent przy przejściu rozpuszczalnika ze stanu ciekłego w stały. Wynik ten można wytłumaczyć obniżeniem wydajności przenoszenia energii promieniowania, co z kolei przemawia za pośrednim mechanizmem działania promieni. Inna metoda obniżania wydajności przenoszenia ener-

gii z rozpuszczalnika na ciało rozpuszczone polega na dodawaniu tzw. protektorów, tzn. związków szybciej reagujących z jonami rozpuszczalnika niż cząsteczki białka. Przykładem protektorów mogą być: mocznik, cystyna, glutation. Wg Dale (6,7) hamujące aktywność karboksypeptydazy działanie promieni X jest bardzo silnie osłabione przez dodatek mocznika.

Mało mamy danych dotyczących inaktywacji enzymów znajdujących się w produktach naturalnych. Ponieważ każdy poszczególny enzym stanowi jedynie nieznaczną część tzw. ciała rozpuszczonego, powinien być on bardzo dobrze chroniony przed pośrednim wpływem promieniowania. Doświadczenia wykazały, że np. doza promieniowania potrzebna do zinaktywowania katalazy w rozartych kartoflach wynosi 5×10^6 jednostek, gdy tymczasem dla zinaktywowania czystego roztworu katalazy zawierającego 1 mg enzymu w 1 ml potrzeba jedynie 25000 jednostek. W rozartych kartoflach znajduje się cały szereg składników komórkowych mogących działać jako protektory (13).

Przy naświetlaniu pewnych układów chemicznych duży wpływ na przebieg wywoływanych reakcji może mieć ich skład. Np. gdy naświetlamy suchą leucynę, nie czujemy żadnego zapachu. Po dodaniu wody wydziela się zapach charakterystyczny dla aldehydu izowalerianowego. Przy naświetlaniu leucyny w roztworze wodnym zaabsorbowana energia promieniowania wywołuje reakcję, w której powstaje aldehyd izowalerianowy i amoniak. Gdy naświetlamy suchą leucynę, rozpada się ona z wydzieleniem dwutlenku węgla i wodoru. Podobnie inne produkty rozpadu daje naświetlania kazeina i sucha kazeina w roztworze wodnym. Częstym wynikiem naświetlania związków organicznych jest ich polimeryzacja względnie depolimeryzacja. Sposób naświetlania często wpływa na stopień tych procesów. Wyżej przytoczone badania pozwalają nam jedynie do pewnego stopnia zbliżyć się do wyjaśnienia wpływu promieniowania na organizmy. Musimy bowiem pamiętać, że nie można przenosić bez zastrzeżeń wyników uzyskanych w doświadczeniach z poszczególnymi składnikami chemicznymi na całe komórki. W komórce nieuszkodzonej istnieje współdziałanie poszczególnych jej składników. Jednakże ustalenie typów występujących reakcji i obecności pośredniego działania promieniowania obok bezpośredniego dla poszczególnych substancji chemicznych, można uważać co najmniej za wskazówkę, że podobne procesy zachodzą również i w nieuszkodzonych całych komórkach.

Z kolei zastanowimy się nad badaniami, które wykazały, że różne warunki środowiska zewnętrznego mogą mieć modyfikujący wpływ na wyniki naświetlania, a mianowicie na wysokość procentu powstających mutacji czy przeżywalność naświetlanych organizmów. Czynnikiem takimi są np. ilość tlenu zawartego w otoczeniu naświetlanego organizmu, tempe-

ratura, w której prowadzimy doświadczenie, stan fizjologiczny organizmu (9). Rolę czynników chroniących organizm przed szkodliwymi działaniami promieni mogą odegrać również najróżnorodniejsze związki chemiczne. Badania nad działaniem wyżej wymienionych czynników były prowadzone w ostatnich latach bardzo intensywnie. W zasadzie wyniki ich dla różnych organizmów są identyczne i tak np. zmniejszenie koncentracji tlenu w atmosferze otaczającej organizm w czasie naświetlania zmniejsza jego działanie mutagenne czy letalne zarówno u *Drosophila* i wyższych roślin jak u bakterii i grzybów. Ograniczymy się tutaj do omówienia powyższego zagadnienia jedynie w odniesieniu do mikroorganizmów. Zaczniemy od krótkiego zreferowania prac Hollaendera, Bakera i Andersona (11) nad *Escherichia coli*. Naświetlali oni kultury, z których usunięto tlen oraz kultury nasycone tlenem, i porównywali działanie letalne określonych dawek promieni Roentgena. Ilość organizmów w obu kulturach była identyczna i wynosiła 2×10^9 na 1 ml. W kulturach odtlenionych wrażliwość bakterii na promieniowanie malała bardzo znacznie. Przeżywalność ich była większa 10 000 razy w stosunku do przeżywalności kultur przetlenionych. W kulturach odtlenionych tlen zastępowano azotem, wodorem, helem lub dwutlenkiem węgla. Rodzaj gazu użytego zamiast tlenu dla wyrównania ciśnienia nie odgrywał żadnej roli. W dalszym ciągu doświadczeń autorzy ci badali wpływ koncentracji tlenu na mutagenny efekt promieni X. Użyli dwóch szczepów *E. coli* — mutantą, którego wzrost zależny był od obecności streptomycyny w pożywce oraz mutantą o deficyjencji purynowej, rosnącego jedynie w obecności adeniny. Badano procent powstających pod wpływem promieniowania mutacji zwrotnych, polegających na odzyskaniu utraconej zdolności doprowadzenia odpowiedniej syntezy, przy czym oba szczepy naświetlane były jednakowymi dawkami promieni X w warunkach beztlenowych i w hodowlach silnie nasyconych tlenem. W obu szczepach przeżywalność w hodowlach silnie nasyconych tlenem spadała bardzo znacznie dla identycznej dozy promieniowania. Procent mutacji zwrotnych w przypadku mutantą, którego wzrost uzależniony był od streptomycyny, był stały dla danej dozy promieniowania, niezależny od obecności czy braku tlenu, w przypadku zaś mutantą o deficyjencji purynowej procent ten znacznie wzrastał, gdy naświetlanie prowadzone było w obecności tlenu. Np. dla szczepu o deficyjencji purynowej przy naświetlaniu w obecności dużej koncentracji tlenu dawką 50 kiloroentgenów ilość mutacji zwrotnych wynosiła 7200 na 10^8 przeżywających komórek, natomiast w atmosferze beztlenowej dla tej samej ilości przeżywających bakterii zanotowano jedynie 300 mutacji zwrotnych. Fakty powyższe wskazują, że o ile mechanizm powodujący śmiertelność komórek jest w obu szczepach identyczny i w obu przypadkach uzależniony w jakiś sposób od

obecności tlenu, to procesy mutagenne w szczepie zależnym od streptomycyny i w szczepie wykazującym deficyt purynową różnią się w sposób bardzo istotny. Doświadczenia powyższe jasno wykazują, jak złożonym zjawiskiem jest mutacja. Proces mutagenny indukowany przez ten sam czynnik może przebiegać inaczej dla różnych genów. Obecność czy brak tlenu jest, jak widzimy, bardzo ważnym czynnikiem, decydującym o wpływie promieni X na organizm. Zależność powyższa przemawia na korzyść pośredniego działania promieni drogą wyzwalania wolnych rodników.

Wrażliwość bakterii na naświetlanie można zmniejszyć również przez dodanie do pożywki różnorodnych związków chemicznych. Doświadczenia tego typu prowadzone były przez Hollaendera, Bakera i Andersona (11) przy współpracy Burnetta, Stapletona i Morse (3). Wyróżniają oni następujące grupy protektorów: 1) związki zawierające grupy sulfhydrylowe jak np. cysteina, 2,3-dwumerkaptopropanol (BAL), kwas merkaptobursztynowy, kwas merkaptopyrogronowy. BAL, który ma dwie grupy SH działa najsilniej, 2) związki silnie redukujące, np. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 3) gliceryna, glikol propylenowy, glikol trójetylenowy, alkohole pierwszorzędowe jak etanol, metanol, propanol, 4) kwasy karboksylowe, np. kwas bursztynowy, mrówkowy i in. Mechanizm ich ochronnego działania w większości przypadków, jak się wydaje, polega na usuwaniu tlenu z otoczenia i z wnętrza komórki. W przypadku np. kwasów wskazuje na to fakt, że gdy do naświetlanej kultury dodany zostanie jeszcze jakiś inhibitor oddechowy, np. cyjanek potasu, zmienia on całkowicie korzystny wpływ protektora. Niektóre protektory wykazują działanie addytywne. Np. BAL podnosi procent przeżywających komórek bakterii o 18%, kwaśny siarczyn sodu o 18%, alkohol etylowy o 11%. Gdy dodamy do kultury przed naświetlaniem jednocześnie BAL i alkohol etylowy, ilość przeżywających bakterii wzrośnie do 41% alkohol etylowy i kwaśny siarczyn sodu do 40%, BAL i kwaśny siarczyn sodu — do 37%. Wskazuje to na odmienny mechanizm ich działania względnie na fakt, że przy identycznym mechanizmie działałyby one w innych miejscach systemu komórkowego. Jak wiemy, pod wpływem działania promieni X na wodę powstają czynne rodniki jak $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 oraz $\text{HO}_2\cdot$. Z innych źródeł wiemy, że H_2O_2 jest związkiem mutagennym. Przy większej ilości tlenu rozpuszczonego w wodzie ilość powstających rodników, a więc i H_2O_2 będzie większa. Na tej podstawie jasne jest, że każdy związek usuwający tlen z kultury i z wnętrza komórki zmniejszy ilość H_2O_2 , a więc odegra rolę protektora.

Zagadnieniem, które było przedmiotem licznych prac i teoretycznych rozważań, jest kwestia letalnego efektu działania promieni na organizm. U organizmów wyższych np. u *Drosophila* znamy całą grupę tzw. letalnych mutacji genowych lub polegających na powstawaniu pęknięć w odpowied-

nich miejscach w chromosomach. Uszkodzenia te powodują śmierć organizmu w różnych stadiach rozwoju zależnie od typu mutacji, niekiedy już zygota nośząca mutację letalną nie jest w stanie rozwijać się dalej. Mutacje bywają dominujące lub recesywne, u *Drosophila* np. stanowią one bardzo poważną grupę mutacji powstających pod wpływem naświetlania. U mikroorganizmów niezmiernie trudno jest rozstrzygnąć, czy przyczyną śmierci komórki naświetlonej jest indukowana przez promienie mutacja letalna, czy też ginie ona w wyniku uszkodzeń typu fizjologicznego.

W latach poprzedzających 1948 r. większość badaczy przyjmowała hipotezę, że przyczyną śmierci naświetlonej komórki bakterii jest powstanie mutacji letalnej. Np. Lea (16) jest zwolennikiem powyższej hipotezy i poświęca wiele prac dla udowodnienia jej przy pomocy teorii trafień. Lea uważa, że komórka bakterii ginie na skutek trafienia jednej cząstki jonizującej czy kwantu energii w objętość wrażliwą, którą utożsamia on z jakimś określonym genem. Podstawą powyższej teorii były następujące fakty: procent komórek bakterii inaktywowanych przy pomocy danej dozy promieniowania jest niezależny od: 1) zagęszczenia komórek w hodowli, 2) intensywności promieniowania, 3) temperatury otoczenia w granicach od 0 do 37°. Procent inaktywowanych komórek zależy jedynie od gęstości jonizacji, a więc od rodzaju użytego promieniowania. Dużo światła rzucają na zagadnienie przyczyn śmierci mikroorganizmu prowadzone w ostatnich latach badania nad czynnikami zmieniającymi wrażliwość na promieniowanie. Gruntowną analizę tego zagadnienia przeprowadza Stapleton (13). Dzieli on czynniki modyfikujące wrażliwość bakterii na promieniowanie na dwie grupy, zależnie od okresu ich działania w stosunku do momentu naświetlania. Jedne z tych czynników działają modyfikująco na procent przeżywających bakterii, gdy zostaną zastosowane przed i w trakcie naświetlania, wpływ drugich ujawnia się przy zastosowaniu ich w okresie po naświetlaniu. Do pierwszej grupy czynników Stapleton zalicza obecność względnie brak tlenu. Jak już było to powyżej omówione, usunięcie tlenu z kultury znacznie zmniejsza wrażliwość bakterii na promienie i podnosi procent ich przeżywalności. Oprócz *Escherichia coli* badane tu były i inne bakterie, oraz drożdże. Działanie protekcyjne całego szeregu związków chemicznych polega, jak wiemy, na usuwaniu tlenu. Stapleton zbadał dokładnie mechanizm protekcyjny jednego z nich, mianowicie kwasu bursztynowego. Gdy do kultury *E. coli* dodamy przed naświetlaniem 0,01% roztworu kwasu bursztynowego i będziemy inkubować kulturę w temp. 0°, nie uzyskamy protekcyjnego działania tego związku. Natomiast inkubacja w temp. 37° przez 30 min. przed naświetlaniem wywoła znaczny spadek śmiertelności bakterii. Protekcyjne działanie kwasu bursztynowego znosi

całkowicie dodatek inhibitorów oddechowych takich jak cyjanki, kwas malonowy, jodoocetan. Podobny układ działania opisują K ö l m a r k i Westergaard (14, 15) w pracy nad chemicznym indukowaniem mutacji u *Neurospora*. Pod wpływem działania wody utlenionej obserwowali oni znaczny procent mutacji zwrotnych dla mutantu o deficyjencji adeninowej. Gdy do kultury dodano katalazy, woda utleniona traciła całkowicie swe mutagenne działanie. Po dodaniu cyjanku potasu, który niszczy katalazę, procent mutacji powstających pod wpływem wody utlenionej gwałtownie wzrasta. W dalszym ciągu badań S t a p l e t o n stwierdza, że innym czynnikiem który zmniejsza śmiertelność bakterii, jest ich wysoka koncentracja w pożywce, ale dopiero powyżej 10^{11} komórek w 1 ml. Ochronny wpływ koncentracji nie występuje, gdy pożywkę nasycimy tlenem lub gdy obniżymy temperaturę. Wysoka koncentracja działa poprzez endogenne oddychanie bakterii, które usuwa tlen z kultury. S t a p l e t o n i H o l l a e n d e r (25) wykazali u *Aspergillus terreus*, że zmniejszenie ilości wody w sporach zmniejsza ich wrażliwość na działanie promieni. Wydajność promieniowania spada proporcjonalnie do spadku wody w konidiach. Podobną zależność znaleziono i u bakterii. Wydaje się, że przyczyną powyższego jest zmniejszenie szybkości dyfuzji aktywnych cząstek. Gdy naświetlamy *Escherichia coli* w temperaturze ciekłego azotu, tj. -196° , spada ilość zinaktywowanych komórek w porównaniu do kultur naświetlanych w temp. 0° . Dalsze doświadczenia wykazały, że przy obniżaniu temperatury poniżej 0° istnieje pewien moment zwrotny we wrażliwości bakterii na naświetlanie. Jest nim temperatura kilku stopni poniżej zera, a mianowicie punkt krzepnięcia zawiesiny. Znamy liczne przykłady wskazujące na różnice we wrażliwości bakterii w różnych fazach cyklu wzrostowego. „Młode” bakterie są najwrażliwsze na promieniowanie, natomiast bakterie znajdujące się już w tzw. „lag phase” są odporniejsze niż w jakimkolwiek innym momencie cyklu wzrostowego. U wyższych organizmów zjawisko to jest również znane. Najwrażliwsze są te komórki, które dzielą się intensywnie, np. tkanki merystematyczne u roślin, kiełkujące nasiona itp.

Przejdziemy z kolei do drugiej grupy protektorów wyróżnionej przez Stapletona, a mianowicie tych, których działanie ochronne występuje przy zastosowaniu ich po naświetlaniu. Umieszczenie hodowli po naświetlaniu w temperaturze różnej od optymalnej znacznie zwiększa procent przeżywających komórek. Doświadczenia prowadzono w sposób następujący: próbki z naświetlanych i nienaświetlanych kultur *E. coli* przeszczepiano na płytki agarowe i inkubowano w temperaturze od 6° do 37° przez 24 godziny, a następnie przenoszono do termostatu o temperaturze 37° . Postępowanie takie nie wpływa na ilość komórek w nie naświetlanych kultu-

rach, natomiast w kulturach naświetlanych 24-o godzinne obniżenie temp. inkubacji zwiększało procent przeżywających komórek. Największą przeżywalność otrzymano dla kultur inkubowanych w temp. 18°C. Wyniki powyższe St a p l e t o n tłumaczy tym, że w temperaturach różnych od normalnie optymalnej zmienia się stosunek szybkości przebiegu procesów syntetycznych i destrukcyjnych. Przy obniżaniu temperatury szybkość obu grup procesów spada najwidoczniej w niejednakowy sposób, tak że w temp. 18°C występuje przewaga procesów syntezy i stąd powstaje prawdopodobnie korzystny wpływ tej temperatury. Optymalne temperatury dla przeżywalności po naświetlaniu różnych szczepów. *E. coli* są różne. St a p l e t o n znalazł trzy szczepy różniące się pod tym względem. Gdy inkubujemy je po naświetlaniu w temp. 37°C, przeżywalność każdego z nich jest inna, natomiast przy inkubacji w temperaturze optymalnej dla każdego szczepu przeżywalności ich są prawie idetyczne. Wskazuje to, że różnice we wrażliwości na naświetlanie mają swe źródło w specyficzności biochemicznej każdego szczepu.

Podsumowując powyższe badania można stwierdzić, że proces inaktywacji bakterii pod wpływem promieni X jest zjawiskiem bardzo złożonym i może być modyfikowany przez cały szereg czynników jak stan fizjologiczny organizmu, temperatura, koncentracja tlenu. Inaktywacja byłaby więc wynikiem wewnątrzkomórkowego pośredniego efektu wywołanego przez powstawanie pod wpływem promieniowania czynnych wolnych rodników w płynach komórkowych. Wydaje się, że letalny efekt może mieć wiele różnorodnych przyczyn i że nie można inaktywacji tłumaczyć jedynie powstawaniem mutacji letalnych, analogicznych do mutacji letalnych u wyższych organizmów. Bez wątpienia mutacje tego typu mogą powstawać i być przyczyną śmierci w niektórych przypadkach, jednak w większości przypadków przyczyny śmierci komórki należy szukać w mechanizmach fizjologicznych. Analizą tego zagadnienia zajmują się między innymi Powers i Ehret (24) wskazując, jak trudno jest w przypadku śmierci jednokomórkowego organizmu zdecydować, czy powodem jego śmierci była mutacja genowa, czy też mamy tu do czynienia z fizjologicznym mechanizmem letalnego działania promieniowania. K e l n e r (12) uważa, że takim mechanizmem fizjologicznym mogłoby być np. całkowite zahamowanie syntezy DNA, co z kolei uniemożliwiłoby syntezę enzymów adaptatywnych. N e w c o m b e (21) stwierdza, że przyczyną śmierci komórki może być zahamowanie wielu syntez względnie zmian ich produktów końcowych. Jedną z takich syntez mógłby być np. proces prowadzący do duplikacji genu. Przyczyny śmierci komórki mogą być rozliczne, w poszczególnych przypadkach może być ona wywołana kilkoma różnymi i jednocześnie działającymi czynnikami.

Mutagenne działanie promieniowania wykorzystane zostało do badań mających na celu wyjaśnienie skomplikowanych procesów metabolicznych. Najlepszym materiałem do doświadczeń tego typu są właśnie mikroorganizmy. Badania te zapoczątkował w latach 40 Beadle używając jako organizmu doświadczalnego grzyba *Neurospora*. Następnie przeprowadzono podobne badania używając jako materiału najrozmaitszych pleśni, drożdży i bakterii.

Ogólna zasada teoretyczna pozwalająca na biochemiczne interpretowanie wyników wspomnianych prac jest następująca: pod wpływem naświetlania możemy otrzymać u badanego organizmu mutanty, które utraciły zdolność do syntezy jakiegoś ważnego metabolitu, warunkującego ich normalny wzrost. Który z niezbędnych czynników wzrostowych nie może być przez dany mutant syntetyzowany, możemy łatwo sprawdzić badając jego wzrost na pożywkach o różnym składzie. Jeżeli ustalimy, że czynnikiem tym jest, powiedzmy, jakiś prosty związek, możemy uważać z dość dużym prawdopodobieństwem, że bierze on udział w reakcji biochemicznej stanowiącej ważne ogniwo w łańcuchu reakcji metabolicznych. Do badań używane są na ogół te organizmy, których wymagania odżywcze są proste. Np. *Neurospora* rośnie normalnie na pożywce zawierającej prócz soli nieorganicznych i cukru (jako źródła węgla i energii), tylko jedną z witamin — biotyne. Z powyższego wynika, że zdolna jest ona do syntezy całego szeregu najrozmaitszych aminokwasów, witamin, kwasów nukleinowych, złożonych węglowodanów, tłuszczów oraz innych związków wchodzących w skład protoplazmy. Jednakże należy pamiętać, że powyższa metoda podobnie jak i inne jest ograniczona. Jeżeli pod wpływem naświetlania lub innych czynników mutagennych powstanie organizm niezdolny do syntezy metabolitu, który nie przechodzi przez błonę komórkową, a więc nie może być pobrany z pożywki, organizm ten ginie i mówimy, że mamy tu do czynienia z mutacją letalną. Dobrą ilustracją badań prowadzonych przez tzw. genetykę biochemiczną pozwalającą na zrozumienie pewnych ogólnych prawidłowości dotyczących powstawania mutantów biochemicznych są np. wyniki doświadczeń nad *Neurospora*, wyjaśniające drobny wycinek przemian związków azotowych (31). W doświadczeniach tych otrzymano mutanty niezdolne do syntezy argininy. Pierwszy z nich wymagał dla normalnego wzrostu obecności w pożywce argininy, drugi mógł wykorzystać albo argininę, albo cytrulinę, trzeci росł jednakowo dobrze na pożywkach zawierających prócz składników podstawowych ornitynę lub też cytrulinę względnie argininę. Z powyższego wynika, że pod wpływem czynnika mutagennego łańcuch reakcji prowadzących do syntezy argininy został przerywany u mutanta pierwszego przed samą argininą, u mutanta drugiego przed cytruliną, która musi być prekursorem argininy, a u mutanta trze-

kiego przed ornityną, która z kolei jest prekursorem cytruliny. Innymi słowami, otrzymane wyniki wskazują na to, że *in vivo* arginina powstaje na drodze prostych reakcji łańcuchowych z ornityny poprzez cytrulinę. Ponadto możemy wyprowadzić drugi, bardziej ogólny wniosek, że różne genetyczne mutanty, które są niezdolne do syntezy tego samego zasadniczego metabolitu, mają często zablokowany łańcuch reakcji w różnych miejscach. Dany mutant zdolny jest do syntezy i normalnego wzrostu w obecności każdego z kilku związków stanowiących pośrednie ogniwo w reakcjach, które występują za miejscem zablokowanym. Naturalnie przedstawiony obraz jest bardzo uproszczony, często przerwa w łańcuchu reakcji zależy od całego szeregu czynników otoczenia zewnętrznego i wewnętrznego.

Zależność pomiędzy syntezą kwasu pantotenowego a obecnością w komórkach określonego systemu dostarczającego dla takiej reakcji energii rozumiano dzięki uzyskaniu pod wpływem naświetlania promieniami ultrafioletowymi oraz promieniami X mutantów niezdolnych w normalnych warunkach do syntezy tej witaminy. *Neurospora* ma system enzymatyczny katalizujący reakcję syntezy kwasu pantotenowego z kwasu pantojowego oraz β -alaniny. Obecność tego systemu wykryto zarówno w samej grzybni, jak i w wysuszonych preparatach acetonowych. Wspomniane wyżej mutanty nie syntetyzują kwasu pantotenowego. Jednakże jak wykazano w dokładniejszych badaniach, można z nich uzyskać preparaty równie aktywne pod względem syntezy witaminy, jak preparaty otrzymane z organizmu nienaświetlanego. Stwierdzono ponadto, że kultury mutantów bardzo silnie przetlenione wytwarzają kwas pantotenowy. Z powyższego wynika, że utrata zdolności do syntezy kwasu pod wpływem naświetlania spowodowana jest zaburzeniem nie w przebiegu samej reakcji, lecz w systemie dostarczającym energii dla tej reakcji. Wykazano tu uzależnienie przebiegu jednej z zasadniczych reakcji syntezy od obecności innej reakcji, a mianowicie utleniania.

Podobnych przykładów wykorzystania mutantów biochemicznych dla analizy przebiegu łańcucha reakcji prowadzących do syntezy najróżnorodniejszych metabolitów znamy w obecnej chwili już bardzo wiele. Metoda wywoływania u mikroorganizmów biochemicznych mutacji pod wpływem działania promieniowania stała się w ostatnich latach niezmiernie użytecznym narzędziem pracy w badaniach biochemicznych. Reakcje biochemiczne prowadzące do syntezy niezbędnych metabolitów przebiegają na ogół u wszystkich organizmów w bardzo podobny sposób. Wyniki uzyskane dzięki badaniu mutantów u mikroorganizmów są więc w dużym stopniu pomocne dla zrozumienia ogólnych dróg metabolizmu u wszystkich organizmów żywych.

LITERATURA

1. Auerbach Ch., *Nuclear effects of chemical substances*. Exp. Cell Res. Suppl. **1**, 93, 1949.
2. Auerbach Ch., *Problems in chemical mutagenesis*. Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. **16**, 199, 1951.
3. Burnett W. T., G. E. Stapleton, M. L. Morse, A. Hollaender, *Reduction of X-ray sensitivity of Escherichia coli B-r sulfhydryl compounds, alcohols, glycols, and sodium hydrosulfite*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **77**, 636, 1951.
4. Conger A. D., N. H. Gilles, *The cytogenetic effects of slow neutrons*. Genetics **35**, 297, 1950.
5. Conger A. D., *The effects of boron enrichment on slow neutron irradiated tissues*. Genetics **38**, 128, 1953.
6. Dale W. M., *The effects of X-ray on enzymes*, J. Biochem. **34**, 1367, 1940.
7. Dale W. M., *The indirect action of ionizing radiations on aqueous solutions and its dependence on the chemical structure of the substrate*. J. Cellular Comp. Physiol. **39**, Suppl. I, 39, 1952.
8. Davis B. D., *Nonfiltrability of the agents of genetic recombination in Escherichia coli*. J. Bact. **60**, 507, 1950.
9. Geyer-Duszyńska I., *X-ray induced fragmentation of salivary gland chromosomes in Drosophila melanogaster*. Zoologica Poloniae, **6**, 250 1955.
10. Gopal-Ayengar A. R., *Cytological and cytochemical effects of radiation (and radiomimetic substances) in actively proliferating biological systems*. Int. Conf. P. U. Atomic. Energ. A (Congr. 8/P) 904, 1, 1955.
11. Hollaender A., Baker W. K., Anderson E. A., *Effects of oxygen tension and certain chemicals on the X-ray sensitivity of mutation production and survival*. Cold. Spring, Harb. Symp. Quant. Biol. **16**, 315, 1951.
12. Kelner A., *Growth, respiration, and nucleic acid synthesis in ultraviolet-irradiated and photoreactivated Escherichia coli*. J. Bact. **65**, 252, 1953.
13. Kelner A., Bellamy W. D., G. E. Stapleton, M. R. Zelle, *Symposium on radiation effects on cells and bacteria*. Bacter. Rev. **19**, 1, 22, 1955.
14. Kölmark G., Westergaard M., *Further studies on chemically induced reversions at the adenine locus of Neurospora*. Hereditas **39**, 209, 1953.
15. Kölmark G., *Differential response to mutagenes as studied by the Neurospora reverse mutation test*. Hereditas **39**, 270, 1953.
16. Lea D. E., *Action of radiation on living cells*. Cambridge, **1**, 344, 1946.
17. Lederberg J., Tatum E. L., *Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria*. Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. **11**, 1947.
18. Lederberg J., *Gene recombination and linked segregation in Escherichia coli*. Genetics **32**, 505, 1947.
19. Lederberg J., Lederberg E. M., Zinder N. D., Lively E. R., *Recombination analysis of bacterial heredity*. Gold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. **16**, 413, 1951.
20. Muller H. J., *Analysis of the process of structural change in chromosomes of Drosophila*. J. Genet. **40**, 1, 1940.
21. Newcombe H. B., *The delayed appearance of radiation induced genetic change in bacteria*. Genetics **38**, 134, 1953.
22. Nybom N., *Some experiences from mutation experiments in Chlamydomonas*, Hereditas **39**, 317, 1953.

23. Nybom N., *On the differential action of mutagenic agents*. Hereditas **42**, 211, 1956.
24. Powers E. L., Ehret C. F., *Radiation effects on cells. Genetics or physiology*. Int. Conf. P. U. Atomic Energ. (Conf. 8/P) **239**, 1, 1955.
25. Stapleton G. E., Hollaender A., *Mechanism of lethal and mutagenic action of ionizing radiations on Aspergillus terreus. II. Use of modifying agents and conditions*. J. Cellular Comp. Physiol. **39**, Suppl. I, 101, 1952.
26. Stone W. S., Wyss O., Haas F., *The production of mutation in Staphylococcus aureus by irradiation of substrate*. Proc. Acad. Sci. Wash. **33**, 59, 1947.
27. Timofèeff - Ressoovsky N. W., *Experimentelle Mutationsforschungs in der Vererbungslehre*. Wiss. Forsch. Ber. Naturwiss. Reihe **42**, 1, 1937.
28. Timofèeff-Ressoovsky N. W., Zimmer K. G., *Das Treffer-prinzip in der Biologie*. Biophysik. Leipzig, **1**, 1, 1947.
29. Ulrich H., *Allgemeine Genetic (einschlüsslich Genphysiologie)* Forsch. Zool. N. F. **9**, Ber. Jahre 1945—1950, 700, 1952.
30. Wagner R. P., Haddox C. H., Fuerst R., Stone W. S., *The effects of irradiated medium, cyanide and peroxide on the mutation rate in Neurospora*. Genetics **35**, 237, 1950.
31. Wagner R. P., Mitschell H. K., *Genetics and metabolism*. New York—London, 1955.

E. GAŚSIOR i K. OBOJSKA

Przygotowanie ekstraktów bakteryjnych do badań enzymatycznych

Badanie złożonego mechanizmu reakcji chemicznych komórki bakteryjnej dokonane może być albo *in vivo* na nienaruszonej komórce, albo *in vitro* po zniszczeniu struktury komórkowej. Dyskusja, która z metod badawczych jest właściwsza, wciąż trwa. Bez wątplenia przebieg izolowanych reakcji enzymatycznych na dezintegratach różni się od tychże reakcji zachodzących w komórce nienaruszonej. Jednakowoż do badań przemiany pośredniej, charakterystyki enzymu i mechanizmu reakcji enzymatycznej potrzebne są izolowane systemy enzymatyczne. Rozbicie komórki umożliwia ponadto poznanie funkcji fizjologicznych niektórych jej fragmentów strukturalnych.

Pierwsze próby niszczenia struktury komórkowej zapoczątkował w 1897 r. B u c h n e r rozcierając komórki drożdży z piaskiem celem otrzymania wyciągu zymazy (21). W 1903 r. B u c h n e r i H a h n (22) wykorzystali do tych celów prasę hydrauliczną. Ich badania zapoczątkowały dziś już powszechne stosowanie niszczenia struktury komórkowej mikroorganizmów.

Sposoby prowadzące do otrzymania wyciągu bezkomórkowego są różne i na ich dobór wpływa rodzaj drobnoustroju i formy związania enzymów w cytoplazmie komórki. Niekiedy udaje się wyizolować enzym przez ekstrakcję wodą lub buforami suchych preparatów drobnoustroju. Przeważnie jednak stosuje się liczne metody dezintegracji, których skuteczność dla danego materiału ustalamy najczęściej doświadczalnie.

Charakterystykę metod dezintegracji podał H u g o (79). Ogólne uwagi na temat sposobu suszenia i dezintegracji mechanicznej podaje G u n s a l u s (64).

Celem niniejszego referatu będzie przegląd i opis:

A. Sposobów ekstrakcji enzymów z suchych preparatów drobnoustrojów i

B. Metod dezintegracji: 1) biologicznej, 2) chemicznej, i fizycznej.

A. Sposoby otrzymywania wyciągów enzymatycznych przez ekstrakcję suchych preparatów drobnoustrojów

Aktywne wyciągi bezkomórkowe uzyskuje się niekiedy przez bezpośrednią ekstrakcję proszków bakteryjnych wodą lub buforami. Suchy proszek odznacza się w stosunku do wilgotnej masy bakteryjnej większą przepuszczalnością błony komórkowej, toteż ekstrakcja suchych proszków daje czynne wyciągi niektórych enzymów. Wydaje się, że istnieje ścisła zależność między rodzajem suszenia a aktywnością enzymatyczną wyciągów. Dotyczy to w pierwszym rzędzie enzymów łatwo inaktywujących się. Suche preparaty nadają się do kilkumiesięcznego przechowywania w temperaturze poniżej zera. Ułatwia to znacznie gromadzenie materiału do preparatyki enzymatycznej.

Sposoby suszenia i ekstrakcji proszków

1. Liofilizacja

Jest to sposób suszenia polegający na wysublimowaniu wody z zamrożonych do kilkudziesięciu stopni poniżej zera bakterii pod ciśnieniem mniejszym niż 0,1 mm Hg. Preparaty liofilizowane wyróżniają się trwałością w większym stopniu niż inne suche preparaty. Liofilizacja znajduje szerokie zastosowanie do suszenia wyciągów, czystych kultur itp. (5, 44, 45, 92, 107, 141, 173).

2. Suszenie przy użyciu rozpuszczalników organicznych

Masę bakteryjną zadaje się kilkakrotną ilością oziębionego (od -10° do -20°C) acetonu, eteru, alkoholu lub mieszanin tych rozpuszczalników, miesza się, odwirowuje albo sączy przez lejek Büchnera. Proces ten powtarza się trzykrotnie i suszy w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem albo na powietrzu. Gale i współp. (52) zastosowali tę technikę do otrzymywania bezkomórkowych wyciągów dekarboksylazy lizyny. Zawiesiny bakteryjne *E. coli* i *Bac. cadaveris* traktowano pięciokrotną odjętością acetonu, mieszało i sączyło przez lejek Büchnera, przemywało eterem i suszyło na powietrzu. Do proszku dodawano M/45 bufor boranowy w ilości 1 ml na 20 mg proszku i ekstrahowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C .

Karboksylazę kwasu szczawiooctowego z *Azotobacter vinelandii* (120), dekarboksylazę kwasu szczawiooctowego z *Clostridium acetobutylicum* (30) oraz dehydrogenazę kwasu mlekowego z drożdży (16) otrzymano z suchych preparatów tych drobnoustrojów.

3. Suszenie pod zmniejszonym ciśnieniem

Wilgotną masę bakteryjną suszy się w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem w obecności tlenu, chlorku lub siarczanu wapnia, pięciotlenku fosforu albo siarczanu magnezu. Ekstrahuje się roztworami zawierającymi siarczki, cysteinę lub glutation celem ochrony grup tiolowych enzymów.

Hughes i Williamson (78) otrzymali tą metodą glutaminazę przez ekstrakcję suchych bakterii *Cl. welchii*. Zamrożone komórki suszono pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu a następnie ekstrahowano roztworem drugorzędowego fosforanu sodu z dodatkiem chlorku potasu przez 15 godzin w + 2°C. Wydajność wynosiła 80—90% aktywności enzymu. Stadtman i Barker (142) przez ekstrakcję suchych bakterii rozcieńczonym roztworem siarczku sodu, a Stokes i Campbell (145) przez ekstrakcję wodą otrzymali aktywne wyciągi enzymatyczne.

4. Suszenie na powietrzu

Drożdże dają się suszyć i na powietrzu bez widocznych strat aktywności enzymatycznej. Kilkumilimetrową warstwę drożdży suszy się przez 2—3 dni w temperaturze 25—35°C. W czasie suszenia zachodzi częściowa autoliza. Ekstrahuje się woda albo odpowiednimi roztworami buforowymi przez kilka godzin (75).

B. Metody dezintegracji i ekstrakcji enzymów

I. METODA BIOLOGICZNA

a) Autoliza stanowi najprostszą metodę rozpuszczania otoczki komórkowej. Proces ten dokonuje się pod wpływem wewnątrzkomórkowych fermentów. Przeprowadzamy ją najczęściej wobec wody, roztworu buforowego i takich środków konserwujących jak toluen, ksylen, tymol chloroform itp. Procesy autolityczne są zwykle długotrwałe (2), kilku, a nawet kilkunastodniowe, co w znacznym stopniu zmniejsza ich przydatność w preparatyce enzymów.

Bailey i Webb (10) wykorzystali autolizę do wyizolowania heksokinazy z drożdży. 12,7 kg drożdży kruszono i mieszano z 760 ml. toluenu pozostawiając zawiesinę w 38°C przez 3—5 godzin. Do roztworu dodawano 12 litrów zimnej wody i 100 g siarczku sodowego dziewięćco-wodnego doprowadzając pH do 6—6,5 przy pomocy kwasu solnego. Autolizujące drożdże pozostawiono w temperaturze 20—25°C przez 42 godziny i następnie odwirowywano. Dodatek siarczku sodu hamował, przez swoje ochronne działanie na grupy tiolowe enzymu, inaktywację heksokinazy.

Virtanen i Tarnanen (165) otrzymali aspartazę przy pomocy autolizy *Bac. fluorescens liquefaciens* w ciągu 2—3 dni w 37°C. Obojska (113) w celu otrzymania wyciągów fosfatyz z różnych szczepów *mykobakterii* zastosowała również autolizę. Proszek acetonowy bakterii zmieszany z poczwórną objętością wody albo wilgotną masę bakteryjną zmieszaną z podwójną objętością wody z dodatkiem toluenu i octanu etylu poddawano autolizie przez 4—10 dni. Proces autolizy kontrolowano mikroskopowo. Znamy inne jeszcze przypadki stosowania autolizy w preparatyce enzymatycznej (6, 18, 27, 32, 72, 76).

b) Liza błon komórkowych przy pomocy enzymów

1. Lizozym

W 1922 Fleming (40) zaobserwował lizę *Micrococcus lysodeicticus* przez silny czynnik bakteriolityczny znaleziony w tkankach oraz w dużych ilościach w białku jaja. Czynnik ten nazwano lizozymem. Wiemy, że rozkłada on mukopolisacharydy błon komórkowych niektórych bakterii.

Trawienie lizozymem przeprowadza się mieszając bakterie z krystalicznym preparatem enzymu w stosunku kilkanaście mg lizozymu na 1 g bakterii. Czas trwania lizy wynosi zwykle kilka godzin.

Georgi i współp. (54) otrzymali przy dodaniu lizozymu (Armour) w ilościach 100 mg/10 g *Bac. stearothermophilus* zawieszonych w 200 ml 0,067M buforu boranowego, aktywne struktury cytoplazmatyczne odpowiadające, jak twierdzi autor, mitochondriom z tkanek zwierzęcych. Penrose i Quastel (117) przebadali aktywność różnych enzymów w lizatach *M. lysodeicticus* i komórkach nienaruszonych. Stwierdzili, że aktywność katalazy, fumarazy i innych enzymów jest większa w preparatach z komórek poddanych lizie niż w komórkach nienaruszonych. Odwrotnie aktywność niektórych enzymów była mniejsza, a dehydrogenaza glukozy, glicerofosforanu i kwasu glutaminowego ulegają całkowitej inaktywacji.

Gorini i Crevier (58) donieśli, że liza *M. lysodeicticus* powoduje wydzielanie się enzymów proteolitycznych wymagających do aktywacji jonów wapnia. Zwiększenie czasu lizy powoduje inaktywację lizozymu przez bakteryjne fermenty proteolityczne. Dodatek szczawiooctanu zmniejsza inaktywację lizozymu, ponieważ wiąże jony wapnia.

Poszczególne przypadki stosowania lizozymu cytujemy, a każdy z nich zawiera ciekawą inowację metodyczną (41, 85, 73, 100, 101, 118, 125, 130, 166).

2. Inne czynniki bakteriolityczne

Do bakteriolitycznych enzymów należy enzym produkowany przez *Streptomyces albus*. Działanie jego polega na rozpuszczaniu błon komór-

kowych zawierających ramnozę i heksozaminę u *Streptokoków* grupy A (95).

Enzymy trawiące streptokoki wytwarzane są także przez inne mikroorganizmy np. *Micromonospora* i *Noctardia cardneri* (129). W/g Welscha (168) enzymy rozpuszczające błony komórkowe stafilocoków produkowane są przez szereg *Actinomycetów*. Nie spotkano w literaturze żadnej wzmianki o aktywności enzymatycznej lizatów otrzymanych przez działanie czynników strepto i stafilocyticznych na bakterie. Podobnie jak lizozym mogą one znaleźć zastosowanie w preparatyce enzymatycznej.

3. Enzymy proteolityczne

Enzymy proteolityczne znajdują również zastosowanie do niszczenia struktury komórkowej drobnoustrojów. Np. Stickleland (144) otrzymał aktywną dehydrogenazę kwasu mrówkowego przy trawieniu komórek *E. coli* w 37°C. Ostatnio Myrbäck i Willstaedt donieśli o izolowaniu inwertazy drożdżowej przy pomocy trypsyny aktywowanej cysteiną (106).

c) Trawienie przez bakteriofagi błon komórkowych

W 1953 r. Sher i Mallette zastosowali wirusa bakteryjnego (bakteriofaga T_{2r} +) do dezintegracji bakterii (136, 137). Zawiesiny *E. coli* po trawieniu bakteriofagowym pozwalały otrzymywać aktywne wyciągi dekarboksylaz argininy i lizyny.

II. METODY CHEMICZNE

a) Liza glikokolem

W 1953 r. Maculla i Cowles (94) opisali nowy sposób otrzymywania lizy przy użyciu glikokolu. W/g nich na lizę bakterii mają wpływ takie czynniki jak stężenie glikokolu, stosunek objętości zawiesiny bakteryjnej do objętości glikokolu, wiek hodowli i czas jej inkubacji. Używano roztworów od 0,5 do 3M glikokolu inkubując 1/2—18 godzin w 37°C. Najkorzystniejszy stosunek masy bakteryjnej do ilości glikokolu wynosił 1 : 10 przy użyciu 1M roztworu glikokolu. Stwierdzono ponadto, że stopień lizy komórek zmniejsza się z wiekiem hodowli. Badania przeprowadzone na zawieszynie *E. coli*, *A. aerogenes* i *Bac. mesentericus* wykazały obecność około 85% białka komórkowego. Levine i współp. (90) badając dysymilację seryny u *Pasteurella pestis* dezintegrowali bakterie 1N roztworem glikokolu. Również Gordon i inni (57) przeprowadzali dezintegrację glikokolową. Brak jest dokładnych danych na temat aktywności enzymów otrzymanych tą metodą.

b) Liza mocznikowa

Seibert i Fabrizio (133) wyizolowały ze szczepów *Mycobacterium* czynną frakcję białek, która dawała dodatnią reakcję wiązania dopełniacza, oraz reakcję tuberkulinową. Bakterie umieszczano w 37°C z dwukrotną ilością mocznika na okres 72 godzin, często wstrząsając zawiesinę. Następnie dodawano 1 objętość wody, sączono przez Seitz'a i podano dializie.

W 1956 r. Szymona (1955) w pracy nad metabolizmem glukozy u *Mycob. phlei* zastosował ekstrakcję mocznikiem proszku acetonowego tych bakterii (30% mocznika + 2% węglańu sodu) celem izolacji czynnika fosforylującego. 1 g proszku odtłuszczano na gorąco mieszaniną alkoholu i eteru (3:1), a następnie pozostałość ekstrahowano i odwirowywano. Także Seibert (134) i Obojska (113) stosowały mocznik do ekstrakcji białek z prątków kwasoodpornych z całkowitym powodzeniem.

c) Ekstrakcja glicerolem

Sposobem tym wyizolowano (93a) enzymy proteolityczne i amylolityczne z kilku bakterii przez inkubację z 40% glicerolem przez 4 dni w temperaturze 39°C i 7 dni w 30°C.

d) Ekstrakcja n-butanolem

Sposób ten polega na działaniu na zawiesinę drobnoustroju w wodzie lub buforze n-butanolem. Butanol rozpuszcza fosfolipidy błon komórkowych oraz oddziałuje swoiście (104) na przeprowadzanie białek do roztworu. Inne alkohole nie posiadają tej własności. Butanol nadaje się przede wszystkim do izolowania enzymów związanych z elementami strukturalnymi komórki preparatywnie odpowiadającym mitochondrion i mikrosomom. Mechanizm działania n-butanolu i jego zastosowanie podaje Morton (105) i inni (4, 68).

III. FIZYCZNE METODY DEZINTEGRACJI

a) Technika kolejnego zamrażania i odtajania

Kolejne kilkakrotne zamrożenie masy bakteryjnej do kilkunastu stopni poniżej zera, a nawet do temperatury ciekłego powietrza i odmrożenie powoduje rozbicie komórek i ułatwia izolację wewnątrzkomórkowych składników. Black (17) wypreparował dehydrogenazę aldehydową zamrażając drożdże piekarniane w ciekłym azocie. Po odmarznięciu ekstrahował komórki przez 5 dni roztworem buforowym o pH 8,3 w temperaturze około 5°C. Franke i Schillinger (46) przez pięciokrotne zamrażanie

i odtajanie otrzymali aktywne wyciągi enzymatyczne z prątków kwasoodpornych. Ta metoda została zastosowana do otrzymania wielu czynnych wyciągów enzymatycznych (7, 8, 9, 34, 42, 43, 108, 175, 176).

b) Dezintegracje mechaniczne

1. Technika ręcznego rozcierania w moździerzu

Mechaniczne rozcieranie drobnoustrojów zarówno wilgotnej jak i suchej masy z dodatkiem czynnika rozcierającego, a w niektórych przypadkach i bez czynnika rozcierającego prowadzi do zniszczenia struktury komórkowej. Prostota metody, względy ekonomiczne, a jednocześnie skuteczność przyczyniły się do szerokiego jej zastosowania. Jako czynników rozcierających używa się pyłu szklanego, kwarcowego, kaolinowego, ziemio krzemkowej, pumeksu, a ostatnio coraz częściej specjalnie przygotowanego tlenku glinu. Podstawowym zagadnieniem przy dezintegracji mechanicznej staje się dobranie odpowiedniej wielkości cząsteczek proszku używanego do rozcierania. Poleca się zwykle cząstki o średnicy mniejszej niż średnica komórki poddawanej dezintegracji drobnoustroju. Skuteczność i szybkość dezintegracji zależy w znacznym stopniu od stosunku, w jakim mieszamy czynnik rozcierający z masą bakteryjną. Stosunek ten w poszczególnych pracach jest różny, zawsze jednak ilość proszku rozcierającego jest kilkakrotnie wyższa od masy bakteryjnej. Rozcieranie bakterii przeprowadza się naogół w temperaturze niskiej, często w stanie zamrożonym w czasie od kilku minut do kilku godzin. Zmieloną na ciągliwą papkę masę bakteryjną ekstrahuje się wodą, buforami, rozcieńczonymi roztworami chlorku sodowego, dwuwęglanu sodu itp., a następnie odwirowuje się celem usunięcia proszku i resztek komórkowych. Duże trudności następuje odwirowanie bardzo drobnego i lekkiego pyłu szklanego. Należy dodać, że wysoka wartość tlenku glinu jako czynnika rozcierającego związana jest z jego zdolnościami adsorpcyjnymi.

Wolfe, Ivler i Rittenberg (174) otrzymali z *Pseudomonas fluorescens* bezkomórkowy wyciąg enzymu utleniającego kwas jabłkowy. Na 1 część bakterii suszonych nad siarczanem wapnia dodawano 1—1,5 części buforu fosforanowego o pH 6,1, 3, części proszku szklanego i mielono kilka minut. W podobny sposób inni autorzy (24, 55, 86, 132, 143) otrzymywali wyciągi enzymatyczne. Reithel (124) zastosował również przy uzyskiwaniu wyciągów ze *Streptococcus thermophilus* technikę mielenia w moździerzu. Przemytą masę bakteryjną suszono pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu, a następnie mielono z dwukrotną ilością proszku karborundowego w obecności buforu fosforanowego 0,02M przy pH w 7 oziębionym moździerzu.

M c I w a i n (97) pierwszy użył tlenku glinu do preparatyki enzymów z drobnoustrojów. Bakterie zmieszane z kilkakrotną ilością tlenku glinu rozcierano intensywnie przez kilka minut i odwirowywano. Otrzymano (97) ze *Stroptococcus hemoliticus* bezkomórkowy wyciąg dezaminazy ADP i innych enzymów. W h e a t i A j l (169) zastosowali „aluminę 303” celem izolowania cytratazy z *E. coli*. Bakterie oziębiano w mózdzierzu do -20°C i rozcierano z równą ilością tlenku glinu przez kilka minut. Preparat enzymatyczny zawierał około 30 mg białka w 1 ml ekstraktu. W/g G ą s i o r a (53), który wzorując się na metodzie M c I l w a i n a otrzymał bezkomórkowy wyciąg transaminazy przez rozcieranie proszku acetonowego *Mycob. phlei* z trzykrotną ilością tlenku glinu, najlepsze wyniki uzyskuje się przy 90-minutowej dezintegracji. Metodę M c I l w a i n a stosowało wielu autorów (23, 28, 56, 67, 69, 83, 88, 109, 167, 169) z całkowitym powodzeniem.

W 1955 r. H e l l e r i S z a f r a ń s k i (71) przez rozcieranie proszku acetonowego *Mycob. phlei* w mózdzierzyku bakteriologicznym i odwirowanie otrzymali wyciąg enzymatyczny rozkładający 5-fosforybozę.

2. Mielenie w młynkach bakteryjnych

Dezintegracja mechaniczna może być przeprowadzona przy użyciu specjalnie skonstruowanych młynków. Można ją stosować zarówno z dodatkiem czynników rozcierających jak proszek szklany albo rozcierać same bakterie. Najstarszym tego typu urządzeniem jest młynek stożkowy opisany w 1903 r. przez M a c f a d y e n a i R o w l a n d a (93), a później młynki kulowe (12). Większe zastosowanie znalazł dopiero młynek bakteryjny wprowadzony w 1938 r. przez B o o t h - G r e e n a (19) (schemat 1).

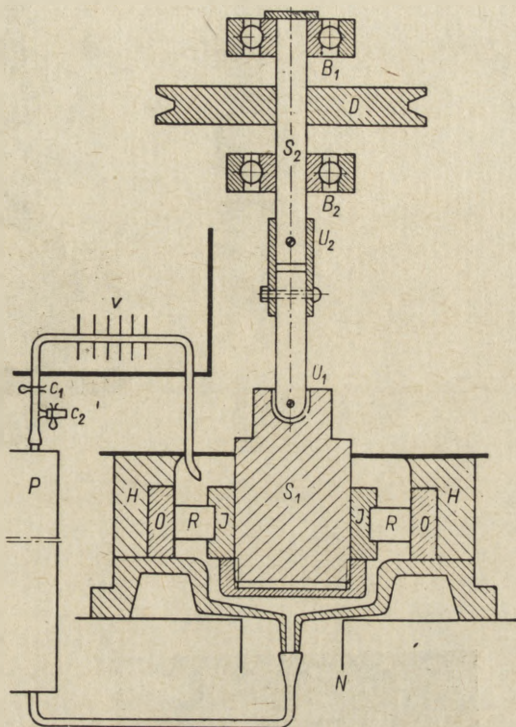
Oziębiona masa bakteryjna jest umieszczona pomiędzy poruszającymi się walcami i mielona. Chłodzenie odbywa się za pomocą spiralnej wężownicy umieszczonej w wannie z lodowatą wodą. Czas dezintegracji zależy od mielonego drobnoustroju wynosi od 1 do kilku godzin. Nie dodaje się w tym młynku czynnika rozcierającego. B o o t h i G r e e n (19) wykazali, że komórki *E. coli* ulegają całkowitemu zniszczeniu dezintegracji, podczas gdy *Bac. subtilis* tylko w 45%, a *Sarcina lutea* po czterogodzinnym mieleniu wykazuje 25% dezintegracji. Tym sposobem autorzy otrzymali z *E. coli* dehydrogenazy: kwasu jabłkowego, glicerofosforowego, mrówkowego, oksydazę cytochromową, katalazę, peroksydazę i asparaginazę. Posługując się młynkiem B o o t h - G r e e n a, G a l e (51), E d s o n (37), S t u m p f (150), A b r a h a m i C h a i n (1), F r a n t z l i C h a r g a f f (47) oraz S t o n e i W i l s o n (148) otrzymali wyciągi enzymatyczne. Ze względu na niski stopień rozbicia większości drobnoustrojów i wymagany długi czas

dezintegracji, młynek ten nie jest prawie stosowany. Nie dodając proszku szklanego w młynie kulowym Youmans i współp. (177, 102) otrzymali aktywne preparaty enzymatyczne z *Mycob. H_{37Ra}*.

Schemat 1. Młynek bakteryjny
Bootha i Greena

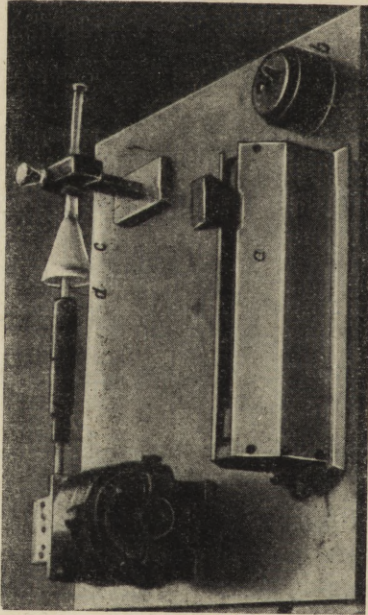
(Booth V. H. and Green D. E. Biochem. J. 32, 855, 1938)

O — blok zewnętrzny dopasowany ściśle do osłony H, H — osłona bloku, S₁ — filar obracający wewnętrzną część młynka, R; J — wewnętrzna część młynka, B₁ łożysko belki S₂, B₂ — łożysko belki S₂, D — koło transmisyjne belki, P — pompa w modelu Bayliss i Müller, C₁ i C₂ — zaciski służące do opróżniania młynka, U₁ — dodatkowe koło transmisyjne belki S₁, U₂ — dodatkowe koło transmisyjne belki S₁, V — zbiornik na wodę z lodem do chłodzenia części mielącej, N — podstawa młynka.

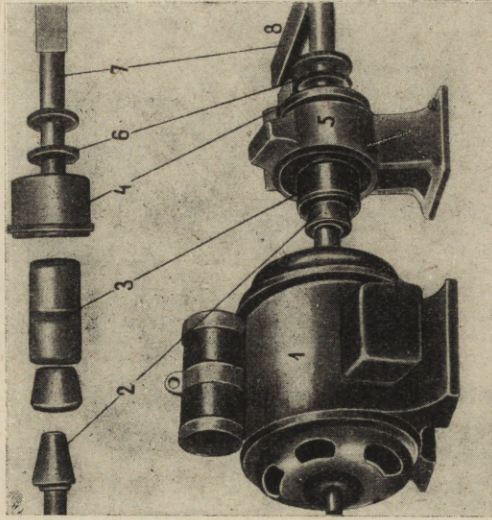
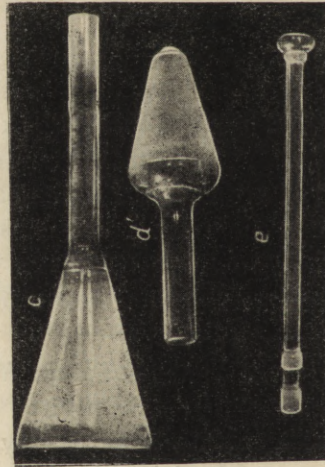


Lepsze są młynki wykorzystujące pył szklany do rozcierania bakterii jak np. wprowadzony w 1942 r. młynek U t t e r a - W e r k m a n a (163), opisany dokładnie przez K a l t n i t z k y' e g o i współp. (81). Komórki bakteryjne zmieszane z proszkiem szklanym w stosunku 1 : 2 i buforem fosforanowym i stanowiące jednorodną pastę miele się między dwoma koncentratrycznymi stożkami szklanymi z których wewnętrzny poruszany jest motorkiem elektrycznym z szybkością 300 obr./min. Powierzchnie trące ochładzane są mieszaniną oziębiającą znajdującą się w wewnętrznym stożku. (fotografia 1).

U t t e r i inni (164) badające stopień rozbicia komórek różnych drobno-ustrojów podczas mielenia w młynie stwierdzają, że stosunkowo duży procent bakterii pozostaje nienaruszony. Drugą ujemną stroną wyżej opisanego młynka są trudności w zbieraniu materiału zmielonego. Posługując się powyższym młynkiem U t t e r i współp. (80, 82, 161) otrzymali szereg wyciągów enzymatycznych z *E. coli*, a G ą s i o r transaminazę z *Mycob.*



Fot. 1. Młynek bakteryjny typu Uttera - Werkmana
 a — opornica do regulowania szybkości obr., b — wylącznik elektryczny, c — zewnętrzny stożek trący, d — wewnętrzny stożek trący, e — stożek wewnętrzny wypełniony lodem w czasie ucięcia pasty bakteryjnej, e) — pręt szklany uszczelniony gumką do upychania masy bakteryjnej



Fot. 2. Młynek bakteryjny Uttera - Werkmana zmodyfikowany przez Nossala i Mortona (w/g Biochim. Biophys. Acta 19, 388, 1956)
 1 — motor, 2 — wewnętrzny stożek trący z twardej stali chromowanej, 3 — zewnętrzna część stożka trącego z cylindrem do przechowywania materiału dehydrowanego, 4 — zewnętrzny płaszcz cylindra z aluminium, 5 — osłona ze stali zaciskająca cylinder, 6 — uszczelniacz osłony, 7 — piston ze stali nierdzewnej, 8 — dźwignia służąca do obracania pistonu

phlei (53). W 1956 r. ukazał się młynek Nossala i Mortona (112) (fot. 2).

Stanowi on modyfikację młynka U t t e r a - W e r k m a n a. Część młyna trójkątny tłuczek i dopasowana do niego nasadka wykonane są z twardej stali, a nie ze szkła jak w młynku U t t e r a - W e r k m a n a. Oba młynki posiadają taką samą pojemność, różnią się jednak szybkością obrotów, mianowicie młynek N o s s a l a i M o r t o n a wykonuje 1500 obr./min. Jako czynnika rozcierającego używa się w nim szklanego czy tlenku glinu zmieszanych w odpowiednim stosunku z mikroorganizmami.

3. Dezintegracja w zmodyfikowanym homogenizatorze *Pottera-Elvehjema*

W 1950 r. D o c k s t a d e r i H a l v o r s o n (33) opisali zmodyfikowany homogenizator P o t t e r a - E l v e h j e m a (122). Przy pomocy tego aparatu dezintegrowali bakterie używając jako czynnika rozcierającego sproszkowanego szkła lub tlenku glinu. Szybkość obrotów tłoczka wynosi 2000 obr./min. Przy zastosowaniu optymalnych warunków dezintegracji w ciągu krótkiego czasu obserwowano rozbitcie bakterii w 100%. Wyciąg z tablicy zawartej w pracy D o c k s t a d e r a i H a l v o r s o n a umieszczony poniżej (tablica 1) obrazuje zależność pomiędzy: rodzajem mielenia, stosunkiem komórek do czynnika rozcierającego i wody, czasem mielenia, rodzajem czynnika rozcierającego, a ilością zniszczonych komórek. W niektórych przypadkach należy przeprowadzić wiele prób wstępnych, aby natrafić na najlepszy dla danego drobnoustroju sposób dezintegracji. I tak np. W h i t e h e a d o w i i w s p ó ł p. (170) nie udało się wyizolować sulfatazy aryłowej z *Mycob. piscium* przy ręcznym mieleniu bakterii w moździerzu i ekstrakcji buforem. Dobre wyniki otrzymali dopiero po zastosowaniu ziemi okrzemkowej i zmodyfikowanego homogenizatora P o t t e r a - E l v e h j e m a. Dezintegrowano proszek acetonowy zmieszany z podwójną ilością ziemi okrzemkowej i podwójną ilością wody przez 15 minut w homogenizatorze zanurzonej do łaźni oziębiającej. Posługując się tą metodą S t r e h l e r i C o r n i e r (147), oraz N e w b u r g h i w s p ó ł p. (109) otrzymali pozytywne rezultaty. Do dezintegracji nie używali oni żadnego czynnika rozcierającego.

4. Dezintegracja w prasach bakteryjnych

Na uwagę zasługuje prasa bakteryjna wprowadzona przez H u g h e s a (77) (fot. 3). Dezintegracja odbywa się w niskiej temperaturze i przez bardzo krótki czas tarcia mechanicznego.

Drobnoustrój zmieszany z odpowiednim proszkiem umieszcza się w dłu-

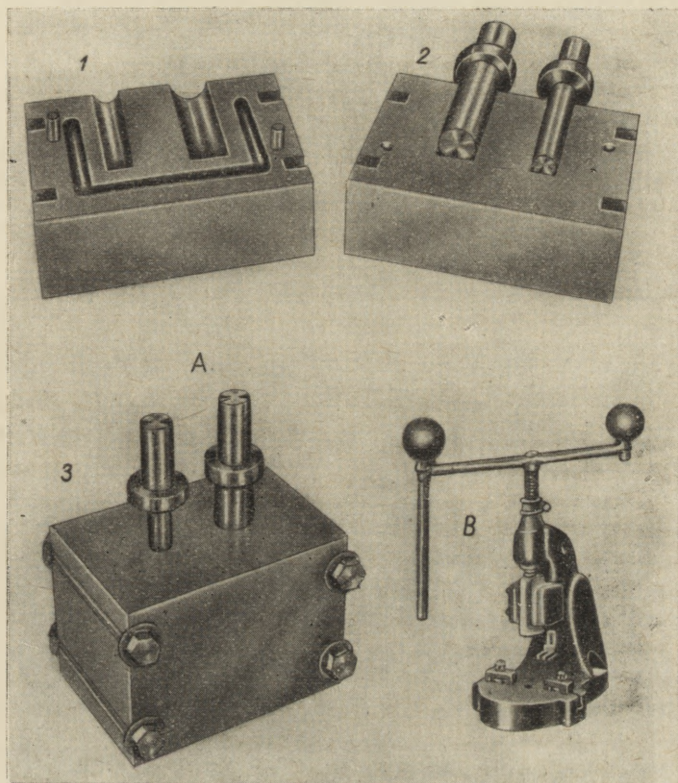
gim oziębionym cylindrze. Dokładnie dopasowany tłok podnosi się przy pomocy sprężonego powietrza i opuszcza na umieszczoną w cylindrze masę bakteryjną. W metodzie Hughesa drobnoustrój mieszany jest z proszkiem pyrekсовym, tlenkiem glinu, proszkiem cyrkonowym $ZrSiO_4$ albo żelem krzemionkowym. Przy użyciu optymalnych warunków dezintegracji otrzymano całkowite zniszczenie komórek *Cl. welchii*, *Lactobacillus arabi-*

Tablica 1

Wpływ sposobu i warunków dezintegracji na ilość rozbitych bakterii
w/g Dockstadera i Halvorsona (33)

Sposób mielenia	Stosunek komórek do ilości czynnika rozcierającego	Stosunek wody do czynnika rozcierającego	Czas mielenia w min.	% zniszczonych komórek	Rodzaj czynnika rozcierającego
mielenie ręczne	1:2	1:2	5 20	46,3 59,1	Alumina
	1:4	1:2	5 20	59,1 90,6	
w homogenizatorze Pottera- Elvehjema	1:2	3:5	5 20	95,3 99,3	Nortona
	1:4	3:5	5 20	93,2 99,2	
	1:8	23:40	5 20	93,3 99,7	
w homogenizatorze Pottera- Elvehjema	1:2	1:2	10 20	98,8 99,4	Alumina sproszkowana
	1:1	1:1	10 20	37,7 56,9	
	1:1	1:2	20	99,6	
w homogenizatorze Pottera- Elvehjema	1:2	3:1	15	99,9	Hyflo Super-Cell
	—	—	40	42	—

nosus, *E. coli*, *Proteus morgani*, i szeregu innych. Autor otrzymał z *Cl. welchii* dekarboksylazę kwasu glutaminowego, glutaminazę i enzymy rozkładające heksozodwufosforany. La Riviere (89) uzyskał bezkomórkowy wyciąg ze zmiażdżonych w prasie Hughesa *Pseudomonas putida*. Prasę Hughesa stosowano do dezintegracji; *Aerobacter aerogenes* (29), spor bakteryjnych (121) i grzybów (13).



Fot. 3. Prasy bakteryjne Hughes'a

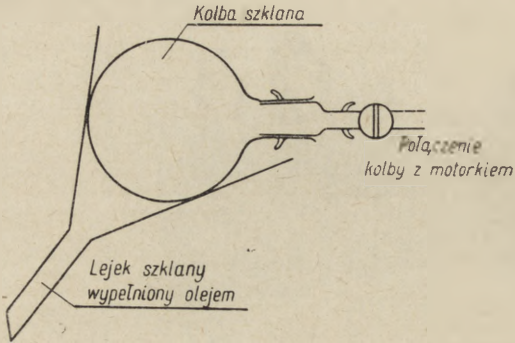
(w/g Hugo B. W. Bacteriol. Revs. 18, 87, 1954)

A — komory wypełniane masą bakteryjną: 1) komora otwarta z wgłębieniami na tłoki, 2) połowa komory z ściśle dopasowanymi tłokami, 3) komora z tłokami, widok ogólny; B — inny typ prasy bakteryjnej Hughesa

5. Dezintegracja przez wytrząsanie z drobnymi cząstkami ciała stałego

Zawiesina drobnoustrojów wytrząsana energicznie z proszkiem szklanym albo kuleczkami szklanymi może ulec dezintegracji. Używa się najczęściej proszku szklanego o wielkości 50 do 500 mikronów albo specjalnych kuleczek o średnicy (300—100 mikronów). W 1945 r. Gunsalus i Umbreit (61) zastosowali specjalną metodę dezintegracji z kulkami

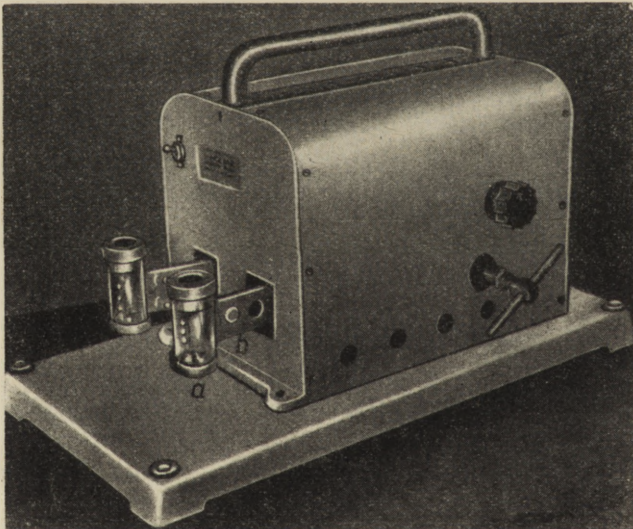
szklanymi połączoną z jednoczesnym suszeniem mokrej masy bakteryjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Lejek szklany zakorkowany szczelnie wypełnia się olejem lekkim, we wnętrzu lejka umieszczamy kolbę szklaną, w której znajduje się mokra masa bakteryjna poddawana dezintegracji. Wylot kolby połączony jest z motorkiem oraz pompą próżniową (schemat nr 2).



Schemat 2. Dezintegrator typu Gunsalus'a i Umbreita.

(w/g Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F. *Manometric Techniques and Related Method for the Study of Tissue Metabolism*, Minneapolis, wyd. 6, 1951).

Drobnoustroje w czasie ruchu obrotowego kolby są dezintegrowane przy jednoczesnym suszeniu. Czas całkowitego rozbicia wynosi 10 do 12 godzin. Po dezintegracji powoli wpuszczamy powietrze do wnętrza kolby, a materiał bakteryjny ekstrahujemy przy użyciu odpowiedniego roztworu.



Fot. 4. Dezintegrator thankowy typu Mickla
(w/g Hugo B. W. *Bacteriol. Revs.* 18, 87, 1954)
a — cylinder szklany, b — wystająca część belki

Mickle (99) w 1948 r. opisał nowy aparat do dezintegracji mikroorganizmów (fot. 4).

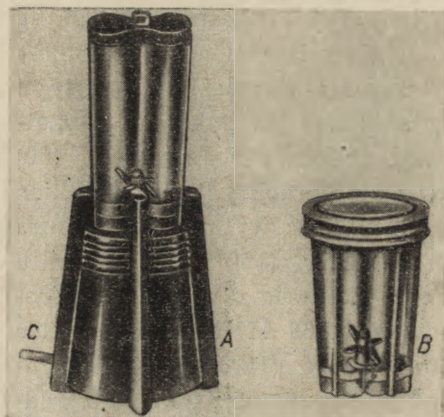
Na fotografii aparatu M i c k l e'a umieszczonej powyżej widać parę rozsuniętych belek, które poruszane są w zmiennym polu elektrycznym. Jeden koniec każdej z nich znajduje się wewnątrz aparatu, na drugim zaś wystającym umocowany jest cylinder szklany o pojemności 15 ml albo w zmodyfikowanym aparacie dwa cylinderki o łącznej pojemności 50 ml. W cylindrach szklanych umieszczone są zawiesiny bakteryjne o gęstości: 2—20 mg suchej masy na 1 ml i kuleczki albo pył szklany stanowiący około 30% wagi niszczonej bakterii. Szybkość wytrząsania w zależności od typu aparatu wynosi 300—3000 drgań/min. Badania nad warunkami optymalnymi dla powyższej metody były prowadzone przez Furnessa (50) i Coopera (26). Stwierdzono, że efekt dezintegracji zależy od takich czynników jak wielkość cząstek szklanych, szybkość wytrząsania, natura i gęstość zawiesiny bakteryjnej. Trudinger (156) użył aparatu M i c k l e'a do izolowania enzymów z *E. coli*. Bakterie zawieszano w środowisku zawierającym 1,5 M chlorek potasu, 0,069 M fosforanu potasu i 0,005 M trójhydroksymetyloaminometan (Tris) o pH 8. Do 11 ml zawiesiny zawierającej 20 mg suchej masy w 1 ml dodawano 5 g kulek o średnicy około 200 mikronów dezintegrowano 20 minut. Ostatnio metoda M i c k l e'a znajduje coraz szersze zastosowanie (25, 66, 70, 119, 123, 128, 140, 146, 157).

Bardzo ciekawe spostrzeżenia uzyskał N o s s a l (110, 111) używając do dezintegracji drożdży ultra szybkiego dezintegratora o częstotliwości 5000 drgań/min. Zawiesinę drożdży z kulkami dezintegrował w czasie 10—90 sekund i odwirowywał. Rezultaty jego badań wykazują, że rozdział enzymów w otrzymanym ekstrakcie jest podobny do rozdziału enzymów w ekstraktach z tkanek zwierzęcych. Dehydrogenazy wiążą się głównie z ziarnistościami komórkowymi, kiedy dezintegracja trwa bardzo krótko, przy dłuższym zaś czasie przechodzą do roztworu całkowicie. Fumaraza i akonitaza natomiast znajdowały się głównie w niesedymentującym ekstrakcie uzyskanym przy szybkości obrotów wirówki 30 000 g.

W 1954 r. L a m a n n a i M a l e t t e (87) wprowadzili nowy sposób rozbijania mikroorganizmów przy użyciu odpowiedniej wielkości kuleczek szklanych (200 milimikronów) i homogenizatorów typu: Waring blender i Virtis (fotografia 5).

Homogenizator Virtis nadaje się do małych ilości suspensji (czas dezintegracji 5 min.). Do większych objętości używano Waring blender, gdzie stosowano gęste zawiesiny drobnoustrojów i dużą ilość kuleczek szklanych. Zawiesina 450 g drożdży w 600 ml i 800 g kuleczek dezintegrowana 90 min. wykazuje 99% rozbitych komórek. W r. 1956 S i n g e r i i n n i (135) zastosowali homogenizator Virtis do wyosobnienia mitochondrii z drożdży. Należy jeszcze wspomnieć, że generatory dźwiękowe i ultradźwiękowe

we mogą zastąpić aparaty Mickle'a czy Waring blender. Do zawiesiny bakteryjnej dodaje się w takich wypadkach proszku szklanego (115) albo karborundowego (39) i poddaje zawiesinę działaniu ultradźwięków. Mechanizm dezintegracji jest wtedy bardziej złożony.



Fot. 5. Dezintegrator „Waring blender”
w: g Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.
Manometric Techniques und Related Method
for the Study of Tissue Metabolism, Minnea-
polis, wyd. 5, 1948)
A — postawa dezintegratora z motorem elek-
trycznym, B — osłona nakładana na podstawę
w czasie mielenia, C — część przewodu podłą-
czanego do sieci

c) Dezintegracja wywołana zmianami w ciśnieniu gazu

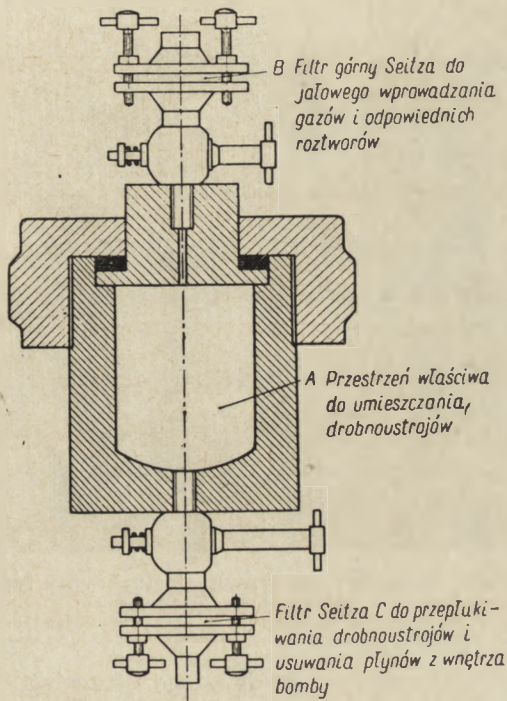
W 1951 r. Frazer (48) doniósł o nowej technice rozbijania bakterii przy pomocy gwałtownego rozprężenia gazu. Autor umieszczał zawiesinę *E. coli* o gęstości 10^8 komórek na ml w cylindrze doprowadzając gaz (azot, tlenek azotu, argon, dwutlenek węgla) pod ciśnieniem 500 funtów na cal² (około 35 kg na cm²). Cylinder odwracano nad zbiornikiem wody lub roztworu buforu i gwałtownie zmniejszono ciśnienie. Powodowało to pęknięcie komórek. Niską temperaturę zapewniało zjawisko Y o u l e — T h o m p s o n a. Niszczenie obejmowało 75% bakterii. F r a z e r stwierdził w ekstraktach komórkowych bakterii poddanych takiemu eksperymentowi aktywną dehydrogenazę mrówczanową.

Szafrański i Szarkowska (153) zastosowali do komórek *Mycob. phlei* infiltrację próżniową (schemat Nr 3).

Wolną od podłoża i starannie przemytą masę bakteryjną poddawano przez 30 min. ciśnieniu 50 atm. dwutlenku węgla, następnie w ciągu 1,5 min. obniżano ciśnienie do 1 atmosfery. Wydostający się z komórek dwutlenek węgla powodował wyciśnięcie pewnej części protoplazmy. Gwałtowne rozprężenie gazu może powodować całkowite zniszczenie struktury komórkowej. Wydaje się, że metoda ta może być zastosowana w celach otrzymywania aktywnych preparatów enzymatycznych z mikroorganizmów, jeśli nie wchodzi w grę swoiste działanie dwutlenku węgla.

d) Dezintegracja przy przejściu przez małe otworki

Milner i współp. (103) i French i Milner (49) opisali nowy sposób dezintegracji polegający na przeciśnięciu przez mały otworek zawiesiny bakteryjnej pod ciśnieniem około 60 ton. Aktywność dekarboksylazy kwasu glutaminowego z *E. coli* wzrastała po takiej dezintegracji siedmiokrotnie. Świadczy to o uszkodzeniu błony komórkowej bakterii. Przy dezintegracji drożdży stwierdzono 20% rozbitych komórek.



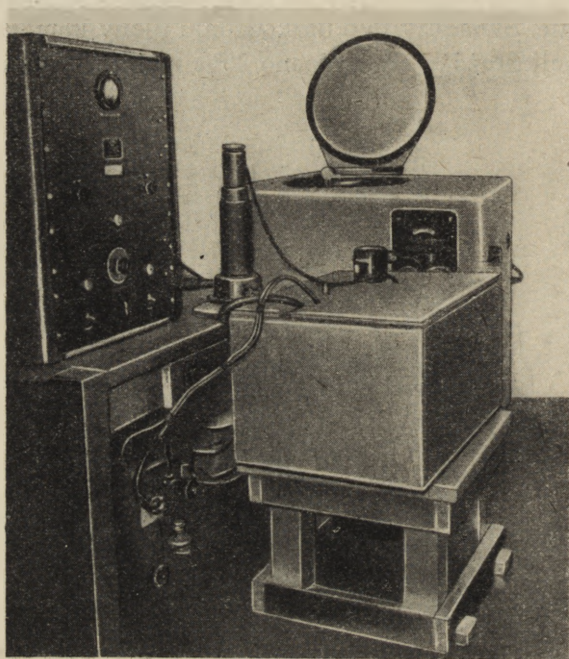
Schemat 3. Aparat do infiltracji drobnoustrojów
(w/g Szafranski P., Szarkowska L., Acta Biochim. Pol., 2, 199, 1955)

e) Dezintegracja ultradźwiękowa

Pręt metalowy albo płytka piezoelektryczna umieszczone w zmiennym polu elektrycznym stają się źródłem fal ultradźwiękowych lub dźwiękowych. Fale te przeniesione na zawiesinę bakteryjną wywołują w niej kolejne zgęszczenia i rozrzedzenia. Wytwarzające się lokalne naprzemienne dodatnie i ujemne ciśnienia wpływają destrukcyjnie na znajdujące się tam komórki. Zjawisko biologicznego działania fal ultradźwiękowych jest zjawiskiem złożonym i obok efektu mechanicznego ultradźwięków dochodzi

jeszcze wywołany przez nie efekt chemiczny, cieplny itp. Wyczerpujące dane dotyczące tego zagadnienia znaleźć można w pracy *G r a b a r a* (60) i *E l p i n e r a* (38).

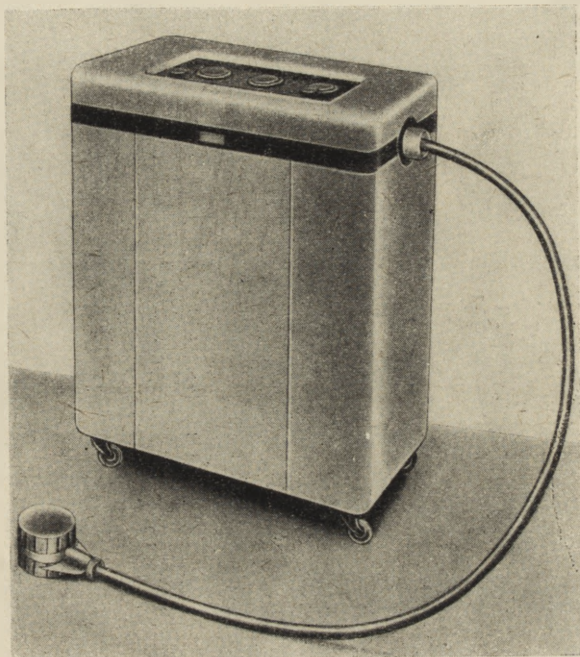
Znane są trzy typy generatorów ultradźwiękowych: 1) syrenowe, 2) magnetostrykcyjne (fot. 6) i 3) z płytką kwarcową piezoelektryczną (fot. 7).



Fot. 6. Generator ultradźwiękowy magnetostrykcyjny typu Raytheon
częstości drgań 10 kc.
(Hugo B. W. *Bacteriol. Revs.* 18, 87, 1954)

Najczęściej stosowane są aparaty drugiego i trzeciego typu. Wśród aparatów magnetostrykcyjnych znane są dwa aparaty pod nazwą Raytheon. Pierwszy z nich posiada częstość drgań 9 kc (50 W), drugi zaś 10 kc (200 W). Różnią się one ponadto wielkością naczynek; 9-kilocyklowy posiada objętość naczynka 60 ml, 10-kilocyklowy 150 ml. Najlepsze warunki do dezintegracji na Raytheonie otrzymuje się przy zastosowaniu gęstości zawiesin 50—100 mg suchej masy w ml. Czas dezintegracji zależy od natury drobnoustroju i wynosi od 10 min do 3 godz. Częstość drgań aparatów z płytką kwarcową nie daje się regulować i to stanowi ujemną stronę tego typu generatorów. Także czas dezintegracji na aparatach kwarcowych jest zawsze dłuższy niż na magnetostrykcyjnych. Zawiesiny bakteryjne, które bardzo szybko zagrzewają się podczas dezintegracji, chłodzi się za pomocą oziębianego oleju. W pewnych przypadkach dodaje się do zawiesiny środków

redukujących jak np. glutation, cysteinę (98, 31, 53), a także małe ilości eteru celem zapewnienia jednorodnego składu roztworu (59). Systematyczne badania nad dezintegracją ultradźwiękową przeprowadzili w 1946 r. S t u m p f i wspóln. (151). Posługiwali się oni aparatem o częstotliwości drgań 600 kc z płytką kwarcową. Zawiesiny bakteryjne umieszczano w stożkowatych kolbach z płaskim dnem w takiej odległości od płytki, aby uzyskać



Fot. Generator ultradźwiękowy z płytką kwarcową piezoelektryczną typu Mullarda

(Hugo B. W. Bacteriol. Revs. 18, 81, 1954)

maksimum drgań zawiesiny. Olej chłodzący zawiesinę przepompowywano przez miedzianą węzownicę otoczoną lodowatą wodą celem zabezpieczenia niskiej temperatury.

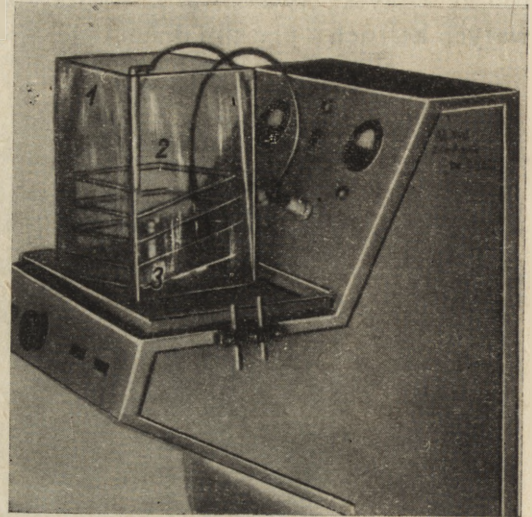
Z wielu czynników, które wpływają na efekt działania ultradźwięków, autorzy wymieniają czas dezintegracji, kształt naczynka i gęstość zawiesiny. Stwierdzono również, że poszczególne drobnoustroje wykazują niejednakową odporność na działanie ultradźwięków. Najbardziej odporne są drożdże i mykobakterie. B r o d i e i wspóln. (20) w swoich badaniach dochodzą do wniosku, że dla każdego oscylatora warunki dezintegracji muszą być ustalane indywidualnie. G ą s i e r (53) i O b o j s k a (113) zastosowali do dezintegracji *Mycob. phlei* naczynka z dnem wklęsłym skupiającym fale do wnętrza naczynka (fot. 8). Optymalna gęstość zawiesiny wynosiła 3 g wilgotnej masy bakteryjnej na 10 ml buforu fosforanowego (53). Posługi-

wano się aparatem czeskim Chirana o częstotliwości drgań 1 Mc z płytką kwarcową (fot. 9).

Metodę ultradźwiękową stosowało wielu autorów (3, 11, 20, 14, 31, 35, 63, 65, 76, 83, 114, 116, 126, 138, 149, 150, 152, 154, 159, 172, 178).



Fot. 8. Naczynka do dezintegracji bakterii.



Fot. 9. Generator ultradźwiękowy z płytką kwarcową piezoelektryczną typu Chirana o częstotliwości drgań 1 Mc

Na zdjęciu widoczny jest: 1 — zbiornik na olej, 2 — szklanna spiralna chłodnica wodna, 3 — metalowy cylinder w którym znajduje się płytka kwarcowa

f) Metody połączone

Często stosuje się połączone metody dezintegracji drobnoustrojów, np. dezintegrację ultradźwiękową w obecności proszków szklanych czy karbo-rundowych (39, 115). Berger i współp. (15) wyizolowali z *Bact. megatherium* enzymy, które rozkładają kazeinę względnie żelatynę techniką zamrażania i odmrażania, a następnie rozcieranie z piaskiem w obecności toluenu.

IV. WYBÓR METODY DEZINTEGRACJI

Przedstawione przez nas metody dezintegracji nie są w jednakowym stopniu skuteczne do niszczenia struktury komórkowej danego mikroorganizmu. Nie jest zatem rzeczą obojętną, jaką metodę zastosujemy. Ze względów praktycznych należy wyjść od metod najprostszych i najtańszych, takich jak dezintegracja mechaniczna w móżdzierzu czy ekstrakcja suchych preparatów. W razie wyników negatywnych stosuje się dopiero metody instrumentalne.

Nasuwa się pytanie, czy na podstawie obecnych doświadczeń nad dezintegracjami można przewidzieć skuteczność takiej czy innej metody dezintegracji fizycznej do celów izolowania określonego enzymu, czy grupy enzymów? Czy istnieją specyficzne metody dla pewnych struktur mikroorganizmów i grup enzymów? Odpowiedź na te pytania jest dość trudna. Używane metody naogół nie są specyficzne. Powszechnie wiadomo, że różnice w strukturze poszczególnych drobnoustrojów są znaczne. Forma związania tego samego enzymu mimo identycznych funkcji spełnianych przez ten enzym w różnych drobnoustrojach będzie inna. To skłania do przypuszczenia, że ten sam sposób dezintegracji zastosowany do różnych drobnoustrojów prowadzi do różnych wyników.

Wydaje się na podstawie literatury i własnych spostrzeżeń, że mielenie z tlenkiem glinu, dezintegracja z kulkami szklanymi w aparacie M i c k l e'a czy Waring blender, dezintegracja w homogenizatorze P o t t e r a - E l v e h j e m a i ultradźwięki stanowią najbardziej ogólne metody nadające się do preparatyki większości enzymów bakteryjnych. Wybór odpowiedniej metody oprzeć trzeba na danych eksperymentalnych, wymaga to nierzadko przebadania wielu sposobów i opracowania optymalnych warunków dezintegracji.

Ciekawe wyniki przy otrzymywaniu wyciągów dekarboksylaz aminokwasów podają S h e r i M a l e t t e (136). Autorzy ci zastosowali do dezintegracji *E. coli* metody: acetonowo-eterową, autolizę, lizę glicynową, lizozym, bakteriofaga, dezintegrację z ziemią okrzemkową, i wytrząsanie z kulkami szklanymi. Wyniki podajemy za autorami:

Aktywność enzymatyczna	w nienaruszonych komórkach	140 jed.
„	„ w proszku acetonowym	450 „
„	„ po lizie bakteriofagiem	1350 „
„	„ po autolizie	800 „
„	„ po lizie glikokolem	600 „

W i d m e r i i n n i (171) celem izolowania cytochromu z *Acetobacter suboxydans* stosowali cholan sodu, aceton, izooktylofenoksylietoksyetanol, kwas trójchlorooctowy, n-butanol, hialuronidazę, lizozym i inne enzymy proteolityczne, oraz dezoksychohan. Tylko desoksychohan dał dobre rezultaty. W/g G ą s i o r a (53) wyraźne są różnice w aktywności enzymatycznej wyciągów transaminazy z *Mycobphlei* otrzymanych przez dezintegrację mechaniczną, ultradźwiękową, autolizę, lizę mocznikiem i ekstrakcję n-butanolem. Najlepsze wyniki otrzymano przy dezintegracji mechanicznej w móżdziejcu.

Te ostatnie przykłady wskazują na konieczność indywidualnego przygotowania aktywnych wyciągów enzymatycznych. Podejście w wyborze metody może być różne.

Pani prof. dr J. Opieńskiej-Blauth i panu doc. drowi M. Kańskiemu za cenne wskazówki udzielane nam przy opracowywaniu tego referatu składamy podziękowanie.

LITERATURA

1. Abraham E. P., Chain E., *Nature* **146**, 837, 1940.
2. Adolaire E., *Ann. Inst. Pasteur*, **27**, 118, 1913.
3. Altenbern R. A., Housewright R. D., *J. Biol. Chem.* **204**, 159, 1953.
4. Appleby C. A., Morton R. K., *Nature* **173**, 749, 1954.
5. Appleman M. D., Sears O. H., *J. Bact.* **52**, 209, 1946.
6. Avery O. T., Cullen G. E., *J. Exptl. Med.* **32**, 547, 1920.
7. Avery O. T., Cullen G. E., *J. Exptl. Med.* **32**, 583, 1920.
8. Avery O. T., Neil J. M., *J. Exptl. Med.* **39**, 357, 1924.
9. Avery O. T., Neil J. M., *J. Exptl. Med.* **39**, 543, 1924.
10. Bailey K., Webb E. C., *Biochem. J.*, **42**, 60, 1948.
11. Barban S., *J. Bact.*, **68**, 493, 1954.
12. Barnard J. E., Hewlett R. T., *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **84**, 57, 1912.
13. Bealing F. J., Bacon J. S. D., *Biochem J.* **53**, 227, 1953.
14. Beck E. S., Lindstrom E. S., *J. Bact.* **70**, 335, 1955.
15. Berger J., Johnson M. J., Peterson W. H., *Enzymologia* **4**, 31, 1937.
16. Bernheim F., *Biochem. J.*, **22**, 1178, 1928.
17. Black S., *Arch. Bioch. Bioph.* **34**, 86, 1951.
18. Blank J., Pozerski E., *Soc. Biol.* **83**, 1315, 1343, 1369, 1920.
19. Booth V. H., Green D. E., *Biochem. J.* **32**, 855, 1938.
20. Brodie A. F., Gray C. T., *J. Biol. Chem.* **219**, 853, 1956.
21. Buchner E., *Ber. deut. chem. Ges.* **30**, 117, 1110, 1897.
22. Buchner E., Hahn H., *Die Zymase-Garung*, Oldenburg, Munich 1903.
23. Campbell L., *J. Biol. Chem.* **217**, 669, 1953.
24. Carlson W. W., Rosano C. L., Whiteside-Carlson J., *Bact.* **65**, 136, 1953.
25. Church B. C., Halvorson H., Halvorson H. D., *J. Bact.* **68**, 393, 1954.
26. Cooper P. D., *J. Gen. Microbiol.* **9**, 199, 1953.
27. Corper H., Sweany H., *J. Bact.* **3**, 129, 1918.
28. Curtis W., Ordell E. J., *J. Bact.* **68**, 351, 1954.
29. Dagley S., Dawes E. A., *Nature* **172**, 345, 1953.
30. Davies R., *Biochem J.* **37**, 230, 1943.
31. De Moss R. D., Gibbs M., *J. Bact.* **70**, 730, 1955.
32. Dernby K., Walbum L., *Biochem. Z.* **138**, 505, 1923.
33. Dockstader W. B., Halvorson H. D., *Science* **112**, 618, 1950.
34. Dodgson K. S., Lloyd A. G., Spencer B., *Biochem. J.* **65**, 131, 1957.
35. Dolin M. J., Gunsalus I. C., *J. Bact.* **62**, 199, 1951.
36. Eaton N. R., Klein H. P., *J. Bact.* **68**, 110, 1954.
37. Edson N. L., *Biochem. J.* **41**, 145, 1947.
38. Elpiner I. E., *Usp. sowr. biol.* **30**, 113, 1950.
39. Feldman L. I., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **187**, 821, 1950.

40. Fleming A., Proc. Roy. Soc. (London) B, **93**, 306, 1922.
41. Fleming A., Allison V. D., Lancet, **206**, 1303, 1924.
42. Fleming W. L., Neil J. M., Exptl. Med. **45**, 169, 1927.
43. Fleming W. L., Neil J. M., J. Exptl. Med. **45**, 947, 1927.
44. Flosdorf E. W., Mudd S., J. Immunol. **34**, 469, 1938.
45. Flodorf E. W., Kimball A. C., J. Bact. **39**, 255, 1940.
46. Franke W., Schillinger A., Biochem Z. **316**, 313, 1944.
47. Frantzl R. E., Chargaff E., Nature **168**, 955, 1951.
48. Fraser D., Nature **167**, 33, 1951.
49. French C. S., Milner H. W., Desintegration of Bacteria and small Particles by High-Pressure Extrusion, Methods in Enzymology, New York 1955.
50. Furness G., J. Gen. Microbiol. **7**, 335, 1952.
51. Gale E. F., Biochem. J. **32**, 1583, 1938.
52. Gale E. F., Epss H. R. M., Biochem. J. **38**, 232, 1944.
53. Gąsior E., Annal. UMCS, S., D, XI, **161**, 1956.
54. Georgi C. E., Militzer W. E., Decker T. S., J. Bact. **70**, 716, 1955.
55. Geret L., Haehn M., Chem. Ber. **31**, 2335, 1898.
56. Gest H., Gibbs M., J. Bact. **63**, 661, 1952.
57. Gordon J., Hall R. A., Stickland L. H., J. Hyg. **51**, 215, 1953.
58. Gorini L., Crevier M. Biochim. Bioph. Acta. **7**, 291, 1951.
59. Grabar P., Ann. Inst. Pasteur **76**, 460, 1949.
60. Grabar P., Adv. Biol. Med. Phys. **3**, 191, 1953
61. Gunsalus I. C., Umbreit W. W., J. Bact. **49**, 347, 1945.
62. Gunsalus I. C., Stanier R. J., Gunsalus C. F., J. Bact. **66**, 535, 548, 1953.
63. Gunsalus I. C., Gunsalus C. F., Stanier R. J., J. Bact. **66**, 638, 1953.
64. Gunsalus I. C., Extration of Enzymes from Microorganism, Methods of Enzymology, New York 1955.
65. Hahn F. E., Wissensman C. L. Jr., Hopps H. E., J. Bact. **69**, 215, 1955.
66. Hansen I. A., Nossal P. M., Biochem. Bioph. Acta **16**, 502, 1952.
67. Hayaishi O., Stanier R. J., J. Bact. **62**, 691, 1951 .
68. Hayaishi O., Kornberg A., J. Biol. Chem. **206**, 647, 1954.
69. Hayaishi O., J. Biol. Chem. **215**, 125, 1955.
70. Heckly R. J., Watson D. W., Am. Rev. Tuberc. **61**, 798, 1950.
71. Heller J., Szafranski P., Acta Biochim. Pol. **2**, 435, 1955.
72. Hestrin S., Avineri - Shapiro S., Aschner M., Biochem. J. **37**, 450, 1943.
73. Herbert D., Pinsent A., J., Biochem. J. **43**, 193, 1948.
74. Hochster R. M., Watson R. W., Nature **170**, 357, 1952.
75. Horecker B. L., Smyrniatis P. Z., J. Biol. Chem. **193**, 371, 1951.
76. Housewright R. D., Thorne C. B., J. Bact. **60**, 89, 1950.
77. Hughes D. E., Brit. J. Exptl. Path. **30**, 97, 1951.
78. Hughes D. E., Williamson D. H., Biochem. J. **51**, 45, 1952.
79. Hugo W. B., Bacteriol. Revs. **18**, 87, 1954.
80. Kalnitzky G., Werkman C. H., Arch. Bioch. **2**, 113, 1943.
81. Kalnitzky G., Utter M. F., Werkman C. H., J. Zact. **49**, 595, 1945.
82. Kaltenbach J. P., Kalnitzky G., J. Biol. Chem. **192**, 629, 1951.

83. King E. T., Cheldelin V. H., *Bioch. Bioph. Acta* **14**, 108, 1954 .
84. Koepsell H. J., Johnson M. J., *J. Biol. Chem.* **145**, 379, 1942.
85. Krampitz L. O., Werkman C. H., *Biochem. J.* **35**, 595, 1941.
86. Krause *Zbl. Bact.* **31**, 673, 1902.
87. Lamanna C., Mallette M. F., *J. Bact.* **67**, 503, 1954.
88. Lara F. J. S., *J. Bact.* **64**, 279, 1952.
89. La Riviere J. W. M., *Bioch. Bioph. Acta* **21**, 190, 1956.
90. Levine H. B., Weimberg R., Dowling J. W., Evenson M., Rockenmacher M., Wolochow H., *J. Bact.* **67**, 369, 1954.
91. Linnane A. W., Still J. L., *Arch. Bioch. Bioph.* **59**, 383, 1956.
92. Lord Stamp, *J. Gen. Microbiol.* **1**, 251, 1947.
93. Macfadyen A., Rowland S., *Centr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. I Orig.* **34**, 765, 1903.
- 93a. Macfadyen A., *J. Anat.* **26**, 409, 1892.
94. Maculla E. S., Cowles P. B., *Science* **107**, 376, 1946.
95. McCarty M., *J. Exptl. Med.* **96**, 555, 1952.
96. McIlwain H., *J. Gen. Microbiol.* **2**, 186, 1948.
97. McIlwain H., *J. Gen. Microbiol.* **2**, 288, 1948.
98. Meyerhof O., Ohlmeyer P., *J. Biol. Chem.* **195**, 11, 1952.
99. Mickle H., *J. Roy. Microscop. Soc.* **68**, 10, 1948.
100. Militzer W., Sonderegger T. B., Tuttle L. C., Georgi C. E., *Arch. Bioch.* **24**, 75, 1949.
101. Militzer Tuttle L.C., Georgi C. E., *Arch. Bioch. Bioph.* **31**, 416, 1951.
102. Millman I., Youmans G. P., *J. Bact.* **69**, 320, 1955.
103. Milner H. W., Lawrence N. S., French C. S., *Science* **111**, 633, 1950.
104. Morton R. K., *Nature* **166**, 1092, 1950.
105. Morton R. K., *Preparation and Assay of Enzymes, Methods in Enzymology*, New York 1955.
106. Myrbäck K., Willstaedt E., *Arkiv Kemi* **8**, 367, 1955.
107. Naylor H. B., Smith P. A., *J. Bact.* **52**, 565, 1946.
108. Neil J. M., Fleming W. L., *J. Exptl. Med.* **45**, 937, 1927.
109. Newburgh R. W., Claridge C. A., Chaldelin V. H., *J. Biol. Chem.* **214**, 27, 1955.
110. Nossal P. M., *Bioch. Bioph. Acta* **11**, 596, 1953.
111. Nossal D. M., *Biochem. J.* **57**, 61, 1954.
112. Nossal P. M., Morton D. J., *Bioch. Bioph. Acta* **19**, 388, 1956.
113. Obojska K., *Praca w przygotowaniu do druku*.
114. Oparin A. J., Gelman N. C., Elpiner I. E., *Dokłady A. N. ZSSR*, **96**, 573, 1954.
115. Paegle L. M., Schlenk F., *Arch. Bioch. Bioph.* **40**, 42, 1952.
116. Pappenheimer A. M. Jr., Hendee E. D., *J. Biol. Chem.* **171**, 701, 1947.
117. Penrose M., Quastel J. H., *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **107**, 168, 1930.
118. Peterson R. G., Hartsell S. E., *J. Infec. Diseases* **96**, 75, 1955.
119. Pierce Jr. W. A., White A. G. C., *J. Bact.* **69**, 230, 1955.
120. Plaut G. W. E., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **180**, 13, 1949.
121. Pollock M. R., *J. Gen. Microbiol.* **8**, 186, 1953.
122. Potter V. R., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* **114**, 495, 1936.
123. Powell J. F., Hunter J. R., *Biochem. J.* **62**, 381, 1956.
124. Reithel F. J., *Arch. Bioch.* **9**, 63, 1946.

125. Repaske R., *Bioch. Bioph. Acta* **22**, 189, 1956.
126. Roessler W. G., Sanders T. H., Dulberg J., Brewer C. R., J. *Biol. Chem.* **194**, 207, 1952.
127. Rudman D., Meister A., *J. Biol. Chem.* **200**, 591, 1953.
128. Salton M. R. J., Horne R. W., *Bioch. Bioph. Acta* **7**, 177, 1951.
129. Salton M. R. J., *J. Gen. Microbiol.* **12**, 25, 1955.
130. Saz H. J., Krampitz L. O., *J. Bacteriol.* **69**, 288, 1955.
131. Schwab J. H., *J. Bact.* **71**, 94, 1956.
132. Seaman G. R., *Arch. Bioch. Bioph.* **48**, 424, 1954.
133. Seibert F. B., Fabrizio A. M., *Am. Rev. Tuberc.* **66**, 314, 1952.
134. Seibert F. B., *Am. Rev. Tuberc.* **59**, 86, 1949.
135. Singer T. P., Thimot N. Z., Massey V., Kearney E. B., *Arch. Bioch. Bioph.* **62**, 497, 1956.
136. Sher J. H., Mallette M. F., *J. Biol. Chem.* **200**, 257, 1953.
137. Sher J. H., Mallette M. F., *Arch. Bioch. Bioph.* **53**, 354, 1954.
138. Slade H. D., *Arch. Bioch. m Bioph.* **42**, 204, 1953.
139. Slade H. D., Vetter J. K., *J. Bact.* **71**, 236, 1956.
140. Slade H. D., Vetter J. K., *J. Bact.* **72**, 27, 1956.
141. Speck M. L., Myers R. P., *J. Bact.* **52**, 657, 1946.
142. Stadtman E. R., Baker H. A., *J. Biol. Chem.* **180**, 1085, 1949.
143. Stevens F. A., West R., *J. Exptl. Med.* **35**, 823, 1922.
144. Stickland L. H., *Biochem J.* **23**, 1187, 1929.
145. Stokes F. N., Campbell J. J. R. *Arch. Bioch.* **30**, 121, 1951.
146. Strange R. E., Dark F. A., *Biochem. J.* **62**, 459, 1956.
147. Strehler B. L., Cornier M. J., *Arch. Bioch. Bioph.* **47**, 16, 1953.
148. Stone R. W., Wilson P. W., *J. Bact.* **63**, 605, 1952 .
149. Stumpf P. K., Green D. E., *J. Biol. Chem.* **153**, 387, 1944.
150. Stumpf P. K., *J. Biol. Chem.* **159**, 529, 1945.
151. Stumpf P. K., Kreen D. E., Smith Jr. F. W., *Bact.* **51**, 487, 1946.
152. Sutton W. B., *J. Biol. Chem.* **210**, 309, 1954.
153. Szafranski P., Szarkowska L., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 199, 1955.
154. Szejnker A. P., Elpiner I. E., *Żurn. microbiot. epidemiol. i immuno-biol.* **5**, 69, 1949.
155. Szymona M., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II.* **4**, 121, 1956.
156. Trudinger P. A., *Biochem. J.* **62**, 480, 1956.
157. Trudinger P. A., Cohen G. N., *Biochem. J.* **62**, 488, 1956.
158. Umbarger H. E., *J. Bact.* **68** 140, 1954.
159. Umbarger H. E., Brown B., *J. Bact.* **71**, 443, 1956.
160. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., *Manometric Techniques and Related Method for the Study of Tissue Metabolism*, Minneapolis 1951.
161. Utter M. F., Werkman C. H., *J. Bact.* **42**, 665, 1941.
162. Utter M. F., Lipmann F., Werkman C. H., *J. Biol. Chem.* **153**, 521, 1945.
163. Utter M. F., Werkman C. H., *Biochem. J.* **36**, 485, 1942.
164. Utter M. F., Kalnitzky G., Werkman C. H., *Arch. Bioch.* **9**, 407, 1946.
165. Virtanen A. J., Tarnanen J., *Biochem. Z.*, **250**, 198, 1932.
166. Warren R. H., Gray J., Bartell P., *J. Bact.* **70**, 614, 1955.
167. Weimberg R., Doudoroff M., *J. Bact.* **68**, 381, 1954.

168. Welsch M., Salmon J., *Ann. Inst. Pasteur* **79**, 802, 1950.
169. Wheat R. W., Ajl S. J., *J. Biol. Chem.* **217**, 897, 1955.
170. Whitehead J. E. M., Morrison A. R., Young L., *Biochem. J.* **51**, 585, 1952.
171. Widmer C., King T. E., Cheldelin V. H., *J. Bact.* **71**, 737, 1956.
172. Williams V. R., McIntyre R. T., *J. Bact.* **70**, 563, 1955.
173. Wiślocki S., *Acta Microbiol. Pol.* **2**, 14, 1953.
174. Wolfe J. B., Ivler D., Rittenberg S. C., *J. Biol. Chem.* **209**, 867, 1954.
175. Wood W. A., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **181**, 171, 1949.
176. Yamamura Y., Kusonose M., Kusonose E., *Nature*, **170**, 207, 1952.
177. Youmans G. P., Milman I., Youmans A. S., *J. Bact.* **70**, 557, 1955.
178. Zeller E. A., Van Orden L. S., Kircheimer W. F., *J. Bact.* **67**, 153, 1954.

PIOTR MASŁOWSKI

Elektroforeza bibułowa aminokwasów przy zastosowaniu wysokich napięć

Wstęp

W ostatnich latach jedną z najpoważniejszych metod stosowanych do oznaczania aminokwasów stała się metoda chromatografii bibułowej, wprowadzona przez Consdena, Gordona i Martina (3) w 1944 r. Metoda ta, głównie chromatografii jednokierunkowej, jako najbardziej nadającej się do oznaczeń ilościowych, poza znaczną trudnością w jej adaptacji, jest czasochłonna. Wiadomo bowiem, że rozdzielenie wszystkich aminokwasów hydrolizatu białkowego na jednym jednokierunkowym chromatogramie jest niemożliwe, a stosowanie kilku chromatogramów, rozwijających się przeciętnie od 24 — 72 godz., przedłuża czas analizy do kilku dni. Poza tym sama identyfikacja aminokwasów prowadzi często do pomyłek, ponieważ współczynniki R_f wykazują dużą zmienność nawet w stosunku do tego samego aminokwasu, zaś test ninhydrynowy stosowany ogólnie do ich wykrywania nie jest bynajmniej swoisty tylko dla aminokwasów. Natomiast metoda elektroforezy bibułowej, głównie przy zastosowaniu wysokich napięć w oparciu o metodę chromatografii bibułowej jako pomocniczej, pozwala uzyskać zadowalający i możliwie dokładny rozdział aminokwasów w stosunkowo krótkim czasie.

Pierwsza wzmianka o użyciu elektroforezy bibułowej ukazała się w 1937 r. w pracy Königa (26), a następnie w 1939 r. w pracy Klobusitzkiego i Königa (23), którzy rozdzielili na paskach papieru nasyconego roztworem elektrolitu żółty barwnik jadu wężowego.

W celu odróżnienia wędrówki dużych jonów w polu elektrycznym — elektroforezy Martin i Syngge (31) wprowadzali pojęcie jonoforezy czyli wędrówki małych jonów w polu elektrycznym. Haugaard i Kroner (18) stosowali kombinację chromatografii i elektroforezy bibułowej do rozdziału aminokwasów, a równocześnie Wieland i Fischer (44) badali połączenia kompleksowe miedzi z aminokwasami celem ich ilościowego oznaczenia. Durrum (9, 12) stosował dwuwymiarową elektroforezę bibułową, a McDonald i współpracownicy (5, 6) badali

ruchliwość aminokwasów w polu elektrycznym w zależności od pH roztworów buforowych, różnicy potencjałów, siły jonowej buforów, temperatury, zjawiska elektroosmozy jak i adsorpcji oraz przydatności różnego rodzaju bibuły.

Metody te następnie *Cremer* i *Tiselius* (4) adaptowali do rozdziału frakcji białkowych. Od tego czasu datuje się intensywny rozwój elektroforezy bibułowej w zastosowaniu do rozdziału frakcji białkowych surowicy krwi (14, 35, 19, 21, 36). W metodach tych dobre wyniki uzyskuje się przy użyciu prądu stałego o niskich napięciach (100—220 V), gdy tymczasem do rozdziału związków o małym lub średnim ciężarze cząsteczkowym, na skutek dyfuzji i innych czynników, okazał się nie wystarczający. Stosowanie natomiast wysokich napięć zwiększa szybkość wędrówki jonów, zmniejsza czas rozwijania elektroforegramów a w związku z tym odpowiednio zmniejsza się efekt dyfuzyjny. Dlatego też pierwszy *Michl* (32), a następnie *Kickhöfen* i *Westphal* (22), *Turba* (41), *Heilmeyer* wraz z współpracownikami (20) oraz *Wieland* (47) i *Lange* (29) dużo miejsca poświęcili w swych pracach metodzie elektroforezy bibułowej przy użyciu wysokich napięć. Na skutek jednak dużych trudności technicznych oraz braku dokładnych teoretycznych podstaw mało jest prac metodycznych na ten temat, szczególnie prac związanych z rozdziałem i oznaczaniem aminokwasów. Co prawda ostatnio praca *Dose* i *Caputo* (8) dosyć obszernie i dokładnie omawia to zagadnienie, jednakże metoda ich wydaje się nam zbyt skomplikowana i mało prawdopodobna do stosowania w naszych krajowych warunkach, ze względu na aparaturę przez nich stosowaną. Autorzy celem rozdzielenia i oznaczenia aminokwasów hydrolizatu białkowego stosują 4 rodzaje buforów: o pH 6; 3,2; 1,9; 10, oraz chromatografię bibułową o dwóch rozpuszczalnikach. Rozdział aminokwasów hydrolizatu białkowego wg *Caputo* i *Dose* przedstawiono w tabeli I.

Celem więc naszej pracy było systematyczne prześledzenie szczególnych warunków, umożliwiających rozdział, w oparciu o dotychczasowe osiągnięcia w dziedzinie chromatografii i elektroforezy bibułowej. W wyniku tych badań opracowano metodę, pozwalającą na uzyskanie szybkiego rozdziału, wystarczającego do seryjnych analiz materiału biologicznego, przy zastosowaniu stosunkowo prostych urządzeń laboratoryjnych.

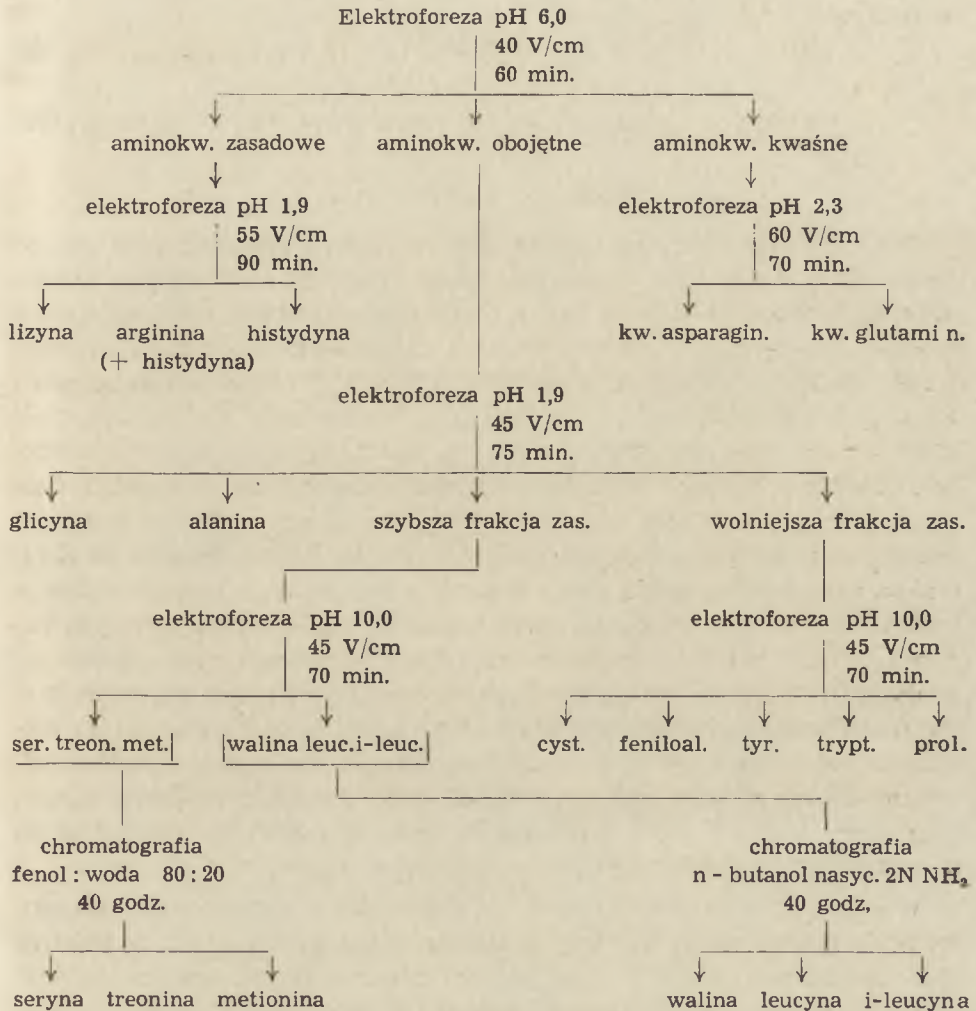
Część doświadczalna

Odczynniki:

1. Aminokwasy f-my F. Hoffmann — La Roche
2. Ninhydryna f-my F. Hoffmann — La Roche
3. Izatyna otrzymana w Zakładzie Biochemii

Tabela 1

Rozdział aminokwasów hydrolizatu białkowego wg Dose i Caputo (8)



4. Kwas octowy lodowaty cz.d.a. Gliwice
5. Kwas mrówkowy cz.d.a. Gliwice
6. Aceton cz.d.a. Gliwice
7. Kwaśny ftalan potasowy cz.d.a. Gliwice
8. Wodorotlenek sodowy cz.d.a. Lachema-Czechosłowacja
9. Chlorek kadmu cz.d.a. Gliwice

Bufory:

1. pH 1,9 — 2 N kw. octowy, 0,6 N kw. mrówkowy (1:1)
2. pH 5,9 — 5,10 g kwaśnego ftalanu potasowego, 0,86 g wodorotlenku sodowego do 1 litra.

Wywoływacze:

1. 75 mg CdCl_2 , 6 ml wody, 0,3 ml CH_3COOH , 100 ml acetonu, 2 g ninhydryny. Łączono wg podanej kolejności (1).
2. 0,2% roztwór izatyny w acetonie z dodatkiem 4% kw. octowego (37).

Komora elektroforetyczna

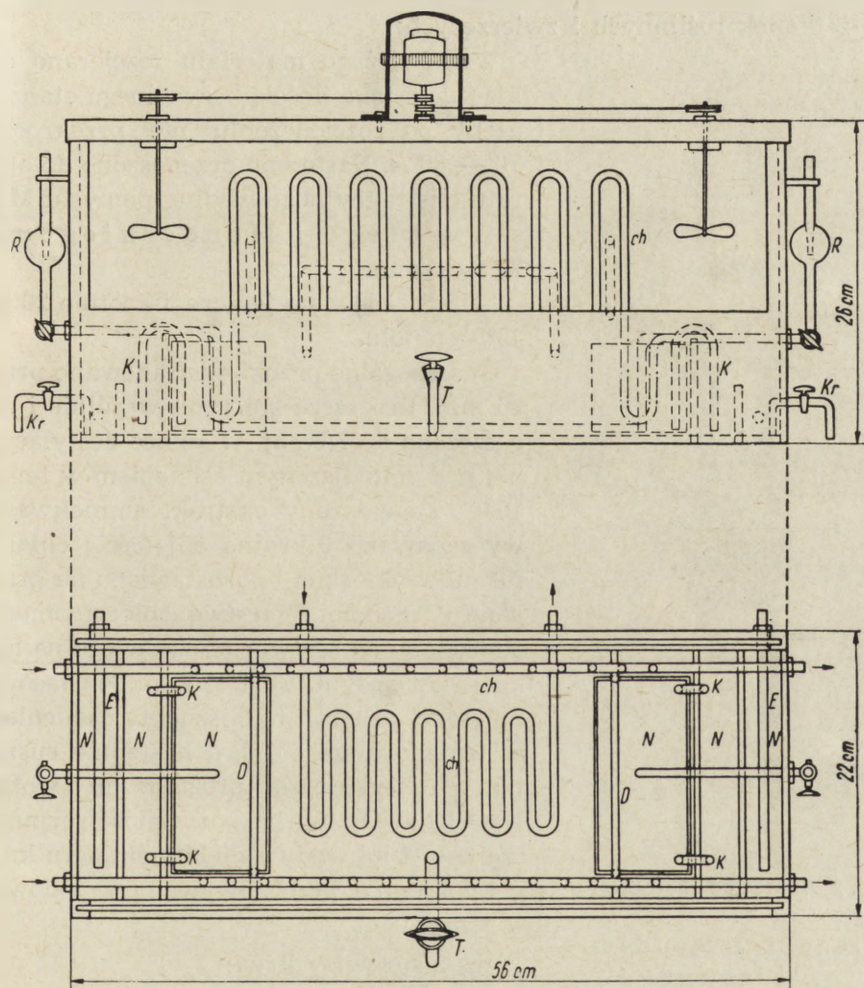
Komorę elektroforetyczną naszej modyfikacji, przedstawioną na rysunku nr 1, stanowi naczynie z mlecznego celuloidu z oszklonymi ścianami, o wymiarach $56 \times 26 \times 22$ cm, zamknięte wieczkiem, na którym umocowany jest motorek elektryczny i dwa mieszadła. Naczynia elektrodowe stanowią dwie wanienki o wymiarach $8 \times 8 \times 15$ cm połączone mostkami w kształcie litery U, z dodatkowymi wanienkami z przegrodą, poza którą umieszczone są elektrody węglowe. Klucze elektrolityczne wypełnione są buforem, a końce rurek klucza zaopatrzone w błony z celofanu. Cała komora wypełniona jest toluenem, ziębionym poprzez szklane chłodnice bieżącą wodą wzgl. solanką, szczególnie w okresie letnim. Urządzenia R i R umieszczone w bocznych ściankach komory umożliwiają przeprowadzenie rozdziału elektroforetycznego substancji przy ciągle przepływającym buforze. Stosuje się to głównie w przypadku substancji mieszających się z toluenem. Wówczas można pominąć odprowadzanie ciepła używając bardzo rozcieńczonego buforu (20, 30-krotnie), który jednak szybko ulega rozkładowi i stale musi być odnawiany. Paski bibuły zawieszono nad chłodnicą na dwóch prętach w ten sposób, że środkowa ich część jest pozioma, przy czym końce bibuły obciążone bagietkami szklanymi zanurzone są w wanienkach z elektrolitem.

W czasie procesu elektroforezy pH elektrolitu w naczyniach elektrodowych ulega zmianie, dlatego stosowano zmianę biegunów prądu po każdym rozdziale aminokwasów. Toluen, którym napelniona jest komora, nasycal się po pewnym czasie roztworem elektrolitu, toteż po dwudziestu pomiarach usuwano go, mieszano z roztworem ługu sodowego i bezwodnym siarczanem sodowym i destylowano.

Przygotowanie hydrolizatu

Wilgotny materiał badany suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 60°C do stałej wagi, celem oznaczenia wody. Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla. Do hydrolizy pobrano taką ilość ba-

danej substancji, żeby zawierała 100 mg białka ($N \times 6,25$) i przenoszono do wąskiej rurki szklanej z zawartością 10 ml równych objętości 6 N HCl i 90% HCOOH. Rurkę zatapiało i wrzucano do łaźni z wodnym roztworem chloru wapniowego, wrzącego w temperaturze 110°C . Próbkę hydrolizowano przez 20 godzin, a następnie hydrolizat przenoszono ilościowo do kolbki destylacyjnej na 20 ml i zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha w temperaturze 40°C . Pozostałość dwukrotnie przepłukiwano 5 ml wody, zagęszczano prawie do sucha, a następnie suszono pod zmniejszonym ciś-



Rys. 1. Komora elektroforetyczna

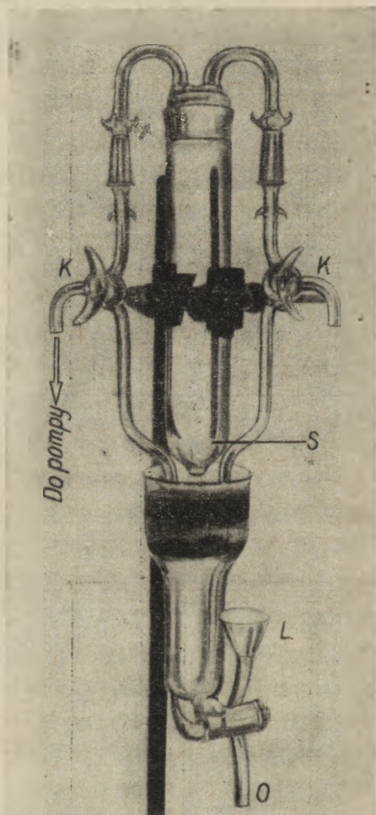
N — naczynia elektrodowe, K — klucz elektrolityczny, E — elektrody węglowe, ch — chłodnice, T — kran do odprowadzenia toluenu, D — bagietki do zawieszania bibuły, R — naczynka do wprowadzenia buforu, Kr — krany do wyprowadzenia buforu

nieniem w eksykatorze próżniowym nad NaOH i P₂O₅. Suchą pozostałość rozpuszczano dokładnie w 5 ml wody z dodatkiem paru kropli toluenu. Tak otrzymany 2% hydrolizat przechowywano w lodówce w temperaturze 0°C.

Badając ilość azotu ogólnego w próbce przed hydrolizą i po hydrolizie, stwierdzono ubytek azotu białkowego wynoszący od 3—6%. Dzieje się to dzięki częściowemu rozkładowi tryptofanu, treoniny, seryny, cystyny i innych aminokwasów.

Przygotowanie wyciągu wolnych aminokwasów

a) z tkanek roślinnych i zwierzęcych:



Rys. 2. Aparat do ekstrakcji ciągłej wg P. Masłowskiego i J. Mendeckiego

K — krany trójdrozne, L — lejek do wprowadzenia substancji ekstrahującej, O — rurka odprowadzająca substancję wyekstrahowaną, S — lejek Schotta G4.

2 g świeżego materiału rozcierano dokładnie z taką ilością bezwodnego etanolu, ażeby po rozcieńczeniu nie przekroczył 70 — 80%. Następnie przenoszono do aparatu ekstrakcyjnego według pomysłu Masłowskiego i Mendeckiego (rys. 2) i sączono.

Osad zadawano jeszcze 3-krotnie 20 ml 75% etanolu.

Poszczególne próbki ekstrahowano przez 20 min. Przesącze zbierano wspólnie i zagęszczano do 2/3 obj. w kolbce destylacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 40°C. Zagęszczony ekstrakt aminokwasowy zadawano 3-krotną objętością chloroformu, wyklócano i pozostawiano na przeciąg 10 godzin. Warstwę chloroformową oddzielano od roztworu właściwego na lejku rozdzielczym. Ekstrakt aminokwasowy zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C, a następnie suszono w eksykatorze próżniowym wobec NaOH i P₂O₅. Suchą pozostałość rozpuszczano w 2 ml wody z dodatkiem paru kropli toluenu i przechowywano w lodówce w temp. 0°C.

b) z surowicy krwi:

Badaną próbkę surowicy krwi odbiałczano mieszaniną metanolu i acetonu (6 : 2), przechowywano 30 min. w lodówce i sączono na lejku Schotta względnie od-

wirowywano. Przesącz odparowywano w temperaturze 40° pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczano w ściśle określonej ilości wody z dodatkiem paru kropel toluenu.

Bibuła

Mając do dyspozycji skromny wybór gatunków bibuły, badaliśmy do celów elektroforezy tylko Whatman nr 1, 2, 4 oraz Macherey-Nagel nr 61, 214. Najostrzejsze rozdzielenie pasm aminokwasów uzyskaliśmy przy stosowaniu bibuły Macherey-Nagel nr 214. Stosowano paski bibuły o różnych wymiarach, głównie zaś o wymiarach 4×50 cm i 11×50 cm. Bibułę przed użyciem zanurzano jednym końcem do naczynia z destylowaną wodą i pozostawiano na 24 godziny. Miało to na celu wyeluowanie zanieczyszczeń organicznych, prawdopodobnie pochodzenia peptydowego. Jak wykazały bowiem badania Wielanda (48), zagęszczony eluat brunatnej barwy, poddany hydrolizie kwasem solnym, dawał na elektroforegramie szereg paszków reagujących z ninhydriną.

Nanoszenie roztworów badanych na bibułę

Stosowano dwojakiego rodzaju nanoszenie:

- a) na suchą bibułę,
- b) na wilgotną bibułę.

Ad a) Nanoszenie na suchą bibułę stosowano dla roztworów o małych ilościach tłuszczowców względnie dla roztworów bardzo rozcieńczonych, wymagających kilkunastokrotnego nanoszenia. W tym celu miejsce startu na pasku bibuły zaznaczano ołówkiem, a na to miejsce nanoszono mikropipetką badaną substancję. Każdą następną porcję aminokwasów wprowadzano dopiero po wyschnięciu pierwszej. Naniesiony prążek winien być odległy od brzegów bibuły co najmniej o 1 cm. Szerokość prążka nie powinna przekraczać 2 — 3 mm. Po naniesieniu badanej substancji pasek bibuły zanurzano do elektrolitu w odległości 1 cm od miejsca startu i przeciągano w kierunku odwrotnym do kierunku rozwijania elektroforegramu. Czekano następnie chwilę, aż elektrolit samorzutnie na skutek „ssania” bibuły znajdzie się w odległości ok. 3 mm od miejsca startu. Pasek następnie prasowano dokładnie wałkiem fotograficznym między dwoma arkuszami bibuły na płycie szklanej. Tę samą czynność wykonywano z drugą częścią paska bibuły elektroforetycznej.

Tego rodzaju postępowanie posiada te dobre strony, że elektrolit wędrujący do miejsca startu na skutek „ssania” bibuły zagęszcza naniesioną substancję.

Ad b) Nanoszenie na wilgotną bibułę stosowano w przypadkach dużej

ilości tłuszczowców. Wówczas nanoszono substancję za pomocą mikropipetki na uprzednio zwilżony i dokładnie wyciśnięty pasek bibuły.

Poszczególnych aminokwasów nanoszono w ilości 10—20 μg w mieszaninie od 100 — 200 μg . Tyż nanoszono badanego hydrolyzatu.

Rozwijanie elektroforegramów

Po usunięciu nadmiaru elektrolitu z paska bibuły obciążano jego końce bagietkami i zawieszano w komorze elektroforetycznej napełnionej toluenem chłodzonym do temperatury 10°C. Stosowano w zależności od potrzeb prąd stały od 15 do 75V/cm. Natężenie od 0,8 — 2 mA na cm szerokości paska. Czas rozwijania od 30 — 120 min.

Suszenie elektroforegramów

Po rozwinięciu końce elektroforegramu wyciskano między dwoma arkuszami bibuły, a następnie zawieszano linią startową do dołu i suszono strumieniem powietrza w temp. 35°C. Usunięcie nadmiaru elektrolitu z końców paska bibuły posiada duże znaczenie. Podczas suszenia bowiem środek elektroforegramu o mniejszej zawartości elektrolitu będzie szybciej wysychał, a tym samym zasysał ciecz z miejsc bardziej wilgotnych, co w rezultacie ujemnie wpływa na ostrość rozdziału.

Wywoływanie elektroforegramów

Elektroforegramy wywoływano techniką zanurzeniową, tzn. przeciągano pasek bibuły przez roztwór wywoływacza w kierunku zgodnym z kierunkiem rozdziału aminokwasów. Ten sposób przeciągania paska bibuły zapobiega rozmazywaniu się plam. Do wywoływania używaliśmy 2% kadmowy roztwór ninhydryny. Po zwilżeniu bibuły wywoływaczem suszono ją strumieniem ciepłego powietrza (35°C), a następnie przechowywano 20 godzin w ciemności do całkowitego wystąpienia barwy.

Identyfikacja aminokwasów

Celem identyfikacji poszczególnych aminokwasów, z wyjątkiem proliny, którą identyfikowano 0,2% roztworem izatyny, posługiwano się dwoma sposobami:

1) Na pasek bibuły nanoszono równolegle określoną ilość badanych aminokwasów oraz tę samą ilość aminokwasów z dodatkiem mieszaniny wzorcowej. Wzmocniona barwa aminokwasów wzorcowych wskazywała na obecność danych aminokwasów w badanym roztworze.

2) Po rozwinięciu elektroforegramu wycinano wąski pasek bibuły i wywoływano. Po stwierdzeniu umiejscowienia się poszczególnych aminokwa-

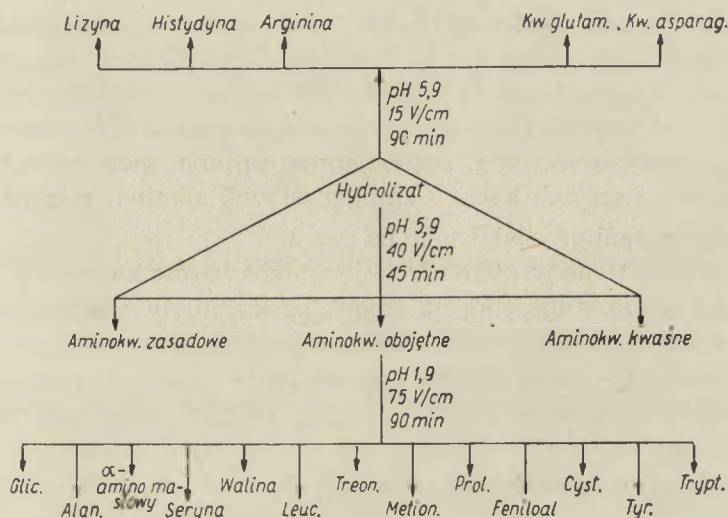
sów wycinano je i eluowano wodą. Poszczególne frakcje sprawdzano chromatograficznie przy zastosowaniu dwóch rozpuszczalników: n-butanol: kwas octowy: woda (4:1:1), oraz izopropanol: kwas octowy: woda (70:15:15).

Przebieg analizy

Przebieg analizy aminokwasów wg naszej metody można podzielić na trzy etapy (tabela 2).

Tabela 2

Rozdział aminokwasów hydrolizatu białkowego wg Mastowskiego



1. Rozdział aminokwasów na trzy frakcje.
2. Rozdział aminokwasów obojętnych.
3. Rozdział aminokwasów kwaśnych i zasadowych.

Ad 1). Na pasek bibuły elektroforetycznej o wymiarach 11×40 cm nanoszono w odległości 2,5 cm od jednego brzegu bibuły 0,5 — 1 ml badanego roztworu. Równolegle do pierwszego paska w odległości 0,5 cm od drugiego brzegu bibuły nanoszono kilka μ l tegoż roztworu jak też próbkę kontrolną. Elektroforegram rozwijano w buforze ftalowym o pH 5,9 w ciągu 40 min. przy zastosowaniu prądu stałego o napięciu 40 V/cm i natężeniu 2 mA/cm szerokości paska. Po rozwinięciu i wysuszeniu elektroforegramu wycinano pasek kontrolny i wywoływano. Po stwierdzeniu umiejscowienia się aminokwasów kwaśnych, zasadowych i obojętnych wycinano je, paski umieszczano między dwoma szklanymi płytkami i aminokwasy eluowano wodą w przeciągu 24 godzin. Do naczynka, do którego ściekał eluat, dodawano parę ml wodnego roztworu alkoholu izopropylowego i kroplę tolu-

nu. Następnie eluaty aminokwasów obojętnych oraz wspólnie zasadowych i kwaśnych zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 40°C do sucha i rozpuszczano w 1 ml redestylowanej wody z dodatkiem 1 kropli toluenu.

Postępowanie tego rodzaju pozwala nie tylko na usunięcie z badanego roztworu aminokwasów zasadowych, kwaśnych i obojętnych, lecz równocześnie uwalnia badaną próbę od całego szeregu związków towarzyszących. Ma to szczególne znaczenie głównie w odniesieniu do ekstrakcji tkankowych, płynów fizjologicznych oraz innych materiałów biologicznych.

Ad 2). Na pasek bibuły elektroforetycznej o wymiarach 4×50 cm w odległości 6 cm od anodowego końca bibuły nanoszono zagęszczone aminokwasy obojętne w postaci kreski o długości 2 cm. Elektroforegram rozwijano 90 min przy zastosowaniu buforu o pH 1,9, napięciu 75 V/cm i natężeniu 1 — 1,2 mA/cm szerokości paska. Uzyskano rozdział 13 aminokwasów: tryptofan, tyrozyna, cystyna, feniloalanina, prolina, metionina, treonina, leucyna, walina, seryna, kwas α -aminomasłowy, alanina, glicyna.

Elektroforegram przedstawiono na rys. 3.

Ad 3). Zagęszczone wspólnie frakcje aminokwasów kwaśnych i obojętnych nanoszono mikropipetką na środek paska bibuły o wymiarach 4×40 cm i rozwijano 90 minut w komorze elektroforetycznej bez toluenu przy zastosowaniu prądu stałego o napięciu 15 V/cm i natężeniu 0,8 — 1 mA/cm szerokości paska. Otrzymano przy katodzie: argininę, histydynę, lizynę, przy anodzie: kwas glutaminowy i kwas asparaginowy.

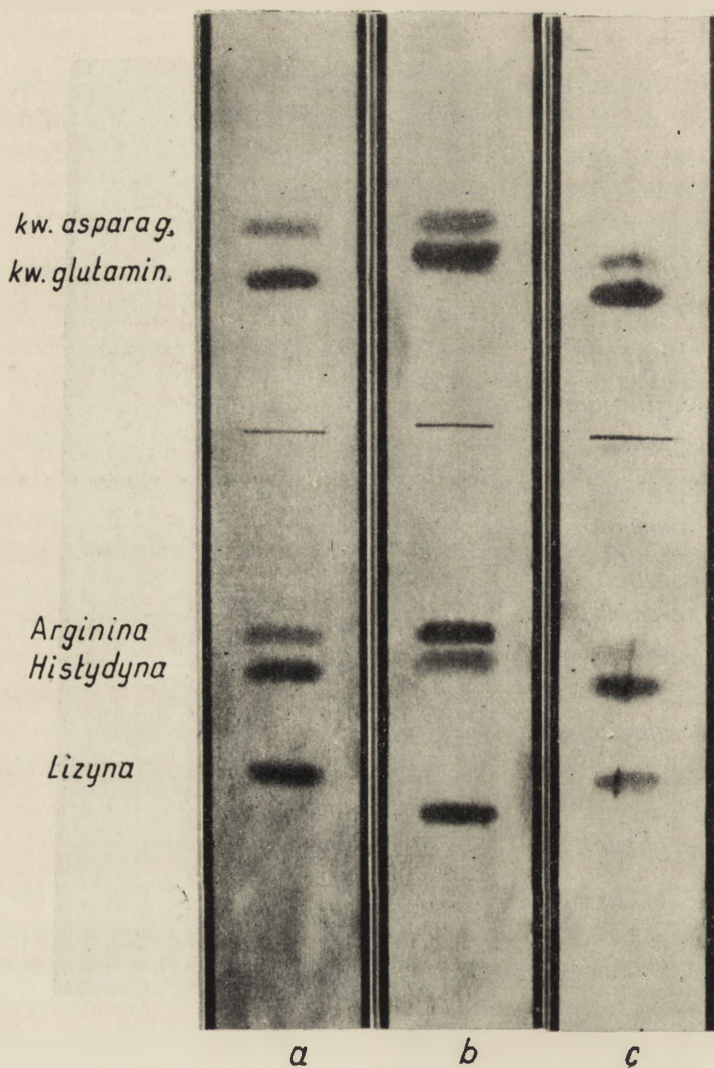
Elektroforegram przedstawiony na rys. 4.

Oznaczenie ilościowe

W tym celu stosowano metodę kolorymetrycznego oznaczania kompleksu ninhydryno- kadmowego aminokwasów według Barroliera (1). Jak wiadomo, reakcja między ninhydriną a aminokwasami nie zachodzi stechiometrycznie. Barwa, jaką ona daje po reakcji z aminokwasami, zależy od szeregu czynników jak: rodzaju elektrolitu, sposobu przygotowania roztworu ninhydryny, zanieczyszczenia bibuły, temperatury i czasu suszenia elektroforegramów, sposobu wywoływania itp. Przy zachowaniu jednak dokładnych i stałych warunków pracy można otrzymać wyniki powtarzalne, nie da się jednak otrzymać jednakowego zabarwienia poszczególnych aminokwasów. Przeprowadzenie natomiast aminokwasów wywołanych ninhydriną w kompleks kadmowy (1) pozwala otrzymać jednako czerwone zabarwienie. Kompleks ten łatwo daje się eluować metanolem i w roztworze oznaczać kolorymetrycznie.



Rys. 3. Elektroforegram aminokwasów obojętnych pH 1,9; 75 V/cm; 1—1,2 MA/cm szer. paska, a) elektroforegram aminokwasów standardowych, b) elektroforegram aminokwasów surowicy krwi, c) elektroforegram aminokwasów hydrolizatu białkowego łubinu.



Rys. 4. Elektroforegram aminokwasów kwaśnych i zasadowych pH 5,9; 15 V/cm; 0,8–1 MA/ szer paska, a) elektroforegram aminokwasów standardowych, b) elektroforegram aminokwasów surowicy krwi, c) elektroforegram wolnych aminokwasów łubinu

W naszym przypadku postępowano następująco: Pasek bibuły elektroforetycznej o szerokości 10 cm i 50 cm długości dzielono ołówkiem na kilka równych stref. Na jedną z tych stref nanoszono 5 μ l badanego hydrolyzatu, a na pozostałe po 2.10^{-8} M każdego z aminokwasów. Po rozwinięciu i wywołaniu ninhydryną porównywano intensywność zabarwienia aminokwasów wzorcowych z badanymi. Jeżeli stężenie aminokwasów hydrolyzatu było wyższe niż wzorcowe, próbę odpowiednio rozcieńczano i analizę powtarzano. Miało to na celu dobranie takiego stężenia aminokwasów hydrolyzatu, ażeby nie przekraczało stężenie 2.10^{-8} M, ponieważ tylko te warunki spełniają prawo B e e r a.

Po oznaczeniu wstępnym określoną ilość hydrolyzatu nanoszono równolegle z aminokwasami wzorcowymi na pasek bibuły o wymiarach 10×50 cm i rozwijano. Po rozwinięciu, wysuszeniu i wywołaniu, obrysowywano ołówkiem zarisy plam aminokwasów badanych i wzorcowych a następnie wycinano. Wycięte paski krajano na drobne kawałki i wykłócano 15 min. z 5 ml metanolu. Eluat przenoszono do kiuwet mikrokolorymetru typu KOŁ 52 i porównywano czerwone roztwory aminokwasów badanych z wzorcowymi przy zastosowaniu filtru $\phi \lambda = 496 \text{ m}\mu$.

Dyskusja

Oznaczanie aminokwasów należy do jednego z zasadniczych zagadnień, jeśli chodzi o poznanie metabolizmu ustrojowego. Spośród różnych dotychczas stosowanych metod jak: chromatografia bibułowa (3), kolumnowa (34), metoda mikrobiologiczna (38), rozcieńczonych izotopów (40) itp., jonoforeza bibułowa przy zastosowaniu prądu stałego o wysokim napięciu w oparciu o chromatografię rozdzielczą, wydaje się najdokładniejszą i najprostszą. Dlatego też w ostatnim 10-leciu daje się zaobserwować zainteresowanie całego szeregu badaczy możliwie gruntownym rozpracowaniem tego zagadnienia. Jak dotychczas jednak, poza pracami H e i l m e y e r a i współpr. (20), oraz D o s e i C a p u t o (8), szereg autorów zajmujących się elektroforezą bibułową, nie zajmowało się, o ile nam wiadomo, identyfikacją wszystkich aminokwasów, podchodząc do tego zagadnienia raczej fragmentarycznie, a głównie kładąc nacisk na przydatność jej do analizy różnych związków biologicznych.

Mimo jednak szeregu prac metoda ta w dalszym ciągu nie jest wystarczająco rozpracowana. Składa się na to wiele czynników. Ograniczymy się tutaj do wyliczenia i omówienia najistotniejszych jak: rodzaju komór, elektrod, przestrzeni elektrodowych, pH elektrolitu, sposobu odprowadzania ciepła J o u l e a, rodzaju bibuły, sposobu jej zwilżania elektrolitem oraz nanoszenia badanego roztworu.

Wieland i Fischer (44, 45, 46) stosują komorę stanowiącą dwie płytki szklane, między którymi znajduje się ramka z masy plastycznej lub szkła. Na tę ramkę napinają bibułę elektroforetyczną i przykrywają płytką szklaną. Durrum (9, 10, 11) zawiesza bibułę w formie daszka na poziomym drążku, zaś Grassmann i Hannig (16) umieszczają na dwóch prętach w ten sposób, aby środkowa jej część była pozioma. Niektórzy autorzy proponują umieszczać paski bibuły między płytkami szklanymi z dobrze uszczelnionymi brzegami, a celem odprowadzenia ciepła zanurzają je w łaźni lodowej (20) względnie w chlorobenzenie (4,13).

Jak wykazały nasze doświadczenia, najdogodniejsze jest użycie swobodnie wiszącego paska bibuły. Unika się przez to przeszkód w przemieszczaniu się aminokwasów na styku wilgotnej bibuły z płytkami, dzięki czemu tworzące się prążki są wąskie i ostre.

Michl (32, 33) proponuje dwa rodzaje aparatury w zastosowaniu prądu o wysokich napięciach: a) do pracy na paskach bibuły, b) do pracy na całych arkuszach bibuły. Jako substancję odprowadzającą ciepło stosuje toluen, zaś Kickhöfen (22), Turba (41) i Lange (29) czterochlorek węgla, Heilmeyer (20) — heksan, zaś Durrum (10) — heptan. Inny sposób odprowadzania ciepła z pasków elektroforetycznych podają Kraus (27) i Gross (17). Paski bibuły elektroforetycznej kładą między cienkimi płytkami szklanymi lub z masy plastycznej. Płytki umieszczają w metalowej chłodnicy, chłodzonej bieżącą wodą. Chłodzenie takie w praktyce wysokich napięć wydaje się niepraktyczne, ze względu na możliwość przecięcia prądu.

W naszym przypadku, mimo że heksan jest lepszym związkiem odprowadzającym ciepło, używaliśmy toluenu, ponieważ ten produkt jest najtańszy i najbardziej dostępny na rynku krajowym.

Drugim czynnikiem odgrywającym bardzo poważną rolę w procesie elektroforezy bibułowej są elektrody i urządzenie przestrzeni elektrodowych. Używano różnego rodzaju elektrod: cynkowych (44), grafitowych (44), srebrnych (27) i platynowych (28).

W naszych badaniach najdogodniejszymi okazały się elektrody platynowe i węglowe, mimo że te ostatnie ulegają stopniowemu rozpylaniu w roztworze. Celem więc zabezpieczenia elektrolitu stosowano błony celofanowe względnie korki gipsowe, oddzielające roztwór w naczyniach elektrodowych od reszty układu.

Bardzo poważnie zakłócają przebieg elektroforezy związki wydzielane na skutek elektrolizy zachodzącej przy elektrodach. W celu zabezpieczenia

stosuje się odpowiednie labirynty (4) względnie system mostkowy na drodze między przestrzenią elektrodową a elektrolitem, w którym zanurzona jest bibuła. Stosuje się mostki agarowe (5), paski bibuły (42) względnie korki gipsowe. Zapobiegać też można dyfuzji umieszczając szklaną watę (28) pomiędzy oddzielnymi labiryntami układu elektrodowego.

Badania przeprowadzone przez nas wykazały, że najlepszy rozdział aminokwasów uzyskuje się przy zastosowaniu klucza elektrolitycznego napełnionego stosowanym do elektroforezy elektrolitem. Celem zaś utrudnienia konwekcji elektrolitu zaopatruje się końce klucza w błony z celofanu względnie w cienkie korki gipsowe.

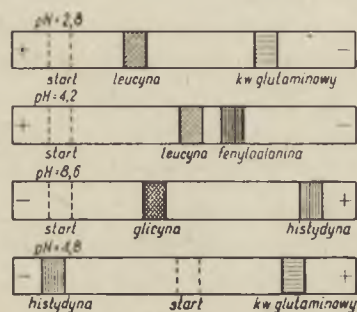
Przy rozdzielaniu elektroforetycznym nieodzowny jest odpowiedni dobór elektrolitu oraz jego pH. Wpływ pH na szybkość i kierunek wędrówki aminokwasów w polu elektrycznym ilustruje jonogram Mc Donalda (7) przedstawiony na rys. 5.

M i c h l (32) stosuje 10% kwas octowy z dodatkiem pirydyny do żądanego pH, W e r n e r i W e s t p h a l (43) 2 N kwas octowy i 0,6 N kwas mrówkowy (pH ok. 2), S p e n g l e r i K n e d e l (39) stosują dwa elektrolity: kwas octowy i mrówkowy (pH 1,9), oraz kwas octowy i pirydyna (pH 3,6), zaś D o s e i C a p u t o (8) cztery elektrolity — 15% kwas octowy i 5% kwas mrówkowy (pH 1,9), 2 N kwas octowy (pH 2,3), 10% roztw. pirydyny i 1% roztw. kwasu octowego (pH 6) oraz 0,5% roztw. węgla amonowego z 5 N amoniakiem (pH 10,0).

W naszych badaniach najlepszy rozdział aminokwasów obojętnych uzyskano przy stosowaniu 2 N kwasu octowego i 0,6 N kwasu mrówkowego w stosunku 1:1 (pH 1,9). Natomiast aminokwasy zasadowe i kwaśne łatwo ulegają rozdziałowi przy stosowaniu buforu ftalowego (pH 5,9).

Niezmiernie poważnym czynnikiem, wpływającym na rozdział aminokwasów jak też na otrzymywanie powtarzalnych wyników, jest sposób nanoszenia substancji oraz zwilżania bibuły. Niektórzy autorzy stosują nanoszenie punktowe (4, 22), inni w formie paska (25). Jedni używają do tego celu mikropipetki, inni — pędzelka (20, 30).

W e r n e r i W e s t p h a l (43) polecają umieścić pod płytkę z nanoszonym papierem wałki zestalonego CO₂. Wówczas nanoszona w postaci wąskiego paska substancja krzepnie i nie rozplýwa się. Chodzi bowiem



Rys. 5. Schemat jonogramu aminokwasów według Mc Donalda

o to, ażeby nanoszona plamka lub kreska zajmowała jak najmniejszą powierzchnię i nie miała postrzępionych brzegów.

Bibułę elektroforetyczną zwilża się elektrolitem przed nanoszeniem substancji (4, 27) względnie po naniesieniu (46, 30). Pierwszy sposób ma tę złą stronę, że powoduje stosunkowo dużą adsorpcję, natomiast nieodzowny jest przy nanoszeniu większych ilości roztworu wymagającego kilkakrotnego nakładania substancji.

W naszym przypadku stosowaliśmy zarówno pierwszy jak i drugi sposób w zależności od stopnia rozcieńczenia substancji oraz ilości związków towarzyszących, głównie tłuszczowców.

Badania nasze wykazały też, że w celu otrzymania dokładnych i powtarzalnych wyników należy skutecznie przestrzegać następujących warunków pracy:

1. Roztwór badanej substancji nie powinien zawierać obcych elektrolitów, gdyż wpływ ich zakłóca rozwijanie elektroforegramu.

2. Bibuła elektroforetyczna winna być równomiernie nasycona buforem, ponieważ różnica w wilgotności pasków powoduje rozmazanie plam.

3. Nadmierna wilgotność bibuły nasyconej buforem prowadzi do zamazywania się stref, zaś niedosycenie powoduje to, że pasek wprowadzony do przestrzeni elektrodowych dopaja się buforem, co powoduje przesunięcie się naniesionych substancji do środka.

4. Naniesiony pasek badanej substancji na bibułę powinien być równy i jak najbardziej wąski. Przy nanoszeniu stosować mikropipetkę z dobrze oszlifowanym końcem, ażeby nie uszkodzić włókien bibuły, co prowadzi do wytwarzania się „ogonów”.

5. Nie należy nanosić dużych ilości aminokwasów, szczególnie leżących blisko siebie, gdyż tworzą wspólną plamę utrudniającą identyfikację i oznaczanie.

6. Nie należy stosować prądu o dużej mocy przekraczającej 2 mA/cm szerokości paska, gdyż to wpływa na zwiększenie szybkości wędrówki aminokwasów z jednoczesnym osłabieniem rozdziału.

7. Ciecz odprowadzająca ciepło, w naszym przypadku toluen, powinna być chemicznie czysta i nie zawierać domieszek elektrolitu, co wpływa ujemnie na rozdział aminokwasów. Dlatego też po zakończeniu pracy należy zlewać go do oddzielnego naczynia a po kilkunastu pomiarach wyklócić ze związkami zobojętniającymi i odwadniającymi i przedestylować.

Przy przestrzeganiu powyższych wskazówek oraz przy pewnym opanowaniu strony technicznej, metoda ta pozwala na możliwie szybkie i dokładne oznaczanie najważniejszych aminokwasów w materiale biologicznym.

Streszczenie

1. Podano prostą i praktyczną aparaturę do elektroforezy bibułowej aminokwasów przy zastosowaniu wysokich napięć, jak też sposób nanoszenia substancji na bibułę, sposób jej zwilżania elektrolitem, suszenia, wywoływania i identyfikacji aminokwasów.

2. Przy zastosowaniu buforu ftalowego (pH 5,9) oraz octowo-mrówkowego (pH 1,9) w czasie od 60 — 90 min przy użyciu prądu stałego o napięciu od 15 — 75 V/cm i natężeniu 0,8 — 2 mA/cm szerokości paska rozdzielono i zidentyfikowano 18 aminokwasów.

3. Rozdzielone aminokwasy oznaczono w postaci kompleksu ninhydryno — kadmowego metodą kolorymetryczną przy użyciu mikrokolorymetru typu KOŁ 52 przy zastosowaniu filtru o $\lambda = 496 \mu\text{m}$.

LITERATURA

1. Barrolier J. *Naturwiss.* **42**, 416, 1955.
2. Bode F. H., Hübner H. J., Brückner H., Hoeres K. *Naturwiss.* **39**, 524, 1952.
3. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P. *Biochem. J.* **38**, 224, 1944.
4. Cremer H. D., Tiselius A., *Biochem. Z.* **320**, 273, 1950.
5. Mc Donald H. J., Urbin M. C., Williamson M. B. *Science* **112**, 227, 1950.
6. Mc Donald H. J., Marbach E. P., Urbin M. C. *Clin. Chemist.* **5**, 17, 1953 — Mc Donald H. J., Lappe R. J., Marbach E. P., Spitzer R. H., Urbin M. C. — *Clin. Chemist.* **5**, 51, 1953.
7. McDonald H. J., *J. Chem. Educat* **29**, 428, 1952.
8. Dose K., Caputo A. *Biochem. Z.* **328**, 376, 1956.
9. Durrum E. D. *J. Colloid Sci.* **6**, 274, 1951.
10. Durrum E. L. *Science* **113**, 66, 1951.
11. Durrum E. L. *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2943, 1950.
12. Durrum E. L. *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 4875, 1951.
13. Esser H., Heinzler F., Kazmeier F., Scholtan W., *Münch. med. Wochsch.* **93**, 986, 1951.
14. Flynn F. V., De Mayo P., *Lancet* **261**, 235, 1951.
15. Fischer F. G., Dörfel H. *Biochem. Z.* **324**, 544, 1953.
16. Grassmann W., Hanning K., *Z. Physiol. Chem.* **290**, 1, 1952.
17. Gross D. *Nature* **172**, 908, 1953; **173**, 487, 1954.
18. Haugaard G., Kroner T. D. *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 2135, 1948.
19. Hardwicke J. *Biochem. J.* **57**, 166, 1954.
20. Heilmeyer L., Clotten R., Sano J., Sturm A., Lipp A. *Klin. Wochschr.* **32**, 831, 1954.
21. Hoch H., Barr G. H. *Science* **122**, 243, 1955.
22. Kickhöfen B., Westphal O. *Z. Naturforsch.* **7 b**, 655, 1952.

23. Von Klobusitzky D., König P. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **192**, 271, 1939.
24. Kawerau E., Wieland Th. *Nature* **168**, 77, 1951 .
25. Knedel M. *Med. Monatschr.* **707**, 1951.
26. König P. *Actas III Congr. Sud-Americ. Chimica* **2**, 334, 1937.
27. Kraus K. A., Smith G. W. *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 4330, 1950.
28. Kunkel H. G., Tiselius A. *J. Gen. Physiol.* **35**, 89, 1951.
29. Lange G. *Biochem. Z.* **326**, 172, 1955.
30. Latner A. L. *Biochem. J.* **51**, XII, 1952.
31. Martin A. J. P., Syngé R. L. M. *Advances in Protein Chem.* **2**, 31, 1945.
32. Michl H. *Mh. Chem.* **82**, 489, 1951.
33. Michl H. *Mh. Chem.* **83**, 737, 1952.
34. Moore S., Stein W. H. *J. Biol. Chem.* **192**, 663, 1951.
35. Ostrowski W. i Mikucki A. *Acta Physiol. Pol.* **3**, 277, 1952.
36. Ramshorn K. *Die Pharmazie* **9**, 181, 1954.
37. Saifer A., Oreskes I. *Science* **119**, 124, 1954.
38. Snell E. E. *Adv. Protein Chem.* **2**, 75, 1946.
39. Spengler G., Knedel M. *Klin. Wochschr.* **34**, 389, 1956.
40. Shemin D., Foster G. L. *Ann. New York. Acad. Sci.* **47**, 119, 1946.
41. Turba F., Pelzer H., Schuster H. *Z. physiol. Chem.* **296**, 97, 1954.
42. Wallenfells K., Pechmann E. *Angew. Chem.* **63**, 44, 1951.
43. Werner G., Westphal O. *Angew. Chem.* **67**, 251, 1955.
44. Wieland T., Fischer E. *Naturwiss.* **35**, 29, 1948.
45. Wieland T., *Angew. Chem.* **60**, 313, 1948.
46. Wieland Th., Wirth L. *Angew. Chem.* **62**, 473, 1950.
47. Wieland Th., Pfeleiderer G. *Angew. Chem.* **67**, 257, 1955.
48. Wieland Th., Pfeleiderer G. *Angew. Chem.* **69**, 199, 1957.

Henryk Wieland

4. VI. 1877 — 5. VIII. 1957

Dnia 5 sierpnia 1957 r. zmarł w 81-ym roku życia Henryk O. Wieland — emerytowany profesor chemii organicznej w Uniwersytecie im. Bayera w Monachium. Podobnie jak Justus Liebig, Adolf Bayer i Ryszard Willstätter — jego poprzednicy na tym stanowisku — przyczynił się Henryk Wieland wybitnie do rozwoju zarówno chemii organicznej jak i biochemii. Jako chemik z wykształcenia właściwie oceniał znaczenie dobrego przygotowania laboratoryjnego dla późniejszych prac badawczych. Z tego względu od 1925 r. opracowywał unowocześniał zbiór ćwiczeń z chemii organicznej L. Gattermanna *Die Praxis des organischen Chemikers*. Rzadko który podręcznik może poszczycić się tak wielką popularnością a zarazem długowiecznością, od przeszło sześćdziesięciu lat znany jest dobrze studentom chemii, doczekał się trzydziestu kilku kolejnych wydań, z czego dziewiętnaście opracowanych przez Wielanda i był wielokrotnie tłumaczony na inne języki (między innymi trzy tłumaczenia polskie).

Różnokierunkowe zainteresowania Wielanda koncentrowały się na badaniu związków naturalnych i przemian zachodzących w organizmach żywych — a więc zagadnieniach bliskich dziś każdemu biochemikowi. Do 1949 roku wiele ważkich odkryć dokonano w jego laboratorium. Przez szereg lat pracował Wieland nad związkami grupy sterydów: sterolami drożdży, kwasem żółciowym i jadamii ropuszymi. Za wyjaśnienie znaczenia biologicznego i częściowej budowy chemicznej kwasów żółciowych otrzymał w 1927 r. nagrodę Nobla.

Badania Wielanda i jego uczniów wniosły szereg nowych danych w poznanie budowy alkaloidów niektórych gatunków roślin jak *Lobelia*, *Strychnos*, *Papaver somniferum*. Interesował się również składnikami owadów. Badając barwniki skrzydeł motyli ustalił budowę szkieletu nowej grupy cyklicznych związków azotowych o dużym znaczeniu biologicznym i wprowadził dla nich nazwę pteryne.

Największe jednak znaczenie mają prace Wielanda nad utlenianiem biologicznym. Jest on pierwszym badaczem, który sformułował i uzasadnił doświadczalnie, że olbrzymia większość reakcji utleniania związków organicznych polega na odłączeniu wodoru, czyli odwodorowaniu. Ustalił, że odwodorowanie właściwe różnym procesom fermentacji zachodzi przy współdziałaniu enzymów odwodorowujących, zwanych dziś dehydrogenazami. W pracach nad utlenianiem tkankowym już w 1913 r. zwrócił uwagę na rolę dehydrogenaz w aktywacji utlenianych substratów, odłączaniu przy współdziałaniu odpowiednich pośredników wodoru i przeniesienie go na tlen cząsteczkowy.

Dziś dzięki pracom prowadzonym w dziesiątkach różnych instytutów i laboratoriów badania w tej tak bardzo istotnej dziedzinie biochemii posunęły się znacznie naprzód. Podwaliny ich stanowią w znacznej mierze osiągnięcia Wielanda zebrane przez niego w monografii *Über den Verlauf des Oxydationsvorgänge* opublikowanej w 1933 r.

I. Chmielewska

JÓZEF HELLER

Sprawozdanie z podróży naukowej do USA

Wyleciałem z Warszawy 15 kwietnia 1957 r. samolotem Sabeny i w dniu 16 rano wylądowałem w Nowym Jorku. Po załatwieniu formalności granicznych przesiadłem się na samolot linii Northwestern i poleciałem do Chicago na odbywający się zjazd Federation of American Societies for Experimental Biology. Do federacji należą towarzystwa: Chemii Biologicznej, Fizjologii, Immunologii, Farmakologii, Patologii i Odżywiania. Był to olbrzymi zjazd doroczny, obejmujący 7500 uczestników. Obrady odbywały się w 2 grupach: biochemicznej obradującej w Palmer House, i fizjologicznej mieszczącej się przy tej samej ulicy w hotelu Conrad Hilton. W każdej grupie odbywało się jednocześnie 4 do 5 zebrań, największą frekwencją cieszyła się sekcja wirusów i nukleoproteidów.

Zjazd dawał doskonałą sposobność do szerokich kontaktów, dobrze zorganizowana służba łączności pozwalała na szybkie porozumienie się. Uczestnicy mieszkali na miejscu i przeważnie korzystali z restauracji mieszczących się w tym samym gmachu. Obszerne halle, korytarze były stale co najmniej równie wypełnione jak sale wykładowe. Potwierdza to ustalająca się od szeregu lat opinię, że rola dużych zjazdów naukowych polega przede wszystkim na umożliwieniu osobistej wymiany poglądów. Także i dla mnie był zjazd doskonałą sposobnością do odnowienia dawnych znajomości oraz podyskutowania z kolegami, których odwiedzenie nie leżało w dalszych planach mej podróży (Stany Południowe i Zachodnie).

W piątek 19 kwietnia wyjechałem do Milkwaukee, gdzie spędziłem dni świąteczne w domu prof. Michała Laskowskiego. W poniedziałek 22 kwietnia, który nie jest dniem świątecznym w Stanach, zwiedziłem Zakład Biochemii Uniwersytetu Marquette, gdzie zapoznałem się z pracami Laskowskiego nad fosfodiesterazą. Poznałem się również z prof. Quirkiem, znanym ze swych badań nad krzepnięciem krwi. W dniu tym odwiedził Laskowskiego prof. Piffner, wybitny tereotyk i praktyk biochemii witamin, a zwłaszcza B₁₂. Zna on dobrze polskie prace z tego zakresu. Wieczorem przyjechałem autobusem do Madison, gdzie mnie oczekiwał prof. Henry Lardy. W Madison spędziłem resztę tygodnia i poznałem zakłady Lardy'ego i Greena w Enzyme Institute, McArdle Laboratory for Cancer Research, Zakład Chemii Fizjologicznej Medical School, prowadzony przez P.P. Cohena oraz Zakład Biochemii Agriculture College kierowany przez Elvehjema. Zapoznałem się również z organizacją Postgraduate School, w której kierownikiem jest Elvehjem, a wykładają członkowie wszystkich wymienionych placówek, na których terenie odbywa się też nauka.

Z Lardym dyskutowaliśmy na temat efektu Pasteura i rozkojarzania fosforylacji, zwłaszcza nad rolą tyroksyny i jej pochodnych. Lardy stwierdził, że tyroksyna we krwi wiąże się z pewnym określonym białkiem, zajmującym pograniczne stanowisko między albuminami a globulinami, a w nerce przechodzi w trójiodotyroninę. Wbrew panującym poglądom wykazał Lardy, że oba te ciała wywierają ilościowo ten sam efekt na metabolizm, tylko trójiodopochodna działa w czasie pięciokrotnie krótszym. Stąd w krótkotrwałych doświadczeniach powstaje mylne wrażenie, że działa ona pięć razy mocniej.

Nasuwa się wniosek, że formą aktywną jest wyłączenie trójiodotyronina a tyroksyna, czyli czwórijodotyronina, objawia działanie tylko w miarę przechodzenia w trójiodopochodną. Obecnie Lardy pracuje nad syntezą pochodnej tyroksyny, mającej drugą grupę wodorotlenową w pozycji orto do pierwszej. Syntezą tą zajmuje się R. D o s k o t s h. J. A d l e r w pracowni L a r d y e'g o badał przemiany kwasu itakonowego (metylenobursztynowy lub metylofumarowy) w mitochondriach z wątroby świnki morskiej i szczura. W przemianie tej bierze udział nukleotyd gwanozynotrójfosforowy, jony magnezu i koferment A. Produktami przemiany są: acetylo-CoA i kwas pyrogronowy.

M c M u r r a y działa falami ultradźwiękowymi o mocy 10 kc na mitochondria zawieszane w wodzie (nie w moderatorach) przez 15 do 30 sekund. Otrzymuje preparaty wykazujące pełne oddychanie przy zmniejszającej się zdolności fosforylacji, zależnie od czasu działania ultradźwięku. W ten sposób działając różnie długo ultradźwiękiem otrzymuje preparaty dające stopniowo coraz niższy iloraz P:O. Rozbijanie przez czas dłuższy niż 30 sekund uszkadza także oddychanie aż do zupełnego zaniku. Otrzymane preparaty fotografowano w elektronowym mikroskopie. Na obrazie widać obok pojedynczych zachowanych mitochondriów bardzo liczne kuleczki, o regularnym kształcie, linearnie 10-krotnie mniejsze od mitochondriów. Kuleczka taka przedstawia zatem 1/1000 objętości mitochondrium i odpowiada ETP G r e e n a (Electron Transporting Particle).

W pracowni L a r d y e'g o poznałem również D. I. A r n o n a (fotosyn-teza), który bawił tam z krótką wizytą.

Drugi Zakład w Enzyme Institute prowadzi D. E. G r e e n. Dyskutowaliśmy z nim nad mechanizmem oddychania komórkowego w związku z krytycznymi uwagami B. Chance'a. Green wypracowuje obecnie nową koncepcję ETP. Wychodząc z ustalonego faktu wysokiej zawartości lipidów w tych cząsteczkach, wyobraża je sobie jako submikroskopijną kropelkę lipidową otoczoną warstwą białka. Poszczególne przenośniki elektronów jak flawiny i różne pochodne hemowe znajdowałyby się na powierzchni tej kulki, pomiędzy nimi pośredniczyłyby jakiś układ chinonowy rozpuszczalny w tłuszczu, oscylujący między poszczególnymi akceptorami i przenoszący atomy wodoru poprzez kropelkę tłuszczu. Green twierdzi, że wyosobnił taki chinon, ale go dotąd nie zidentyfikował.

McArdle Laboratory zawiera 5 oddziałów, których kierownikami są: Van R. Potter, James Miller, Gerald Mueller, Charles Heidelberger i G. Alvin Lepage.

Van Potter bada enzymy hepatoma w porównaniu z prawidłową komórką. Jako charakterystyczny rys dla nowotworu stwierdził brak enzymu

przenoszącego wodór między DPN i TPN. Interesuje się bardzo zagadnieniem ewolucji biochemicznej, przypisując kluczową rolę nukleoproteidom. Znany jest u nas ze swej metody homogenizacji komórek, wypracowanej wspólnie z byłym uczniem Schneiderem, który podobnie jak i Pardee oraz Siekiewitz są już na własnych placówkach naukowych w innych Stanach.

Również nad rakiem wątroby pracuje James Miller z żoną Elizabethą, która jest profesorem-asystentem (W USA są trzy stopnie profesorskie: assistant professor — ma wydzieloną część zajęć profesorskich, associate professor — zwykle prowadzi samodzielnie część zakładu zarówno w zakresie dydaktyki jak i naukowo, oraz professor). Pracują oni nad rakowaceniem komórek wątroby pod wpływem barwików. Ich hipotezą roboczą jest założenie, że nie sam barwik jest czynnikiem wywołującym, ale jego połączenie z białkiem. Połączenie to działając na sposób antygeny powodowałoby powstanie nowego nieprawidłowego białka, wolnego już od barwika i to byłby dopiero bezpośredni czynnik rakotwórczy.

G. Mueller bada mechanizm działania estrogenów na macicę samicy szczura przy wycięciu jajników. Już 6 godzin po wprowadzeniu estrogeny wzmaga się synteza uracylu i w ogóle kwasu rybonukleinowego. Sam estrogen ulega przy tym rozpadowi i przemianom, dając produkty a) związane z białkiem, b) rozpuszczalne w wodzie, c) rozpuszczalne w rozpuszczalnikach tłuszczowych. Nad pierwszą frakcją pracuje Erich Hecker, sty-pendysta z pracowni Butenandta (NRF).

Charles Heidelberger (syn M. Heidelbergera) pracuje nad chemoterapią raka, badając wpływ inhibitorów *in vitro* na hodowlę tkankową oraz *in vivo* na nowotwory u zwierząt. Niedawno ukazał się w „Nature” jego artykuł w tej sprawie. Główną trudność stanowi występowanie odmian komórek niewrażliwych na dany środek. By zniszczyć to niebezpieczeństwo, chcą badacze przygotować możliwie duży asortyment chemoterapeutyków i stosować je równocześnie.

Dr Lepage studiuje hamowanie syntezy puryn z myślą o zastosowaniu wyników do chemoterapii raka. W jego pracowni R. K. Boutwell bada czynniki przyspieszające lub hamujące proces karcinogenezy, zwłaszcza wpływ kortizonu i zagęszczenia zwierząt w małym pomieszczeniu. Kortizon zmniejsza zużycie glikozy, a przynajmniej dłużej utrzymuje się we krwi piętno wprowadzonej glukozy znakowanej. Nawiązując do badań Berenhaupta, który stwierdził, że synergetyczne działanie różnych słabych karcinogenów z olejem krotonowym daje 100% nowotworów, Boutwell znalazł synergizm tego oleju z fenolem. Może to mieć znaczenie w higienie przemysłowej. Podawanie kortizonu zmniejsza w tych doświadczeniach częstość występowania raka.

Zakład Chemii Fizjologicznej w Medical School Uniwersytetu prowadzi Philip P. Cohen, interesujący się zagadnieniami biochemii porównawczej, a przy tem zamiłowany pedagog. Dyskutowaliśmy nad szeregiem zagadnień biologicznych, zwłaszcza nad reakcjami związanymi z fosfokarbaminianem. Dużo czasu poświęciliśmy sprawie nauczania biochemii dla studentów medycyny. W Stanach Zjednoczonych szkoła podstawowa (Grammar- lub Elementary-school) trwa 8 lat, następnie 4-letnia High School, po skończeniu której można się zapisać do College, gdzie nauka trwa 4 lata. Są College

techniczne lub humanistyczno-przyrodnicze, istnieją też osobno zawodowe College dla nauczycieli. Po skończeniu College otrzymuje się niższy stopień naukowy „bachelor”. Po dalszym roku można tam otrzymać tytuł magistra w zakresie pedagogiki, humanistyki, biologii, fizyki, matematyki, chemii. Można też po College przejść do wyższej szkoły zawodowej jak medycyna, prawo lub nauki rolnicze, które trwają po 4 lata i dają tytuł zawodowy. Dla otrzymania doktoratu potrzebne są dalsze 4 lata „post graduated teachnig”, a to już przeważnie na wysokich stypendiach bądź Uniwersytetów, bądź National Science Foundation. Tak więc na otrzymanie dyplomu lekarza potrzeba co najmniej 20 lat nauki, na tytuł doktora medycyny 24 lata. Biochemii uczą się na wysokim poziomie w College, na medycynie jest już biochemia ściśle medyczna. Studentów na medycynie jest około 100, profesorów wykładających, którzy jednocześnie zajęci są w nauczaniu doktorantów jest w Madison 5. Otrzymałem od prof. Cohena powielane materiały dydaktyczne, jak pytania kollokwalne i egzaminowe dla studentów medycyny, które pozwalają porównać tamtejszy poziom wymagań z naszym.

W Zakładzie Cohena można wyróżnić trzy odrębne pracownie. R. McGilvery prowadzi pracownię przemiany cukrowców, pracuje obecnie nad enzymem fruktozo-1, 6-dwufosfatazą, która aktywuje się papainą. McGilvery jest autorem tablicy metabolicznej, w której w różnych kolorach zestawiono główne szlaki przemian. Tablicę tę spotykałem następnie niemal w każdej pracowni, obok tablicy California Foundation, podającej szczegółowe szlaki przemian nukleinowych. Druga pracownia, pod kierunkiem H. J. Sallacha, zajmuje się ogólnie metabolizmem aminokwasów, aktualnie studiuje reakcję przekształcania glicyny w serynę. Nad metabolizmem białkowym pracuje Harold Deutsh.

Zakład Biochemii w Agriculture College zajmuje ogromny budynek z własną pilotką do hodowania drobnoustrojów na skalę półtechniczną. Jest on najlepiej zaopatrzonym w aparaturę Zakładem w Madison. Bogactwo swoje zawdzięcza dochodom z patentów witaminowych profesora Steenbocka i Elvehjema. Przykładowo wymienię dwa elektro-nowe mikroskopy, ultrawirówkę preparatywną Spinco itp. Prof. C. A. Elvehjem jest zamiłowanym organizatorem pracy naukowej i kształcenia doktorantów. Pokazywał mi listę około 400 doktorów biochemii, którzy stopień swój uzyskali w Madison od 1906 r. Spotkałem tam nazwiska wielu wybitnych uczonych, zajmujących liczne katedry biochemii na całym obszarze Stanów. Innych wymieniał Elvehjem jako wybitne osobistości w przemyśle.

W czasie pobytu w Madison wysłuchałem wykładu gościa z Bethesdy, O. Hayashi, o utlenianiach pochodnych tryptofanu.

W sobotę 27 kwietnia przyleciałem do Bostonu-Cambridge i zamieszkałem w Domu Uniwersyteckim „Kirkland House”. W poniedziałek, wtorek i środę odwiedzałem kolejno biochemiczne pracownie należące do „Biological Laboratories of Harvard University”.

G. Wald pracuje nad biochemią widzenia. Wspólnie z panią Ruth Hubbard przedstawili mi rozwój swych badań nad purpurą wzrokową zwierząt. Witamina A utlenia się na aldehyd retinen redukując DPN (w ten sposób w procesie widzenia bierze udział druga witamina, pochodna niacyny). Retinen łączy się z białkiem opsyną na rodopsynę, która na świetle

odbarwia się uwalniając witaminę A. Wychwytując w obecności opsyny aldehyd hydroksylaminą, można przesunąć równowagę całkowicie w stronę utleniania. Udaje się to z witaminą z rybiej wątroby, ale nie idzie z syntetyczną trans-trans. Badali więc izomery zawierające konfiguracje cis w różnych położeniach, syntetyzowane dla nich w Zakładach Eastman Kodak. Znaleźli w ten sposób, że właściwą odmianą jest 11-cis, czyli neo-b. Mało jej jest w naturalnej witaminie A, która jest mieszaniną różnych form. Wzrasta jej zawartość procentowa w krążącej krwi, w siatkówce stanowi ona właściwy składnik. Przy odbarwieniu rodopsyny powstaje wyłącznie forma trans-trans. Forma cis-trans ma energię wyższą o 2 do 3 tys. kalorii, przemianę w neo-b przeprowadza izomeraza, wykorzystując energię światła. Z witaminy A₂ powstaje porfiropsyna, charakterystyczna dla zwierząt wodnych. Z siatkówki oka kury izolowali jeden z barwików czopkowych — jodopsynę zawierającą retinen neo-b i inne białko — fotopsynę. Pani Hubbard proponuje dla jodopsyny nazwę: konopsyna od cone — czopek, korzystając z podobieństwa nazwy rhodos do rod — pręcik. Autorzy przeprowadzili *in vitro* syntezę fotopsyny z retinenem₂ otrzymując niebieski barwik — cyanopsynę. Istnieją pośrednie dowody, że barwik ten występuje w oczach niektórych zółwi. Z innych retinów izo *a* daje odpowiednio izorodopsynę i izoporfiropsynę, inne formy są nieczynne. Ostatnie badania nad minogiem zakończyły kilkunastoletni spór o naturę barwika wzrokowego u tych zwierząt. Okazało się, że płynąc z morza do Wielkich Jezior posiadają porfiropsynę, w drodze powrotnej rodopsynę. Zależy to od rodzaju witaminy A w pokarmie.

T. H. Goldsmith bada budowę złożonego oka owadów. Indywidualne ocelli mieszczą się jakby w ciemnym worku z ommatynowych komórek. Komórki wzrokowe po 7 w okółku posiadają każda jedną rhabdomerę, u niektórych gatunków rhabdomery zrastają się w jednolitą wiązkę. W elektronowym mikroskopie rhabdomery wykazują budowę plastra miodu, znajduje się w nich retinen, lecz nie występuje witamina A.

Norman Krinski bada witaminę A w krwi i znajduje ją tylko w postaci estru związanego z lipoproteidem. Młody badacz John Dalling prowadzi ciekawe badania równoległe, oznaczając w różnych stadiach awitaminozy A poziom witaminy we krwi, wątrobie i siatkówce, poziom rodopsyny i opsyny oraz prądy czynnościowe siatkówki i obrazy siatkówki w elektronowym mikroskopie. Okazało się, że w miarę postępu awitaminozy obniża się i to powoli tylko poziom witaminy w wątrobie. Po wyczerpaniu tego zapasu spada nagle poziom jej we krwi, potem w siatkówce, bezpośrednio potem poziom rodopsyny, wreszcie powoli zaczyna zanikać opsyna. Przy spadku zawartości rodopsyny elektretinogram wykazuje zanik aktywności. Przy zaniku opsyny elektronowy mikroskop daje obraz naruszenia struktury siatkówki.

M. Carroll Williams demonstrował swoje metody operacyjne. Operuje na lejku Buchnera wprawionym w stół, od dołu przepuszcza stale strumień CO₂, utrzymując w ten sposób owady w narkozie. Poczwarcom *Cecropia* wycina mózg i powstały otwór zamyka szybką z plastiku. Do wszystkich operacji stosuje duże dawki antybiotyków. Takie poczwarki mogą do dwu lat żyć bez rozwoju i stanowią doskonały obiekt testowy do doświadczeń hormonalnych, ponieważ przez szybką można bezpośrednio

obserwować procesy rozwojowe. Obecnie studiuje głównie hormon juvenilny. Jak wiemy z badań *Wiggleswortha*, hormon ten, produkowany przez *corpora allata*, hamuje przeobrażenie komórek larwalnych w komórki dojrzałego owada. Dotąd badano działanie tego hormonu drogą transplantacji *corpora allata* lub w doświadczeniach parabiotycznych, nie udawało się natomiast dotąd otrzymać samego hormonu w ilościach wystarczających do doświadczeń.

Dopiero *Williams* stwierdził u motyla samca jedwabnika *Platysmia cecropia* nagromadzenie się hormonu juvenilnego w odwłoku. Hormon wyciąga się doskonale rozpuszczalnikami organicznymi, zwłaszcza eterem. Nie wykazuje on specyficzności gatunkowej, bo preparat z *cecropii* okazał się czynny w stosunku do motyla bielinka, chrząszcza *Tenebrio molitor*, pluskwiaka *Rhodnius prolixus* i u karaczana. Po odpędzeniu rozpuszczalnika otrzymuje się czerwono-żółty oleisty płyn. Ciekawą zagadką jest gromadzenie się tego hormonu w odwłokach samców *cecropii*. Jakkolwiek bowiem drobne ilości hormonu można znaleźć w różnych tkankach różnych motyli obojga płci, to nagromadzenie się stwierdzono jedynie u samców tego jednego gatunku i tylko w odwłoku. *Williams* demonstrował mi poczwarkę, która pod wpływem zastrzyku hormonu juvenilnego przeszła przeobrażenie w nową, mniejszą poczwarkę. Co prawda zmiana cuticuli nie występuje tu samorzutnie, trzeba starą powłokę zedrzeć mechanicznie, przy czym oczywiście nowa poczwarka ulega silnym uszkodzeniom.

Znaczne postępy poczynił *Williams* na drodze do wyjaśnienia skomplikowanego wpływu temperatury na rozwój poczwarek u *cecropia*. Jest to gatunek wybitnie jednopokoleniowy, na 15 tys. obserwowanych w różnych temperaturach osobników, tylko u jednego udało się stwierdzić rozwój bez diapauzy. Odbija to znacznie od stosunków u naszego wilczomlecza, u którego na 8 tys. obserwowanych osobników udało mi się u ponad 3 tys. wywołać rozwój doraźny. *Williams* wykazał już przed laty, że diapauza poczwarki jest następstwem przerwania czynności neurosekretorycznej jej komórek mózgowych. Po upływie kilku miesięcy w temperaturze pokojowej komórki te podejmują znowu działalność i pobudzają czynność *glandula thoracica*, gdzie powstaje właściwy hormon przeobrażenia, zbadana przez *Butenandt* ekdyzyna. Ekdyzyna pobudza budowę tkanek imaginalnych i prowadzi do wylęgu motyla. Czas diapauzy można skrócić przez oziębienie całej poczwarki lub tylko jej mózgu. Obecnie dzięki dalszym badaniom tej pracowni (*van der Kloot* i sam *Williams*) możemy o przebiegu tych zjawisk powiedzieć już znacznie więcej:

W chwili zapoczwarczenia ustają żywe przedtem prądy czynnościowe mózgu i nie dadzą się wywołać nawet drażnieniem elektrycznym, a pierwsze objawy czynności elektrycznej dają się wykazać dopiero na kilka dni przed końcem diapauzy. Równolegle na dwa dni przed zapoczwarczeniem zaczyna się gwałtowny spadek cholinesterazy, która znika zupełnie w chwili zapoczwarczenia, by pojawić się w słabym stopniu pod koniec diapauzy. Osobne doświadczenia wykazały, że idzie tu o zanik enzymu, a nie o jego zahamowanie. W okresie diapauzy gromadzi się w mózgu jakieś ciało o działaniu cholinergicznym (acetylocholina?), którego aktywność dochodzi do maksimum pod koniec diapauzy. Aktywność acetylazy cholinowej, badana w homogenatach z mózgow zarówno ziębionych jak nie ziębionych,

pozostaje cały okres poczwarkowy bez zmian. W miarę pojawiania się z powrotem cholinesterazy zawartość czynnika cholinergicznego spada i w czasie rozwoju motyla utrzymuje się na niskim poziomie, by wzrosnąć pięciokrotnie tuż przed wylęciem. W mózgu poczwarek gatunków rozwijających się bez diapauzy żadna z opisanych zmian nie dała się zaobserwować. Autorzy przypuszczają, że bodźcem do syntezy cholinesterazy jest nagromadzenie jej substratu, ciała cholinergicznego, które narasta szybciej w temperaturze niskiej niż w wysokiej. W ten sposób chłodzenie działa jako bodziec skracający diapauzę, a więc przyspieszający rozwój. Od momentu podjęcia syntezy cholinesterazy przez mózg stosunki się odwracają i zmiany temperatury działają zgodnie z ogólnymi zasadami, tj. wyższa temperatura przyspiesza, niższa opóźnia rozwój.

Ciekawym szczegółem badań było zaobserwowanie przez *Williamsa* nazwanej przez niego „choroby zimowej” poczwarek. Polega ona na porażeniach mięśni odwłoka, które występują pod wpływem zbyt długiego trzymania poczwarek w temperaturze 6° i niżej. Porażenia te zrazu odwracalne po przeniesieniu poczwarki do wyższej temperatury, po dłuższym pobycie w zimnie stają się nieodwracalne i w końcu obejmują i serce, prowadząc do śmierci poczwarki. *Williams* o *Williams* udało się wywołać te same objawy u poczwarek nie chłodzonych przez przetoczenie im hemolimfy z poczwarek chorych. *Williams* przypuszcza, że mamy tu do czynienia z niedomogą detoksykacji końcowych produktów przemiany azotowej. Przemawiałoby za tym wypadanie białego osadu, o wyglądzie kwasu moczowego, z hemolimfy osobników, którym udało się ozdrowieć po chorobie zimowej.

Gerard Wyatt zajmował się ostatnio składnikami krwi motyli i znalazł trehalozę, fosfocholinę, aminoetanolofoforan, α -glicerofosforan oraz wolny glicerol. Obecnie śledzi metabolizm nukleinowy wyprzeżowanych skrzydeł poczwarki, które w płynie odżywczym utrzymują się przez długi czas i przechodzą procesy metamorfozy.

William Harvey opowiadał o swoich wynikach, które zdają się wskazywać, że niewrażliwość na cyjanek w diapauzie może polegać na nadmiarze układu cytochromowego w stosunku do małych potrzeb oddechowych w tym okresie. Interesuje się bardzo zależnością procesów biologicznych od temperatury. Pracuje też nad wpływem zranienia na metabolizm, przy czym doświadczenia wskazują na to, że ze zranionej cuticuli wyzwała się jakiś czynnik, stymulujący oddychanie.

W pracowni *Williamsa* odwiedzili mnie *Tomasz Eisner* i *Barbara Stay*, by podyskutować o badaniach nad chinonami owadów. Badają oni p-chinony wydzielane przez karaluchy. Uzyskują je z ootek i oznaczają metodą spektrografii masowej. Przypuszczają, że pierwotnie wydzielane są związki fenolocukrowe, które się następnie rozkładają i utleniają.

Zakład prof. *Thimanna* przystosowany jest do badań z zakresu fizjologii roślin. Posiada pokoiki z regulowaną automatycznie temperaturą i wilgotnością, oraz sztucznym światłem dziennym działającym w automatycznie regulowanych okresach. Azagwanina, jak wykazał *Thimann*, hamuje syntezę barwików antocjanowych, hamowanie da się usunąć przez odpowiednio duże dawki ryboflawiny.

W instytucie Chemicznym Uniwersytetu odwiedziłem Konrada Blocha. Opowiadał o swoich pracach wspólnie z G. Fraenklem nad sterolami u owadów. Prace te kontynuuje obecnie w Cambridge.

W samym Bostonie mieszczą się wybitne placówki biochemiczne w General Hospital i w Massachuset Technical Institute. Odwiedziłem w M.T.I. dział biologii. Jest to najbogaciej urządzone laboratorium ze wszystkich, jakie zwiedziłem. Kierownikiem działu jest Irvin Sizer, Dr Buchanan oprowadzał mnie po zakładzie zapoznając z pracownikami i przedyskutował doświadczenia nad hamowaniem syntezy puryn.

W General Hospital, który należy do Harvard Medical School, pokazano mi przede wszystkim amfiteatr, w którym dokonano pierwszej w świecie narkozy eterowej (Ether-Dom). Następnie odwiedziłem Dział Biochemii kierowany przez P. C. Zamecnika. Pracują wraz z R. B. Loftfieldem nad syntezą białka. Loftfield pokazał mi swój artykuł na ten temat, który ma się ukazać w „Progress in Biophysics and Biochemistry”. Śledzą metodą izotopową włączanie aktywowanych kwasów aminowych. Zostałem tam jeszcze Fritza Lipmanna, który przyjął już kierownictwo pracowni w Instytucie Rockefellera w Nowym Yorku. Przenosi się tam za kilka miesięcy po przebudowaniu przeznaczonych dla niego pomieszczeń. Rozmawialiśmy wraz z panią Jones o ich pracach nad rolą fosfokarbaminianu. Lipmann jest raczej rozczarowany stosunkowo wąskim zakresem występowania w przyrodzie reakcji posługujących się tym mechanizmem. Opowiadał o pracach nad enzymami aktywującymi różne aminokwasy, przebadał ich dotąd 13. Przy tej sposobności dyskutowaliśmy o pracy Szafrńskiego z Workiem. Obecnie Lipmann interesuje się głównie metabolizmem pochodnych kwasu siarkowego.

W pobliżu Bostonu mieści się College w Tufts, gdzie odwiedziłem K. D. Roedera, autora znanego podręcznika fizjologii owadów. Pracuje on głównie nad modliszkami, których hoduje szereg różnych gatunków. Wspólnie z H. Mittelstaedtem, gościem z Max Planck Institut badają odruchy chwytania pokarmu przez modliszkę, posługując się specjalnie skonstruowaną aparaturą. Roeder zaprodukował mi z taśmy magnetofonowej sprzężonej z oscylografem przebieg doświadczenia nad reakcjami słuchowymi motyla. Rejestracja prądów czynnościowych w nerwie słuchowym, powstających jako reakcje na dźwięki wydawane przez kwarcowy wibrator, pozwoliła określić na jakie częstotliwości fal akustycznych reaguje motyl, a więc jaki jest zakres jego zdolności słyszenia. Między innymi widziałem na ekranie oscylografu reakcję ćmy na sygnały „radarowe” wysyłane przez nietoperza. Okazuje się więc, że ćma „słyszy” te sygnały.

W sobotę 4 maja przelot do Washingtonu, gdzie pozostałem do wtorku 7 maja, załatwiając swe sprawy w Ambasadzie oraz w Dyrekcji National Science Foundation. Dyrektorowie L. Levin i J. T. Wilson (biologia i medycyna) udzielili mi obszernych wyjaśnień o organizacji i zakresie pracy NSF i wzajemnie wypytywali o organizację nauki i rolę PAN-u w Polsce.

We wtorek 7 przyjechałem do Bethesdy stanowiącej jakby przedmieście Washingtonu. Instytuty Zdrowia (National Health Institutes) położone są jeszcze za miejscowością, co daje odległość od śródmieścia Washingtonu dobrych kilkanaście kilometrów. N.H.I. jest to kompleks budynków, z któ-

rych największy 14-piętrowy mieści kliniki i laboratoria, dookoła zaś rozrzucone są 2-piętrowe budynki poszczególnych instytutów. Są to: 1) National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, 2) National Heart Institute, 3) National Institute of Dental Research, 4) National Microbiological Institute, 5) National Cancer Institute, 6) National Institute of Mental Health i 7) National Institute of Neurological Diseases and Blindness. Położony o kilkaset metrów budynek gospodarczy posiada podziemne połączenie z budynkiem klinicznym.

W N.H.I. pracuje około 5000 ludzi, wydają oni własny dwutygodnik, który zajmuje się głównie sprawami bytowymi i życiem towarzyskim, a poza tym przynosi listę prac zgłoszonych do publikacji. Przeciętnie lista ta obejmuje w każdym numerze 30 pozycji. Osobliwym rysem w krajobrazie są olbrzymie parkingi Instytutu wypełnione szczególnie samochodami o żywych kolorach. Różne kategorie pracowników mają osobne parkingi, np. pielęgniarki, lekarze, administracja. W sąsiedztwie N.H.I. po drugiej stronie szosy znajduje się podobnych rozmiarów ośrodek naukowy Marynarki Wojennej z centralnym wieżowcem.

Moim gospodarzem w N.H.I. był entomolog John Buck, kierownik pracowni Fizykochemicznej Instytutu Arthritis. W Pracowni jego panie dr. Keaster i dr. Park badają zależność oddychania poczwarki *Phormia* od ciśnienia tlenu i znajdują spadek oddychania z malejącym ciśnieniem parcjalnemu tlenu już od zawartości 18% tlenu w atmosferze. Dr. St. Friedman znalazł w poprzednich pracach z G. Fraenklem niezbędną karnitynę w odżywianiu larwy *Tenebrio*. Obecnie opracowuje z McCarthy metodę oznaczania tego ciała jako wstęp do badań nad jego metabolizmem. Buck badał ostatnio zjawisko niejednorodnego wydalenia CO₂ przez poczwarki. Wiadomo obecnie, że wydalanie dwutlenku węgla następuje w pewnych odstępach czasu jakby wybuchowo. Dr. Buck opracował teorię tego zjawiska opierającą się na analogicznych zasadach co teoria „fizycznych płuc” owadów.

Rozbieżności między nazwą pracowni i instytutu a tym nad czym się pracuje spotkałem w Bethesda nie tylko u Bucka, jak o tym będę miał sposobność mówić niżej. Sam Buck żartuje na ten temat, że w Instytucie Arthritis badania nad *Arthropodami* są zupełnie na miejscu już ze względu na wspólną etymologię tych nazw.

Na propozycję J. Bucka wygłosiłem referat o pracach Zakładu Biochemii Ewolucyjnej Instytutu Biochemii PAN. Ograniczyłem się głównie do badań nad pirofosforanami, tyrozinazą, metabolizmem tyrozyny i nad cyklem pentozowym. Tamtejszym zwyczajem przerywano mi pytaniami, na które bezpośrednio odpowiada się. Było około 50 osób i dyskusja była dość żywa, między innymi brał w niej udział Horecker.

Dr. Horecker, którego pracownię zwiedziłem po wykładzie, przedstawił mi wyniki właśnie zakończonej pracy nad metabolizmem pentozy u *L. plantarum*. Przemiana prowadzi do octanu i kwasu mlekowego, dając brutto 3, a netto 2 cząsteczki ATP na jedną pentozę. Powstający acetylofosforan nie może reagować z kofermentem A, natomiast fosforyluje ADP na ATP. W dyskusji nad biologicznym znaczeniem cyklu pentozowego wysunął Horecker przypuszczenie, że idzie tu o produkcję TPNH, który nie zawsze i nie wszędzie da się zastąpić przez DPNH. Opiera się

przy tym głównie na interpretacji prac Sutherlanda i współpracowników nad działaniem ACTH a fosforylazą w nadnerczu. Metabolizm steroli, a więc i hormonów kory nadnercza wymaga właśnie TPNH. ACTH aktywując fosforylazę wzmacnia powstawanie fosfo-6-glikozy, a tym samym natężenie cyklu pentozowego w nadnerczu. W dyskusji nad pracą Mochackiej i Szafrąńskiego o transketolazie mózgowej, Horecker stwierdził, że również w wątrobie znalazł transketolazę silnie związaną z dwufosfotiaminą, pominął to jednak w publikacji ponieważ nie przypisywał temu wówczas większego znaczenia. Transketolaza wątroby również nie oddaje fosfotiaminy przy dializie. W pracowni Horeckera pracuje Heppel znany ze swych badań nad przemianą nukleinową.

Następnie odwiedziłem Hermana Kalckara, który pracuje nad jedną z form zaburzenia metabolizmu cukrowego u dzieci. Zaburzenie to polega na niewydolności enzymu wymieniającego glikozę na galaktozę w nukleotydzie uracylodwufosfoglikozowym. Normalnie pod wpływem enzymu fosfogalaktotransferazy nukleotyd ten reaguje z 1-fosfogalaktózą uwalniając 1-fosfoglikozę a przechodząc sam w nukleotyd galaktozy. Na tym szczeblu następuje epimeryzacja galaktozy na glikozę. Niedomoga fosfogalaktotransferazy prowadzi do gromadzenia się galaktozy. W badaniach tych u Kalckara bierze udział pani Szulmajster, stypendystka z Paryża z pracowni Ephrussi'ego.

Jako gość naukowy Kalckara bawił właśnie duński uczony prof. H. H. Ussing z Kopenhagi. Bada on wpływ wyciągu ze środkowej części przysadki na przepuszczalność skóry żaby. Przepuszcza przez skórę roztwór soli sodowej rejestrując napięcie prądów czynnościowych, równocześnie obserwuje pod mikroskopem wygląd komórek skóry.

O. Hayashi prowadzi departament toksykologii. Na 15 pracowników naukowych tej pracowni toksykologią zajmuje się dwóch, których głównym zadaniem jest śledzenie piśmiennictwa. Reszta pracuje nad biochemią drobnoustrojów. Bieżące tematy to synteza gramicydyny japońskiej, cyklicznego polipeptydu złożonego z 8 aminokwasów, oraz powstawanie i metabolizm kwasu szczawiowego u drobnoustrojów. Kwas szczawiowy powstaje obok acetylokonezemu A z kwasu szczawiowoocetowego działaniem enzymu wymagającego Mn^{++} . Acetylo-Co-A ulega dekarboksylacji na formylo-Co-A, który następnie rozpada się na kwas mrówkowy i wolny koenzym. Hayashi ma poruczone zorganizowanie kolokwium o oksydazach na IV Kongresie Biochemików we Wiedniu.

J. P. Greenstein zajmuje się metabolizmem kwasów aminowych u szczurów *in vivo*. Szczury karmione są wyłącznie płynem, zawierającym wszystkie niezbędne do utrzymania ich wzrostu składniki. W tych warunkach szczury nie wydają żadnych stałych odchodów, co pozwala trzymać ogromną ich ilość w stosunkowo małej przestrzeni. Dr Greenstein interesuje się głównie rolą poszczególnych aminokwasów w stosunku do amoniaku. Są to badania niezmiernie kosztowne ze względu na to, że całe zapotrzebowanie azotowe szczurów jest pokrywane przez czyste kwasy aminowe.

Tego samego dnia odwiedziłem w pracowni Wyckoffa Louisa Labaw a którego prace referowałem w ubiegłym roku na sesji problemowej o metabolizmie wirusów. Labaw zniechęcił się do badań nad fagami ze względu na małą powtarzalność wyników. Zaczęliśmy dyskusję o fenome-

nie maleinowym K o z i ń s k i e g o (otrzymywanie *S. typhi* bez osłonek i ich liza po przeniesieniu do normalnej pożywki). L a b a w miał podobne obserwacje u *E. coli* pod wpływem nadmiaru jonu wapniowego. Próbowałem wyjaśnić te i podobne zjawiska jako zahamowanie rozwoju wirusów w związku z obniżeniem metabolizmu komórki, co by dało przedłużenie istnienia formy lizogennej bakterii. Dyskusja przeszła na zagadnienia ogólnobiologiczne jak zapłodnienie i nowotwory. L a b a w jest z wykształcenia fizykiem, obecnie pracuje nad ulepszeniem metod mikroskopii elektro-nowej.

Następnego dnia odwiedziłem pracownię E. R. S t a d t m a n n a. Pani S t a d t m a n n pracuje nad reakcją S t i c k l a n d a, tj. utlenieniem aminokwasu sprzężonym bezpośrednio z redukcją innej cząsteczki. S t a d t m a n n interesuje się także metabolizmem owadów, zaczął od gąsienic żerujących na sośnie. Ze względu na bogactwo terpenów w tym materiale oczekiwał obecności odpowiednich enzymów. Zachęcony pierwszymi wynikami wysłał swą współpracownicę panią H o r n i n g specjalnie do Meksyku po larwy błonkówek żerujących na agawach i obecnie prowadzi nad nimi badania.

Pani Z. P. S m y r n i o t i s (z pochodzenia Greczynka) przeszła do pracowni S t a d t m a n n a od H o r e c k e r a, z którym pracowała nad cyklem pentozowym glikozy. Obecnie wyosobniła z gleby drobnoustroje rozkładające ryboflawinę i studiuje te przemiany. Podobnie dr S c h u l m a j s t e r, stypendysta z Zakładu Fizykochemii Biologicznej w Paryżu, wyosobnił bakterie rozkładające kreatynę i zaczynał właśnie badania ich metabolizmu.

Jako ostatnią w Bethesda odwiedziłem pracownię dr H. M i t o m a (oddział chemii farmakologicznej w Heart Institute), który pracuje nad przemianą cyklicznych aminokwasów u drobnoustrojów oraz nad stosowaniem aminokwasów do odżywiania parenteralnego. Specjalnie zajmuje go obecnie oksyprolina, która wydalą się w dużych ilościach w moczu. Dyskutowaliśmy nad naszymi zagadnieniami związanymi z przemianą tyrozyny u owadów. Chciał mnie skontaktować z swoim przyjacielem B. N. L a D u, który pracuje również nad przemianą tyrozyny i ma podobne trudności jak my. Niestety okazało się, że właśnie zachorował.

Sobotę 11.V poświęciłem na wycieczkę do Grand Rapids of Potomac. W niedzielę 12 zwiedziłem Galerię Narodową. W poniedziałek 13 maja wyjechałem koleją do Filadelfii.

W Filadelfii mieści się kilka szkół wyższych. Odwiedziłem Jefferson University i Pennsylvania University. W Jefferson University Medical College pracuje L e v e n b o o k w Zakładzie Biochemii, którego kierownikiem jest C a n t a r o w. Następnie byłem w Zakładzie Biochemii w Pennsylvania University Medical School u prof. G u r i n a. Jest on zamiłowanym pedagogiem, toteż kilka godzin przedyskutowaliśmy o metodach i kłopotach dydaktycznych w USA i u nas. Na uwagę zasługuje wprowadzenie przez niego kilku zadań izotopowych do programu ćwiczeń biochemicznych dla studentów medycyny. W Zakładzie G u r i n a pracuje prof. D. L. D r a b k i n, z którym dyskutowałem o jego publikacji nad wpływem tyroksyny na enzymy oddechowe. Zakwestionowałem interpretację ilościową przemiany podstawowej podaną w tej pracy. D r a b k i n oświadczył, że

przytoczył tylko dane zebrane z piśmiennictwa, nie zastanawiając się głębiej nad nimi i nie zamierza upierać się co do ich słuszności. B. S h e p a r t z pracuje od lat nad oksydacyjną przemianą tyrozyny. Przedyskutowaliśmy szczegółowo nasze prace w tym kierunku. Podkreślił wielkie trudności w rozwiązywaniu tego zagadnienia.

Z *Levenbookiem*, u którego zamieszkałem, dyskutowaliśmy do późna w noc i całe następne przedpołudnie. Pracował on ostatnio nad kwasami nukleinowymi w jajach *Drosophili*. Znajduje prawie wyłącznie (99%) RNA, z dużą przewagą uracylu i adenyliny. Stosunkowo dużo nukleozydów zwłaszcza dezoksy występuje w stanie wolnym. Obecnie bada występowanie i rolę glutaminy, która łącznie z kwasem glutaminowym stanowi 1% ciała tłuszczowego. W obecności chlorku amonowego wolny kwas przechodzi w glutaminę. Przemianę tę katalizuje enzym o charakterze globuliny. Nawiązując do prac nad sześcioczłonowymi peptydami owadów — larwiną i pupiną — wykazał, że larwina tworzy się również przy karmieniu larw wyłącznie czystymi aminokwasami, jest więc związkem endogenicznym. Larwy i gąsienice mają dużo kwasu bursztynowego i cytrynowego, po zapoczwazaniu ilość ta spada.

Levenbook potwierdził w sposób bardzo przekonujący moje doświadczenia z 1940 r. nad wpływem DPN na oddychanie i melanogenezę miążgi owadów. Biorąc mitochondria z tkanek larwy *Gastrophilus* a hemolimfę z *Calliphora* otrzymywał przez dodanie DPN, kwasu mlekowego i jego dehydrogenazy bardzo znaczne przedłużenie oddychania, zwiększenie ilości pobranego tlenu i opóźnienie czernienia.

Do University of Pennsylvania należy również laboratorium Johnson Research Foundation kierowane przez B. C h a n c e'a. Pracownia ta wywarła na mnie największe wrażenie z wszystkiego, co oglądałem w USA. Wyekwipowanie stanowią tu nie aparaty seryjnej produkcji, lecz urządzenie zestawione przez samego Chance'a. Jest np. przyrząd rejestrujący, w którym pisak przesuwają się od strony lewej do prawej przez obracanie korbą, równocześnie ruch korby przenosi się na monochromator zmieniając w sposób ciągły długość fali światła, zaś wychylenia pisaka w górę i dół rejestrują wielkość absorpcji przy danej długości fali. W ten sposób kilka obrotów korby pozwala wykreślić w sposób ciągły widmo badanego roztworu. Inny zestaw składa się z mikrokuwety, w której zanurza się wibrująca mikroelektroda polarografu, z dwu monochromatorów, przepuszczających na przemian przez kiwetę promienie oznaczonej długości oraz z trzech przyrządów rejestrujących, z których dwa zapisują absorbcję osobno dla każdego monochromatora, i trzeci dla polarografu. W ten sposób można rejestrować równocześnie prężność tlenu w kiwecie i absorbcję przy dwóch długościach fali. Przez odpowiednie nastawienie monochromatorów można badać zmiany absorpcji wywołane przez redukcję lub utlenienie DPN, FAD, lub cytochromu, odczytując równocześnie prężność tlenu w danym momencie. C h a n c e demonstrował mi preparat mitochondriów, który w stanie równowagi zupełnie nie zużywał tlenu, rozpoczynał natomiast oddychać za dodaniem ADP. Można było przy tym śledzić redukcję poszczególnych przenośników elektronów, aż do wyczerpania ADP. Demonstrował mi również ciekawy fenomen, który referował 3 tygodnie przedtem w Chicago na Federation Meeting, wywołując tam bardzo żywą

kontrowersję. Jeśli mianowicie do wspomnianej zawiesiny mitochondriów dodać bursztynianu, następuje natychmiastowa i zupełna redukcja DPN. Jest to nieoczekiwany efekt, bo jak wiadomo utlenianie bursztynianu omija DPN. Prawdopodobnie idzie tu o jakąś reakcję przebiegającą w sprzężeniu z utlenieniem bursztynianu, np. utlenienie kwasu jabłkowego.

Razem ze mną spędził to południe u *Chance'a B. Sacktor*, pracujący w laboratorium wojskowym nad metabolizmem owadów, głównie much. Przywiózł on kilka swoich preparatów do zbadania metodą *Chance'a*. Spośród współpracowników *Chance'a* poznałem prof. *Andersona*, który wrócił niedawno z dłuższego pobytu we Francji.

W środę 15 maja pojechałem pociągiem do Nowego Yorku. Zakwaterowałem się jako gość *S. Ochoa'y* w budynku *Hall of Residence* w *New York Bellevue Medical Center*. Apartament przeznaczony dla 2 studentów kosztuje dziennie 8 dolarów. Zakład *Ochoa'y* przedstawia się kadrowo dość skromnie, natomiast duża ilość gości, samodzielnych pracowników, którzy przyjeżdżają na rok lub dłużej, zmienia go praktycznie w duży instytut, w którym praca badawcza przesłania zupełnie jego charakter dydaktyczny. Pierwszego dnia *Ochoa* przedstawił mi w zarysie głównie kierunki badawcze swego Zakładu. W ciągu następnych dni odwiedzałem kolejno poszczególne pracownie, interesując się szczegółami pracy.

W centrum zainteresowania pracowni *Ochoa'y* stoją badania związane z enzymem syntetyzującym polinukleotydy z dwufosfonukleotydów, zasadą może przy tym być adenina, hipoksantyna uracyl, tymina, w słabszym stopniu reagują nukleotydy gwaninowe. Do syntezy potrzebny jest polinukleotydowy „primer”, którego skład chemiczny wpływa na wybór nukleotydów z mieszaniny reagującej. Stosując różne metody fizyko — chemiczne i enzymatyczne potwierdził *Ochoa* z współpracownikami identyczność szeregu syntetycznych polinukleotydów z produktami otrzymanymi przez frakcjonowanie naturalnych kwasów nukleinowych. Punktem wyjścia badań, które doprowadziły do odkrycia tego enzymu, było poszukiwanie rozpuszczalnego układu enzymatycznego, przenoszącego nieorganiczny fosforan na ADP, czyli, biorąc metodycznie, wymieniającego końcowy fosforan ATP na fosforan znakowany środowiska. Okazało się przy tym, że wymiana taka idzie tym gorzej, im dokładniej oczyszcza się preparat ATP. Skierowało to uwagę na swoistość ADP, a potem dwufosfonukleotydów w ogóle. Pracownia *Ochoa'y* zajmuje się produkcją tego enzymu, który nazwano w analogii do fosforylazy — nukleofosforylaza. W suterynach mieści się pilotka, w której przeprowadza się na skalę półtechniczną hodowlę drobnoustrojów i wyosobnienie enzymu. Enzym jest niestety bardzo nietrwały i wymaga przechowywania w niskiej temperaturze. Rozsyła się go więc w zbiornikach z suchym lodem pocztą lotniczą. *Ochoa* współpracuje obecnie z całym szeregiem placówek biochemicznych w Stanach i jego gabinet przypomina chwilami kwaterę dowództwa w czasie operacji wojennej. W czasie naszej kilkunastogodzinnej rozmowy wielokrotnie przeżywały nam międzymiastowe rozmowy telefoniczne informujące o wyniku doświadczeń. Np. *Heppel* z *Bethesdy* przetelefonował cały komunikat pozwalający na wyrysowanie wykresu. Przeważnie przedmiotem badania jest biosynteza białka mierzona włączaniem znakowanych aminokwasów. Sztuczne polipeptydy stymulują tę syntezę na równi z naturalnym kwasem rybonukleinowym. Najciekawszym przy tym jest to, że dobór zasad w po-

linukleotydach wpływa na wybór aminokwasów spośród ich mieszaniny. Istnieje tu jakiś „code” trudny jeszcze w tej chwili do odcyfrowania.

Drugim z kolei kierunkiem są badania nad utlenianiem kwasu propionowego, które prowadzą goście naukowci W. S. Beck i Alisa Tietz. Odkryli przy tym reakcję, którą nazwali izomeryzacją kwasu izobursztynowego, lecz właściwie jest to reakcja transkarboksylacji. Jeśli bowiem izobursztynylo-CoA inkubować z enzymem i znakowanym propionylem CoA, otrzymuje się znakowany bursztynylo-CoA i nieznakowany propionylo-CoA. Reakcja ta przebiega tylko w obecności fluorku i dwuwęglanu. Autorzy więc przyjmują jako hipotezę roboczą powstawanie H_2PO_3F , który wymienia fluor na grupę karboksylową. Fluorofosforan jak też karboksyfosforan są jako bezwodniki kwasowe związkami wysokoenergetycznymi. Świadczy o tym ich odwracalna równowaga z ATP. Karboksyfosforan stanowi analogię do Lipmannowskiego karbomylofosforanu. Jego funkcja zdaje się polegać na przenoszeniu grupy karboksylowej. Dr Tietz pracuje nad wydzieleniem i oczyszczeniem enzymu zapoczątkującego tę reakcję przez włączenie fluorku. Enzym ten nazywa fluorokinazą.

Do stałych pracowników Zakładu należą prof. R. C. Warner i dr Gilvarg. Warner prowadząc oddział fizykochemiczny pomaga wnikać w budowę otrzymywanych w syntezie polinukleotydów, stosując pomiary dyfuzji metodą interferometryczną, pomiary wiskozymetryczne lepkości, elektroforezę, absorpcję światła itp. Tymi metodami wykazał m. in., że przy zmieszaniu roztworów syntetycznych polinukleotydów czysto adeninowych i czysto uracylowych powstaje samorzutnie kompleks o masie cząsteczkowej odpowiadającej sumie obu składników. Dr Gilvarg bada powstawanie kwasu diaminopimelinowego. Jest to ciało występujące u wszystkich przebadanych bakterii z wyjątkiem gramododatnich koków i u niebieskozielonych glonów. M. Carsotis bada odcinek cyklu Krebsa między kwasem cytrynowym a α -ketoglutazarowym. Oczyszczył dehydrogenazę izocytrynową, aktywowaną najlepiej przez mangan. Stosując metody izotopowe nie zdołał wprowadzić piętna izotopowego do danego kwasu szczeniowo-bursztynowego. Nasuwa to wątpliwości, czy kwas ten występuje w ogóle jako wolny produkt pośredni, czy też obecny jest tylko w śladowych katalitycznych ilościach.

Do stałych współpracowników Ochoa'y należy jeszcze G. W. E. Plaut, który zajmuje się biogenezą ryboflawiny.

W Bellevue Center odwiedziłem poza tym Zakłady Fizjologii i Mikrobiologii. Zakład Fizjologii prowadzi M. Rockstein, wybitny specjalista fizjologii owadów. Zajmował się zwłaszcza fosfatazami u much i pszczoł oraz cholinesterazą i zmianami zachodzącymi z wiekiem w aktywności enzymów. Katedrę Mikrobiologii prowadzi A. M. Pappenheimer Jr. Wziąłem tam udział w seminarium na temat mechanizmu zakażenia komórki *E. coli* przez fagi serii T: Prof. Pappenheimer opowiadał mi o bardzo ciekawych badaniach, które prowadził z drem Bernheimerem nad toksynami streptokokowymi. Zwłaszcza ciekawie się przedstawia rozpuszczalna pozakomórkowa DPN-aza toksyczna dla leukocytów, przy czym wchłaniają ją jedynie leukocyty zwierząt zakażonych. Praktyczne znaczenie dla badań nad *Corynebacterium diphth.* może mieć lizogenny fag dyfterytyczny, nad którym pracuje Barksdale.

Pappenheimer interesuje się bardzo owadami jako materiałem do badań. Wspólnie z C. M. Williamsem i z B. Chancem badał rolę metaboliczną cytochromu b_5 u owadów oraz swoistość immunologiczną białka hemolimfy.

Ochoa zaproponował, bym opowiedział o naszych badaniach z dziedziny biochemii porównawczej w ramach zebrań seminaryjnych jego Zakładu. Udział wzięli również goście z Instytutu Rockefellera i Columbia University. Specjalnie miłe było spotkanie z prof. Nowińskim (Texas), który przyjechał właśnie na kilka tygodni do New Yorku. W dyskusji zabierali głos głównie Ochoa i Dische.

W Instytucie Rockefellera odwiedziłem M. Kunitza. Kunitz zademonstrował mi krystalizację pod mikroskopem swojej pirofosfatazy i dał mi większą jej próbkę. Oprowadził mnie następnie po Instytucie, gdzie miałem sposobność obejrzenia oryginalnych zestawów Craiga oraz Steina i Moora w obecności ich twórców.

W najbliższym sąsiedztwie Instytutu Rockefellera mieści się gmach Instytutu Sloan-Kettering. Jest to szpital onkologiczny z doskonałymi laboratoriami badawczymi. Odwiedziłem tam J. Foxa, który pracuje nad inhibitorami syntezy puryn. Instytut ma się przeprowadzić do dużo większego pomieszczenia, tymczasem jest tam bardzo ciasno i w laboratoriach aparaty tarasują przejścia. Dużym zgrupowaniem biochemików może się pochwalić College of Physicians and Surgeons Uniwersytetu Columbia. Jest tam 13 profesorów biochemii, przeważnie na etatach klinik, między innymi E. Chargaff, Z. Dische, D. Nachmanson, Rittenberg, Shemin, Sprinson i S. Zamenhoff. Zwiedziłem pracownie Chargaffa, Dischego i Zamenhoffa. Nachmanson był w tym czasie za granicą. Rittenberga, Shemina i Sprinsona poznałem później na posiedzeniu „Enzyme Club”, na zwiedzenie ich pracowni nie starczyło mi już czasu.

Chargaff interesuje się bardzo rozwojem biochemii w Polsce, który śledzi na podstawie „Biuletynu II Wydziału PAN” i „Acta Biochimica Polonica” oraz „Postępów Biochemii”. Dische specjalizuje się w odczynach cukrowych, poza tym bada biochemię soczewki oka. Zamenhoff pracuje nad biochemią transformacji u drobnoustrojów, jest jednym z czołowych przedstawicieli tego kierunku w Stanach.

„Enzyme Club” grupuje badaczy interesujących się chemią enzymów, z różnych środowisk Nowego Yorku. Posiedzenia zaczynają się wspólnym obiadem, po czym odbywa się wykład z dyskusją. Podczas mego pobytu odbył się wykład Pani Stadmanna z Bethesdy o jej badaniach nad reakcją Sticklelanda. Na posiedzeniu tym poznałem oprócz wymienionych już badaczy z Columbia University panią Sarę Rattner i E. Rackera.

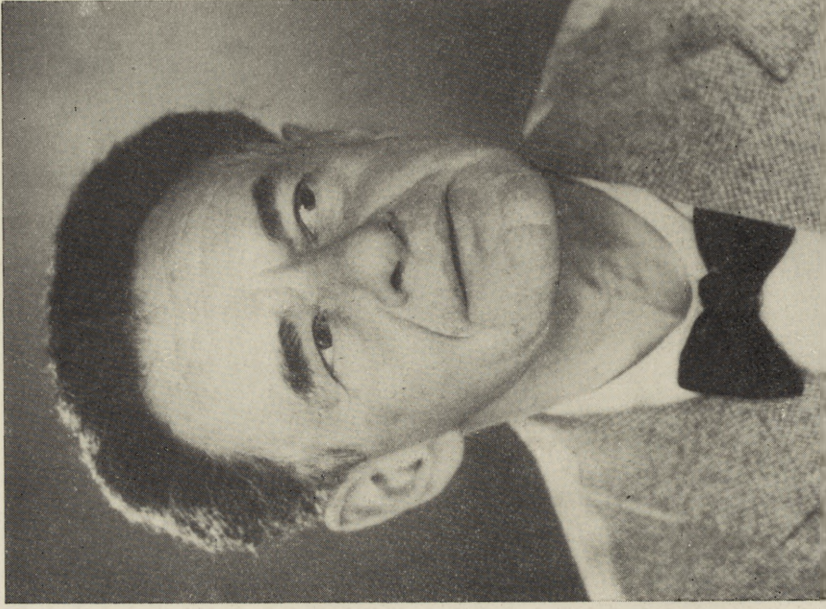
Prof. M. Heidelberger pracuje obecnie w Instytucie Mikrobiologii Rutgers University w Nowym Brunświku w Stanie New Jersey (niepełna godzina drogi pociągiem pośpiesznym z Nowego Yorku). Instytut położony jest samotnie, kilka kilometrów za miastem. Heidelberger opowiada z zapałem, jak przed rokiem spędził kilka miesięcy w Anglii ucząc się nowej dla siebie techniki chromatografii, a potem rozpoczął nowe, oryginalne badania nad strukturą wielocukrów bakteryjnych. Punktem wyj-

ścią była znana obserwacja, że niektóre surowice przeciwpneumokokowe dają strąć z dekstranem. Heidelberger stwierdził, że te same surowice (anty II, IX, XII, XX i XXII) strącają również glikogen. Założył więc, że swoistość ta obejmuje poliglikozany posiadające wiązania 1—4 i 1—6 równocześnie. W podobny sposób charakteryzował swoistość innych surowic na podstawie ich odczynów precypitacyjnych z wielocukrami o znanej budowie. Odwracając zagadnienie próbuje obecnie charakteryzować różne naturalne wielocukry roślinne, przez dobieranie reagujących z nimi surowic o znanej specyficzności. Najbliższym współpracownikiem H e i d e l b e r g e r a jest W a c ł a w S z y b a l s k i, wychowanek Politechniki Gdańskiej, który interesuje się głównie genetyką drobnoustrojów.

Pięcioletniowy okres ważności wizy nie pozwolił przedłużyć pobytu w Nowym Yorku, gdzie biochemika interesować musi jeszcze wiele innych placówek, np. w Cornell University, gdzie pracuje Du Vigneaud. W piątek 24 maja pożegnałem gościnną pracownicę prof. O c h o a'y i odleciałem do Europy.



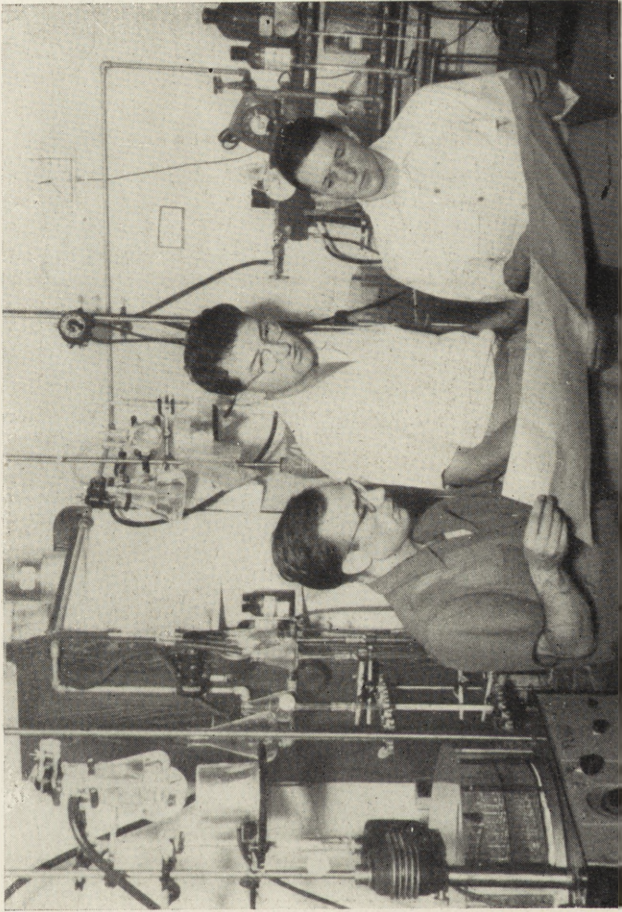
Fot. 1. Severo Ochoa
(Dept. of Biochemistry, New York University, College of Medicine)



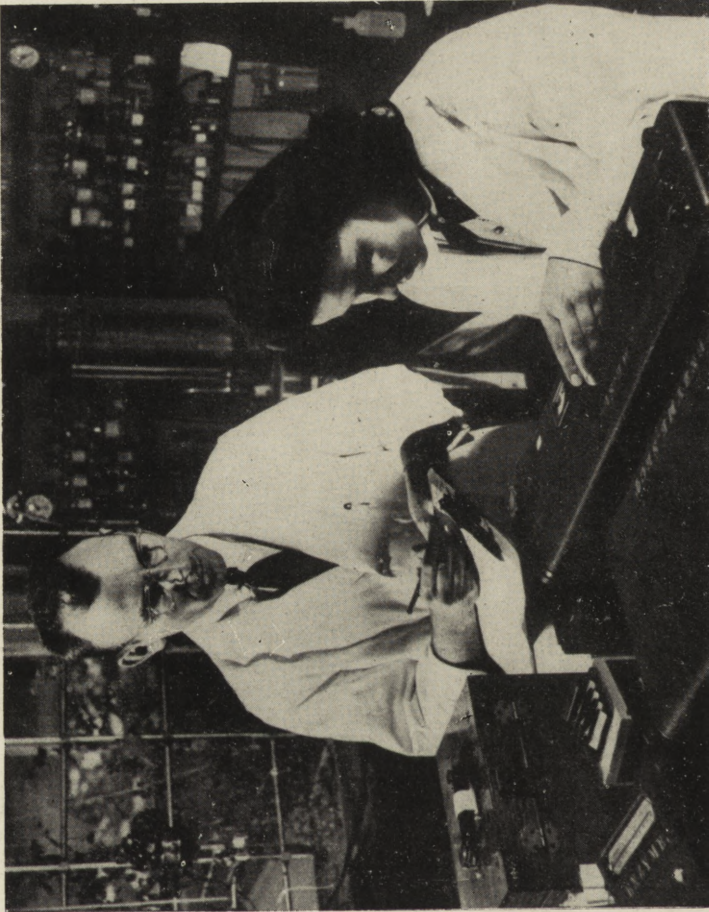
Fot. 2. Fritz Lipmann
(obecnie w Rockefeller Institute w New-Yorku)



Fot. 3. Herman M. Kalckar
(The National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases,
Bethesda)



Fot. 4. H. Schmitz, R. Van Potter i R. B. Hurlbert
(Mc Ardle Laboratory, Madison)



Fot. S. B. L. Horecker i P. Z. Smyrniotis
(The National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases Bethesda)

JERZY KRAWCZYŃSKI

Międzynarodowy Kongres Chemii Klinicznej

Sztokholm 19 — 23 sierpnia 1957 r.

W dniach 19—23 sierpnia 1957 obradował w Sztokholmie Międzynarodowy Kongres Chemii Klinicznej zorganizowany przez Szwedzkie Towarzystwo Chemii Klinicznej pod protektoratem Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (International Federation of Clinical Chemistry), Komisji Chemii Klinicznej wchodzącej w skład Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (Commision of Clinical Chemistry of the International Union of Pure and Applied Chemistry), oraz Skandynawskiego Towarzystwa Chemii Klinicznej i Klinicznej Fizjologii (Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology).

W Kongresie wzięło udział 400 delegatów reprezentujących 31 krajów. Najliczniejszą była delegacja gospodarzy licząca 89 członków. Liczne były też delegacje państw skandynawskich (Dania — 34 osoby, Finlandia — 28 osób, Norwegia — 18 osób), oraz delegacje: Wielkiej Brytanii — 44 osoby, Niemiec — 36 osób, Stanów Zjednoczonych — 25 osób, Holandii — 21 osób i Związku Radzieckiego — 19 osób). W skład delegacji polskiej wchodziły 3 osoby (Prof. dr Z. Stolzman, prof. dr L. Działoszyński i doc. dr J. Krawczyński).

Obrady odbywały się na terenie Karolinska Institutet. Kongres otwarty został przez szwedzkiego ministra Oświaty p. Ingvara Lindella. Honorowym Przewodniczącym Kongresu został wybrany prof. D. Van Slyke.

Referaty podstawowe poświęcone zagadnieniom stanowiącym zasadniczą tematykę Konkresu wygłaszano na posiedzeniach przedpołudniowych. Po południu obrady odbywały się równolegle w 3 a nawet 4 sekcjach. Na posiedzeniach sekcji przedstawiano krótkie doniesienia zgłoszone przez delegatów mniej lub więcej związane z zasadniczą tematyką Kongresu.

Tematyka Kongresu obejmowała następujące zagadnienia:

- A. Wpływ hormonów na przemianę elektrolitów,
- B. Metody chromatograficzne i ich zastosowanie w klinice,
- C. Chemia kliniczna wielocukrowców,
- D. System DPN⁺ i jego zastosowanie w chemii klinicznej.

Ad A: Referaty wprowadzające wygłosili: J. F. Tait (W. Bryt.) w imieniu własnym i współpracowników referat pt. „Correlation of adrenal steroid concentrations and changes in electrolyte metabolism”, F. Bartter (USA) referat pt. „On the hormonal regulation of body fluid volume and

composition" oraz F. Prunty i McSwiney (W. Bryt.) referat pt. „Some clinical considerations of body electrolytes in relation to hormone action”.

W referatach tych omówiono m. in. następujące problemy: Wynikiem działania hormonów nadnerczy na przemianę elektrolitów u zwierzęcia pozbawionego nadnerczy jest zatrzymanie sodu, zwiększone wydalanie potasu z ustroju i doprowadzenie do normalnych wartości ciśnienia krwi i filtracji kłębuszkowej. Ze znanych dotychczas mineralokortykosteroidów największe znaczenie mają aldosteron i kortyzol. Efektywność tych hormonów przy usuwaniu objawów niewydolności nadnerczy nie jest jednak jednako- wa w odniesieniu do każdego objawu. Działanie hormonów zależy też od warunków, w jakich znajduje się organizm. Przy przewlekłym podawaniu ACTH dominującą rolę w przemianie mineralnej odgrywa kortyzol, po usunięciu przysadki mózgowej — aldosteron, a w syndromie adreno — genitalnym przebiegającym z objawami nadciśnienia — 17 — hydroksy — dezoksykortikosteron i dezoksykortikosteron.

Metabolitami kortizolu wydalonymi z moczem są: tetrahydrokortyzol i allotetrahydrokortyzol. Po dożylnym podaniu znakowego kortizolu ustalono, że jego okres półtrwania w puli wymiennej ustroju wynosi 1,4 godziny. Metabolizm aldosteronu studiowano przy pomocy aldesteronu znakowanego tryterem. Okres półtrwania aldosteronu jest krótszy niż kortizolu i wynosi tylko 0,4 godz. Po 24 godz. wydala się z moczem 49% podanej radioaktywności, z czego 33% w formie glukoronidów.

Kliniczne metody oznaczania aldosteronu ograniczają się do oznaczania jego zawartości w moczu po ekstrakcji przy pH — 1. Oznaczanie we krwi napotyka na wielkie trudności. Przed oznaczeniem poleca się przeprowadzić oczyszczenie ekstraktu na drodze chromatograficznej.

Poddany został krytyce szeroko rozpowszechniony pogląd L u e t s c h e r a, wg którego istnieje ścisła zależność między wydalaniem sodu i wydalaniem aldosteronu (wzrostowi wydalania aldosteronu towarzyszy spadek wydalania sodu i odwrotnie). Stwierdzono bowiem, że przy obciążeniu ustroju sodem (20 gm dzienne) następuje spadek wydalania aldesteronu i wzrost wagi ciała. Wzrost wydalania sodu zachodzi jeszcze 24 godziny wcześniej, co dowodzi, że proces ten nie jest regulowany tylko przez aldosteron. Wydalanie aldosteronu przez normalnego osobnika nie ulega w ciągu doby wahaniom. Wyraźnym wahaniem dobowym podlega natomiast wydalanie elektrolitów i kortizolu, co świadczy, że aldosteron nie odgrywa ważniejszej roli w regulacji tych procesów. W nerczyicy przebiegającej ze znaczną utratą elektrolitów zaobserwowano 10 × większe wydalanie aldosteronu niż normalnie, a więc znów brak zależności sugerowanej przez L u e t s c h e r a. Wydaje się natomiast, że zachodzi ścisła zależność między ilością wydalanego z moczem aldosteronu a objętością płynu pozakomórkowego (PPK) w ustroju (odwrotna proporcjonalność). Taka sama zależność wydaje się istnieć między wielkością filtracji kłębuszkowej a ilością wydalanego aldosteronu.

Zwrócono też uwagę na znaczenie hormonów tarczycy w przemianie elektrolitów. Istnieją dowody na to, że hormon tarczycy może osłabić działanie ACTH na korę nadnerczy. Hormony płciowe: testosteron i estrogen mogą spowodować zatrzymanie sodu i wody w ustroju. Wpływ estrogenów na wydalanie sodu może być bardzo znaczny w okresie przedmiesiączko-

wym i musi być brany pod uwagę przy badaniach nad metabolizmem elektrolitów. Progesteron wpływa na gospodarkę elektrolitową ustroju w ten sposób, że powoduje zwiększone wydalanie sodu z moczem i utratę wody przez ustrój.

Istniejące zależności między czynnością gruczołów wewnętrznego wydzielania a gospodarką elektrolitową ustroju mają coraz większe znaczenie w diagnostyce laboratoryjnej.

Ad B. Wprowadzający referat pt. „Recent advances in chromatography” wygłosił prof. L e d e r e r z Paryża. W referacie autor daje ogólny obraz ewolucji, jakiej ulegają metody chromatograficzne, i przedstawia możliwości zastosowania chromatografii do celów chemii klinicznej. Bardziej szczegółowo omawia następujące metody:

1. Chromatografię adsorpcyjną z zastosowaniem standaryzowanych adsorbensów oraz tzw. adsorbensów swoistych otrzymany przez pokrycie obojętnego nośnika substratem enzymu lub przeciwciałem adsorbującym swoście dany enzym lub antygen. Wymywanie poleca przeprowadzić przy zastosowaniu roztworów rozpuszczalnika o stale wzrastającej sile wymywającej (gradient elution).

2. Chromatografię z użyciem wymienników jonowych. Technika ta pozwala już na chromatograficzne rozdzielanie białek o c.c.z. od 10 do 100 tys. Syntetyczne pochodne celulozy nadają się szczególnie dobrze do rozdzielania enzymów a coraz szerzej wprowadzane są do badań wymienniki swoiste dla pewnych grup związków.

3. Chromatografię bibułową ze szczególnym uwzględnieniem metod ilościowych oraz metod z zastosowaniem radioaktywnych indykatorów.

Autor zwraca też uwagę, że w ostatnim czasie przy pomocy chromatografii odkryto szereg nowych składników występujących w płynach ustrojowych, jak np. lathosterol, rakotwórczy produkt utleniania cholesterolu, nowy kwas uronowy w kwasie chondroitynosiarkowym itd. Przy użyciu chromatografii przebadano metabolizm rakotwórczego węglowodoru — benzantracenu. Przeprowadzono też szczegółową analizę chromatograficzną moczu ludzkiego wykrywając przy tym wiele nowych składników.

Identyfikacja substancji jedynie przez określenie wartości R_f jest uważana dzisiaj za niewystarczającą i musi być uzupełniona przez określenie niektórych własności fizycznych badanej substancji (np. punktu topnienia).

Uzupełnieniem powyższego referatu był referat L. H u i s i n t V e l d (Holandia) pt.: „The use of chromatographic methods for clinical steroid analysis”.

Chromatografia adsorpcyjna lub rozdzielcza jest stosowana przy klinicznej analizie steroidów w następujących celach:

1. Usunięcie substancji przeszkadzających przy przeprowadzaniu oznaczeń kolorymetrycznych lub spektrofotometrycznych,

2. Zwiększenie czułości metod analitycznych przez rozdzielenie od siebie poszczególnych steroidów cechujących się np. niejednakowym powinowactwem do odczynnika, z którym dają reakcję barwną,

3. Zwiększenie wartości diagnostycznej przeprowadzanych w laboratoriach klinicznych oznaczeń steroidów w moczu przez możliwość określenia ich pochodzenia (gonady czy nadnercza).

Metody chromatograficzne w analizie klinicznej steroidów mają w pewnym sensie ograniczony zakres działania, szczególnie gdy chodzi o ich znaczenie jako metod ilościowych lub półilościowych.

Doktór C. Dent z Londynu w referacie pt. „Clinical applications of aminoacid chromatography” omawia znaczenie chromatografii bibułowej przy badaniu składu aminokwasowego płynów ustrojowych. Skład aminokwasowy osocza jest na ogół stały. Wahania w warunkach fizjologicznych (np. po spożyciu białek) są niewielkie. Wszystkie większe zmiany (ilościowe i jakościowe) wskazują więc na istnienie poważnych zaburzeń w ustroju (przeważnie uszkodzenie wątroby i nerek). Zmiany w moczu odbijają się na aminokwasowym składzie moczu. W ludzkim moczu stwierdzono ostatecznie obecność 27 zidentyfikowanych aminokwasów, 10 aminokwasów niezidentyfikowanych i 26 peptydów. Skład aminokwasowy moczu osobnika żyjącego w standardowych warunkach jest na ogół stały. Różnice pod tym względem między poszczególnymi osobnikami mogą być jednak dość duże. Skład aminokwasowy moczu może być uwarunkowany też czynnikami dziedzicznymi (u 50% ludzi głównymi aminokwasami moczu są glicyna i kwas beta-aminoizomasłowy w odróżnieniu od normalnie występujących jako główne aminokwasy: glicyny, tauryny i histydyny) oraz stanem czynnościowym nerek. W stanach patologicznych poza schorzeniami wątroby zmiany składu aminokwasowego moczu są niemal wyłącznie pochodzenia nerkowego. (Uszkodzenie nerek w ołowicy, przy zatruciu lizolem, zaburzenie ich czynności przy hipowitaminozie C i D u dzieci). Nawet w chorobie Wilsona i przy galaktozemii zmiany składu aminokwasowego moczu są wynikiem uszkodzenia nerek przez gromadzące się w ustroju: miedź i galaktozę.

Podając przykłady stanów patologicznych cechujących się nienormalną aminoacidurią autor jeszcze raz podkreśla rolę czynnika dziedzicznego jako głównej przyczyny występowania tych stanów. Przy badaniu ilościowych zmian składu aminokwasowego moczu oraz mechanizmu patologicznej aminoacidurii szczególnie ważną rolę odgrywa chromatografia na wymiennikach jonowych zastosowana przez Moora i Steina, oraz testy oczyszczania dla pojedynczych aminokwasów (renal clearances): jest to szczególnie ważne przy badaniu zaburzeń u heterozygot, u których patologiczna aminoaciduria stanowi cechę recesywną nieznacznie wpływającą na ilość i skład wydalanych z moczem aminokwasów.

Ad C. Wprowadzające referaty wygłosili: Prof. G. Blix (Szwecja) pt. „Mucopolysaccharides and glycoproteins”, Prof. H. Schultze (NRF) pt. „Klinisch interessante Polysaccharidverbindungen”, oraz Dr P. Kent (W. Bryt.) pt. „Recent development in the biochemistry of mucosubstances”.

Blix rozróżnia następujące rodzaje mukopolisacharydów:

1. Mukopoliuronidy (kwas chondroitynosiarkowy, kwas hialuronowy i heparynę),

2. Polisacharydy, w których podstawowymi elementami strukturalnymi są N: -acetyloglukozamina, N -acetylogalaktozamina, galaktoza i fukoza. Część tych polisacharydów przedstawia się jako spolimeryzowany dość długi łańcuch, od którego odchodzą drobne odgałęzienia tworzone przez

fukoze, heksozaminę lub reszty kilku — cukrowcowe (substancje grupowe krwi, niektóre polisacharydy występujące w komórkach nabłonkowych).

3. Polisacharydy wchodzące w skład śluzów produkowanych przez komórki nabłonkowe, w których elementem strukturalnym jest komponenta węglowodanowa zbudowana z różnoważnych ilości N -acetyloheksozaminy i kwasu sialowego.

W surowicy spotyka się glikoproteidy, których część węglowodanowa zbudowana jest z jednostek strukturalnych składających się z mannozy — galaktozy — heksozaminy i kwasu sialowego — heksozaminy. Sposób powiązania części węglowodanowej z białkami surowicy i jej struktura mogą ulegać znacznym zmianom w czasie choroby, co świadczy o dużym znaczeniu diagnostycznym tych związków.

Schultze dzieli związki, jakie tworzą węglowodany w organizmie ludzkim i zwierzęcym na 3 grupy, z których ostatnia obejmuje związki zawierające w cząsteczce kwas uronowy.

Grupa I obejmuje związki, w skład których wchodzi glukoza, fruktoza, ryboza i dezoksyryboza (produkty przemiany pośredniej glukozy, estry heksozofosforowe, glikogen, kwasy nukleinowe).

Grupa II obejmuje tzw. „glikopolipeptydy” i gliko(muko)proteidy, w skład których wchodzi galaktoza, mannoza, fukoza, N -acetyloglukozamina, N -acetylogalaktozamina i kw. sialowy.

Grupa III obejmuje poliuronidy B l i x a.

Autor zwraca uwagę na kliniczne znaczenie tych związków, zwłaszcza grupy II i III, nie docenianych jeszcze dostatecznie z tego punktu widzenia. Przy identyfikacji tych związków i określeniu ich lokalizacji w tkankach i poszczególnych komórkach wielką rolę powinna wg autora odegrać cytochemia związków wielocukrowcowych.

Praktycznie szczególnie ważne jest badanie związków wielocukrowcowych w surowicy. Dotyczy to zwłaszcza grupy II, ponieważ związki grupy III występują tam tylko w niewielkich ilościach. Dotychczasowe badania nad glikoproteidami występującymi w surowicy, prowadzone przy pomocy elektroforezy bibułowej, są niewystarczające. W obrębie opisywanych najczęściej jako wiążących węglowodany frakcji α i β globulinowej spotyka się bowiem białka zarówno ubogie jak i bogate w węglowodany. Dlatego też autor proponuje następujący podział białek surowicy:

- 1) ubogie w węglowodany białka surowicy z wyłączeniem γ globulin,
- 2) bogate w węglowodany białka surowicy z wyłączeniem γ globulin,
- 3) ubogie w węglowodany γ globuliny,
- 4) bogate w węglowodany γ globuliny,
- 5) bogate w węglowodany i ubogie w węglowodany immunoglobuliny.

Badanie glikoproteidów w surowicy ma szczególne znaczenie diagnostyczne przy zapaleniu stawów, w zawale mięśnia sercowego, w schorzeniach wątroby, w obrzęku śluzakowatym, w schorzeniach urazowych, nowotworowych itp.

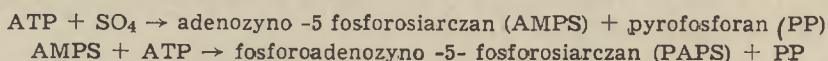
Duże znaczenie diagnostyczne ma też badanie moczu w kierunku wykrycia obecności produktów depolimeryzacji mukopolisacharydów.

Kent opisuje szczegółowo ostatnie osiągnięcia w ustaleniu struktury kwasu chondroitynosiarkowego, a m. inn. wyizolowanie dwucukrowca

chondrozyiny będącej β -glukuronozylu 1-, 3-glukozamina, co pozwoliło ustalić, w jaki sposób wiąże się w cząsteczce kwasu chondroitynosiarkowego kwas uronowy. Na podstawie własności fizycznych oraz działania hialuronidazy bakteryjnej, jak też hialuronidazy wypreparowanej z jądra wołu można wyróżnić trzy typy kwasu chondroitynosiarkowego A, B i C.

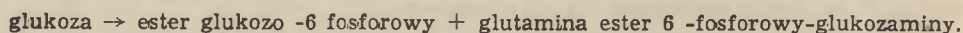
W dalszym ciągu autor zajmuje się zagadnieniem biosyntezy kwasu chondroitynosiarkowego kolejno rozpatrując mechanizm wykorzystania jonu siarczanowego przez organizm, proces biosyntezy aminocukrów i kwasów uronowych, oraz sam proces polimeryzacji.

Jon siarczanowy pochodzi z aminokwasów zawierających siarkę i uwolniony ostatecznie z kwasu β -sulfinylopyrogronowego powstałego w wyniku transaminacji kwasu — cysteinosiarkowego i kwasu α keto-glutarowego. W wyniku następujących reakcji:



powstaje PAPS uważany przez K i l z a i L i p m a n a za „aktywny siarczan” spełniający rolę donatora grup siarczanowych.

Glukozamina powstaje w następujących reakcjach bezpośrednio z glukozy:



Grupa aminowa glukozaminy jest natychmiast acetylowana przez system: acetylowany -CoA i ATP, w wyniku czego otrzymuje się ester — 6-fosforowy N-acetylglukozaminy i CoA. Ester 6-fosforowy N-acetylglukozaminy znajduje się w równowadze z estrem 1 fosforowym N-acetyl glukozaminy przy obecności estru 1,6 dwufosforowego glukozy.

W reakcji między kwasem urydylotrójfosforowym (UTP) i N-acetylglukozaminą powstaje urydylodwufosfoacetylglukozamina, która ulega przemianie w odpowiedni nukleotyd N-acetylo-galaktozaminy.

Biosynteza kwasu glukuronowego zachodzi prawdopodobnie w wątrobie z udziałem dehydrogenaz przez utlenienie UDP-glukozy do UDP-kwasu glukuronowego. Zagadnienie polimeryzacji jako ostatniego stadium biosyntezy polisacharydów jest niejasne. Wydaje się jednak, że w procesie tym szczególną rolę odgrywają nukleotydy urydylowe. Ostateczne wyjaśnienie procesów przemiany i biosyntezy polisacharydów może mieć nie-powszednie znaczenie dla zrozumienia mechanizmu szeregu procesów biochemicznych w różnych stanach patologicznych.

Ad D. W referacie wstępnym prof. H. T h e o r e l l a (Szwecja) pt. „Analytical procedures based on DPN-linked enzyme systems” omówiono teoretyczne podstawy uzasadniające zastosowanie tego typu enzymów do analiz klinicznych. Autor jest zdania, że tego typu oznaczenia wyprą z repertuaru analityki lekarskiej wiele analiz powszechnie dziś przyjętych i powszechnie uważanych za klasyczne, głównie ze względu na następujące zalety:

1) enzymy sprzężone z DPN lub TPN biorą pośredni lub bezpośredni udział w wielu reakcjach związanych z pośrednią przemianą materii w ustroju ludzkim,

2) zredukowane koenzymy DPNH lub TPNH wykazują maksimum absorpcji przy długości fali światła 340 $m\mu$, co umożliwia stosunkowo łatwe ich oznaczenie metodami spektrofotometrycznymi,

3) DPNH jak i TPNH pobudzone światłem o długości fali 340 $m\mu$ dają biało-niebieską fluorescencję, co umożliwia przeprowadzenie oznaczeń z dokładnością do 10^{-8} mola,

4) Zarówno DPNH jak i TPNH nie podlegają autooksydacji, co umożliwia przeprowadzenie oznaczeń w warunkach aerobowych.

Prof. V. H i n s b e r g (NRF) w referacie pt. „Der diagnostische Wert DPN-abhangiger Enzyme” stwierdza, że z ok. 30 enzymów zależnych od systemu DPN tylko niewielka ich część znalazła zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej.

Metody oparte na mierzeniu stężenia DPN i DPNH (pomiar różnicy ekstynkcji przy 340 $m\mu$) można podzielić na 3 grupy:

1) Metody, w których znaczenie diagnostyczne posiada oznaczenie aktywności samego enzymu (np. dehydrogenazy kwasu mlekowego (LD) aldolazy, transaminazy glutamino-szczawiooctowej (GOT), transaminazy glutamino-pyrogrońskiej (GPT) itd.

2. Metody, w których enzym jest wykorzystany do oznaczenia innego składnika, np. alkoholu, glukozy, kwasu mlekowego, kwasu pyrogrońskiego itp.

3. Metody, w których enzym zależny od DPN zostaje dodany do środowiska celem uzyskania bardziej dogodnych warunków do wykonania pomiaru.

Autor przewiduje, że obok dzisiaj już stosowanych w analizie lekarskiej enzymów, takich jak GOT, GPT, LD, MD i aldolaza, wiele innych jeszcze enzymów zależnych od systemu DPN \rightleftharpoons DPNH (fosfoglicerokinaza, dehydrogenaza kwasu jabłkowego i inne) znajdzie wkrótce praktyczne zastosowanie. Autor podkreśla szczególne znaczenie diagnostyczne oznaczenia aktywności niektórych enzymów, a zwłaszcza aldolazy w schorzeniach wątroby i mięśni oraz transaminaz w schorzeniach mięśnia sercowego.

Prof. F. W r ó b l e w s k i (USA) w referacie pt: „The clinical significance of alterations in lactic dehydrogenase activity of body fluids”, opierając się na bardzo bogatym materiale klinicznym, omówił znaczenie diagnostyczne oznaczenia dehydrogenazy kwasu mlekowego (LD) w surowicy płynach przesiękowych (PP) i w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) w przebiegu różnych schorzeń. Wzrost aktywności LD w surowicy spotyka się w wielu schorzeniach. Znaczenie diagnostyczne i rokownicze ma to przede wszystkim w rozpoznawaniu zawału sercowego (zmiany występują b. wcześniej 6—12 godzin po zawałe), oraz w stawianiu prognozy co do jego przeżycia, ponieważ wzrost aktywności LD w surowicy jest proporcjonalny do wielkości uszkodzenia mięśnia sercowego). Wzrost aktywności LD powyżej 3000 jednostek przy normalnych wartościach 200—680 jedn./ml -rokuje bardzo źle. Podwyższenie aktywności LD w surowicy spotyka się w również w chronicznych białaczkach szpikowych, w rozsianym raku, w ostrych schorzeniach homolitycznych, w ostrym zapaleniu wątroby, przy uszkodzeniu mięśni szkieletowych, a sporadycznie w ostrych schorzeniach nerek i trzustki.

We wszystkich tych schorzeniach enzym wydostaje się z komórek uszkodzonego narządu i przenika do płynu pozakomórkowego (PPK). Z powyższego wynika jasno, że wzrost aktywności LD w surowicy nie jest próbą swoistą i przy ustalaniu rozpoznania odgrywa rolę pomocniczą (wyjątek zawał mięśnia sercowego).

W schorzeniach nowotworowych znacznie większe znaczenie praktyczne ma oznaczanie aktywności LD w płynach przesiękowych. Przy schorzeniach nienowotworowych aktywność LD w płynie przesiękowym jest zawsze mniejsza niż aktywność LD w surowicy. W razie obecności nowotworu występuje zjawisko odwrotne. Należy zaznaczyć, że i hodowane *in vitro* komórki rakowe wydalają do środowiska znaczne ilości LD. Znaczenie diagnostyczne tego zjawiska jest tym większe, że może mieć ono miejsce nawet wtedy, gdy mikroskopowe badanie przesięku nie wykaże obecności komórek nowotworowych. W wynik leczenia nowotworu czy to hormonami, czy też iperytem azotowym można na odwrót uzyskać obniżenie aktywności LD w płynie przesiękowym bez wyraźnego zmniejszenia ilości komórek nowotworowych stwierdzalnych mikroskopowo, co świadczy o wpływie jaki wywiera stosowany środek leczniczy na metabolizm komórek nowotworowych.

U osób normalnych i u osobników nie cierpiących na schorzenia centralnego systemu nerwowego (CNS) aktywność LD w PMR jest zawsze niższa niż aktywność LD w surowicy. W schorzeniach nowotworowych z przerzutami do mózgu (białaczka limfatyczna z ogniskami w mózgu) aktywność LD w PMR jest podwyższona. Pierwotne nowotwory mózgu nie wywołują podwyższenia aktywności LD w PMR. W zapaleniach opon mózgowych (także w *Meningitis tbc.*) w ostrym stadium spotykamy się ze znacznym podwyższeniem aktywności LD w PMR. Mechanizm wzrostu aktywności LD w PMR nie jest jasny. LD może pochodzić z leukocytów lub też erytrocytów pojawiających się w większych ilościach w PMR w niektórych schorzeniach, lub też w wyniku uszkodzenia bariery mózgowo-rdzeniowej.

Na zakończenie autor podkreśla, że dopiero dalsze badania mogą ostatecznie pozwolić na ocenę praktycznego znaczenia z punktu widzenia klinicysty, oznaczeń aktywności LD w płynach biologicznych.

Spośród 141 przedstawionych na Kongresie doniesień na specjalną uwagę zasługują następujące:

1. Chen Pai - En (ChRL) „Abnormalities of copper metabolism in Wilsons disease”.

Przebadano 7 chorych. Oznaczano zawartość miedzi i ceruloplazminy w surowicy moczu i kale. Zawartość miedzi w tkankach i moczu jest podwyższona, natomiast zawartość ceruloplazminy w surowicy i miedzi w kale jest obniżona. Fakty te przemawiają za tym, że choroba Wilsona jest wrodzonym zaburzeniem metabolicznym polegającym na upośledzeniu biosyntezy ceruloplazminy w ustroju prowadzącym do wzmożonego odkładania się miedzi w tkankach. Autor sugeruje nazwę „cupresis” lub „acaeruloplasminosis” dla określenia powyższego schorzenia.

2. H. Dulce, T. Gunther, E. Schutte (NRF): „Influence of adrenalectomy on water and electrolyt metabolism of organs”.

W niewydolności nadnerczy następuje obniżenie poziomu sodu i chlorków surowicy oraz zmniejszenie objętości PPK. Równocześnie wzrasta poziom potasu w surowicy. Autorzy oznaczali zawartość potasu, sodu i chloru oraz wody związanych śród-

komórkowo i pozakomórkowo w tkance wątrobowej, mięśniowej i w skórze normalnego i pozbawionego nadnerczy szczura. Stwierdzono, że po adenektomii następuje:

a) wzrost ilości wody związanej śródkomórkowo w wątrobie. Na — wchodzi do komórek w stężeniu większym, a chlorki w stężeniu mniejszym niż w płynie pozakomórkowym (PPK). Stężenie potasu spada zarówno w komórkach jak i PPK.

b) W mięśniach zawartość wody w komórkach również wzrasta. Chlorki gromadzą się w komórkach w stężeniu większym niż w PPK. Zawartość Na i K w PPK spada, a pozostaje bez zmian w komórkach.

c) W skórze następuje największy wzrost zawartości wody. Przestrzeń sodowa pozostaje niezmienną, tzw. „związany Cl” jest obniżony.

Hormony nadnercza wpływają więc na:

a) w komórkach wątroby i mięśniach na aktywny transport jonów przez błonę komórkową,

b) w skórze na proces pęcznienia kolagenu.

3. T. Aronsson, A. Grönwall (Szwecja): „Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis — a new electrophoresis buffer”.

Autorom udało się rozdzielić białka surowicy przy pomocy elektroforezy bibułowej na 9 frakcji: frakcją przedalbuminową oraz albuminy, α_1 , α_{2a} , α_{2b} , β_1 , β_2 , β_3 , γ globuliny stosując bufor składający się z trihydroksymetylaminoetanu (Tris), kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) i kwasu borowego.

4. O. Foss (Norwegia): „J₁₃₁ as amplifier in paper electrophoresis of low concentrated protein solutions”.

Przy stosowaniu elektroforezy bibułowej do badania płynów o małej zawartości białka konieczne jest zagęszczenie płynu aż do uzyskania stężenia białka 1 g^o/. Uniknąć tego można przeprowadzając jodowanie białek przy pomocy J₁₃₁ i odczytując proteinogramy metodą autoradiografii. W ten sposób można przeprowadzić elektroforezę bibułową roztworów białek zawierających 1mg^o/o białka.

5. M. Keler, Z. Pucar, M. Petek (Jugosławia) „Zweidimensionale Elektrochromatographie und Triasfarbung normaler und pathologischer humanen Sera”.

Stosując technikę dwuwymiernej elektrochromatografii przebadano szereg surowic normalnych i patologicznych stosując swoiste dla lipidów (czerń sudanową) węglowodanów (kwas nadjodowy — fuksyna) i białek (czerń amidowa) metody barwienia. Stwierdzono, że węglowodany wędrują zawsze razem z frakcjami białkowymi. Natomiast lipidy można podzielić na 3 grupy: 1) obojętne tłuszcze zaadsorbowane przez bibułę na linii startowej, 2) swobodne lipidy adsorbujące się na bibule, pochodzące z chylomikronów i frakcji lipidowej takiej jak frakcja α_2 -globulinowa. Ta ostatnia frakcja lipidowa składa się jeszcze z 2 komponent; jednej od początku elektroforezy wędrującej swobodnie i drugiej, która początkowo wędruje z γ -globulinami. 3) lipidy nie adsorbujące się na bibule, silnie związane z białkami. W grupie tej można wyróżnić: α_1 , α_2 , β , γ lipoproteidy. Dwuwymiarowa elektrochromatografia bardziej umożliwia zróżnicowanie lipidów w surowicy niż zwykła elektroforeza bibułowa. W stanach patologicznych, w zachowaniu się i składzie frakcji lipidowych dają się zauważyć znaczne odchylenia od normy. Wszystkie przebadane przez nich surowice patologiczne autorzy sklasyfikowali w obrębie 5 grup charakteryzujących się swoistymi zmianami w obrębie frakcji lipidowych.

6. G. Tonini, C. De Risio (Włochy): „Paper electrophoresis of cerebrospinal fluid (CSF) proteins”.

Autorzy stwierdzili, że białka płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzą częściowo z surowicy (albuminy), częściowo zaś z centralnego systemu nerwowego (frakcja przedalbuminowa i globuliny). Sugerują też, że wzrost zawartości globulin może być wynikiem lokalnego podrażnienia systemu siateczkowo-śródbłonkowego.

7. P. Almqvist, E. Lausing (Szwecja): „A study of serum glucoproteins in cancer”.

Badania przeprowadzono na 224 pacjentach. W przypadkach wolnych od przerzutów stwierdzono wzrost policharydów w obrębie frakcji α_1 i α_2 globulinowych, a w przypadkach z przerzutami zaobserwowano zmiany zawartości polisacharydów w obrębie albumin i β globulin. Zmiany te nie były jednak znamienne statystycznie.

8. D. Baron, J. Bell, C. Oakley: „Transminase and Lactic Dehydrogenase Estimation in Serum and Cerebrospinal Fluid and Their Clinical Significance”.

Przy zawale mięśnia sercowego aktywność transminazy w surowicy wzrasta między 6 a 72 godzinami po zawale, a aktywność LD między 6 a 120 godzinami. W zatorze płuc aktywność LD zwykle wzrasta a ST pozostaje bez zmian. Aktywność ST wzrasta po operacjach chirurgicznych serca, w martwicy wątroby, w żółtacze zakaźnej i w czynnej marskości wątroby. W PMR aktywność transminazy wzrasta po zakrzepach mózgowych, po krwotokach podpajęczynówkowych, przy guzach przyśadki i przy ropniach mózgu. Pierwotne nowotwory mózgu nie powodują wzrostu aktywności transminazy w PMR.

9. L. Działośzyński (Polska): „The clinical value of arylsulphatase estimation in urine”.

Stwierdzono, że w schorzeniach nowotworowych i w schorzeniach cechujących się stanami zapalnymi, jak również w białaczkach wzrasta wyraźnie wydalanie arylsulfatazy z moczem. Oznaczanie arylsulfatazy w moczu może być bardzo użyteczne w wykrywaniu przerzutów pojawiających się po operacyjnym leczeniu nowotworu.

10. Thomas Laurson, F. Hansen: (Dania): „A fluorometric method for determination of serum glutamic pyruvic transminase”.

Przedstawiono nową metodę oznaczania GPT z użyciem kwasu α -ketoglutazarowego i l-alaniny jako substratów. Aktywność enzymu wyraża się w ilości kwasu pyrogroonowego wytworzonego w ciągu 1 godz. przez 1 ml surowicy w określonych warunkach doświadczalnych. Kwas pyrogroonowy oznacza się ilościowo oznaczając ilość uwolnionego DPN w obecności dehydrogenazy kwasu mlekowego i DPNH. Sam DPN oznaczany jest fluorometrycznie w postaci produktu kondensacji z metyletylketonem.

11. R. Ordell (Szwecja): „Serum malic dehydrogenase (MD) estimation and its clinical significance”.

Autor podaje pośredni i bezpośredni sposób określania aktywności MD w surowicy, z których sposób pośredni jest szczególnie wygodny. Polega on na tym, że oznaczenie aktywności transaminazy glutaminowo-szczawiooctowej (GOT) przeprowadza się kolejno w obecności i nieobecności preparatu MD dodanego z zewnątrz. Aktywność MD obecnej w surowicy zwykle nie wystarcza do uzyskania optimum warunków potrzebnych do oznaczenia aktywności GOT. W tym wypadku aktywność GOT jest proporcjonalna do ilości obecnej w surowicy MD. Oznaczenie w jednej próbce krwi 3 enzymów MD, LD, GOT umożliwia szybkie rozróżnienie zawału mięśnia sercowego od ostrych schorzeń wątroby i dróg żółciowych, jak również rozróżnienia żółtaczki hemolitycznej od hepatocelularnej i zastoinowej.

12. G. J u n g e r (Szwecja): „On the activity of electrophoretic components of glutamic — oxalacetic transaminase in human serum”.

Stosując technikę elektroforezy kolumnowej w celulozie i skrobi przy pH—4,6 wykryto w oczyszczonym preparacie GOT 3 komponenty: niewielki ilościowo składnik A, oraz składniki B i C występujące przy pH wyżej 4,8 w postaci kompleksu AB. Obraz elektroforetyczny preparatu GOT nie zależy od tego, czy GOT pochodzi od osobnika zdrowego, czy też chorego, oraz od tego z jakiego narządu została otrzymana. Aktywność enzymatyczna poszczególnych składników zależy od metody oznaczania aktywności GOT. Komponenty B i C, kompleks BC dają wyższe wartości w metodach, w których stosuje się fenylohydrazynę, niż w metodzie K a r m e n a. Składnik A daje natomiast wartości o połowę niższe. Przy zastosowaniu innych metod najbardziej aktywnym okazuje się składnik A. Tak różnorodne zachowanie się składnika A nie ma większego wpływu na oznaczanie aktywności całkowitej GOT, ponieważ zawartość tego składnika w preparatach GOT nigdy nie przekracza 30%.

13. J. V e r s c h u r e (Holandia): „Studies on efficiency and accuracy of routine laboratory methods”.

Przestudiowano 2 problemy:

1. Wpływ oznaczeń seryjnych na czas potrzebny do wykonania jednej analizy. Celem było znalezienie tzw. „optymalnej serii” dla bieżącej pracy.

2. Wpływ, jaki wywiera na szybkość i dokładność oznaczania zastąpienie zwykłych pipet przez pipety automatyczne lub dyspensery.

Jak stwierdzono, automatyzacja pipetowania przy zwiększonej dokładności wyników pozwala przeprowadzać oznaczenia w czasie o połowę krótszym.

14. E. W h i t e h e a d (USA): „The use of an automatic analyzer in the clinical chemistry laboratory”.

Autor demonstrował aparat pozwalający na całkowite automatyczne ilościowe oznaczenie glukozy, mocznika, wapnia i alkalicznej fosfatazy w surowicy.

W czasie końcowej sesji Prezydent Kongresu prof. dr J. L e h m a n podsumował wyniki obrad Kongresu stwierdzając między in., że Kongres ten powinien w istotny sposób przyczynić się do rozwoju chemii klinicznej, będącej obecnie w trakcie wyodrębnienia się jako nowej specjalności lekarskiej i to zarówno pod względem naukowym jak i organizacyjnym, a zarazem stać się początkiem ściślejszej współpracy między chemikami klinicznymi całego świata.

W czasie trwania Kongresu uczestnicy mieli możliwość zwiedzania laboratoriów klinicznych na terenie Sztokholmu. Spośród laboratoriów, które zwiedził autor sprawozdania, za najlepiej urządzone i najbardziej nowoczesne należy uznać laboratorium przy szpitalu św. Eryka w Sztokholmie prowadzone przez doc. B. J o s e p h s o n a.

W pomieszczeniach sąsiadujących z salami obrad urządzona była wystawa aparatury laboratoryjnej. Udział w wystawie wzięło 31 firm.

Z wystawionych aparatów zasługują na wymienienie:

1. Wspomniany wyżej automatyczny analizator prod. „Technicon International” (USA).

2. Spektrofotometr „Beckman” model DK — 2 przeznaczony do badania w podczerwieni, ultrafiolecie i widzialnej części widma z całkowicie automatyczną rejestracją wyników.

3. Spektrofotometr „Beckman” model B do badań w widzialnej części widma, stosunkowo niedrogi i szczególnie użyteczny dla laboratoriów chemiczno-klinicznych.

4. Analytrol „Spinco” prod. „Berkman” do odczytywania proteinogramów bibułowych — całkowicie zautomatyzowany.

5. Aparat Astrupa do oznaczania pH krwi $p\text{CO}_2$ itp. oraz potencjometr typu TTT produkowany przez F-mę Radiometer — Kopenhaga.

6. Celloscop, F-my. Ljungberg: Aparat do automatycznego liczenia czerwonych i białych krwinek i do różnicowania tych ostatnich.

7. Aparatura do diagnostyki izotopowej F-my Phillips.

W czasie Kongresu zapoznano również uczestników z sytuacją chemii klinicznej na terenie Skandynawii.

Od szeregu lat chemia kliniczna w Skandynawii traktowana jest jako odrębna specjalność lekarska posiadająca własne stowarzyszenia naukowe i własne czasopisma. Na wydziałach lekarskich istnieją specjalne Zakłady Chemii Klinicznej. Przyszli kierownicy laboratoriów klinicznych i przyszli lekarze laboratoryjni (laboratory doctor) już po uzyskaniu dyplomu muszą przejść specjalne przeszkolenie najpierw w zakładach biochemii, a potem w centralnych laboratoriach klinicznych. Zasadą organizacyjną jest tworzenie przy szpitalach centralnych laboratoriów klinicznych. Laboratoria przykliniczne są uważane za oddziały centralnego laboratorium. Kierownik centralnego laboratorium jest całkowicie samodzielny pod względem fachowym i naukowym i ma te same prawa co kierownicy oddziałów klinicznych. W laboratoriach centralnych oprócz badań chemiczno-klinicznych prowadzi się też prostsze badania hematologiczne a czasem i bakteriologiczne. Asystentami w laboratoriach są najczęściej lekarze, w większych laboratoriach także fizycy, chemicy, farmaceuci i biolodzy. Personel techniczny kształci się w 3-letnich szkołach laboranckich.

Z członków polskiej delegacji prof. D z i a ł o s z y ń s k i na posiedzeniu sekcji C przedstawił wspomniane wyżej doniesienie, pozostali członkowie na zebraniach sekcyjnych zabierali głos w dyskusji. Prof. S t o l z m a n był przewodniczącym jednego z zebrań sekcji C. Członkowie naszej delegacji nawiązali też szereg cennych kontaktów z pracownikami ośrodków chemiczno-klinicznych różnych krajów.

Pięćciolecie Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk

1. Wstęp

W pracach Podsekcji Podstawowych Nauk Lekarskich I Kongresu Nauki Polskiej stan biochemii ujmowano w taki sposób:

„Gałęzią wiedzy, której stan w tej chwili musi budzić szczególnie żywy niepokój, jest biochemia. Ta nauka, mająca w Polsce piękne tradycje wiążące się nazwiskami Nenckiego, Marchlewskiego, Bądryńskiego, Białaszevicza, Parnasa, Przyłęckiego, znalazła się w okresie powojennym w szczególnie ciężkiej sytuacji. Jedną z głównych przyczyn tego stanu jest bolesny ubytek w latach wojny wielu najznakomitszych naszych pracowników w tej dziedzinie, i to zarówno zajmujących wybitne stanowiska profesorów, jak i rokujących najlepsze nadzieje młodych docentów. Ponieważ odpowiednio szybkie uzupełnienie luk w kadrach personalnych tej nauki było niemożliwe przeto powstała taka sytuacja, że na 9 katedr tego przedmiotu w akademiach medycznych 3 pozostają wciąż nieobsadzone. Rozporządzamy ponadto trzema habilitowanymi docentami i trzema kandydatami do habilitacji.

Niedostatek w zakresie kadr biochemików pogłębia się skutkiem zwiększenia potrzeby specjalistów w tej dziedzinie na wydziałach farmaceutycznych akademii medycznych, wydziałach matematyczno-przyrodniczych i rolniczych uniwersytetów oraz wydziałach chemicznych politechnik, które w słusznym zrozumieniu olbrzymiej roli tej gałęzi chemii w różnych dziedzinach współczesnych nauk przyrodniczych tworzą swe własne zakłady i katedry biochemii. Wreszcie specjalne pracownie biochemiczne tworzone przy takich instytutach, jak PZH., Instytuty przeciwrakowe, Instytut Medycyny Morskiej itd. wymagają wykwalifikowanych specjalistów.

Znaczyć również należy, że wykształcenie pracowników naukowych w tej dziedzinie, a zwłaszcza tych, którzy mieliby pracować naukowo samodzielnie w zakresie biochemii ściśle związanej z medycyną, nastrocza szczególne trudności. Wymagane jest, aby pracownik taki z wykształcenia był lekarzem i miał gruntowne zrozumienie problemów biologicznych i klinicznych. Równocześnie jednak musi opanować odrębną technikę badawczą i przyswoić sobie chemiczny sposób myślenia, co — jak uczy doświadczenie — nie jest sprawą prostą dla lekarza... Pamiętać również należy o tym, że pracownie biochemiczne są — spośród wszystkich teoretycznych zakładów biologicznych — najbardziej uzależnione w swej pracy badawczej od importu zagranicznej aparatury i specjalnych, nieosiągalnych w kraju odczynników. To też nawet najlepiej zaopatrzone zakłady biochemiczne narzekają wciąż na poważne braki, a zakłady znajdujące się w stadium organizacji walczą z przeszkodami z największą trudnością. Niebezpieczeństwo grożące biochemii polskiej tkwi jednak

nie tyle w technicznych warunkach pracy, ile w braku dostatecznej ilości wyspecjalizowanych już pracowników naukowych. Ten brak pociąga za sobą niemożność roztoczenia należytej opieki nad młodymi, rozpoczynającymi dopiero swój staż naukowy adeptami, co może się w przyszłości szczególnie dotkliwie odbić na dalszym rozwoju tak ważnych badań biochemicznych. Zresztą trudności lokalowe, braki w aparaturze i odczynnikach, niedostateczna liczba wykwalifikowanych starszych pracowników naukowych, przeciążenie pracą dydaktyczną wiążą się razem w zawiły splot czynników wzajemnie się warunkujących, a ciężących niekorzystnie nad tą gałęzią teoretycznych nauk lekarskich. W tej dziedzinie konieczny jest zbiorowy wysiłek i większy, jednorazowy wkład materialny dla jak najszybszego usunięcia dotychczas piętrzących się trudności”.

W wyniku obrad I Kongresu Nauki Polskiej w zapatrywaniach na organizację badań naukowych w Polsce zaznaczył się pewien przełom. Konieczność zbiorowego wysiłku, o której mówił w swym referacie cytowanym wyżej prof. Skarżyński przybrała po Kongresie Nauki określoną postać organizacyjną. Ministerstwo Zdrowia powołało przy swej Radzie Naukowej Komisję Biochemiczną. Przewodniczącym Komisji został prof. T. Baranowski, a członkami prof. prof. J. Blauth-Opieńska, J. Heller, B. Skarżyński, Z. Stolzman oraz dr J. Meduski. W czasie prac Komisji dokooptowano do jej składu prof. W. Mozołowskiego oraz doc. T. Korzybskiego. Założeniem pracy Komisji był pogląd sformułowany w referacie jej przewodniczącego, prof. T. Baranowskiego: „Organizacja biochemii w obecnej trudnej sytuacji kadrowej powinna być zbiorowa, plany naukowe skoordynowane, wprowadzone bardziej racjonalne metody pracy.” i dalej: „Zagadnienie organizacji badań biochemicznych nie ogranicza się do Służby Zdrowia, ale dotyczy znacznie szerszego zakresu gospodarki narodowej”. Zaslugą Komisji jest wyodrębnienie z planu badań naukowych Ministerstwa Zdrowia zagadnień biochemicznych. Okazało się przy tym, iż np. 41 zagadnień na 100 biochemicznych tematów dotyczyło białek (w tym 2 prace o oznaczaniu białek, 21 prób preparatyki, 12 prac o białkach we krwi, 5 prac o enzymach proteolitycznych i 1 praca o białkach tkankowych). Jedynie dwie prace poświęcone były przemianie pośredniej, natomiast 53 prace były oznaczeniami w badaniach kazuistycznych. Przemianom tłuszczowców poświęcono dwie prace, biochemii raka jedną i przemianom węglowodanowym jedną. W związku z takim układem tematyki uznano za konieczne położenie nacisku na rozwój następujących kierunków biochemii: biochemii nowotworów, nukleoproteidów, drobnoustrojów, antybiotyków, przemiany pośredniej, mięśnia, oraz metodyki badań biochemicznych w klinice. Te kierunki próbowała Komisja na terenie Ministerstwa Zdrowia popierać. Zaslugą Komisji jest zorganizowanie w dn. 24 lutego 1952 r. sympozjum biochemicznego w Łodzi poświęconego organicznym związkom fosforowym. Lista uczestników tej pierwszej wyłącznie biochemicznej konferencji obejmowała 70 nazwisk z wszystkich ośrodków kraju.

Wspomniane wyżej założenia pracy Komisji przewidywały przekształcenie jej w oparty o wszystkie ośrodki i rodzaje pracy biochemików — ogólnopolski Komitet Biochemiczny. Komitet taki powstał w maju 1952 roku jako Komitet Biochemiczny Wydziału Nauk Biologicznych Polskiej Akademii Nauk. W skład Komitetu weszli: prof. prof., J. Heller — przewodniczący oraz członkowie: T. Baranowski, J. Opieńska - Blauth, B. Skarżyński, W. Niemierko, Z. Stolzman, I. Reifer oraz doc. J. Meduski. W czasie prac w skład Komitetu dokooptowano: prof. prof. A. Dmochowskiego, W. Mozołowskiego, J. Chmielewską. Sekretarzem naukowym Komitetu został J. Meduski,

a w skład sekretariatu wchodziła najpierw S. Horodyńska, a następnie A. Chrzanowska.

Komitet odbył swe pierwsze posiedzenie plenarne 29 maja 1952 roku. Do chwili obecnej, to znaczy do 6 października 1957 zebrań takich odbyło się 35.

W ciągu pierwszego pięciolecia swego istnienia Komitet ukształtował formy i zakres swej działalności, poszerzając niejednokrotnie ramy nakreślone mu przez ustawę i Wydział II PAN. Niniejsze sprawozdanie zamierza przedstawić zakres i formy pracy Komitetu, zagadnienia finansowe Komitetu, a zwłaszcza jego dotacje; zamierzamy omówić sytuację specjalności „biochemik” w Polsce, sprawy wydawnicze Komitetu, stosunek Komitetu do polskich placówek biochemicznych, współpracę Komitetu z innymi specjalnościami, oraz krótko kontakty naukowe z zagranicą.

W momencie, kiedy PAN dyskutuje nad swą organizacją i rolą komitetów naukowych, dokładne przedstawienie rozwoju Komitetu może się okazać ważnym argumentem w dyskusji i ewentualnie może służyć jako model przy kodyfikacji działalności komitetów naukowych.

Dotychczasowe wyniki naszej działalności pozwalają przypuszczać, iż pierwsze pięciolecie istnienia Komitetu stało się trwałym fundamentem pod budowę współczesnej biochemii polskiej.

2. Zakres i formy pracy w Komitecie

Na pierwszym plenarnym posiedzeniu Komitetu Biochemicznego w dniu 29 maja 1952 roku Sekretariat Wydziału II PAN postawił Komitetowi szereg zadań do wykonania. Zadania te ukształtowały poraz pierwszy zakres pracy Komitetu. Z czasem napływające bieżące obowiązki ów pierwotny zakres zmodyfikowały.

Należało zapoznać się i ocenić plan prac biochemicznych placówek PAN i placówek innych resortów. Nie chodziło ani o rozszerzenie planu badań, ani o nadmierny krytycyzm wobec poszczególnych punktów tego planu. Należało poprostu z problematyki ocenianej wyłowić zagadnienia szczególnie ważne. Od razu nasunęła się konieczność przedyskutowania określenia „szczególnej ważności”. Szczególnie ważności PAN, a mianowicie problemy szczególnie ważne dla gospodarki i kultury społeczeństwa, problemy wymagające poparcia władz centralnych i wreszcie problemy wykonywane z inicjatywy poszczególnych badaczy, okazały się schematyczne i nie wiele pomogły w ustawieniu planu. Dyskusja okazała, że ważność problemów zależy od stosunku ich do podstaw biochemii, od zapotrzebowania społecznego na wyniki badań biochemicznych od stanu biochemii polskiej, jej dziedzin zaniedbanych i wymagających szczególnej opieki. Należało również uwzględnić fakt, iż głównym odbiorcą wyników biochemika jest pracownik naukowy w medycynie, w rolnictwie, w weterynarii, którego z kolei zadaniem winno być przetłumaczenie przyswojonego dorobku biochemicznego na język praktycznych potrzeb resortowych.

Należało opracować wytyczne przyszłych badań biochemicznych uwzględniając ocenę istniejącego stanu rzeczy. Należało ustosunkować się do programów zjazdów i konferencji naukowych, by zapewnić w nich należyty udział biochemii. Należało przedłożyć Wydziałowi II projekt wydawnictw naukowych w zakresie biochemii.

Zwrócono się do Komitetu o projekt sieci placówek biochemicznych już to jako własnych instytutów, już to jako placówek pomocniczych, względnie katedr afiliowanych. Praca nad wypełnianiem tych zadań miała pomóc do wypracowania regulaminu Komitetu Biochemicznego. Już na piątym zebraniu Komitetu (22.XI.1952) okazało się, iż zakres zainteresowań Komitetu należy zwiększyć. Wypłynęła sprawa szkolenia

kadr biochemicznych, a zwłaszcza aspirantur. Należało ustalić, jakie ośrodki biochemiczne w Polsce mogą drogą aspirantury kształcić przyszłych biochemików. Wpłynęła sprawa dotowania tych placówek, których plany badawcze zasługiwały na poparcie. Okazało się również celowe opiniować przydatność książkowych pozycji wydawniczych z dziedziny biochemii.

Do Komitetu zwróciły się katedry politechniczne z prośbą, by Komitet ułatwił wprowadzenie do produkcji ich dorobku mającego znaczenie dla puli odczynnikowej, względnie aparaturowej naszego rynku. Likwidacja Komisji Biochemicznej przy Ministrze Zdrowia narzuciła Komitetowi konieczność dokładniejszego zajmowania się problematyką lekarsko-biochemiczną.

Wynikła sprawa nagród państwowych dla biochemików, nagród naukowych Komitetu Biochemicznego.

Po przyjęciu Polski do Międzynarodowej Unii Biochemicznej i po ustaleniu przez Prezydium PAN, że Komitet Biochemiczny jest Narodowym Komitetem Biochemii, Prezydium Polskiej Akademii Nauk w uchwale z dnia trzydziestego kwietnia 1957 postanowiło, że Komitet Biochemiczny w stosunku do Unii Biochemicznej będzie miał obowiązki komitetu narodowego w stosunku do unii naukowej wchodzącej w skład International Council of Scientific Unions. Obowiązki te to: przygotowanie dla Unii rocznych sprawozdań charakteryzujących polski dorobek naukowy, dostarczanie Unii materiałów bibliograficznych i w ogóle bieżących materiałów informacyjno-sprawozdawczych; czuwanie nad wykonaniem uchwał Unii; współdziałanie w zakresie współpracy Unii z pracownikami naukowymi w kraju; systematyczne zbieranie informacji o pracach naukowych z zakresu problematyki Unii; ocena opracowywanych w kraju materiałów przeznaczonych do opublikowania w wydawnictwach Unii; rozpowszechnianie materiałów naukowych dostarczanych przez Unię; informowanie o działalności organizacyjno-naukowej Unii; współpraca z zainteresowanymi resortami, stowarzyszeniami naukowymi i naukowo-technicznymi w kraju w zakresie działalności Unii. To ostatnie zadanie Komitet realizuje przez nawiązanie ściślejszej współpracy z Ministerstwem Rolnictwa, Szkolnictwa Wyższego oraz wspomnianego wyżej Ministerstwa Zdrowia. Komitetowi po długim okresie przygotowawczym udało się zainicjować powstanie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, którego statut jest w chwili obecnej (IV kwartał 1957) w rejestracji.

Do dalszych zadań Komitetu, jako komitetu narodowego należy wnioskowanie o składzie oficjalnych delegacji na kongresy, zjazdy, sympozja organizowane przez Unię, względnie Komitety Narodowe innych państw należących do Unii, a także merytoryczna ocena referatów i innych materiałów naukowych kierowanych na wspomniane kongresy, zjazdy, czy sympozja. Komitet wysuwa do władz Unii przedstawicieli polskiej biochemii, nawiązuje bezpośrednią naukową i organizacyjną współpracę z innymi Komitetami Narodowymi.

Wspomniana uchwała Prezydium PAN gwarantuje jednocześnie Komitetowi otrzymanie w ramach budżetu PAN środków potrzebnych na prace natury organizacyjno-administracyjnej, a w szczególności na techniczne przygotowanie materiałów dla Unii.

Życie nie skorygowało jeszcze postanowień omawianych przez kwietniową uchwałę Prezydium PAN. Pełna jej realizacja pogłębi znaczenie Komitetu.

Komitet obradował zrazu w terminach miesięcznych. Porządek obrad plenarnych posiedzeń ukształtował się tak, że po odczytaniu i przyjęciu protokołu z poprzedniego zebrania Przewodniczący składał szczegółowe sprawozdanie za okres od ostatniego spotkania członków Komitetu, potem następowały sprawy przekazane przez Wydział II, a ostatnio i Wydziały V i VI PAN. Z kolei omawiano zagadnienia

bieżące i wolne wnioski. W okresie między zebraniem agenda Komitetu prowadzi Przewodniczący przy pomocy sekretarza wzywając niekiedy w szczególnie ważnych sprawach dla wspólnego podjęcia decyzji warszawskich członków Komitetu, tak zwaną: warszawską grupę roboczą.

Prócz zebrań plenarnych i posiedzeń warszawskiej grupy roboczej Komitet zwoływał sympozja naukowe, konferencje problemowe oraz sesje sprawozdawcze.

Sympozja stanowiły otwarte posiedzenia Komitetu. Miały one charakter konferencyj roboczych. Były pomyślane jako dyskusje metodyczne mające ułatwić planowanie naukowe przez krytyczne naświetlanie zagadnień, które zdaniem Komitetu nie są w bieżącym planowaniu naszych placówek badawczych uwzględniane w zakresie wystarczającym. Referaty i dyskusje miały pomóc w przejściu od ogólnie sformułowanych problemów do ścisłego tematu roboczego, miały ułatwić dobór metod i scharakteryzować główne trudności, z którymi należy się liczyć przy ich stosowaniu.

Komitet zorganizował sześć sympozjów: na wiosnę roku 1952 w Łodzi na temat biochemii związków fosforowych (wspólnie z Komisją Biochemiczną przy Ministrze Zdrowia), w październiku 1952 w Rokietnicy Bytomskiej o biochemii nowotworów, w kwietniu 1953 w Poznaniu (biochemia kliniczna) i we wrześniu 1953 w Białymstoku sympozjum omawiające zagadnienie związków azotowych w roślinach. V sympozjum (ostatni kwartał 1954) poświęcone było zastosowaniu badań polarograficznych w biochemii.

Sympozjum VI odbyło się w marcu 1955 roku w Łodzi i zajmowało się kwasami nukleinowymi i nukleoproteidami. Sympozjum Łódzkie było ostatnim. Forma sympozjów, zdaniem Komitetu, rolę swą spełniła. Pierwsze łódzkie oparte było głównie na referowaniu przeczytanych obcych prac doświadczalnych. Odbyło się ono w czasie, kiedy pisma zagraniczne nie docierały do większości biochemików i dlatego stanowiło ono poważne źródło informacji w omawianym zakresie. Miało ono również dużą rolę pobudzającą. Sympozjum w Rokietnicy Bytomskiej częściowo oparte już było o doświadczenia własne. Stanowiło ono bodziec nie tylko dla biochemików, lecz także dla kół naukowych w podstawowych dyscyplinach medycznych. Sympozjum poświęcone biochemii klinicznej w Poznaniu miało zapoczątkować ściślejszy kontakt między pracownikami klinik, a biochemikami w zakresie biochemii klinicznej. Nie zdało ono jednak pod tym względem egzaminu. Inicjatywa w dziedzinie analityki klinicznej przeszła całkowicie do resortu zdrowia. Stanowić to może ilustrację, że współpraca nawiązuje się trudno między różnymi dyscyplinami w tych zakresach, gdzie z jednej strony mamy pracowników resortowych, a z drugiej pracowników związanych z Polską Akademią Nauk, a nie posiadających ośrodków badawczych w zakresie uprawianym przez odpowiedni resort.

Sympozjum białostockie omówimy szerzej przy przedstawieniu współpracy Komitetu z innymi specjalnościami. Sympozjum polarograficzne zwróciło uwagę na możliwości metodyczne aparatury, która w dużych ilościach znajdowała się w ręku biochemików i słabo była wykorzystywana.

Najlepszym sympozjum było ostatnie, gdzie tematyka opierała się głównie o własne doświadczenie referujących i wносиła częstokroć oryginalne myśli w dziedzinie biochemii kwasów nukleinowych i nukleoproteidów. Komitet zasadniczo z formy sympozjum nie rezygnuje i jeśli potrzeba będzie zainicjować nowy kierunek badań, do formy tej powróci.

Rolę sympozjów spełniają teraz sesje sprawozdawcze. Sesje te to robocze dyskusje laboratoryjne, których celem jest kontrola prac dotowanych. Sesje odbywają się corocznie w różnych ośrodkach biochemicznych. Pośrednią formą między sympozjum,

a sesją sprawozdawczą są otwarte zebrania sprawozdawcze z międzynarodowych kongresów.

Wspomniane wyżej konferencje problemowe (w 1953 zorganizowano odbyłą na początku 1954 roku konferencję o bazie żywienia) są próbą przekazania specjalistom resortowym wyników pracy biochemików i nawiązania ściślejszych kontaktów między ośrodkami biochemicznymi, a odpowiednimi placówkami resortowymi. Po konferencji o bazie żywienia przekazano całość zagadnienia odpowiedniej powstałej w tym celu komisji problemowej PAN przy V Wydziale, która inicjatywę Komitetu przejęła. Ogólne wnioski z organizowanej przez Komitet konferencji problemowej tyczyły sprawy wzajemnego stosunku trzech następujących członów: a) laboratorium produkcyjnego i produkcji (kontrola zatwierdzonego procesu technologicznego), b) instytutu resortowego opracowującego proces technologiczny na podstawie danych naukowych, c) instytutu badań podstawowych — w naszym przypadku ośrodka biochemicznego — którego zadanie polega na poszukiwaniu nowych faktów naukowych. Praktyka podjąć może wyniki działalności naukowej, jeśli nauka dostarczy praktyce nie tylko przydatnych obserwacji i faktów, ale opracowany proces półtechniczny produkcji oraz zorganizowaną bazę surowcową. Instytuty teoretyczno-badawcze nie są zdolne do doprowadzenia wyników swej działalności do takiej właśnie postaci i dlatego rolą instytutów resortowych jest pośrednictwo między laboratorium teoretycznym i halą produkcyjną. Niestety, pion pośredni, pion instytutów resortowych, pracuje żywiołowo bez uświadomienia sobie tej roli. Sieć dobrze pracujących instytutów resortowych, powiązanych z jednej strony z placówkami badań podstawowych, a z drugiej z produkcją, jest zagadnieniem o państwowym znaczeniu, niezwykle ważnym dla postępu technicznego naszej produkcji i dla podnoszenia jakości tej produkcji i obniżenia jej kosztów. Omówiliśmy szerzej te wnioski, gdyż winny one w przyszłości wpłynąć na zakres pracy Komitetu.

Dotychczas omówione formy działania Komitetu będą wymagać zmiany, gdy konieczność rozszerzenia i nasilenia prac Komitetu pociągnie za sobą zwiększenie udziału w działalności Komitetu wszystkich jego członków. Nowe formy były niejednokrotnie przedmiotem dyskusji. Projekty szły w dwóch zasadniczych kierunkach.

Pierwszy kierunek omawiany na dwudziestym trzecim zebraniu plenarnym 9.XII.1954 przewidywałby wydzielenie z agend Komitetu czterech grup zagadnień i przydział ich czterem komisjom. Pierwszą z nich była by istniejąca Komisja Biochemii Klinicznej, będąca w pewnym sensie dziedzictwem po Komisji Biochemicznej Ministerstwa Zdrowia. Drugą Komisją była by Komisja Historii Biochemii. Trzecią Komisją była by komisja aparaturowa reprezentująca interesy biochemii polskiej w zakresie aparatury na terenie PAN, a gdyby zasza potrzeba także i na terenie innych resortów. Czwartą komisją była by komisja Szkoleniowo-kadrowa która prowadziła by zagadnienie studium aspiranckiego w zakresie biochemii, oraz przystąpiła by do opracowania kierunków kształcenia asystentów. Prezydium Komitetu — zgodnie z projektem — koordynowało by prace poszczególnych Komisji, prowadziło by referat wydawnictw Komitetu i programów wydawniczych, a poza tym referowało by zagadnienia planowania kierunków badań na plenarnych zebraniach Komitetu. Ponadto Prezydium wykonywało by obowiązki Komitetu wobec Unii przygotowując materiał na plenarne zebrania. Takie ujęcie prac Komitetu pozwoliło by na rzadsze organizowanie zebrań plenarnych bez obniżenia aktywności. Każda z komisji miała by prawo dokooptować z poza Komitetu tych biochemików, których udział stanowiłby pomoc w pracach Komisji, przez co powiązanie ogółu biochemików polskich z pracami Komitetu uległoby dalszemu wzmocnieniu.

Drugi kierunek nowych form działalności Komitetu to oparcie i skoordynowanie tej działalności z Polskim Towarzystwem Biochemicznym. Projekt statutu tego towarzystwa przedyskutowany na trzydziestym czwartym posiedzeniu plenarnym Komitetu w dniu 28.VI.1957 roku mówi, że dla osiągnięcia swych celów to znaczy dla popierania rozwoju biochemii i jej popularyzacji w społeczeństwie Towarzystwo:

A) organizuje zjazdy, konkursy, zebrania naukowe i dyskusje, odczyty, wykłady i kursy,

B) inicjuje lub wydaje czasopisma naukowe, książki i broszury z dziedziny biochemii i jej zastosowania,

C) opiniuje o stanie i potrzebach biochemii polskiej i występuje w jej sprawach wobec władz,

D) utrzymuje łączność z pokrewnymi stowarzyszeniami w kraju i za granicą,

E) zabiega i korzysta w subwencji władz i instytucji publicznych na poszczególne cele PTBioch.,

F) powołuje spośród swych członków komisje do wykonywania poszczególnych zadań.

Z powyższego zestawienia wynika wyraźnie możliwość powiązania działalności Komitetu z działalnością Towarzystwa. Szczegóły organizacyjne wymagają opracowania. Nie ulega jednak wątpliwości, iż ten drugi kierunek oparty na wybieralnych władzach Towarzystwa jest bardziej demokratyczny i lepiej odpowiada chwili obecnej.

3. Zagadnienia finansowe Komitetu

Budżet Komitetu składa się z dwóch części: wydatków własnych, to znaczy z kosztów delegacji na różne rodzaje zebrań, i z kosztów sekretariatu oraz wydatków związanych z dotowaniem przez Komitet prac uznanych za ważne. Na swym pierwszym zebraniu uznano za ważne następujące kierunki badań biochemicznych:

- a) biochemia nowotworów,
- b) biochemia wirusów,
- c) biochemia drobnoustrojów chorobotwórczych, glebowych, mających znaczenie przemysłowe oraz pleśni (antybiotyki),
- d) biochemia mięśnia,
- e) biochemia kliniczna,
- f) biochemia owadów,
- g) biochemia stadialnego rozwoju roślin i zwierząt,
- h) biochemia procesu jarowizacji i krzyżówek wegetatywnych,
- i) biochemia herbicydów i insektycydów,
- j) symbioza bakterii brodawkowych z roślinami motylkowymi,
- k) pierwiastki śladowe.

Z dotacji w 1953 roku skorzystało 14 ośrodków biochemicznych z Poznania (Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Zakład Chemii Organicznej AM, Zakład Mikrobiologii WSR, oraz Pracownia biochemiczna Zakładu Chemii Organicznej Un. Poznańskiego), Wrocławia (Zakład Chemii Fizjologicznej AM) Lublina (Zakład Chemii Fizjologicznej AM), Łodzi (Zakład Chemii Fizjologicznej AM i Zakład Chemii Fizjologicznej UŁ), Warszawy (Zakład Chemii Ogólnej AM, Zakład Chemii Fizjologicznej Wydz. Weterynarii SGGW, Dział Biochemii PZH, Oddział Biochemii Instytutu Gruźlicy), Rokitnicy (Zakład Chemii Fizjologicznej Śląskiej AM), Krakowie (Zakład Chemii Fizjologicznej AM). Ogólna suma dotacji wyniosła około 450 tysięcy złotych. Sprawozdanie z prac

dotowanych złożyły ośrodki dnia 21 marca 1954 roku w Warszawie. Sesja sprawozdawcza wykazała, że tematykę dotowaną należy zwięzić. Na rok 1954 Komitet wybrał i przekazał ośrodkom w terenie następujące problemy biochemiczne uznane za najważniejsze:

a) biochemia białek z uwzględnieniem nukleoproteidów,

b) biochemia ewolucyjna (problem ten potraktowano jako długo-falowy, a w 1954 roku wskazano na tematy z zakresu biochemii ewolucyjnej drobnoustrojów i owadów),

c) aspekt biochemiczny bazy żywnościowej państwa.

Dotacje na rok 1954 wyniosły sumę 312 tysięcy złotych. Tyczyły one prócz ośrodków dotowanych w 1953 roku jeszcze Gdańska (Zakład Chemii Fizjologicznej AM i Oddział Biochemii Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej); w Poznaniu počęto dotować Pracownię Fizjologii Porównawczej Zakładu Zoologii Ogólnej UP. Ośrodek w Rokitnicy w 1954 nie był dotowany.

W roku 1955 Komitet akceptował dotowanie 24 tematów wykonywanych w 10 ośrodkach badawczych na ogólną sumę 245 tysięcy złotych. Tematyka dotowana to:

a) białka biologicznie czynne,

b) fizjologiczne i biochemiczne prawidłowości rozwoju mikroorganizmów, ich eksperymentalna zmienność i selekcja,

c) biologia nowotworów,

d) biologia wirusów i choroby wirusowe,

e) naukowe podstawy żywienia zbiorowego,

f) antybiotyki,

g) tematyka różna o znaczeniu metodycznym.

Dotacje w 1956 roku objęły kwotę 163 tysięcy złotych, przekazaną 11 ośrodkom (21 tematów) pracującym w zakresie biochemii klinicznej, przemiany drobnoustrojów, witaminologii, biochemii porównawczej, nukleoproteidów, enzymologii ogólnej, antybiotyków i aspektów biochemicznych bazy żywnościowej.

W roku 1957 wydano 179 tysięcy złotych na dotacje dla 14 ośrodków (nowymi ośrodkami tutaj to Katedra Technologii Rolnej WSR Poznań, Katedra Chemii Organicznej UW w Warszawie, oraz Centralne Laboratorium Kliniczne AM Lublin). Tematyka dotowana tyczyła biochemii klinicznej przemiany drobnoustrojów, witaminologii, nukleoproteidów, antybiotyków, bazy żywieniowej, enzymologii ogólnej, oraz biochemii systemu nerwowego. Szczegółowy przegląd trzech pierwszych sesji sprawozdawczych Komitetu Biochemicznego opublikowany został w „Postęпах Biochemii”. O czwartej sesji sprawozdawczej donosi bieżący numer „Postępow Biochemii”.

Cyfry podane tutaj dowodzą zmniejszania ogólnych sum dotacji. Zmniejszanie to szło równoległe z rozwojem placówek własnych PAN. Odnośnie dotacji Komitet wprowadził zasadę, że z akcji subwencjonowania wyjęte są nie tylko placówki własne PAN, ale i placówki obce kierowane przez pracowników PAN.

W okresie sprawozdawczym Komitet korzystał z funduszy dewizowych Wydziału II dla przeszkolenia biochemików w zakresie metodyki biochemicznej przy użyciu izotopów. Z dotacji przyznanych na wniosek Komitetu Biochemicznego na powyższy cel korzystali: prof. dr T. Baranowski, prof. dr I. Reifer, prof. dr B. Skarżyński, doc. dr J. Meduski, dr S. Karpiak, k. n. J. Brahms, mgr. T. Szczepkowski, mgr. P. Szafranski i mgr. L. Wierzbowski.

4. Specjalność „biochemik” w Polsce

Komitet Biochemiczny przeprowadził ankietę w terenie, by zorientować się ilu specjalistów biochemików potrzeba obecnie w Polsce. Okazało się, iż w chwili obecnej potrzeba w kraju około jednego tysiąca biochemików. Na wkład biochemików czekają nauki medyczne i praktyka służby zdrowia, czeka rolnictwo i hodowla oraz związane z nimi gałęzie przemysłu, czekają zakłady Ministerstwa Szkół Wyższych, gdyż biochemia nie zajmuje dotychczas należnego jej miejsca w kształceniu przyrodników w szerokim rozumieniu tego słowa.

W tej sytuacji należało obmyślić drogi wiodące do nasycenia zapotrzebowania krajowego na biochemików. Drogą taką mogła być rozbudowa powstałego w maju 1954 roku Zakładu Biochemii PAN (obecnie Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN). Niestety warunki lokalowe uniemożliwiły to. Drugą drogą ma być zorganizowanie studiów specjalistycznych w zakresie biochemii na Wydziałach Biologii i Nauki o Ziemi uniwersytetów. W chwili obecnej studia takie zainicjowano w Łodzi i w Warszawie. Na swym VII zebraniu plenarnym (28.I.1953) Komitet uchwalił zwrócić się do PKPG o włączenie biochemii jako odrębnej specjalności do kierunku biologicznego. Pozytywna decyzja PKPG umożliwiła dalsze kroki zmierzające do powstania studiów biochemicznych. Dopiero 8 października 1956 roku konferencja zespołu rzeczoznawców biologii Rady Głównej w sprawie planów studiów dla II, III, IV, i V roku zdecydowała programy specjalizacji biochemii, fizjologii i mikrobiologii. Umożliwiło to stopniowe wprowadzenie programu szkolenia biochemików wspomnianego wyżej w Warszawie i Łodzi. Na przeszkodzie pełnemu rozwojowi studiów stoją warunki lokalowe i kadrowe uczelni.

Dotychczasowa praca ośrodków szkolących biochemików nie prowadzi do nasycenia zapotrzebowania krajowego na pracowników naukowych tej specjalności. Życie wymaga obsadzenia istniejących i powołania nowych katedr; powstania szeregu zakładów biochemii stosowanej np. biochemii fermentacji przemysłowych, biochemii mikroorganizmów, biochemii zwierząt hodowlanych, biochemii genetycznej, czy innych. Zrozumienie sytuacji biochemii, pomoc PAN i zainteresowanych resortów, oraz duży wysiłek czynnych biochemików może powoli poprawić złą sytuację biochemii.

Prócz sprawy kształcenia biochemików drogą aspirantur, drogą studium biochemicznego Komitet wystąpił do PAN o ustanowienie dorocznych nagród naukowych im. Marcelego Nenckiego dla biochemików polskich za oryginalne — doświadczenia lub teoretyczne — prace z dziedziny biochemii, lub za prace z historii biochemii polskiej opublikowane w polskich czasopiśmiech, lub innych wydawnictwach naukowych. Regulamin tych nagród opublikowany będzie w „Postęпах Biochemii”. Rozwojowi biochemii towarzyszyć winna popularyzacja tej dziedziny wiedzy wśród społeczeństwa. Komitet Biochemiczny zobowiązał swoich członków do brania udziału w akcjach popularyzacyjnych organizowanych przez Towarzystwo Wiedzy Powzechnej, czy Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika.

5. Sprawy wydawnicze Komitetu

Już na swym drugim posiedzeniu plenarnym w dniu 5.VI.1952 roku Komitet stwierdził, że w obecnym etapie rozwojowym biochemia polska winna posiadać do swej dyspozycji wyłącznej dwa czasopisma:

a) czasopismo, które by zamieszczało opracowania monograficzne poszczególnych zagadnień, referaty przeglądowe, oraz wyniki sympozjów biochemicznych, sprawoz-

dań pokongresowych i aktualności biochemiczne. Głównym celem takiego czasopisma to współdziałanie w szkoleniu kadr młodych biochemików.

b) czasopismo, w którym ukazywały by się bieżące publikacje doświadczalne wszystkich polskich placówek biochemicznych. Publikacje winny posiadać streszczenia w językach kongresowych. Czasopismo to powinno również zawierać dział krótkich doniesień, które w paru wierszach informowały by ogół biochemików o bieżących postępach prac doświadczalnych.

Czasopisma takie powstały. Pierwsze — przeglądowe — otrzymało nazwę „Postępy Biochemii”. Pierwsze dwa numery wydało PZWL. Następne — PWN. W chwili obecnej oprócz dwu numerów wydanych w PZWL-u ukazał się zeszyt trzeci tomu trzeciego „Postępów Biochemii”. W chwili obecnej czasopismo redaguje zespół: prof. Heller, i doc. Meduski. Sekretarzem redakcji jest dr Piechowska.

Drugie czasopismo z pracami oryginalnymi powstało również pod nazwą „Acta Biochimica Polonica”. W chwili obecnej ukazał się już zeszyt drugi tomu czwartego. Zespół redakcyjny w chwili obecnej to: prof. Mozłowski, prof. Mochnačka i prof. Korzybski.

Oba czasopisma zyskały sobie dużą popularność w Polsce i poza jej granicami. Są one referowane przez najpoważniejsze czasopisma streszczeniowe i uwzględniane w przeglądach bibliograficznych.

Prócz własnych czasopism Komitet Biochemiczny inicjuje i opiekuje się wydawnictwami książkowymi z dziedziny biochemii. Przegląd akcji wydawniczej Komitetu w zakresie podręczników i dzieł biochemicznych zamieszczają „Postępy Biochemii”.

Ostatnio wychodzi cykl tłumaczeń, stosunek Komitetu do których wyraża się formułą: „tłumaczono z inicjatywy i pod opieką Komitetu Biochemicznego PAN”. Z cyklu tego ukazały się książki Bladergoena, o kinetyce procesów biologicznych, Pipera: „Analiza gleby i roślin”, w druku są książki Baldwina o biochemii dynamicznej, Manra o biochemii nasienia, oraz Haldane o biochemii genetycznej. Pierwsze dwie wydało Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Pozostałe przygotowuje PWRiL. Zamierzenia Komitetu w dziedzinie wydawniczej idą — prócz kontynuacji dotychczasowej akcji — w trzech kierunkach. Komitet rozważa stworzenie cyklu oryginalnych monografii biochemicznych, zamierza wydawać zeszyty metodyczne „Postępów Biochemii” poświęcone szczegółowemu opisowi bardziej złożonych technik biochemicznych, a wreszcie zamierza wydawać przy „Postępach Biochemii” zeszyty klasyków biochemii polskiej gdzie by drukowano interesujące wyjątki ze światowego dorobku klasyków biochemii polskiej.

Sprawą ściśle związaną z akcją wydawniczą Komitetu jest zagadnienie polskiego słownictwa biochemicznego. W czasie swej pracy Komitet zajmował nieraz stanowisko w sprawach słownictwa. Opracował np. słownictwo aminokwasów, peptydów i białek dla Komitetu Normalizacyjnego. Przedstawiciele Komitetu brali udział w pracach komisji słownictwa biologicznego. Na szczegółowsze jednak opracowanie zasługuje całokształt zagadnienia. Prace słownikowe będą zmierzać do powstania Polskiego Słownika Biochemicznego.

Sytuacja jest o tyle utrudniona, że słownictwo biochemiczne musi się opierać o ustaloną klasyfikację, ta zaś w dziedzinie biochemii jest jeszcze przedmiotem rozważań powołanego w tym celu międzynarodowego ciała.

6. Komitet, a polskie placówki biochemiczne

W chwili powstania członkowie Komitetu reprezentowali prawie wszystkie czynne ośrodki biochemiczne i dlatego Komitet mógł uważać się nie za instytucję nadrzędną wobec polskich placówek biochemicznych, a za rodzaj autonomicznej rady naukowej ogółu czynnych warsztatów. W związku z tym w pierwszych miesiącach swego istnienia Komitet szczegółowo zajmował się analizą tematyki wykonywanej przez poszczególne ośrodki, podejmował wizytacje pracowni itp.

Postawa taka była wówczas potrzebna, bo niektóre ośrodki badawcze ulegały lokalnym czynnikom spychającym je w kierunku ściśle użytkowym, a nawet „wyrobniczym”.

Obecnie akcja dotacyjna i sesje sprawozdawcze są główną formą kontaktu Komitetu z placówkami biochemicznymi. Powstanie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego utworzy mocną więź organizacyjną nie tylko między Komitetem a laboratoriami, lecz także między placówkami.

Nie rozwiązana do chwili obecnej sprawą jest poruszany już w niniejszym sprawozdaniu stosunek placówek biochemicznych do resortowych instytutów naukowo-badawczych. Konferencja problemowa Komitetu Biochemicznego pod tytułem „Biochemia a baza żywienia” wskazała na szereg możliwości badań naukowo-teoretycznych i naukowo-technicznych a także badań praktycznych. Badania pierwszego rodzaju to np. studia nad chlorellą, nad depolimeryzacją enzymatyczną bionnika, nad fermentacją metanowo-octową, nad fermentacjami wyższych alkoholi, czy nad tyrozinazą. Tematykę wysuniętą przekazuje się zainteresowanym komitetom naukowym PAN. To samo winno się odnosić do problematyki badań naukowo-technicznych związanych z tematyką konferencji. Wymienimy przykładowo zagadnienie fermentacji cytrynowej i acetonowo-butanolowej, badania nad zastosowaniem amylazy pleśniowej do procesów scukrzenia, studia nad polepszeniem wykorzystywania ziemniaka, wywaru melasowego, drożdży browarnianych, trocin i innych odpadków roślinnych. Niestety powiązania Komitetu z resortami nie gwarantowały przenoszenia wyników konferencji do prac resortowych. Zadaniem Komitetu jest takie zorganizowanie współpracy z odpowiednimi resortami (oczywiście uwzględniając działalność Wydziałów PAN) by placówki biochemiczne miały łatwy kontakt z odpowiednimi placówkami resortowymi.

Omówiliśmy dokładniej sprawy wiążące się z konferencją problemową o bazie żywienia, gdyż nasunęła ona ogólne postulaty organizacyjne.

Już na trzecim zebraniu plenarnym odbytym 19.IX.1952 roku Komitet postanowił objąć ankietą zawodową wszystkich biochemików polskich. Sporządzona na podstawie tej ankiety kartoteka jest uzupełniana i pozwala orientować się w możliwościach kadrowych biochemii polskiej. Kartoteka wykazała deficytowe gałęzie biochemii.

Dziedziny takie, w których istnieją braki kadrowe to: biochemia weterynaryjna, biochemia genetyczna, embriochemia, biochemia parazytologiczna, fermentacje przemysłowe, że wymienimy pozycje najjaskrawsze. Poprawa sytuacji pod tym względem jest zadaniem bieżącym Komitetu.

Niewątpliwym osiągnięciem Komitetu w omawianym obecnie zakresie jest opublikowanie w zeszycie drugim tomu trzeciego 1957 rok. „Postępów Biochemii” Materiałów do Rozwoju Biochemii Polskiej w okresie pierwszego pięciolecia Komitetu Biochemicznego. Materiały te są najlepszą ilustracją niniejszego sprawozdania, a wykaz publikacji biochemicznych w tym okresie stanowi pierwszą próbę polskiej bibliografii biochemicznej.

7. Współpraca Komitetu z innymi specjalnościami

Biochemia, jej metodyka i sposób ujmowania zagadnień jest nieuchronnym etapem rozwojowym dyscyplin doświadczalnych zajmujących się przyrodą żywą. Jednym z wniosków tej sytuacji jest znaczenie biochemii dla fizjologii zwierząt i roślin, medycyny, czy mikrobiologii. Stąd usiłowania Komitetu nawiązania ścisłej współpracy z tymi specjalnościami. W 1953 roku Komitet delegował jednego ze swych członków na odbywającą się w Warszawie (23 i 24 II) roboczą konferencję fizjologów roślin. Komitet zaproponował fizjologom roślin współudział w organizacji sympozjum poświęconego biochemii roślin. Sympozjum takie odbyło się, nie przyniosło ono jednak systematycznej współpracy obu specjalności. Komitet bierze dotychczas udział we wszystkich zjazdach Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego. Systematycznej współpracy z fizjologami zwierząt i człowieka nie ma jednak. Najlepiej może przebiegać współpraca z mikrobiologami. Udział biochemików w konferencjach mikrobiologicznych oraz w zjazdach Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego jest dobrym punktem wyjścia dla dalszej współpracy. Organizacja studiów biochemicznych i powiązanie ich na pierwszych latach ze studiami mikrobiologicznymi i fizjologicznymi współpracę tę zacieśni. Dobrze rozwija się współpraca z naukami medycznymi.

Komitet nasz oddawna dostrzega brak kontaktu z Komitetem Nauk Chemicznych Wydziału III PAN. Chemicy i biochemicy współpracują ściśle na arenie międzynarodowej. W 1955 roku w Brukseli żywa inicjatywa chemików doprowadziła do powstania ciała koordynującego działalność Unii Biochemicznej i Unii Chemii Czystej i Stosowanej. W Polsce w tej chwili żadnych takich powiązań nie ma. Chemicy nie wykazują zainteresowania dla koordynacji poczynań z biochemikami.

Być może, iż powołanie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pozwoli na systematyczniejszą współpracę biochemików polskich z innymi specjalnościami.

Należy tu stwierdzić, iż formy organizacyjne Polskiej Akademii Nauk nie sprzyjają ściślejszej i bezpośredniej współpracy Komitetów Naukowych PAN. W ciągu pięciu ubiegłych lat ani razu np. nie obyło się wspólne zebranie aktywów Komitetów Naukowych na terenie II Wydziału PAN. Zebrania takie pomogły by uniknąć wielotorowości w pracy i osiągnąć lepsze współdziałanie.

Przykładem współpracy Komitetu z innymi specjalnościami była sprawa zastosowania izotopów do prac badawczych w naukach biologicznych. Na dwudziestym ósmym posiedzeniu plenarnym w dniu 25.IX.55 r. Komitet Biochemiczny wyraził gotowość podjęcia odpowiedzialności za organizację badań izotopowych w zakresie nauk przyrodniczych w ramach II Wydziału PAN. Komitet zwrócił wówczas uwagę na zupełny brak przeszkolonych kadr i całkowity brak wyposażenia technicznego i podkreślił, że poziom badań w niektórych dyscyplinach nauk przyrodniczych, a zwłaszcza w biochemii umożliwiał już wówczas wprowadzenie metody izotopowej do tematyki bieżącej. Wówczas również Komitet wskazał na szereg warunków umożliwiających wprowadzenie metody izotopowej.

W wyniku tej oferty Prezydium PAN powzięło uchwałę podaną do wiadomości Walnego Zgromadzenia PAN nakładającą na Komitet Biochemiczny obowiązek wdrożenia metod izotopowych w całej biologii. Niestety, prócz uzyskania kilku stypendiów zagranicznych do systematyczniejszej realizacji propozycji Komitetu i uchwały Prezydium PAN nie doszło. Kontaktowanie się ośrodków powołanych przez Rząd do zajęcia się metodyką izotopową z Komitetem Biochemicznym również nie jest zbyt ściśle. Postulowane przez nas spotkania aktywów Komitetów Naukowych mogło by w tym i podobnych przypadkach wiele pomóc.

8. Kontakty naukowe z zagranicą

Biochemia polska brała udział w pierwszym, drugim i trzecim Międzynarodowych Kongresach Biochemików. Po kongresie Brukselskim Polska stała się członkiem Międzynarodowej Unii Biochemicznej, o czym już obszernie była mowa. Nawiązano ściśle kontakty z biochemią Związku Radzieckiego (symposium o pochodzeniu życia w Moskwie w lecie 1957), Stanów Zjednoczonych (wizyta Przewodniczącego Komitetu, oraz Prof. Baranowskiego w USA), z biochemią krajów zachodnio-europejskich oraz Węgier i Czechosłowacji. Nie mamy w chwili obecnej bezpośrednich kontaktów z biochemią krajów azjatyckich.

W Polsce przebywało na zaproszenie Komitetu Biochemicznego wielu wybitnych Biochemików zagranicznych (jak np. laureat Nagrody Nobla prof. Syngge, prof. Fraenkel - Conrat, prof. Schramm, prof. Cook, prof. Theorell, czy inni). Nawiązano już współpracę doświadczalną polskich biochemików z biochemikami angielskimi, radzieckimi, amerykańskimi, czeskimi, francuskimi. Istnieją dane, aby sądzić, że współpraca ta ożywiać się będzie nadal i pomoże Komitetowi w systematycznym kształceniu kadr biochemików polskich.

IV. Sesja sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego

IV sesja objęła sprawozdania z tematyki dotowanej w r. 1956 i częściowo w roku bieżącym. Odbyła się ona w Poznaniu w dniach od 6 do 7 października. Obrady utworzył przewodniczący Komitetu prof. dr J. Heller. Posiedzeniom przewodniczyli prof. dr Z. Stolzmann i prof. dr I. Reifer. W sesji brało udział ok. 60 pracowników naukowych z 14 ośrodków. Dotacje w r. 1956 wyniosły 163 tys. zł., a w r. 1957 — 179 tys. zł.

W pierwszym dniu obrad zgłoszono następujące sprawozdania:

1. Prof. dr T. Baranowski złożył sprawozdanie z prac wykonywanych w Dziale Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Opracowywano:

a) zagadnienia dotyczące grup M i N, metod ich wydzielenia i określania ich aktywności.

b) temat dotyczący enterotoksyny gronkowcowej (praca w tym zakresie została przerwana).

c) badania nad antymetabolitami zbliżonymi do glutationu.

W dyskusji nad sprawozdaniem głos zabrali doc. Meduski i doc. Borowski poruszając sprawę obliczania ruchliwości elektroforetycznych substancji grupowych w elektroforezie strefowej oraz przeprowadzanie doświadczeń antymetabolitami grupowymi w sztucznych układach.

2. Doc. dr W. Ostrowski wygłosił sprawozdanie w imieniu nieobecnego na sesji prof. dr. B. Skarżyńskiego z prac wykonywanych przez Zakład Chemii Fizjologicznej w Krakowie. Omówił:

a) mechanizm wiązania witaminu B₁₂ z białkami,

b) przemianę siarki w samożywnych bakteriach siarkowych przy użyciu ³⁵S.

W dyskusji głos zabierali prof. Pawełkiewicz oraz prof. Chmielewska. Poruszono sprawę biosyntezy witaminu B₁₂ oraz radioaktywności związków omawianych w temacie b.

3. Lek. R. Niemiro z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku zdał sprawozdanie z pracy wykonywanej pod kierunkiem prof. dr. W. Mozołowskiego na temat próby chromatograficznego rozdziału związków wapniowych ultrafiltratu osocza krwi.

W dyskusji głos zabierali prof. Reifer, prof. Opieńska - Blauth oraz prof. Chmielewska. Omówiła czułość reakcji, odtwarzalność wyników oraz konieczność zachowania warunków doświadczenia.

4. Z kolei sprawozdanie złożył Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Łodzi pracujący pod kierunkiem prof. dr Br. Filipowicza. Po ogólnym wprowadzeniu kierownika Zakładu referowano szczegółowo:

a) lek. H. Panusz próby izolowania dezoksyrybonukleazy z grasicy cielęcej oraz badanie jej aktywności.

b) lek. B. Skoczylas mówił o otrzymywaniu wysokopolimeryzowanej soli sodowej kwasu dezoksyrybonukleinowego.

c) lek. A. Brzeziński mówił o przemianie węglowodanowej w mięśniu sercowym.

W dyskusji głos zabierał prof. Heller i doc. Meduski. Poruszono stosowanie lecznicze tiaminy w intoksykacjach mięśnia sercowego zamiast używanej ko-karboxylazy oraz układy metodyczne dogodne dla badania wpływu toksyn bakteryjnych na mięsień sercowy.

5. Prof. dr I. Chmielewska z Katedry Chemii Organ. U. W. mówiła o metabolizmie azotowym u ludzi zdrowych po podaniu dożylnym enzymatycznego hydrolizatu białka krwi bydłowej. Referowane przez nią badania są dalszym ciągiem pracy rozpoczętej w 1950 r. nad metabolizmem azotowym u ludzi po podaniu dożylnym hydrolizatu białka krwi bydłowej. Prace prowadzone były przez dr. Krystynę Belżecką i dr. Konstancję Raczyńską - Bojanowską z Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Warszawie przez doc. dr. Jerzego Manickiego z II Kliniki Chirurgicznej AM w Warszawie oraz przez referentkę z Katedry Chemii Organicznej UW.

W dyskusji głos zabrał prof. Stolzmann zapytując o sposób uzyskiwania hydrolizatów oraz ich sterylizacji.

W drugim dniu obrad sprawozdanie złożył Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Lublinie.

6. Prof. dr J. Opieńska - Blauth wygłosiła referat ogólny syntetyczny z prac wykonywanych w Zakładzie Chemii Fizjologicznej w Lublinie.

a) dr M. Szymona mówiła o fosforylacji glikozy przez metafosforany u *Mycobacteria*,

b) lek. I. Madecka - Borkowska mówiła o zmianach biochemicznych pałeczki okrężnicy pod wpływem inhibitora.

c) mgr. O. Sakławska - Szymonowa mówiła o transaminacjach aminokwasów zasadowych.

d) mgr. E. Gąsior referował przystosowanie żywie jonowymiennych sulfenolowych do odsalania materiału biologicznego w analizie chromatograficznej aminokwasów.

e) prof. Opieńska - Blauth poddała krytycznej ocenie testy barwne na aminokwasy w analizie chromatograficznej na podstawie badań własnych i modyfikacje własne w metodyce analizy chromatograficznej aminokwasów.

W dyskusji głos zabierali prof. Heller, prof. Filipowicz, doc. Smockiewiczowa, prof. Pawełekiewicz, prof. Reifer. Omówiono sprawę słownictwa w pracy dr. Szymony, zagadnienie stosownej techniki chromatograficznej oraz rozdzielenia na żywicy związków biorących udział w cyklu ornitynowym.

7. Doc. dr E. Borowski z Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku omówił postępy badań nad antybiotykiem tetainą wykonywanych w Pracowni Biochemicznej tego Instytutu.

W dyskusji prof. Opieńska - Blauth poruszyła sprawę organizacji kursu chromatografii planowanego w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku w kierunku udostępnienia go pracownikom spoza Gdańska. Realizacja projektu możliwa jest dopiero po powrocie doc., Borowskiego ze Stanów Zjednoczonych.

8. Prof. dr J. Pawełekiewicz z Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu wygłosił sprawozdanie z pracy o wytwarzaniu cyjanokobalamin przez *Corynebact. Diphtheriae*.

9. Mgr Pędziwiłk wygłosił w imieniu prof. dr. J. Janickiego kierownika Zakładu Technologii Rolnej WSR sprawozdanie z prac wykonywanych przez Zakład na następujące tematy:

- a) wpływ kiełkowania na występowanie witaminu B₁₂ w nasionach roślin motylkowych,
- b) wpływ sulfatiazolu na biosyntezę witaminów z grupy B₁₂ przez *Propionibact. shermanii*.
- c) wpływ jonów metali Co, Cu, Mn na biosyntezę syjanokobalaminy przez *Propionibact. shermanii*.
- d) wpływ różnych wartości pH podłoża na wydajność cyjanokobalaminy przez *Propionibact. shermanii*.

10. Dr J. Michejda z Zakładu Zoologii Ogólnej UAM w Poznaniu zdał sprawozdanie z następujących tematów wykonywanych w Zakładzie:

- a) polarograficzna metoda badania oddychania zwierząt wodnych,
- b) wpływ wartości osmotycznych na oddychanie żyworodki,
- c) fosforylacja tlenowa u ślimaka.

11. Doc. dr J. Meduski złożył sprawozdanie z prac na temat toksyny alfa, czyli fosfolipazy C pałeczki zgorzeli gazowej. Prace wykonywano w Pracowni Przemiany Pośredniej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie, oraz w Zakładzie Biochemii im. Bacha w Moskwie, a także w Zakładzie Biochemii ANM ZSRR w Moskwie. W badaniach współdziałali mgr J. Zbrożyna, dr A. Zakrzewska, mgr D. Olkowska, mgr B. Orłowska i O. Klahr. W Moskwie współdziałali kand. nauk W. D. Uspienska ja i kand. nauk M. S. Wołkova.

- a) Badania elektroforetyczne w bloku skrobiowym nad fosfolipazą C,
- b) Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego fosfolipazy C przy pomocy inaktywacji promieniami gamma.
- c) O nowej metodzie oznaczania aktywności fosfolipazy C opartej na teście lecyto-witelinowym.

12. Doc. dr L. Diałoszyński z Zakładu Fizjologii Zwierząt WSR w Poznaniu omówił prace nad wpływem obciążenia niektórymi truciznami na aktywność sulfatazy aryłowej narządów myszy.

13. Mgr E. Sempńska w imieniu prof. dr A. Dmochowskiego z Zakładu Biochemii UŁ złożyła sprawozdanie z badań:

- a) nad kwasami nukleinowymi i nukleoproteidami łusek łuszczyca oraz
- b) nad nową metodą oznaczania pirymidyn.
- c) mgr Walter z tego samego Zakładu mówiła o badaniach nad kwasami nukleinowymi trzustki.

W czasie trwania sesji sprawozdawczej prof. dr W. Niemierko przedstawił zebranym sprawę organizacji Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Na zebraniu członków założycieli Towarzystwa wybrano zarząd w składzie: prof. dr W. Niemierko — przewodniczący, prof. dr I. Reifer — z-ca przewodniczącego, prof. dr T. Korzybski, prof. dr B. Filipowicz oraz prof. dr Z. Stolzman — członkowie Zarządu. Zadaniem nowego Zarządu jest rejestracja Towarzystwa, werbowanie członków i zwołanie walnego zebrania.

VII Krajowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego

W październiku br. w dniach od 16 do 19, odbył się w Warszawie w salach Pałacu Kultury i Nauki VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego.

Zgodnie z tradycją posiedzenie plenarne w ostatnim dniu zjazdu poświęcone było pamięci jednego z wielkich polskich fizjologów — profesora Adolfa Becka. Podstawową tematyką Zjazdu była fizjologia układu nerwowego i fizjologia wstrząsu. Te zagadnienia omawiano w referatach plenarnych w 1-ym i 3-im dniu Zjazdu, oraz w szeregu komunikatów w sekcjach. Na drugim posiedzeniu plenarnym ogłoszono referat na temat antymetabolitów.

Poza referatami plenarnymi, na Zjeździe wygłoszono 245 komunikatów, z czego 57 biochemicznych.

Obradowano w kilku sekcjach, których tematykę ułożono według omawianych zagadnień z zakresu:

- 1) fizjologii (układ nerwowy, oddychanie i trawienie, krew i układ sercowo-naczyniowy, fizjologia zwierząt hodowlanych, hipotermia),
- 2) biochemii (enzymy, nukleotydy i biochemia owadów),
- 3) farmakologii.

Przedmiotem licznych komunikatów była metodyka biochemiczna, farmakologiczna i fizjologiczna.

Zarówno po referatach programowych, jak i po komunikatach wywiązywała się dyskusja — często bardzo ożywiona.

W ostatnim dniu Zjazdu odbyły się demonstracje zabiegów doświadczalnych w warszawskich zakładach naukowych, oraz wyświetlane były filmy naukowe.

W obradach wzięło udział kilku gości zagranicznych: Prof. Anochin, z ZSRR, który wygłosił referat o roli i czynności układu siateczkowego (formatio reticularis), prof. Laborit, z Francji, który wygłosił referat o hipotermii i gospodarce jonowej w ustroju, oraz prof. Anatol z Czechosłowacji.

Obrady z zakresu biochemii podsumował prof. J. Heller. Podkreślił stały rozwój prac biochemicznych w Polsce. Przed 6-oma laty na zjeździe we Wrocławiu przeważały prace metodyczne, przed 3-a laty w Krakowie była już pewna ilość prac problemowych brakło jednak badań z dziedziny enzymatyki i zastosowania izotopów. Obecnie i ta luka została zapełniona, w szeregu dziedzin obserwuje się dalszy postęp — tematyka jest skryształizowana a osiągnięcia bardzo interesujące.

Ogólnego podsumowania obrad dokonał prof. Fr. Czubalski, zwracając uwagę na znaczny wzrost zainteresowania fizjologią i aktywny udział w pracach Zjazdu młodych naukowców.

Streszczenia komunikatów ze Zjazdu wydrukowano w Nr 3 — 3a tomu VIII, Acta Physiologica Polonica 1957. Referaty plenarne i dyskusja po nich mają być zamieszczone w najbliższym numerze tego czasopisma.

Barbara Kozarzewska-Saper

F. M. Burnet — *Enzyme, Antigen and Virus. A Study of Macromolecular Pattern in Action.* Cambridge University Press 1956, stron 194.

Sir Macfarlane Burnet jest autorem dwóch większych prac: „The Production of Antibodies” wydanej w roku 1949 i „Natural History of Infectious Disease” z roku 1952. Obecna praca, podobnie do poprzednich, odznacza się szerokimi horyzontami w przedstawieniu materiału. Jej podtytuł tylko do pewnego stopnia odzwierciedla zakres poruszanych problemów. Perspektywy, jakie daje książka, są znacznie szersze.

Według słów autora wypowiedzianych w przedmowie do omawianej książki praca ta ma być esejem o biologicznej syntezie białka, ma stanowić także ciąg dalszy względnie unowocześnioną formę monografii autora o powstawaniu przeciwciał. Następnym powodem do przygotowania tej pracy było zainteresowanie autora w zagadnieniach genetyki wirusa grupy i roli kwasu rybonukleinowego w tym problemie. Ostatnim wreszcie punktem zainteresowania autora jest karcynogeneza. Wszystkie te główne kierunki omawiane w książce są powiązane ze sobą wspólną myślą zmierzającą do stworzenia ogólnej teorii biologicznej, która by stanowiła analogon do teorii informacji zastosowanej do wytlomaczenia sposobów, jakimi posługują się komórki w przekazywaniu informacji przy powtarzaniu struktur białkowych podczas nowotworzenia białka. Ta wspólna myśl jednoczy ze sobą cztery główne tematy książki. Pewne zastrzeżenie może budzić słowo „antygen” użyte w tytule. Tekst książki sugerowałby raczej umieszczenie słowa „przeciwciało” zamiast „antygen”, lub co najmniej obydwu słów obok siebie.

Książka składa się z czterech rozdziałów głównych i piątego stanowiącego uwagi końcowe i ogólne. Pierwszy rozdział omawia powstawanie indukowanych enzymów u drobnoustrojów na przykładzie przede wszystkim β -galaktozydazy i penicylinyazy. Autor omówił przy tym szczegółowo rolę kwasów nukleinowych ze specjalnym uwzględnieniem zagadnień związanych z mechanizmami przenoszenia informacji z substancji indukującej na powstający enzym. Drugi rozdział stanowi nowoczesny sposób przedstawienia materiału zawartego w poprzedniej pracy autora wydanej wspólnie z Fennerem pt. „The production of Antibodies”. W rozdziale tym autor przeprowadza dyskusję pojęcia „self-marker” przy tworzeniu przeciwciał, zaczerpniętego z poprzedniej pracy, a którego podstawą jest fakt, że te same systemy komórek wchodzi w grę przy usuwaniu zużytych komórek — bez tworzenia przeciwciał — i obcego ustrojowi materiału — z wytworzeniem przeciwciał. W rozdziale tym przedstawiono obszernie dane odnoszące się do nowotworzenia cząsteczek białka przeciwciał. Rola kwasów nukleinowych została w tym rozdziale również szeroko uwzględniona. W trzecim rozdziale omówiono głównie ten rodzaj biosyntezy białka, który następuje przy wzroście nowotworu. I tutaj także zastosowano podobne podejście do zagadnienia uwzględniając teorię „self-marker”, a także rolę kwasów nukleinowych. Czwarty rozdział, o rozmnażaniu się wirusa, jest wynikiem obszernych i mających podstawowe znaczenie doświadczalnych prac autora. Problem ten przedstawiono znowu pod podobnym kątem widzenia. Ostatni wreszcie rozdział zawiera główne fi-

lozoficzno-biologiczne zapatrywania autora na omawiane problemy. Treść tego rozdziału znacznie wybiega poza ramy określone tytułem. Czytelnik znajdzie tam rozważania nad podstawami pracy badawczo-naukowej, nad ogólnymi teoriami biologicznymi i ich znaczeniem. Zdaniem autora do takich ogólnych twierdzeń, które coraz silniej zostają w biologii ugruntowane, należy zapatrywanie, że nowotworzenie białka następuje na cząsteczkach kwasu nukleinowego. Autor analizuje dotychczas stosowane w biologii sposoby podejścia do zagadnień, morfologiczny, fizyczny, i chemiczny. „Biochemicy obecnie tak silnie dominują w biologii, że byłyby nierozsądnym niedocenianie tych osiągnięć uzyskanych w rozmaitych dziedzinach chemii żywej substancji. Wyświetlenie procesów, w których zostaje spalana glikoza, jest arcydziełem eksperymentu i logiki, pozostawia ono nas jednak w głębokiej nieświadomości co do strukturalnej podstawy i funkcjonalnej koordynacji procesów, które zostały wykryte...” (str. 162); poza fizycznym i chemicznym aspektem także i podejście morfologiczne, zdaniem autora, jest konieczne, ale „wydaje się, że usiłowanie zastosowania podejścia morfologicznego, fizycznego i chemicznego dla zrozumienia procesów życiowych osiągnęło już stadium, w którym zyski zmniejszają się w stosunku do wkładanego wysiłku. Zbliżamy się do asymptotycznej bariery i być może niebawem staną się konieczne pewne modyfikacje horyzontów i sposobów podejścia do teoretycznej biologii” (str. 163).

Książka Burneta wywiera na czytelniku duże wrażenie, zapładnia jego myśli, obejmuje bowiem wielkie horyzonty nauk biologicznych, w których autor często brał osobisty, eksperymentalny udział. Wykład jest jasny, układ książki przejrzysty. Drobne przeoczenie przy wykładzie budowy kwasów nukleinowych (str. 22) gdzie podano, że zasady w RNA są związane z drugim, a w DNA z trzecim węglem pentozy, zamiast w obydwu przypadkach, z pierwszym — nie zmieniają faktu, że udokumentowanie też wypowiedzianych przez autora jest na wysokim poziomie.

T. Korzybski

Międzynarodowa Unia Biochemiczna (IUB)

Biuletyn Nr. 2* Listopad 1957

1. Nowi członkowie

Wpłynęło podanie od Bułgarii i zostało przyjęte przez pozostałe państwa należące do IUB. W ten sposób całkowita liczba państw członków IUB wynosi 23.

Ponadto Peru i Szwajcaria zwróciły się z prośbą o informacje w sprawie członkostwa.

2. Międzynarodowe Symposium na temat pochodzenia życia na ziemi, Moskwa 1957

W Moskwie w dniach od 19 do 24 sierpnia 1957 odbyło się pod protektoratem IUB międzynarodowe symposium na temat „Pochodzenie życia na ziemi”, zwołane przez Akademię Nauk ZSSR. Na symposium przybyło około 50 naukowców, głównie biochemików z poza Związku Radzieckiego oraz nieco liczniejsza grupa radzieckich uczonych. Wygłoszone referaty dotyczyły 5 następujących głównych zagadnień:

- a) Zaczątki powstawania na ziemi prostych związków organicznych,
- b) Przekształcanie się pierwotnych związków organicznych na ziemi.
- c) Pochodzenie białek, nukleoproteidów i enzymów.
- d) Pochodzenie struktur i przemian.
- e) Ewolucja przemian.

Akademia Nauk ZSSR wydała w języku angielskim i rosyjskim książkę pt. „Pochodzenie życia na ziemi”, zawierającą sprawozdania z 43 prac przedstawionych na Sympozium. Na zakończenie moskiewskiego Sympozium delegaci przejechali do Leningradu na dwudniowe zwiedzanie instytutów naukowych w tym mieście.

3. Międzynarodowe Symposium na temat chemii enzymów, Tokio 1957

W Tokio i Kioto w dniach od 15 do 23 października 1957 r. odbyło się pod protektorem IUB międzynarodowe symposium na temat chemii enzymów, zorganizowane przez Radę Naukową Japonii przy współudziale uniwersytetów w Tokio i Kioto. Na Sympozium reprezentowanych było 22 państwa; przybyło 108 naukowców z zagranicy oraz ponad 800 badaczy japońskich. Główna tematyka poruszana na Sympozium obejmowała następujące zagadnienia:

- a) Mechanizmy enzymatycznego przenoszenia grup.
- b) Układy enzymatyczne przenoszące wodór, tlen i elektrony.
- c) Synteza białek i enzymów.
- d) Enzymy i przemysł.

* Biuletyn nr 1 został podany w numerze 4/56 *Postępów Biochemii*.

Referaty przedstawione na tym Sympozium będą wydane w tomie „Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry”.

4. IV Międzynarodowy Kongres Biochemiczny

IV międzynarodowy kongres biochemiczny odbędzie się we Wiedniu w dniach od 1 do 6 września, 1958 r. pod przewodnictwem prof. Carla F. Cori. Sekretarzem generalnym kongresu jest prof. O. Hoffman - Ostenhof. Zgodnie z obecnym planem program naukowy obejmować będzie: a) dwa główne wykłady, które wygłosić mają prof. E. Chargaff (Nowy York) i prof. A. E. Braunstein (Moskwa) b) dwanaście pół-dniowych symposiów odbywających się równolegle w ciągu 4 dni, c) cztery półdniowe kolokwia i d) komunikaty i pokazy, zorganizowane w 17 sekcjach. Ponadto zorganizowana będzie wystawa aparatury naukowej, książek biochemicznych i produktów, których wytwarzanie opiera się na badaniach biochemicznych. Projektowane są również imprezy towarzyskie i wycieczki do ciekawych miejsc w okolicy.

5. Komisja enzymatyczna

Prof. A. L. Lehninger zgodził się wejść w skład komisji, powiększając tym samym liczbę członków zwyczajnych do 10.

Zebrań komisji odbyło się w Paryżu w dniu 22 i 23 lipca 1957 r. Przewodniczył prezes komisji dr M. Dixon. Na zebraniu tym postanowiono zaprosić jako członka korespondenta językoznawcę, który pomagałby w zagadnieniach nomenklatury, a szczególnie w zagadnieniach związanych z przyjęciem nowo powstałych nazw. Na propozycję dra Gale'a zgodził się zostać członkiem korespondentem i podjąć tę pracę H. S. Davies, Fellow of St. John's College, Cambridge.

W bieżącym roku przygotowano projekty szeregu uchwał i rozesłano je między członków komisji. Projekty te następnie omawiano na zebraniu w Paryżu, gdzie uzgodniono znaczną ich część oraz powołano podkomisje dla rozpatrzenia pozostałych.

W godzinach popołudniowych 23 lipca odbyło się łączne posiedzenie Komisji enzymatycznej IUB i Komisji nomenklatury biochemicznej IUPAC, na którym omówiono zagadnienia o wspólnym zainteresowaniu.

6. Komitet koordynujący działalność Międzynarodowej Unii Biochemicznej IUB oraz Międzynarodowej Unii Chemii Teoretycznej i Stosowanej IUPAC

W Paryżu dnia 24 lipca 1957 r. odbyło się 3-cie zebranie komitetu koordynującego działalność IUB i IUPAC, na którym zostało złożone sprawozdanie z prac komisji enzymatycznej oraz omawiano symposia, mające się odbyć w latach 1958 i 59.

Dr J. Murray Luck powiadomił Komitet, że Deutsche Chemische Gesellschaft zwróciło się z zaproszeniem i propozycją, aby Międzynarodowy Kongres w r. 1959 odbył się w Munich, sugerując jednocześnie, aby tematyka poruszana na Kongresie obejmowała: a) chemię nieorganiczną i b) biochemię. Ze względu na to, że organizowanie międzynarodowych kongresów biochemicznych należy do IUB, Komitet koordynujący uznał, że tematyka biochemiczna na kongresie w Munich powinna ograniczyć się do 3 lub 4 symposiów poruszających zagadnienia szczególnie interesujące dla chemików. Na zakończenie postanowiono, że Komitet koordynujący poleci Radom obu Unii, by przy zawiadamianiu o przyszłych kongresach lub sympozjach dołączały do programów drukowane oświadczenie, że tematyka zebrań została za ustalona przy współudziale Komitetu koordynującego IUB i IUPAC.

7. Uroczystości związane z 100 letnią rocznicą powstania Societe Chimique de France

Prezydent IUB został zaproszony jako przedstawiciel Unii na uroczystości związane ze 100-letnią rocznicą powstania Société Chimique de France. Ponieważ prezydent sam nie mógł przybyć zastąpił go główny sekretarz, który wygłosił przemówienie jako przedstawiciel Unii.

8. 8 - plenarne posiedzenie Międzynarodowej Rady Unii Naukowych ICSU

Prof. E. H. Stotz zgodził się reprezentować Unię na 8-ym plenarnym posiedzeniu ICSU, które ma odbyć się w Waszyngtonie w r. 1958.

9. Komitet ICSU do spraw związanych z abstraktami biologicznymi

W czerwcu 1956 r. w Bagnères de Bigorre Biuro wykonawcze ICSU postanowiło powołać komitet do spraw związanych z abstraktami biologicznymi i zwróciło się do IUB o zamianowanie swego przedstawiciela. Prof. H. C. K. Westenbrink (Holandia) zgodził się pełnić tę funkcję.

10. Konferencja Naukowo-Informacyjna

W związku z zaproszeniem na konferencję naukowo-informacyjną która ma odbyć się w USA w r. 1957 główny sekretarz Unii rozesał do członków zawiadomienia z podaniem dokładnych informacji dotyczących konferencji.

11. Plany dotyczące przyszłych sympozjii

a) W r. 1958 projektowane jest sympozjum na temat enzymów hematynowych w Canberra, Australia.

b) Projektowane jest wspólnie z Międzynarodową Unią Nauk Fizjologicznych IUPS łączne sympozjum na temat oddychania w 1958 r. prawdopodobnie w Rzymie.

c) W związku z zaproszeniem na sympozjum na temat mechanizmu dyskryminacji chromatynowej u zwierząt i człowieka organizowanym przez IUBS w lipcu 1958 r.

Unia Biochemiczna podała nazwiska 2 lub 3 biochemików pracujących w tej dziedzinie, którzy mogliby wziąć udział w tym sympozjum.

12. Reprezentowanie IUB w Komitecie Sekcji Chemii Biologicznej IUPAC

W związku z zakończeniem okresu urzędowania prof. Florckina jako członka Komitetu Sekcji Chemii Biologicznej IUPAC na stanowisko to powołano prof. R. H. S Thompsona.

13. Finanse

W r. 1957 IUB poraz pierwszy otrzymała finansową pomoc od ICSU. Wyrażała się ona sumą 550 dolarów, którą przeznaczono na zorganizowanie pierwszego zebrań Komisji enzymatycznej, sympozjum moskiewskiego i sympozjum japońskiego. Na cele te przeznaczono łącznie sumę 6300 dolarów i brakujące 800 dolarów dołożono z funduszu opłat członkowskich. Na początku 1957 r. saldo wynosiło 2000 dolarów i w ciągu roku wpłynęło 2700 dolarów z opłat członkowskich. Wydatki wliczając wyżej wspomniane 800 dolarów wynosiły 2300 dolarów, tak że pod koniec roku saldo w przybliżeniu wynosić będzie 2400 dolarów. Przychody i rozchody za okres od ostatniej Rady i posiedzenia plenarnego zostaną dokładnie przedstawione Radzie podczas Kongresu w Wiedniu.

14. Publikacje

a) Origin of Life in Earth — sprawozdanie z międzynarodowego sympozium w Moskwie w sierpniu 1957 r. zostało wydane przez wydawnictwo Akademii Nauk ZSSR (w języku angielskim i rosyjskim).

b) Development of International Organization of Biochemistry E. H. Stotz. Federation Proceedings (1956) 15, 807.

IV Międzynarodowy Kongres Biochemików

Redakcja otrzymała od Generalnego Sekretariatu Kongresu następujący komunikat z prośbą o umieszczenie w „Postęпах”: „IV Międzynarodowy Kongres Biochemii pod egidą Międzynarodowej Unii Biochemicznej odbędzie się w czasie od 1 do 6 września 1958 w Wiedniu. Wszelkie zapytania odnośnie udziału i zgłoszenia Komunikatów proszę kierować do Generalnego Sekretariatu, Wien IX Währingerstr. 42, Österreich”.

Podając powyższe do wiadomości informujemy, że Komitet Biochemiczny PAN zajmuje się organizacją zbiorowego udziału biochemików polskich w IV Kongresie. M. in. Komitet stara się o fundusze na ten cel za pośrednictwem Zarządu Unii Międzynarodowej. Komitet rozesłał już pierwsze komunikaty o Zjeździe i formularze zgłoszeń do poszczególnych ośrodków. Osoby zainteresowane, do których zaproszenia nie doszły, mogą się zgłaszać o nie do Komitetu Biochemicznego PAN. Zgłoszenia i teksty referatów Komitet prosi również kierować na jego ręce .

Rok Darwinowski w Polsce

Wydział Nauk Biologicznych PAN podjął na plenarnym posiedzeniu uchwałę w sprawie obchodu roku Darwinowskiego. Tekst uchwały podajemy naszym czytelnikom w pełnym tekście.

„Wydział Nauk Biologicznych PAN po wysłuchaniu i przedyskutowaniu referatu przewodniczącego Komisji Ewolucjonizmu PAN prof. dra K. Petruszewicza o projekcie obchodu roku Darwinowskiego podejmuje następującą uchwałę:

I. Wydział Nauk Biologicznych powierza Komisji Ewolucjonizmu PAN, jako robocznemu Komitetowi organizacyjnemu, przygotowanie programu obchodu roku Darwinowskiego (1959), zorganizowanie poszczególnych imprez z wiązanych z obchodem, oraz zobowiązuje Komisję Ewolucjonizmu PAN do przedstawienia w terminie do 31 grudnia 1957 r.:

1) szczegółowego programu obchodu z uwzględnieniem metod propagandy jubileuszu wśród najszerzych kręgów biologów i przedstawicieli innych specjalności, które by nadały uroczystościom darwinowskim skalę krajową,

2) wniosków dotyczących składu i zakresu działania Komitetu Obchodu Roku Darwinowskiego przy Prezydium PAN, który obejmie protektorat nad uroczystościami jubileuszowymi.

II. Wydział II akceptuje następujący ramowy program obchodu roku Darwinowskiego:

1. Jubileuszowe wydanie „Dzieł wybranych Darwina”.

Wykonanie tego zadania powierza się Kolegium Redakcyjnemu Biblioteki Kłasyków Biologii przy Komisji Ewolucjonizmu PAN pod przewodnictwem prof. dra T. Wolskiego, które zapoczątkowało już w r. 1956 opracowanie polskiego wydania „Dzieł wybranych”.

Wydział akceptuje wydanie w serii jubileuszowej następujących dzieł: *Autobiografia, O powstaniu gatunków, O pochodzeniu człowieka, Dobór płciowy, Wyraszczenie człowieka i zwierząt, Zmienność roślin i zwierząt w stanie kultury, Podróż naturalisty, Sprawozdanie z przebiegu posiedzenia Linnean Society w 1858 r., O krzyżowaniu i zapyłaniu u roślin*; oraz prosi o poinformowanie Wydziału o ostatecznym projekcie *Dzieł wybranych* jak również o informację bieżącą o postępie prac w tej dziedzinie.

2. Ogłoszenie konkursu na prace dotyczące rozwoju myśli ewolucyjnej w Polsce (1957 — jesień) oraz zorganizowanie w jesieni 1959 r. sesji PAN na temat rozwoju idei ewolucji w Polsce. Zakres i warunki konkursu powinien opracować powołany przez Komisję Ewolucjonizmu PAN zespół w składzie: prof. prof. Brzęk, Konopka, Makarewicz, Makower, Petruszewicz, Raabe, Skarżyński i Suchodolski. Będzie on również czuwał nad przebiegiem prac konkursowych i zorganizuje sesję problemową PAN w 1959 r., na której oprócz typowanego programu jubileuszowego będą referowane ostateczne wyniki konkursu lub jego przebieg. Program konkursu winien być przedstawiony Wydziałowi do dn. 1.I.1958 r.

3. Ogłoszenie konkursu na prace badawcze (eksperymentalne lub terenowe) w zakresie ewolucji organicznej i zorganizowanie w 1959 r. sesji problemowej PAN poświęconej tym zagadnieniom*).

Na sesji oprócz referatów ogólnych będą referowane prace uczestników konkursu. Wydział akceptuje opracowane przez powołany już przez Komisję Ewolucjonizmu PAN zespół w składzie: prof. prof. Gajewski, Kaufman, Kozłowski, Kunicki-Goldfinger, Michajłow, Petruszewicz, Raabe, Stefański, Szafer, Szaferowa, Wolski zakres problematyki i warunki konkursu (załącznik), oraz powierza wymienionemu zespołowi czuwanie nad przebiegiem prac konkursowych i zorganizowanie sesji problemowej PAN w 1959 r. Zobowiązuje się Zespół konkursu do opracowania szczegółowego regulaminu i przedstawienie go Wydziałowi do 1.III.1958 r.

4. Wydanie szeregu broszur, książek popularnych na różnych poziomach naukowych, odczytów itp., tak by szeroko spopularyzować wśród społeczeństwa polskiego postać K. Darwina i jego rolę w nauce.

Zobowiązuje się Komisję Ewolucjonizmu PAN do opracowania i przedstawienia Wydziałowi zamierzeń w tym zakresie oraz projektu udziału członków PAN w tym obchodzie.

5. Udział w uroczystościach jubileuszowych organizowanych w innych krajach, a głównie w Anglii. Nawiązanie już w r. 1957 kontaktu z Linnean Society, British Museum, British Association i innymi organizacjami i instytucjami zainteresowanymi obchodem.

6. Propaganda roku Darwinowskiego poprzez Wydawnictwa PAN tak, by włączyć się do jego obchodu uczelnie wyższe, towarzystwa, placówki naukowo-badawcze itp.

Konkurs na pracę badawczą z ewolucji organicznej

Komisja Ewolucjonizmu PAN, za zgodą Wydziału Nauk Biologicznych PAN, ogłasza konkurs na pracę badawczą z zakresu ewolucji świata organicznego.

Do konkursu zgłaszane być mogą prace badawcze oparte o jakąkolwiek dyscyplinę biologiczną i prowadzone właściwymi jej metodami, w sposób świadomy i udokumentowany, wyjaśniające lub w istotnym stopniu przyczyniające się do wyjaśnienia procesów ewolucji świata organicznego.

*) Tekst konkursu podajemy poniżej.

Zakres problematyki prac konkursowych obejmuje więc badania nad jednostkami podlegającymi ewolucji, oraz procesem (przebieg, prawa i prawidłowości), czynnikami (przyczynami) specjacji i filogenezy.

Konkurs będzie rozstrzygany trzy razy w latach 1959, 1960 i 1961. Prace odpowiadające warunkom konkursu będą referowane i dyskutowane na Sesji Problemowej Wydziału II, po czym Jury Konkursu odbędzie posiedzenie rozstrzygające wyniki.

Przedmiotem ostatecznej oceny Jury w każdym z trzech terminów mogą być tylko prace zakończone, wydrukowane lub opracowane do druku.

Termin zgłaszania prac na pierwsze (tzn. w 1959 r.) posiedzenie Jury upływa w zasadzie z dniem 1.VII.1958 r. Do konkursu mogą być zgłaszane prace podjęte specjalnie na konkurs, lub rozpoczęte przed ogłoszeniem konkursu, o ile odpowiadają warunkom konkursu (do udziału w konkursie mogą być zgłaszane prace wydrukowane po ogłoszeniu konkursu).

W każdym z trzech terminów rozstrzygnięcia konkursu przewiduje się:

jedną pierwszą nagrodę w wysokości	10 000 zł.
dwie drugie nagrody po	5 000 zł.

oraz pewną ilość wyróżnień za walory metodyczne.

Regulamin konkursu będzie opracowany i ogłoszony do 1.III.1958 r.

P 1310



INFORMACJE I WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

1. Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w „Postępkach Biochemii” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach.

2. Prace należy przysyłać do redakcji w 3 egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie z podwójną interlinią, z marginesem około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej, oraz numeracją stron. W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem. Po tytułach nie należy stawiać kropek.

3. Przesłane do redakcji maszynopisy powinny być w postaci gotowej do druku, ilość poprawek nie może przekraczać pięciu na jednej stronie.

Prace nie odpowiadające wymaganiom zostaną przepisane na koszt autora, a odpowiednia kwota zostanie potrącona z honorarium autorskiego.

4. Wszelkie rysunki, wykresy i fotografie należy złożyć razem z maszynopisem na oddzielnych kartkach, w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Rysunki, wykresy i fotografie powinny być ponumerowane, a w tekście maszynopisu należy wskazać na marginesie miejsca i rozmiary poszczególnych klisz. U dołu rysunku, a przy fotografiach na odwrocie należy czytelnie podać odpowiedni napis oraz tytuł pracy i nazwisko autora. Ostateczne wykonanie rysunków jest obowiązkiem redakcji. Nadmierna ilość rysunków może być wykonana wyłącznie na koszt autora.

5. Wzory lub części wzorów i oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, powinny być napisane ręcznie atramentem, bardzo wyraźnie.

6. Tablice powinny mieć nagłówek opisujący ich treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu pracy.

7. Cytowaną literaturę należy wypisać na oddzielnej karcie, wymieniając pozycję w alfabetycznej kolejności autorów. W wykazie podać kolejno liczbę porządkową, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopisma, tom (rocznik), stronę i rok wydania. Np. 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793, 1953. Jeżeli cytowany artykuł ma kilku autorów, należy w wykazie literatury podać nazwiska i początkowe litery wszystkich autorów. Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać także tytuł książki, nazwisko nakładcy, miejsc oraz rok wydania dzieła. Np. Przyięcki S. J., Podręcznik Chemii Fizjologicznej, Lemański, Łódź, 1947. Wykaz używanych czasopism podają Roczniki Chemii 26, 497, 1952. Powoływanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie. Np. (10).

8. Autora obowiązuje korekta autorska, którą należy zwracać redakcji w ciągu 3 dni. Korektę należy wykonać kolorowym ołówkiem (nie czerwonym). Koszty spowodowane zmianą tekstu w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor. Autorzy wydrukowanych artykułów otrzymują honorarium i 25 bezpłatnych odbitek pracy. Żądanie większej ilości odbitek należy zgłosić piśmiennie przy zwrocie korekty autorskiej. Koszt tych odbitek ponosi autor.

9. Redakcja nie przeprowadza żadnych zmian w pracy bez zgody autora. Dla dokonania zmian uważanych przez redakcję za celowe dwa egzemplarze pracy odsyła się autorowi, trzeci pozostaje w aktach redakcji.

Cena w prenumeracie: półroczna zł 40.—; rocznie zł 80.—

Prenumeratę przyjmują: 1) Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, ul. Miodowa 10. Konto PKO Nr 1 — 6 — 100.214, 2) Centrala Kolportażu „Ruch”, Warszawa, Srebrna 12. Konto PKO 16—100.020, 3) oddziały „Ruchu” w Warszawie, w miastach wojewódzkich i powiatowych, 4) urzędy pocztowe i listonosze.

Pojedyncze egzemplarze do nabycia w księgarniach naukowych oraz we Wzorcowni PWN (Warszawa, Miodowa 10).

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę — rocznie zł. 112.— Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wilcza 46, Konto PKO nr 1—6—100.024.

Informacji w sprawie sprzedaży egzemplarzy z poprzednich okresów udziela Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Dział Czasopism, Warszawa ul. Miodowa 10.