

939
POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK

TOM II

1956

ZESZYT 3

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA



<http://rcin.org.pl>

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 II

1956

ZESZYT 3

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

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

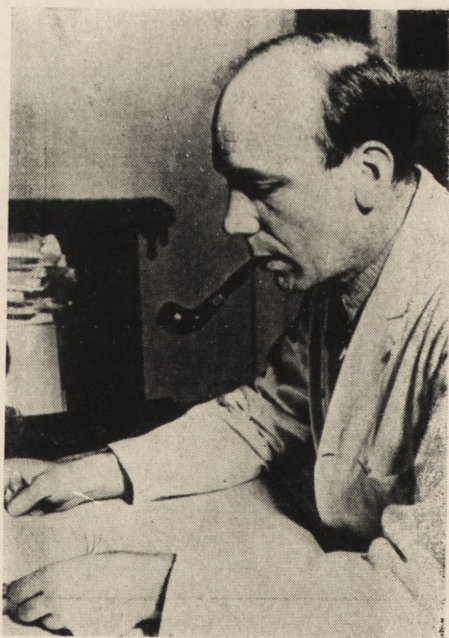
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1956

| | |
|---|--------------------------------|
| Nakład 1042 + 106 egz. | Oddano do składania 8.7.56 |
| Ark. wyd. 7,75. Ark. druk. 6,5 | Podpisano do druku 7.8.56 |
| Papier druk. sat. kl. V, 70 g, 70 × 100 | Druk ukończono w sierpniu 1956 |
| Cena zł 15.— | Zam. 590c/56. B-011. |

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA



Fot. 1. Kaj Linderström-Lang



Fot. 2. Heinz Holter

Fot. 3. Erik Zeuthen w Stacji Zoologicznej w Neapolu



Fot. 4. Wejście do głównego budynku Laboratorium Carlsberg

HUGO THEORELL

Sztokholm

Istota i mechanizm działania enzymów utleniających

Wykład po otrzymaniu Nagrody Nobla 12. XII. 1955 r.

(Nordisk Medicin, 5. I. 1956.)*

Niemal wszystkie reakcje zachodzące w żywej przyrodzie są wyzwalane i kierowane przez enzymy. Oczywistym jest więc, że człowiek od prawieków miał możliwość spostrzegać reakcje enzymatyczne, np. fermentację lub gnicie, i właściwie początków historii enzymów moglibyśmy doszukiwać się jeszcze u dawnych Greków, albo nawet wcześniej. Takie podejście do zagadnienia byłoby jednak bezsensowne, gdyż obserwowanie jakiegoś zjawiska nie jest jeszcze jego objaśnianiem. O wiele bardziej słusznie możemy twierdzić, że nasza wiedza o enzymach jest właściwie produktem badań wieku XX.

Enzymy są pewnego rodzaju katalizatorami i w związku z tym wskazane jest, aby wspomnieć o pochodzeniu pojęcia katalizy. Pojęcie to sformułował mój szkolny kolega z gimnazjum w Linköping, którego niestety nie miałem nigdy zaszczytu poznać osobiście, gdyż był on o 124 lata starszy ode mnie. Był nim twórca Instytutu Karolińskiego** i Szwedzkiego Towarzystwa Lekarskiego, Jöns Jakub Berzelius, który w roku 1835 pisał: „Jest to właściwa zarówno nieorganicznej, jak i organicznej przyrodzie nowa zdolność wyzwalania chemicznej czynności, niewątpliwie bardziej rozpowszechniona niż nam się to dotychczas wydaje, której istota jest dla nas jeszcze nieznaną. Gdy mówię o tej zdolności jako o nowej sile, nie chcę tym samym twierdzić, aby to była zdolność niezależna od zachodzących w materii elektrochemicznych stosunków. Przeciwnie, nie mogę przypuszczać nic innego jak tylko to, że zdolność ta jest pewnym swoistym wyrazem tych elektrochemicznych zjawisk, lecz dopóki nie znamy tej wewnętrznej zależności, dogodniejszym będzie dla naszych badań traktować ją jako siłę odrębną i dać jej szczególną nazwę.

*) Z upoważnienia Autora przetłumaczył B. Skarżyński.

**) Wyższa Szkoła Lekarska w Sztokholmie.

Posługując się znaną w chemii etymologią proponuję nazwać ją siłą katalityczną, a rozkład spowodowany działaniem tej siły — katalizą, tak jak słowem analiza określamy rozdzielanie składników materii przy zastosowaniu zwykłego chemicznego powinowactwa. Siła katalityczna zdaje się polegać na tym, że ciała są zdolne wyzwać powinowactwa drzemiące w danej temperaturze tylko przez swoją obecność."

Enzymy są katalizatorami świata biologii, a opis siły katalitycznej podany przez Berzeliusa jest zdumiewająco dalekowzroczny — niemal proroczy. Należy zwłaszcza zwrócić uwagę na to, że nasz uczony zdecydowanie wyklucza udział innych sił niż siły chemiczne; wierzy, że gdy kiedyś w przyszłości zostanie wyjaśniony mechanizm ich działania, wówczas siły chemiczne wystarczą dla wytłumaczenia tych, na razie mistycznych, reakcji.

Trzeba było czekać przeszło 100 lat, aby móc potwierdzić słusność poglądów Berzeliusa. Przełomowym był rok 1926. Niemiecki chemik Richard Willstätter wygłosił w Niemieckim Towarzystwie Chemicznym odczyt, w którym sumował wyniki swych wieloletnich prób, zmierzających do otrzymania czystych enzymów. Stosując różne metody adsorpcyjne oddzielał coraz to więcej zanieczyszczeń, towarzyszących niektórym enzymom zajmując się szczególnie tzw. peroksydazą — enzymem bardzo rozpowszechnionym w świecie roślinnym. Otrzymał ostatecznie tak mało substancji, że przy zastosowaniu zwykłych metod analitycznych roztwory tej substancji nie wykazywały śladu białka, cukru, lub żelaza, a mimo to wykazywały w pełni katalityczne działanie enzymów. Willstätter wyciągnął z tych faktów wnioski, że enzymy nie zawierają białka, cukrowców lub żelaza, i że w ogóle nie należą do żadnego znanego typu substancji chemicznych. Gotów był wierzyć, że działanie enzymów wywodzi się z jakiejś nowej siły przyrody, a więc formułował pogląd, który już 90 lat wcześniej Berzelius odrzucił jako nieprawdopodobny.

Ironia losu zrządziła, że w tym samym roku badacz amerykański J. B. Sumner opublikował pracę, w której donosił o otrzymaniu w krystalicznej postaci enzymu ureazy, rozkładającego mocznik na dwutlenek węgla i amoniak. Sumner otrzymał swoją krystaliczną substancję w pokąźnych ilościach, posługując się znacznie prostszymi metodami niż te, jakich używał Willstätter dla swych prób oczyszczania enzymów. Krystaliczna substancja Sumnera była czystym, bezbarwnym białkiem. W ciągu następnych kilku lat J. H. Northrop wraz z współpracownikami otrzymał trzy dalsze krystaliczne preparaty enzymów — pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny, które podobnie jak ureaza są enzymami hydrolizującymi, rozkładającymi chemiczne wiązania z udziałem wody.

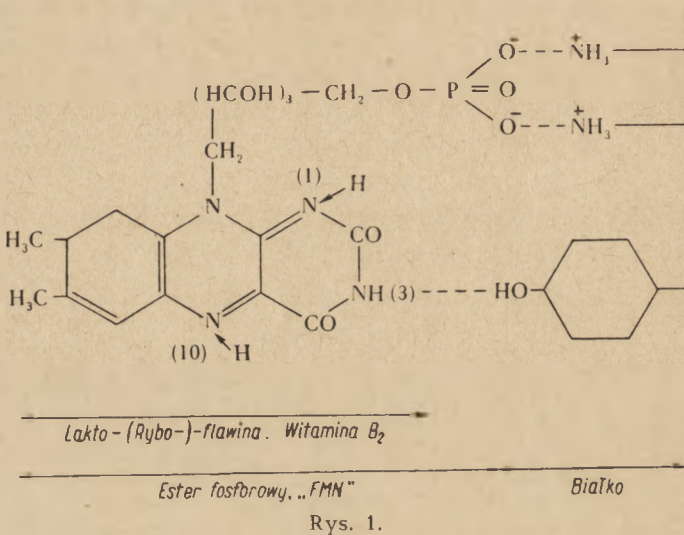
Gdyby te odkrycia zostały od razu uznane i nie były kwestionowane, nie trzeba byłoby czekać dalszych 20 lat, aby Sumner wraz z Northropem i Stanleyem otrzymali Nagrodę Nobla. Nie było to jednak łatwo udowodnić, że piękne kryształki białka są istotnie czystym enzymem a nie jakimś nieczynnym nośnikiem bardzo drobnych ilości właściwego enzymu. Zarówno Sumner, jak i Northrop nagromadzili bogaty materiał doświadczalny, przemawiający z dużym prawdopodobieństwem za tym, że ich preparaty są czystymi enzymami, ale nie zdołali dostarczyć dowodów nie budzących wątpliwości. Rzeczywiście w owym czasie dostarczenie takiego dowodu było niemożliwe. Metody preparatywne i analityczne były jeszcze niedostatecznie wysubtelnione — co zresztą w pewnej mierze odnosi się nawet i do chwili obecnej — aby z całą pewnością na ich podstawie można było wykluczyć obecność drobnych ilości zanieczyszczeń w preparacie białka. Toteż z wielu stron podnoszono zastrzeżenia wobec twierdzeń Sumnera i Northropa, przyczym oczywiście najwydatniej zaznaczał się głos szkoły Willstättera.

Żółty enzym

Gdy w roku 1933 przybyłem jako stypendysta fundacji Rockefellera do Instytutu Ottona Warburga w Berlinie, Warburg i Christian otrzymali z drożdży żółto zabarwiony preparat enzymu utleniającego. Duża zawartość wielocukrowca o charakterze gumy roślinnej świadczyła o tym, że preparat ten daleki jest od czystości. Szczególnie interesującą była żółta barwa tej substancji — barwa ta znikła przy redukcji i powracała w obecności gazowego tlenu, z czego należało wnioskować, że żółty barwnik bierze udział w samym procesie enzymatycznej oksydo-redukcji. Barwnik ten można było oddzielać od nieznanego wielkocząsteczkowego nośnika, działając na enzym zakwaszonym alkoholem metylowym, powodując zarazem zanik własności enzymatycznych. Przeprowadzone równocześnie badania przez Warburga w Berlinie, Kuhna w Heidelbergu i Karrera w Zurychu doprowadziły do określenia struktury żółtego barwnika, nazwanego później flaktoflawiną, ryboflawiną, lub witaminem B₂:

Po raz pierwszy można było powiązać działanie enzymatyczne z określoną konstelacją atomów. Okazało się, że szczególny układ enzymatyczny (TPN — Zwischenferment), którego charakter wyjaśniono później, powoduje odszczepienie dwóch atomów wodoru z substratu (ester fosforowy heksozy), przenosząc je na atomy azotu flawiny, oznaczone we wzorze cyfrą 1 i 10. Powstaje wówczas bezbarwna leukoflawina, która zostaje ponownie utleniona gazowym tlenem, w następstwie czego wy-

tworzą się nadtlenek wodoru i flawina. Flawina może ulec ponownie redukcji na leukoflawinę, potem oddać pobrane atomy tlenu itd. Ten cykliczny proces trwa tak długo, dopóki wszystkie cząsteczki substratu nie stracą dwóch atomów wodoru, przechodząc w kwas fosfoglikonowy przy równoczesnym powstawaniu odpowiedniej ilości nadtlenu wodoru. Po zakończeniu tego procesu żółty enzym pozostaje w postaci niezmięnionej, a więc pozornie — tak jak to wyobrażał sobie Berzelius — samą swoją obecnością wyzwolił powinowactwo chemiczne.



Należałoby odpowiedzieć na bardzo ważne pytania: dlaczego wolna flawina nie posiada zdolności katalitycznych a uzyskuje je po połączeniu się z wielkocząsteczkowym nośnikiem? Co jest tym nośnikiem? Aby wyjaśnić to zagadnienie zdecydowałem się oczyszczać żółty enzym posługując się opracowaną przeze mnie metodą elektroforezy. W owym czasie nie istniała jeszcze o wiele doskonalsza pod względem technicznym metoda elektroforezy, opisana przez Tiseliusa, lecz moja własna okazała się nadspodziewanie dogodna. Zostały usunięte wielocukrowce reprezentujące 80—90% masy preparatu wraz z częścią enzymatycznie nieczynnych bezbarwnych białek. Następnie stosując wytrącanie siarczanem amonowym uzyskałem krystaliczny preparat, który w ultrawirówce i podczas elektroforezy zachowywał się jak jednolity związek. Enzym był białkiem o masie cząsteczkowej 75 000 zabarwionym żółto przez komponentę flawinową; odpowiednia analiza wykazała, że jedna cząsteczka flawiny przypada na jedną cząsteczkę białka. Stosując dializę roztworu enzymu w niskiej temperaturze wobec rozcieńzonego kwasu solnego, można było oddzielić żółty barwnik od bezbarwnego białka.

Zarówno sama flawina, jak i wolne od flawiny białko nie wykazywały własności enzymatycznych, lecz jeżeli w odczynie obojętnym zmieszano roztwór flawiny z roztworem białka własności katalityczne powracały i to wówczas, gdy stosunek cząsteczek obu komponent w mieszaninie był 1 : 1. Za tym, że między oboma składnikami powstawało w tych warunkach połączenie wskazywał m.i. również fakt, iż zielonkawa barwa i żółta fluorescencja wolnej flawiny zmieniała się w barwę czysto żółtą, bez fluorescencji po zmieszaniu z białkiem.

W owym czasie (1934) badania w zakresie związków flawinowych rozwijały się w gorączkowym tempie. Richard Kuhn donosił, że udało mu się odtworzyć żółty enzym mieszając syntetycznie otrzymaną laktoflawinę z moim bezbarwnym składnikiem białkowym. Gdy jego praca ukazała się w druku, wiedzieliśmy już w Berlinie, że twierdzenie to jest błędne. Moje doświadczenia elektroforetyczne wskazywały na to, że sama laktoflawina jest związkiem obojętnym, natomiast odszczepiony z żółtego enzymu barwnik wędruje szybko do anody, ma więc charakter kwaśny. Analiza na fosfor wykazała obecność 1 P w jednej cząsteczce barwnika i gdy wreszcie udało mi się barwną część żółtego enzymu uzyskać w czystym stanie okazało się, że jest ona estrem fosforowym laktoflawiny, pewnego rodzaju nukleotydem; prawdopodobnym więc było przypuszczenie, że kwas fosforowy jest łącznikiem między laktoflawiną a białkiem. Pokażę kilka prostych doświadczeń przeprowadzanych przy użyciu żółtego enzymu, jego barwnej części zwanej dziś FMN (flawinowy mononukleotyd) i jego bezbarwnej komponenty białkowej. (Następuje opis kilku typowych demonstracji wykładowych).

Znaczenie wyników przedstawionych poprzednio badań można streścić w postaci kilku zasadniczych twierdzeń:

1. W toku odwracalnego procesu rozkładu żółtego enzymu rozpada się on stale na jedną cząsteczkę apoenzymu i jedną cząsteczkę koenzymu. Fakt ten dowodzi, że mieliśmy do czynienia z czystym enzymem, gdyż wynik ten byłby niezrozumiały, gdyby sam enzym był tylko zanieczyszczeniem naszego preparatu.

2. Enzym jest niewątpliwie białkiem. Później okazało się, że białkami są wszystkie dotychczas uzyskane enzymy, których w czystym stanie otrzymano przeszło setkę.

3. Stwierdzono, że pierwszy otrzymany w czystym stanie koenzym, FMN, jest estrem fosforowym witaminu. Z czasem okazało się, że jest to sytuacja pospolita w przyrodzie; takie witaminy jak amid kwasu nikotynowego, tiamina i pirydoksyna w analogiczny sposób zostają wbudowane w koenzymy o charakterze nukleotydów, łączące się odwracalnie z białkami.

W ciągu ostatnich 20 lat otrzymano liczne flawoproteidy, obdarzone różnymi własnościami enzymatycznymi. Wiele spośród tych enzymów zawiera zamiast FMN dwunukleotyd FAD, składający się z FMN i kwasu adenilowego.

Postępy techniczne lat ostatnich umożliwiły wyjaśnienie sposobu łączenia się koenzymu z enzymem. Żółty enzym noszący obecnie nazwę „dawnego” żółtego enzymu, ponownie stał się dogodnym obiektem badań. W naszej pracowni skonstruowano bardzo czuły aparat pozwalający rejestrować zmiany zachodzące w nasileniu fluorescencji i umożliwiający tym samym śledzenie szybkości, z jaką maleje fluorescencja podczas łączenia się FMN z białkiem, względnie szybkości narastania fluorescencji podczas rozkładu enzymu na jego zasadnicze komponenty. Szybkość reakcji między koenzymem i białkiem jest znaczna w odpowiednich warunkach, lecz dzięki czułości metody fluorescencyjnej mogłem wraz z moim norweskim współpracownikiem, Agnarem Nygaardem, przeprowadzić dokładne oznaczenie stałej szybkości tej reakcji. Osiągnęliśmy to, posługując się bardzo rozcieńczonymi roztworami, a więc tworząc warunki, w których szybkość reakcji jest bardzo mała, po prostu dlatego, że rzadko zachodzi możliwość kolizji cząsteczki FMN z cząsteczką białka.

Przeprowadzaliśmy nasze oznaczenia w różnych warunkach. Zmienialiśmy kwasotę środowiska, jego skład jonowy oraz temperaturę i działaliśmy na białko różnymi odczynnikami, które w znany sposób wpływają na różne ugrupowania atomowe w cząsteczce białka. W ten sposób udało się nam z dużym prawdopodobieństwem wykazać, że reszta fosforanowa w FMN wiąże się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi białka a grupa iminowa FMN łączy się z grupą fenolową reszty tyrozyny, z równoczesnym wygaszaniem fluorescencji.

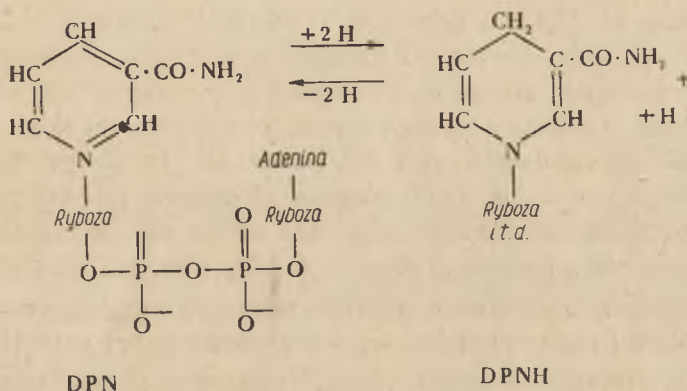
Dotychczas nie jesteśmy w stanie wyjaśnić całkowicie, w jaki sposób część białkowa enzymu wiążąca się z koenzymem aktywuje go, czyniąc koenzym zdolnym do szybkiego łączenia się z wodorem i szybkiego odszczepiania go. Niemniej nieco wiadomości w tym zakresie posiadamy. Doniosłe znaczenie dla tego zjawiska posiada tzw. potencjał oksydacyjno-redukcyjny enzymu, który określa się na podstawie wzajemnego stosunku stałych dysocjacji dla połączenia białka z utlenioną, względnie zredukowaną postacią koenzymu. Z kolei stałe dysocjacji są funkcją stałych szybkości reakcji między koenzymem i enzymem, dających się wyznaczyć zarówno dla żółtego enzymu, jak i dla wielu innych enzymów. Nie wchodząc w dalsze szczegóły pragnę tylko podkreślić, że przyłączenie się białka do koenzymu wywiera nadspodziewanie duży wpływ na jego potencjał. W wielu wypadkach ten efekt połączenia się koenzymu

z białkiem jest uzależniony wybitnie od zmian w stężeniu soli w środowisku. Na tej podstawie możemy snuć pewne przypuszczenia, mające znaczenie dla fizjologii.

Dehydrogenazy alkoholowe

Z kolei przejdę do omówienia naszych prac o dehydrogenazach alkoholowych, ograniczając się zresztą tylko do krótkich wypowiedzi, gdyż enzymy te o wiele mniej nadają się do doświadczalnych demonstracji w toku wykładu.

Te układy enzymatyczne są złożone — podobnie jak i flawinoproteidy — z bezbarwnego białka, łączącego się odwracalnie z koenzymem.



Rys. 2.

Tym koenzymem jest dwufosfopirydynowy nukleotyd, dawniej nazywany kozymazą, obecnie „DPN”, gruntownie zbadany przez Hansa Eulera, Karola Myrbäckę, Ragnara Nilssona i in. w Sztokholmie, oraz przez Ottona Warburga i Waltera Christiana w Berlinie. Koenzym ten zawiera jako aktywne ugrupowanie atomowe amid kwasu nikotynowego, którego funkcja jest analogiczna do roli flawiny w żółtym enzymie i polega na pobieraniu wodoru z jednego związku i oddawaniu go innemu związkowi. Poza tym DPN zawiera rybozę, kwas fosforowy i adeninę.

Dehydrogenazy alkoholowe występują zarówno w świecie zwierzęcym, jak i roślinnym, np. w wątrobie, drożdżach i grochu. Są bezbarwnymi białkami, które współdziałając z DPN mogą utleniać alkohol na aldehyd, jak to np. ma miejsce w wątrobie, lub na odwrót — redukować aldehyd na alkohol, jak to czynią drożdże. Enzym z drożdży otrzymał

w stanie krystalicznym Negelein i Wulff (1936) w instytucie Warburga, enzym z wątroby końskiej wykryli w naszym Instytucie w Sztokholmie w r. 1948 Bonnichsen i Wassén.

Oba te enzymy odegrały pewną rolę w biochemii, ponieważ nadały się o wiele lepiej do badań kinetycznych, niż inne układy enzymatyczne. Zwłaszcza enzym wątrobowy badaliśmy kilkakrotnie specjalnie starannie, gdyż otwierały się tu szczególnie dogodne warunki doświadczalne. Wszystkie enzymy współdziałające z DPN możemy badać spektrofotometrycznie, śledząc przebieg reakcji $DPN^+ + 2H^+ \rightleftharpoons DPHN + H^+$ ponieważ DPHN okazuje smugę absorpcyjną w pozafioletkowej części widma, przypadającą na długość fali 340 m μ . Tego rodzaju doświadczenia wykonywane już tysiące razy we wszystkich pracowniach świata. Przed paroma laty zastosowaliśmy naszą metodę fluorescencyjną, opierając się na tym fakcie, że DPHN w odróżnieniu od DPN^+ okazuje fluorescencję, jakkolwiek znacznie słabszą od fluorescencji flawin. Poza tym enzym wątrobowy ujawnia jeszcze nowy efekt, który okazał się szczególnie korzystny dla spektrofotometrycznych pomiarów szybkości reakcji. W roku 1950 wykazałem wraz z Bonnichsenem, że smuga absorpcyjna zredukowanego koenzymu, przypadająca na długość fali 340 m μ przesuwana się do położenia odpowiadającego 325 m μ po połączeniu się koenzymu z białkiem. Na tej zasadzie mogliśmy wraz z Brittonem Chancem, posługując się jego wyrafinowaną fotometryczną metodą, określić stałą szybkości dla tej nadzwyczajnie szybko przebiegającej reakcji.

Nie chcę wchodzić w dalsze szczegóły, pragnę jednak zwrócić uwagę, że w tym wypadku mieliśmy do czynienia z bardzo zawiłym przebiegiem reakcji. Wynikało to stąd, że musieliśmy pracować z mieszaniną trzech związków — białka enzymu, koenzymu i substratu, w której ponadto zarówno koenzym, jak i substrat występują równocześnie w postaci utlenionej i zredukowanej. Przebieg tej reakcji można najogólniej wyrazić łańcuchem 9 kolejno idących po sobie etapów, przy czym w etapie ostatnim enzym uwalnia się i może rozpocząć ponownie taką samą kolejność przemian. Ostatecznym wynikiem jest przeniesienie 2 atomów wodoru z alkoholu na koenzym. W tym skrajnie uproszczonym schemacie mamy więc do czynienia z 9 częściowymi reakcjami, a dla każdej z nich należy oznaczyć 2 stałe szybkości. W sumie trzeba określić 18 stałych szybkości, co jest olbrzymim zadaniem. W każdym razie udało się nam ustalić odpowiednie wartości dla niektórych z tych reakcji.

Kinetyka enzymu wątrobowego jest odmienna i prostsza. Przebieg katalizowanych przez ten enzym reakcji można wyrazić tylko 3 równaniami z 6 stałymi szybkości. W tym wypadku mogliśmy oznaczyć wszyst-

kie 6 stałych przy różnym stężeniu jonów wodorowych i przy różnym składzie jonowym środowiska, toteż możemy uważać kinetykę tego układu enzymatycznego za najlepiej poznaną ze wszystkich (Theorell, Bonnichsen, Chance, Nygaard). Wykazane w powyższy sposób różnice zachodzące między kinetyką enzymu z drożdży i enzymu z wątroby tłumaczą, dlaczego enzym drożdżowy wytwarza alkohol z aldehydu, podczas gdy enzym wątrobowy przeprowadza tę reakcję w kierunku wręcz przeciwnym. Pewnego rodzaju kaprysem natury jest fakt, że ten sam koenzym, który w drożdżach przenosząc wodór na aldehyd wytwarza alkohol, występuje również w wątrobie, ażeby zamienić wprowadzony do ustroju alkohol na aldehyd, ulegający już dalszemu spalaniu.

Z chwilą, gdy wyjaśniona została kinetyka dehydrogenaz alkoholowych było już tylko prostą sprawą zastosowanie tych enzymów do ilościowego oznaczania alkoholu, np. przy badaniu krwi. Metoda ta, zwana metodą „ADH”, jest równie dokładna, jak sposób postępowania opisany przez Widmarka, ale o wiele bardziej czuła, a przede wszystkim swoista wyłącznie dla alkoholu etylowego. Obecnie jest ona ustawowo wprowadzona do badań sądowych w Szwecji i w Niemczech zachodnich.

Hemoproteidy

Jeszcze przed moim wyjazdem do Berlina w 1933 roku zainteresowałem się związkiem blisko spokrewnionym z hemoglobina. Był nim biochrom, odkryty w roku 1897 w toku badań spektroskopowych przez K.A.H. Mönera, nazwany później mioglobina. Mioglobina otrzymałem w postaci krystalicznej w roku 1932.

Po powrocie z Berlina do Szwecji zająłem się oczyszczaniem innego hemoproteidu cytochromu c, jednej z „histohematyn” albo „miohematyn”, które opisał z końcem lat 1880 Irlandczyk Mac Munn, posługując się skonstruowanym przez siebie spektroskopem. Hematyny Mac Munna przez długie lata egzystowały tylko w drukowanych *petitem* uzupełnieniach do większych podręczników, póki je znowu nie wydobyl na światło dzienne w roku 1925 Dawid Keilin w Cambridge. W r. 1936 uzyskałem cytochrom c w postaci preparatu o 80% czystości, a w r. 1939 niemal w 100% czysty.

Cytochrom c jest czerwonym białkiem, zawierającym układ porfirynewy z żelazem i spełnia funkcje ogniwa w łańcuchu enzymów biorących udział w oddychaniu komórkowym. Rola cytochromu c polega na tym, że zależnie od warunków przyłącza lub oddaje jeden elektron, przy czym zmienia się równocześnie wartościowość atomu żelaza z IIIgo stopnia utlenienia na IIgi i odwrotnie. Cytochrom c jest substancją, z którą

pracuje się z przyjemnością, nie tylko dlatego, że posiada piękną barwę lecz również dlatego, iż jest niezwykle trwałym związkiem. Ze 100 kg mięśnia serca końskiego można otrzymać 3—4 g czystego cytochromu c. Cząsteczka tej substancji o masie cząsteczkowej 12 000 zawiera 1 cząsteczkę żelazoporfiryny.

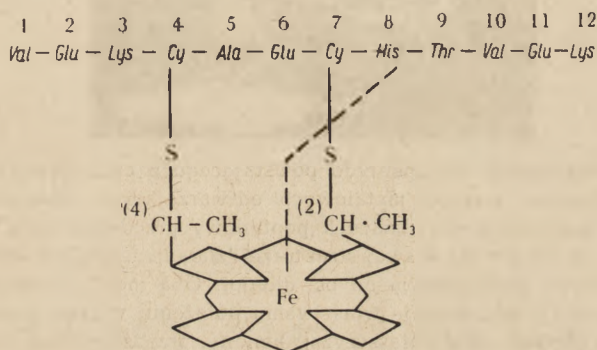
(Następuje opis kilku wykładowych doświadczeń z cytochromem c.)

Z powyższych doświadczeń można wyciągnąć wniosek, że cytochrom c nie reaguje z drobinowym tlenem, nie może być więc ogniwem w łańcuchu enzymów utleniających, znajdującym się najbliżej tlenu. Niezdolność cytochromu c do reagowania z tlenem była zjawiskiem zastanawiającym, wymagającym wyjaśnienia. Inną ciekawą właściwością cytochromu c jest szczególnie trwałe połączenie między częścią białkową tego związku, a żelazoporfiryną. W odróżnieniu od większości innych hemo-proteidów, barwna żelazoporfiryna nie daje się odszczepiać przez dodatek acetonu zakwaszonego kwasem solnym. Poza tym przesunięcie smug absorpcyjnych w widmie cytochromu wskazywało na to, że znajdujące się w protoheminie nienasycone grupy winilowe, w heminie cytochromu są układami nasyconymi. W r. 1938 udało mi się udowodnić że część porfirynewa cytochromu c związana jest z białkiem za pośrednictwem 2 atomów siarki, przynależnych do cząsteczek cysteiny białka i to w ten sposób, że grupy winilowe zostają zamienione na grupy α -tioetylowe, stając się równocześnie ugrupowaniami atomowymi. W ten sposób została wyjaśniona trwałość wiązania i przesunięcia smug widmowych. Pierwszy raz więc udało się wyjaśnić istotę chemicznego wiązania między grupą prostetyczną (w tym wypadku żelazoporfiryną) i częścią białkową enzymu. Karl Gustaw Paul opracował później pomysłową metodę rozrywania mostków siarkowych przy pomocy soli srebra i w ten sposób ostatecznie potwierdził moje wnioski dotyczące tego szczegółu struktury cytochromu c.

Smugi absorpcyjne cytochromu c wskazują na to, że jest on związkiem typu hemochromogenów, tzn. że z żelazem związane są nie tylko 4 atomy azotu układu porfirynewego, lecz ponadto jeszcze jakieś 2 dodatkowe układy atomowe, zawierające azot. Na podstawie pomiarów magnetometrycznych, które przeprowadziłem w pracowni Linusa Paulinga w Pasadenie, na podstawie analizy składu aminokwasowego, kształtu krzywych miareczkowania i pomiarów spektrofotometrycznych dokonanych wspólnie z A. Å k e s o n e m wyciągnąłem wniosek (1941), że tworzące hemochromogen, zawierające azot układy atomowe, należą do histydyny, ściślej mówiąc — są reprezentowane przez układy imidazolowe.

W ostatnim czasie posunęliśmy się dalej w tym zakresie. W ubiegłym roku T u p p y i B o d o w Wiedniu, stosując metodę Sangera, rozpo-

częli badania nad kolejnością, z jaką występują aminokwasy w odcinkach peptydowych pozostających z cytochromu po jego rozkładzie enzymami proteolitycznymi. Badaczom tym udało się określić kolejność aminokwasów w odcinku łańcucha peptydowego, sąsiadującego z heminą. Badania te były kontynuowane i wykończone w naszej pracowni w Sztokholmie przez Tuppy'ego, Paléusa i Ehrenberga z następującym wynikiem:

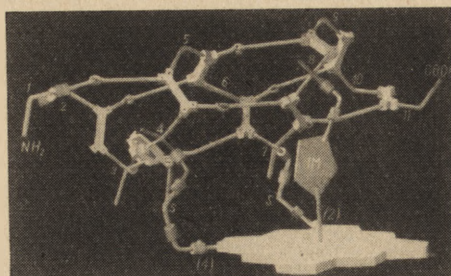


Rys. 3. Łańcuch peptydowy 1—12 jest połączony z heminą za pośrednictwem dwóch mostków wytworzonych przez atom siarki cysteiny i wiązania histydyny z żelazem („Val” = aminokwas walina, „Glu” = glutamina, „Lys” = lizyna itd.).

Gdy w roku 1954 Linus Pauling wygłaszał swój wykład noblowski w Sztokholmie, demonstrował nowy typ modelu, pozwalającego badać przestrzenną konfigurację łańcuchów peptydowych tworzących spirale, lub pofałdowane warstwy. Nasunęła mi się wówczas myśl rozstrzygnięcia w ten sam sposób, które z możliwości konfiguracyjnych byłyby zgodne z egzystencją mostków siarkowych, wiążących łańcuch peptydowy z komponentą heminową i z istnieniem układów zawierających azot, wiążących się z żelazem. Pauling uprzejmie ofiarował mi swoje modele, które zaraz pokażę. Modele te więc po raz drugi wystąpią podczas odczytu związanego z przyznaniem nagrody Nobla.

Wraz z Ehrenbergiem skonstruowałem model heminy, w tej samej skali, w jakiej złożony był model łańcucha peptydowego po czym wypróbowaliśmy wszystkie możliwe warianty wiązań wodorowych w tym celu, aby zbudować model peptydu heminowego, odpowiadającego wszystkim wymogom wynikającym z naszej dotychczasowej wiedzy o strukturze cytochromu. Okazało się, że wiele tych wariantów można było wykluczyć ze względów przestrzennych, inne znów okazywały się nieprawdopodobnymi z innych powodów. Z pierwotnie rozważanych 20 alternatyw pozostała ostatecznie tylko jedna — lewoskrętna α -spirala

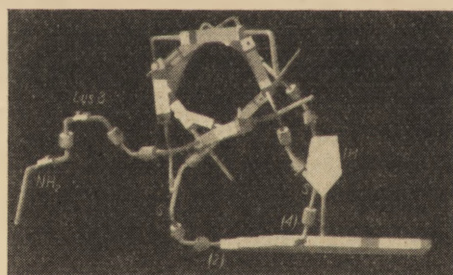
z łańcuchem bocznym cysteiny nr 4 połączonym z łańcuchem bocznym porfiryny w pozycji 4 i z cysteiną nr 7 połączoną z łańcuchem bocznym porfiryny w pozycji 2. Grupa imidazolowa przypadła wówczas dokład-



Rys. 4. Model przestrzenny hemopeptydu powstającego z cytochromu c po trawieniu pepsyną, skonstruowany z części metalowych odtwarzających odległości między atomami i kierunek wartościowości. Łańcuch peptydowy przedstawiający się jako lewoskrętna α -spirala, utrzymywana w swej strukturze działaniem wiązań wodorowych, oglądany jest w kierunku prostopadłym do osi długiej. Oba mostki siarkowe (S) i grupa imidazolowa histydyny odpowiadają właściwemu położeniu wiązań a sam łańcuch peptydowy przebiega równoległe do płaszczyzny heminy, przedstawionej jako jasna wieloboczna płyta w dolnej części fotografii

nie w miejsce odpowiadające połączeniu z atomem żelaza. Spirala peptydowa przebiegała równoległe do płaszczyzny heminy.

Wydaje mi się szczególnie interesującym fakt, że mogliśmy czysto chemicznymi metodami potwierdzić egzystencję najważniejszej spirali

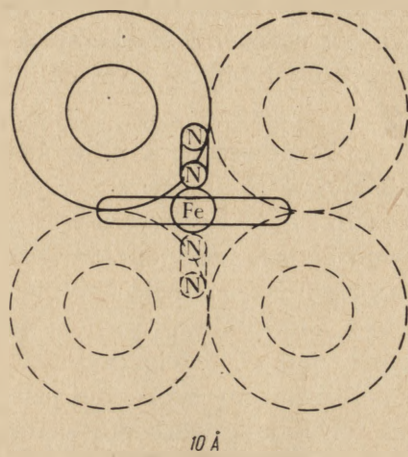


Rys. 5. Model przedstawiony na rys. 4 oglądany w kierunku osi α -spirali, dla przejrzystości zaznaczono tylko te łańcuchy boczne, które należą do lizyny (3), cysteiny (4), cysteiny (7) i histydyny (8)

Paulinga i Corey' a. Było to osiągalne w naszym wypadku dzięki tej szczególnej okoliczności, że mieliśmy do czynienia z krótkim łańcuchem peptydowym, związanym aż w 3 miejscach ze sztywną strukturą heminy. W toku przygotowania tego odczytu do publikacji ukazało się w Anglii doniesienie Arndta i Riley' a, potwierdzające na pod-

stawie analizy krystalograficznej egzystencję w cytochromie c lewoskrętnej peptydowej α -spirali.

Na podstawie znajomości ciężaru właściwego cytochromu dochodzimy do wniosku, że najprawdopodobniej układ heminowy w cytochromie



Rys. 6. Hipotetyczny przekrój przez cząsteczkę cytochromu c. Linia ciągłą zaznaczony hemopeptyd. Liniami kreskowanymi odszczepiane przez pepsynę części cząsteczki. Przestrzeń między zewnętrznymi i wewnętrznymi kołami zajęta jest przez łańcuchy boczne aminokwasów. Cztery łańcuchy peptydowe otaczają w ten sposób atom żelaza (Fe), że staje się on niedostępnym dla gazowego tlenu

c jest otoczony spiralami peptydowymi ze wszystkich stron w ten sposób, iż atom żelaza heminy jest odcięty od kontaktu z tlenem. Tym tłumaczymy fakt, że zredukowanego cytochromu c nie można utlenić gazowym tlenem, gdyż tlen w ogóle nie dochodzi do atomu żelaza. Natomiast dla elektronów otwarta jest droga do atomu żelaza poprzez grupę imidazolową.

W ten sposób zostaje wyjaśniona struktura przestrzenna 1/6 części całej cząsteczki cytochromu, przy czym otwierają się możliwości wyjaśnienia budowy reszty cząsteczki. Należy podkreślić, że właśnie nasze badania nad konstytucją chemiczną cytochromu c pozwalają wytłumaczyć swoisty sposób reagowania tej substancji.

Peroksydazy i katalazy

Enzymy te są hemoproteidami, a więc związkami spokrewnionymi z hemoglobina i cytochromami. Efekty ich działania zaobserwowano już w ubiegłym stuleciu, w przypadku katalaz nawet z początkiem lat

1800-nych, w przypadku peroksydaz w połowie XIX wieku. Dokonanie takich obserwacji było nieuniknionym, toteż Francuz Thenard, który pierwszy otrzymał wodę utlenioną, wykrył również działanie katalazy, gdyż nadtlenek wodoru w zetknięciu się z większością rodzimych materiałów biologicznych, rozkłada się na wodę i gazowy tlen. Na hemo-proteidowy charakter katalaz zwrócił uwagę pierwszy raz w roku 1930 Zeile i Hellström w pracowni Eulera, a pierwszy krystaliczny preparat katalazy z wątroby bydłowej otrzymali Sumner i Dunce w r. 1937.

Peroksydazy są bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym. Gdy w roku 1941 otrzymaliśmy po raz pierwszy krystaliczną peroksydazę z korzenia chrzanu, okazało się, że enzym ten wbrew twierdzeniom Willstättera, zawiera zarówno białko, jak i cukier oraz heminę, w więc zawiera żelazo. Przyczyna błędnych poglądów Willstättera tkwiła w tym, że miał on do czynienia z niezwykle aktywnym enzymem, okazującym działanie nawet w bardzo wielkich rozcieńczeniach. Tysięczna część mg enzymu rozpuszczona w litrze wody wykazuje jeszcze własności katalityczne. Peroksydazy nie rozkładają nadtlenu wodoru bezpośrednio, lecz „aktywują” go w ten sposób, że nabiera zdolności utleniania hydrohinonu, aniliny i m. in. azotynu.

Peroksydazy występują również czasami w materiale pochodzenia zwierzęcego, np. w leukocytach (verdoperoksydaza, otrzymana w czystym stanie w 1941 r. przez Kjella A g n e r a) i w mleku (laktoperoksydaza, otrzymana w czystym stanie kilka lat później przez mnie i Akesona).

Rola zarówno katalaz jak i peroksydaz w żywych komórkach jest zasadniczo identyczna. Enzymy te wykorzystują do utleniania trudno spalających się substratów nadtlenu wodoru, powstający podczas reakcji gazowego tlenu z szeregiem samoutleniających substancji, takich jak flawiny, kwas askorbinowy itd. W związku z tym interesującą jest obserwacja dokonana przez A g n e r a, że verdoperoksydaza leukocytów $+ H_2O_2$ może odtruwać toksynę zarazków tężca i błonicy, co zresztą w pewnej mierze wyjaśniałoby jedną z głównych funkcji leukocytów.

Katalazy i peroksydazy reagują z H_2O_2 wytwarzając naprzód kompleks barwy zielonej, a potem czerwonej. Studium tych kompleksów otwierało wgląd w niezmiernie zawiłe problemy, które usiłowaliśmy rozwikłać, stosując odpowiednie kombinacje spektrofotometrii i bardzo wysubtelnych metod magnetometrycznych. Nasz amerykański kolega, Britton C h a n c e, który pracował w latach 1946—1948 w Instytucie Nobla, z powodzeniem opracowuje te zagadnienia.

Na koniec pytanie. Co jest ostatecznym celem badań nad enzymami?

Pierwszym etapem musi być zbadanie przestrzennej struktury wszystkich enzymów — małe i proste zadanie. Dotychczas poznaliśmy dopiero najłatwiej dostępną szóstą część najmniejszej drobinę enzymatycznej, cytochromu c.

Drugim etapem będzie wyjaśnienie rozmieszczenia i uporządkowania enzymów w strukturach komórkowych. Rozwiązanie tego zagadnienia wypełni otwierającą się przed nami przepaść, dzielącą biochemię od morfologii.

Medyczny Instytut Nobla, Karolinska Institutet, Stockholm 60

S. GOLEWSKI, K. PILEK

Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi

Jonoforeza, polarografia, nefelometria w badaniach nad kwasami nukleinowymi

Dobrze znanym jest fakt, że niektóre substancje koloidowe są obdarzone ładunkiem elektrycznym. Jeżeli przeto podda się je działaniu pola elektrycznego następuje wówczas przemieszczenie cząstek, wędrówka, której kierunek — do katody względnie do anody — uwarunkowany jest znakiem jakim obdarzona jest poruszająca się cząstka. Zjawiska te znane były dawno: *Quincke* w roku 1859 wprowadził nazwę kataforeza, *Ostwald* — anaforeza. Badaniami w tej dziedzinie zajmowali się: *Helmholtz* (1874), *Nernst* (1897), *Guy* (1910), *Deby* i *Hückel* (1924) i wreszcie *Tiselius* (1930—37), który za gruntowne opracowanie tej metody i zbudowanie analizatora optycznego z wykorzystaniem zjawiska interferencji dostał w roku 1948 nagrodę Nobla. Każdy rok przynosił szereg nowych prac wprowadzających modyfikacje do klasycznej elektroforezy, np. zastosowanie różnych podłoży dla wędrówki jonów, jak: waty szklanej (*Coolidge*) (6), perełek szklanych (*Svensson* i *Brattsen*) (26), włókien azbestowych (*Butler* i *Stephen*) (3), żelu krzemowego (*Consdén* i wsp.) (5), czy też agaru (*Peniston*, *Agar* i *McCarthy*) (24), i wreszcie połączenie elektroforezy z zasadą chromatografii bibułowej (19), (28), (1). Ta odmiana zyskała sobie kilka nazw: elektroforeza bibułowa, elektrochromatografia, jonoforeza, jonoforeza (29).

Ścisłej rzecz biorąc, elektroforeza i jonoforeza są tym samym zjawiskiem i właściwie różnica w nazwie nie jest odbiciem jakichś cech zasadniczych. Na ogół pod nazwą „elektroforeza” rozumie się przepływ cząstek koloidalnych w polu elektrycznym, natomiast pod nazwą „jonoforeza” rozumie się wędrówkę jonów w polu elektrycznym. W przypadku jonów szybkość V poruszających się cząstek wyraża się wzorem:

$$V = \frac{e \cdot H}{\sigma \pi r \eta} \quad (a)$$

gdzie e — ładunek jonu

H — natężenie pola

η — lepkość rozpuszczalnika

$\sigma \pi r$ — współczynnik dla cząstek kulistych.

W przypadku elektroforezy siła przyciągania elektrostatycznego między wędrującymi cząstkami koloidalnymi a jonami elektrolitu otaczającego, powoduje, że V jest mniejsze niżby to wynikało z podanego wyżej wzoru. Przyjmuje się za tym, że z elektroforezą mamy do czynienia wtedy, gdy szybkość poruszających się cząstek jest mniejsza lub co najwyżej równa (a).

Już w roku 1937-39 *König i Klobusitzky* (20) zastosowali bibułę filtracyjną w miejsce *U-rurki Tiseliusa*. W ten sposób rozdzielali toksyny jądów węży i mieszaniny różnych barwników. Niezależnie od nich *Wieland i Fischer* (28) zastosowali tę metodę do rozdzielania mieszanin aminokwasów i peptydów, a *Durum* (10), *Cremer i Tiselius* (7) adaptowali ją do białek. W roku 1952 *Davidson i Smellie* (8) zastosowali ją w badaniach kwasów nukleinowych do rozdzielania nukleotydów.

Początkowo metoda ta miała charakter analizy jakościowej, później jednak przez wprowadzanie coraz to nowych ulepszeń aparatury i toku postępowania po rozdzieleniu, zaczęła nabierać cech metody ilościowej do rozdzielania i badania zarówno jonów nieorganicznych jak i związków organicznych, w tym olbrzymiej ilości substancji biologicznie czynnych. Rodzaje aparatów używanych do elektroforezy bibułowej można podzielić na dwa główne typy (16): takie w których pasek bibuły umieszczony jest poziomo jak u *Tiseliusa i Cremera* i takie w których bibuła ułożona jest w kształcie odwróconego „V”, jak podaje *Durum*. Przy ułożeniu płaskim, poziomym, szybkość poruszania się analizowanej substancji po bibule jest niezależna od miejsca nakropienia, podczas gdy w drugim wypadku szybkość wędrowki uzależniona jest od tego jak wysoko nad poziomem buforu obierzemy miejsce startu. Oczywiście w obu przypadkach zasada metody pozostaje niezmienną, a więc mamy dwa naczynia wypełnione roztworem buforowym o odpowiedniej dla danego doświadczenia sile jonowej i pH. W roztworze zanurzone są elektrody. Oba naczynia połączone są paskiem bibuły, którego jeden koniec zanurzony jest w jednym roztworze, drugi w drugim. W ten sposób pasek bibuły speł-

nia rolę klucza elektrolitycznego. Jeżeli teraz na pasku umieścimy jakąś substancję o pewnym ładunku elektrycznym, to po włączeniu źródła prądu substancja ta będzie poruszać się po bibule w kierunku zależnym od jej ładunku: albo do katody, albo do anody, przy czym szybkość tej wędrówki przy określonych warunkach elektrycznych i właściwościach roztworu buforowego będzie zależna od specyficznej ruchliwości poruszającego się jonu względnie cząstki. Wobec tego, jeżeli na bibule nakroplimy mieszaninę różnych jonów, czy związków, to w polu elektrycznym jony o mniejszej ruchliwości będą poruszać się wolniej, jony o większej ruchliwości — szybciej. Po pewnym czasie nastąpi rozdział jednych od drugich co właśnie jest celem tej metody.

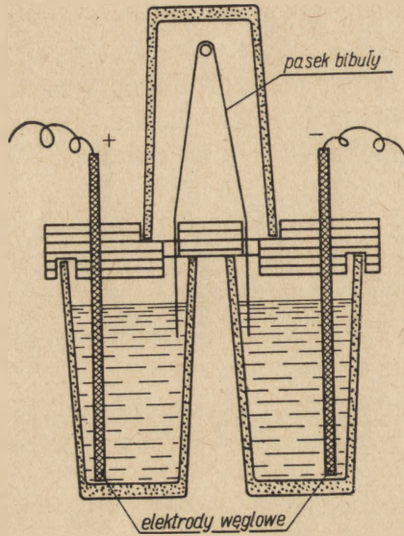
Jest bardzo dużo odmian aparatury stosowanej do elektroforezy bibulowej. Jak już wyżej wspomniano można je podzielić na dwa zasadnicze typy: z bibułą umieszczoną poziomo, albo w kształcie „V”, ale oczywiście każdy z tych rodzajów ma sporo rozwiązań technicznych, rys. 1, 2, 3.

Opracowanie dokładnych teoretycznych podstaw omawianej metody jest właściwie dopiero w stadium początkowym. Ilość parametrów mających wpływ na przebieg jonoforezy i oddziałujących wzajemnie na siebie jest duża. Ograniczę się tutaj tylko do wyliczenia ich bez bliższego omawiania każdego z osobna. A więc: rodzaj buforu, siła jonowa, pH, napięcie i natężenie prądu, rodzaj bibuły, długość i szerokość pasków, temperatura i szybkość parowania. Oczywiście nie da się powiedzieć, który z tych czynników jest bardziej ważny, który mniej. Wszystkie są ważne, bo zmiana choćby jednego wpływa na pozostałe i zmienia warunki doświadczenia.

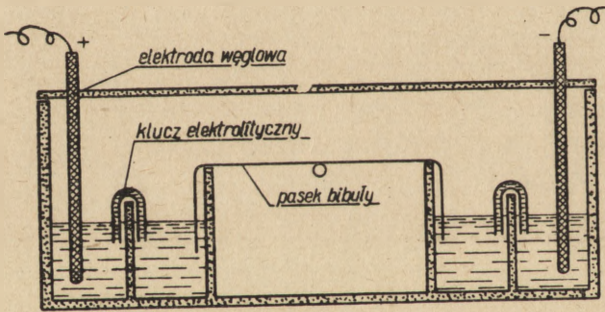
Jeżeli chodzi o zakres zmian tych czynników, to zależy od potrzeby, i tak, buforów używa się najczęściej następujących: mrówczanego, octanowego, cytrynianowego, weronalowego, boranowego, ftalanowego, fosforanowego. pH stosuje się właściwie w całej skali od 0 do 14, napięcie w granicach od 2 do 11V/cm długości paska, natężenie od ok. 0,1 do 20 mA/cm szerokości paska, siła jonowa przeważnie około 0,1 — 0,3. Ostatnio wprowadza się znacznie wyższe napięcia niż podane poprzednio (11). Jest kilka gatunków bibuły nadających się do pracy tą metodą (30), w naszych warunkach najdostępniejszą jak dotychczas jest bibuła *W h a t m a n a* o różnej gęstości. Długość pasków 40 — 70 cm, szerokość 2 — 7 cm.

Odnosnie ostatniego z wymienionych parametrów — parowania, trzeba sobie uświadomić, że w czasie trwania jonoforezy w warunkach określonego doświadczenia mamy stan stosunkowo skromplikowanej równowagi, na który składa się pewna ilość jednocześnie zachodzących

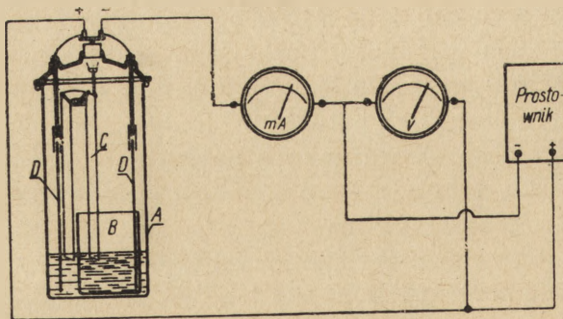
Typy aparatów stosowane do jonoforezy



Rys. 1 wg Durruma 10



Rys. 2 wg Tiseliusa i Cremera 7



Rys. 3. Typ aparatury opracowany i stosowany w Zakładzie Chemii Fizjologicznej A. M. w Łodzi (13).

procesów, a mianowicie: wędrówka jonów w polu elektrycznym, dyfuzja, przepływ roztworu buforowego wywołany elektroendoosmozą, parowanie wody z paska bibuły wskutek ciepła *J o u l a*, równowaga hydrodynamiczna na bibule między siłami kapilarnymi a siłą ciężkości, zmiany oporu elektrycznego wzdłuż paska bibuły. Do niedawna ci którzy zajmowali się zagadnieniem techniki elektroforezy na bibule starali się przeszkodzić lub przynajmniej zmniejszyć do minimum parowanie wody, w tym celu umieszczali np. pasek bibuły między płytami szklanymi i całość zanurzali w chlorobenzenu. Inni poprzestawali na odpowiednim uszczelnianiu aparatury, w której zawieszony był pasek. Jak wykazały prace *M a c h e b o e u f' a* i *R e b e y r o t t e' a* (22), parowanie gra bardzo ważną rolę w rozdzielaniu badanych substancji i raczej należy dążyć do opanowania jego regulacji, niż do zahamowania go. Wobec takich faktów jonoforezę można podzielić na dwa rodzaje: 1) z parowaniem, czyli wysychającą, nazywaną mikroelektroforezą i 2) w przestrzeni zamkniętej, mokrą. Wymienieni autorzy omawiają szczegółowo teorię i zastosowanie mikroelektroforezy w pracy podanej w piśmiennictwie.

Elektroforeza bibułowa ma obecnie olbrzymie zastosowanie. Korzysta się z niej szczególnie w tych dziedzinach gdzie metody chemiczne są zbyt grube i gdzie dysponuje się bardzo małymi ilościami materiału. Ogólnie biorąc metodą tą rozdziela się jony nieorganiczne, kompleksowe jony organiczne, białka, aminokwasy, lipoidy, węglowodany, sterole, hydrolizaty kwasów nukleinowych itd. Poza tym jonoforeza znajduje zastosowanie do celów preparatywnych (30).

Jeżeli jonoforezę stosuje się w celu rozdzielenia badanej mieszaniny na składniki, to następną czynnością jest określenie położenia tych składników na bibule. Do tego celu prowadzą różne sposoby: stosowanie odczynników chemicznych (reakcje barwne) (30), fluorescencja w świetle nadfioletowym (30), absorpcja promieniowania nadfioletowego (technika fotograficzna *M a r h a m a* i *S m i t h a*) (23), technika wysokiej częstotliwości (18), retencjografia (27) i wreszcie autoradiografia (25).

Metody chemiczne mają tę słabą stronę, że chociaż dają możliwość jakościowego wykrycia badanej substancji, to jednak w mniejszym lub większym stopniu niszczą chromatogram, który przez to dla dalszych, ilościowych badań jest przeważnie stracony. Unika się tego stosując wymienione wyżej metody fizykochemiczne. Nie wdając się w bliższy opis tych metod trzeba wspomnieć, że np. węglowodory rakotwórcze, witaminy i porfiryny można wykryć na bibule dzięki fluorescencji w świetle nadfioletowym. Związki pochodne puryn i pirymidyn można

bardzo wygodnie wykrywać korzystając z faktu, że wykazują one znaczną absorpcję promieni nadfioletowych o określonej długości fali. Dalej, położenie plam na bibule można oznaczać stosując technikę wysokiej częstotliwości, gdzie rejestruje się zaburzenia fal elektromagnetycznych przechodzących przez płamę na bibule. Retencjografia polega na tym, że pasek z rozdzieloną mieszaniną białek zanurza się w roztworze azotanu miedziowego. Przez plamy z białkiem miedź dyfunduje wolniej (retencja) niż w czystej bibule. Po pewnym czasie bibułę spryskuje się kwasem rubeanowodorowym, co daje plamy w zależności od rozmieszczenia jonów miedzi. Wysokość frontu dyfuzji zależy od ilości białka w danym miejscu paska. Wykreśla się z tego krzywą elektroforezy wg odpowiedniego wzoru. Metodą ostatnio coraz powszechniej stosowaną jest autoradiografia polegająca na zastosowaniu izotopów promieniotwórczych. Elektroforezie poddaje się substancje znaczone. Po rozdzielaniu na bibule mierzy się radioaktywność paska, która oczywiście jest największa w miejscach największego zagęszczenia substancji znaczonej, albo robi się zdjęcie stykowe.

Mówiąc o zastosowaniu jonoforezy w różnych dziedzinach wspomniano, że między innymi oddaje ona olbrzymie usługi w badaniach kwasów nukleinowych. Jeżeli kwasy nukleinowe podda się hydrolizie, to w zależności od rodzaju hydrolizy otrzymuje się różnego typu produkty odbudowy. Warto tutaj przypomnieć, że od warunków hydrolizy, a więc od czynników chemicznych, temperatury i czasu trwania zależy jakie produkty rozpadu się otrzyma. Biorąc pod uwagę czynniki chemiczne rozróżnia się hydrolizę kwaśną i alkaliczną. Interesujące jest działanie wodorotlenków różnych metali: $Pb(OH)_2$ daje w efekcie nukleozydy, $Zn(OH)_2$ i $Cd(OH)_2$ — mononukleotydy, $Al(OH)_3$ — oligonukleotydy, przy zachowaniu innych warunków doświadczenia niezmiennych.

Stosując elektroforezę bibułową mieszaninę takich produktów można rozdzielić dzięki temu, że poszczególne składniki mieszaniny zachowują się różnie w polu elektrycznym.

I tak np. w środowisku kwaśnym buforu octanowego o pH 3,2—3,5 mononukleotydy jako aniony wędrują do anody. Najwolniej przesuwa się kwas cytydylowy (KC), szybciej adenylowy (KA), jeszcze szybciej guanylowy (KG), najszybszy jest urydylowy (KU).

Wytumaczeniem takiego uszeregowania nukleotydów poddanych jonoforezie jest załączony poniżej wykres (rys. 4) (4). Ilustruje on zależność ładunku cząsteczki rybonukleotydu od pH. Przy pH ok. 3,5 KC ma ładunek najmniej ujemny. Stąd najwolniej przesuwa się do anody. KU reprezentuje ładunek najbardziej ujemny, stąd jego szybkość ku ano-

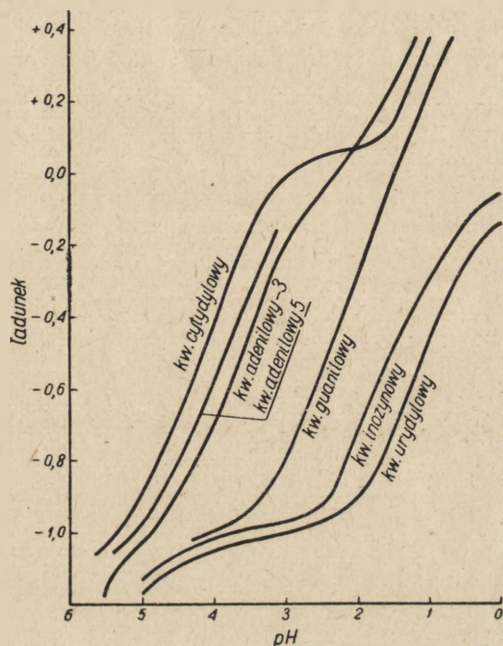
dzie jest największa — oddala się najbardziej od miejsca startu. Z wykresu widać również, że na diagramie elektroforetycznym plamy odpowiadające KC i KA powinny znajdować się blisko siebie; w znacznie większym od nich oddaleniu powinna być plama KG, zaś najdalej plama KU. Tak też jest w rzeczywistości — otrzymuje się bowiem blisko siebie i najbliżej miejsca startu KC i KA, znacznie dalej KG, na końcu zaś KU.

Nukleozydy i wolne zasady jako kationy w tych samych warunkach przesuwały się do katody. Z zasad nukleinowych najszybciej wędruje adenina, dość daleko za nią guanina, następnie uracyl i cytozyna. Rozdzielenie trzech ostatnich zasad nie jest dokładne. Z nukleozydów najszybsza jest cytydyna, która przesuwa się jednak wolniej niż adenina. Za cytydyną wędruje adenozyzna, a urydyna i gwanozyna przesuwały się bardzo niewiele i prawie nie rozdzielały się. Trzeba przy tym podkreślić, że kierunek wędrowki nie jest sprawą prostą. Zależy on od pH buforu a nawet przy jednakowym pH może być różny dla różnych buforów.

Znając powyższe fakty moż-

na z nich wyciągnąć wnioski czy hydroliza prowadzona w określonych warunkach spowodowała rozczepienie kwasu nukleinowego do stopnia mononukleotydów, czy też dalej. Przy możliwie stałych warunkach doświadczenia diagramy elektroforetyczne dają się bardzo dokładnie powtarzać.

Trzeba w tym miejscu przypomnieć, że przed wprowadzeniem chromatografii bibułowej i jonoforezy rozdzielanie i identyfikacja zasad nukleinowych, nukleozydów i nukleotydów w takich mieszaninach jak hydrolizaty kwasów nukleinowych były możliwe tylko metodami czysto chemicznymi, niesłychanie żmudnymi, wymagającymi dużych ilości (ca 100 g) materiałów wyjściowych i dalekimi od ilościowych. Natomiast do jonoforezy wystarczają setne części mililitra roztworu o odpo-



Rys. 4. W. E. Cohn, J. Am. Chem. Soc. 72, 1471, (1950).

wiednim stężeniu hydrolizatu kwasu nukleinowego, a wykrywać się dają mikrogramy badanych składników.

Jak wynika z ostatnich publikacji, metoda ta została doprowadzona do perfekcji. E d s t r o m (11) np. rozdzielał kwas rybonukleinowy (KRN) izolowany z pojedynczej komórki nerwowej. Jego ilość w takim przypadku wynosiła 1 — 100 pgm (1 pgm — $1,10^{-6}$ μ g — $1,10^{-12}$ g). Jonoforezę przeprowadzał na włóknie celulozowym. Całkowity rozdział na nukleotydy następował na przestrzeni 0,5 mm długości włókna, a plamy odpowiadające poszczególnym nukleotydom zupełnie dobrze rozdzielone i widoczne. Wyniki obserwuje się oczywiście przy odpowiednim powiększeniu. Napięcie stosowane w tej pracy — ok. 500 V/mm długości włókna.

Jeżeli chodzi o praktyczne zastosowanie jonoforezy do badania kwasów nukleinowych, to opierając się na szeregu przeprowadzonych przez nas prób możemy stwierdzić, że w naszych warunkach najdogodniejszym okazał się sposób postępowania oparty na następujących metodach: kwasy nukleinowe izoluje się z tkanki i rozdziela jonoforetycznie wg metody D a v i d s o n a i S m e l l i e (8), umiejscowienie plam na bibule określa się stosując technikę fotograficzną w nadfiolecie wg M a r k h a m a i S m i t h a (23), spalenia na fosfor wykonuje się wg B o u l a n g e r a i M o n t r e u i l (2), a ilościowe oznaczenia fosforu przeprowadza się wg F i s k e i S u b b a r o w a (15). Połączenie tych metod, przy wprowadzeniu pewnych własnych modyfikacji (12) daje wyniki zupełnie zadawalające. Do jonoforezy stosowano aparaturę własnego pomysłu (13).

Metoda w skrócie przedstawia się następująco: świeżą tkankę po zhomogenizowaniu, odwodnieniu i odlipidowaniu suszy się w eksykatorze próżniowym do stałej wagi. Suchy proszek w ilości równoważnej 5 g świeżej tkanki ekstrahuje się 10%-ym roztworem kwasu trójchlooroctowego w temperaturze poniżej 0°C, aż do zaniku reakcji na fosfor w przesączu. Osad po odwirowaniu zadaje się wodą i zobojętnia amoniakiem do pH ca 5,5. Po ponownym odwirowaniu poddaje się go trzykrotnie jednogodzinnej ekstrakcji 10%-ym roztworem NaCl na wrzącej łaźni wodnej. Z połączonych przesączów wytrąca się nukleoproteidy dwiema objętościami etanolu. Odwirowany osad poddaje się następnie 18-godzinnej hydrolizie w 0,3 n KOH w temperaturze 37°C. Hydrolizat zakwasza się kwasem nadchlorowym 60%-ym do pH 3, odwirowuje wytrącony kwas dezoksyrybonukleinowy (KDN), nadchloran potasu i białko, a roztwór zawierający rozpuszczone nukleotydy KRN poddaje się analizie. Część tego roztworu spala się w mieszaninie stężonych kwasów: siarkowego, nadchlorowego i azotowego (2) celem ilościowego

oznaczania fosforu rybonukleinowego P_{KRN} w całości, część zaś używa się do jonoforezy. Fosfor oznacza się kolorymetrycznie na fotometrze *Pulfricha* (15).

Warunki w jakich można przeprowadzać jonoforezę: bufor octanowy, siła jonowa ok. 0,1, pH 3,5, napięcie 240 V, natężenie 0,3—0,5 mA, bibuła *W h a t m a n a* Nr. 1, paski 5×50 cm, temperatura pokojowa, czas trwania jonoforezy — kilkanaście godzin. Substancję badaną nakrapla się na paski w ilościach równoważnych 50—100 μg P_{KRN} .

Po zakończeniu jonoforezy pasek wyjmuje się z aparatu, suszy (najwygodniej lampą podczerwoną) i określa na nim położenie plam odpowiadających poszczególnym nukleotydom. Do tego celu nadaje się bardzo dobrze wspomniana wyżej metoda fotografii w nadfiolecie wg *M a r k h a m a i S m i t h a* z użyciem odpowiedniego filtra optycznego (23). Metoda ta oparta jest na spostrzeżeniu, że wszystkie pochodne puryn i pirymidyn wykazują silną absorpcję w nadfiolecie w sąsiedztwie 260 $\text{m}\mu$. Bibuła filtracyjna jest przezroczysta w tym zakresie fal, tak, że możliwym jest naniesienie plam absorbujących substancji na papierze fotograficznym przez zrobienie kontaktowej odbitki. Źródłem światła w tych doświadczeniach może być lampa kwarcowa „*Hannau*” 450 Watt, 200 V. Lampa ta cechuje się dużą emisją przy około 254 $\text{m}\mu$. Do zdjęć nadaje się papier fotograficzny krajowy Filmu Polskiego B 34° 1 11 C. Żeby metodę możliwie najbardziej uczulić pożądane jest użycie filtrów w celu uzyskania światła najbardziej monochromatycznego o ww. długości fali, zwłaszcza gdy materiały fotograficzne są czułe na większe długości fali światła emitowanego przez tę lampę. Do tego celu nadaje się filtr płynny, dwuczęściowy, składający się z mieszaniny roztworów CoSO_4 i NiSO_4 w odpowiednim stężeniu i stosunku ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 100 g/l + $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 350 g/l) i z chloru gazowego rozpuszczonego w CCl_4 .

Wysuszony pasek bibuły przypina się do arkusza dykty, pod niego wkłada się pasek papieru fotograficznego. Dyktę wygina się łukowato w celu lepszego przylegania bibuły do papieru fotograficznego i naświetla się lampą. Czas naświetlania 10 — 20 sek., odległość około 1 m.

Na zdjęciu po wywołaniu stwierdza się obecność 4 plam odpowiadających poszczególnym nukleotydom rybonukleinowym, rozmieszczonym w następującej kolejności od miejsca startu: KC, KA, KG i KU.

W celu ilościowego oznaczenia nukleotydw w oddzielnych plamach postępuje się jak niżej: przez porównanie paska bibuły z fotografią określa się miejsce położenia poszczególnych plam na bibule. Bibułę następnie przecina się na części w ten sposób, żeby każda część zawie-

rała jedną plamę czyli jeden z nukleotydów. Części te spala się wg *Boulangera i Montreil* (2). Spala się również osobno te części bibuły na których zdjęcie fotograficzne nie wykazało obecności związków purynowych. Produkty spalania przenosi się do określonej objętości i oznacza w nich P_{KRN} posługując się fotometrem *Pulfricha* wg metody *Fiske i Subbarowa* (15). Jeżeli używa się kiuwet 5 cm, można jeszcze oznaczyć około 4 μg P_{KRN} w jednej plamie. Suma P oznaczona w każdej części bibuły, po odjęciu zbadanej uprzednio ilości P przypadającej na bibułę czystą i używane odczynniki daje P_{KRN} zawarty w jednym z 4-ch nukleotydów. Z kolei P_{KRN} zawartego we wszystkich czterech plamach powinna dać ilość P_{KRN} nakroploną pierwotnie do jonoforezy. W praktyce uzyskuje się zgodność zupełnie zadowalającą.

Ponieważ atom P_{KRN} odpowiada jednej cząsteczce zasady purynowej lub pirymidynowej, ustalenie ilości P_{KRN} daje możliwość określenia wzajemnych stosunków molarnych zasad występujących w badanym KRN.

Polarografia

Metoda ta w zastosowaniu do oznaczania adeniny w wyciągach tkankowych, obejmuje następujące czynniki (14):

1. odwodnienie i częściowe odlipidowanie zhomogenizowanej tkanki za pomocą mieszaniny acetonu i chloroformu, oziębionej do 0°C .
2. hydroliza otrzymanego proszku z tkanki przy użyciu $\ln \text{H}_2\text{SO}_4$.
3. po doprowadzeniu kwasoty roztworu do ok. 0,5 n wytrącanie puryn IM zawiesiną Ag_2O .
4. ekstrakcja otrzymanego srebrowego osadu puryn za pomocą $\ln \text{HCl}$ d 100°C .
5. polarografowanie otrzymanych ekstraktów z odpowiednim dodatkiem KOH i HClO_4 .

Ponieważ badane ekstrakty stosuje się także do oznaczeń nefelometrycznych gdzie nadmiar chlorków jest szkodliwy, wprowadza się ekstrakcję osadu srebrowego puryn, 0,1 n HCl . Do polarografowania bierze się wówczas bezpośrednio ekstrakt lub rozcieńcza się go odpowiednio 0,1 n HCl .

Podana metoda daje dobre wyniki zarówno przy oznaczaniu adeniny pochodzącej ze wszystkich jej związków zawartych w tkance, jak i przy oznaczaniu adeniny z kwasów nukleinowych tj. po odmyciu kwaso-rozpuszczalnej frakcji tkanki za pomocą kwasu trójchlorooctowego.

Nefelometria

Metoda ta może służyć do określania zawartości adeniny i guaniny zarówno w roztworach zawierających jedną z tych puryn, jak i ich mieszaninę (27).

Puryny wytrąca się amoniakalnym roztworem AgNO_3 w obecności roztworu albuminów jako koloidu ochronnego (17). Otrzymane zmętnienie oznacza się na nefelometrze P u l f r i c h a, wykreślając odpowiednie krzywe mętności względnych i bezwzględnych dla roztworów adeniny i guaniny oraz mieszaniny tych puryn. Dla mieszaniny adeniny i guaniny otrzymuje się wyniki niższe niżby to odpowiadało sumie mętności roztworów zawierających poszczególne puryny. Przy oznaczeniach mieszaniny puryn w ekstraktach otrzymanych z tkanki stosuje się więc następujący sposób postępowania:

1. oznacza się polarograficznie zawartość adeniny w badanym ekstrakcie,

2. znając zawartość adeniny odmierza się do oznaczenia nefelometrycznego objętość roztworu, odpowiadającą określonej ilości adeniny np. 30 μg i zawartość adeniny odczytuje się następnie z krzywej, sporządzonej uprzednio dla mieszanin 30 μg adeniny z różnymi ilościami np. 20 — 80 μg guaniny.

Otrzymuje się dobrą zgodność między sumą zawartości adeniny (z oznaczenia polarograficznego) i guaniny (z oznaczenia nefelometrycznego), a azotem purynowym oznaczonym równolegle w badanych ekstraktach mikrometodę K j e l d a h l a.

LITERATURA

1. B i s e r t e E., *Biochim. Biophysic. Acta*, **4**, 416 (1950).
2. B o u l a n g e r P., M o n t r e u i l J., *Bull. Soc. Chim.*, **33**, 784, 791 (1951).
3. B u t l e r J. A., S t e p h e n J. M., *Nature* **160**, 469 (1947).
4. C o h n W. E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 1471 (1950).
5. C o n s d e n R., G o r d o n A., M a r t i n A., *Biochem. J.* **40**, 33 (1946), **46**, 10 (1950).
6. C o o l i d g e T. B., *J. Biol. Chem.* **127**, 551 (1939).
7. C r e m e r H. D., T i s e l i u s A., *Biochem. Z.* **320**, 273 (1950).
8. D a v i d s o n J. N., S m e l l i e R. M. S., *Biochem. J.* **52**, 594 (1952).
9. D i m r o t h K., J a e n i c k e L., V o l l b r e c h t s h a u s e n I., *Z. Physiol. Chem.* **289**, 71 (1952).
10. D u r r u m E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950).
11. E d s t r o m J. E., *Nature*, **174**, 4420, 128 (1954).
12. F i l i p o w i c z B., G o l e w s k i S., P i l e k K., S k a r ż y ń s k i J., *Acta Physiol. Pol.* **5**, 629 (1954).

13. Filipowicz B., Skarzyński J., Golewski S., Pilek K., w druku w pracach zjazdu „Kolokwium Chromatografia”, Kraków (1953).
14. Filipowicz B., Leyko W., Bull. Soc. Sci. Łódź, Classe III, v. IV, 5 (1953).
15. Fiske C., Subbarow Y., J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
16. Franglen G. T., J. of Clinical Path., **6**, 183 (1953), **7**, 87 (1954).
17. Graves S. S., Kobera P. A., J. Am. Chem. Soc. **37**, 2430 (1915).
18. Hashimoto Y., Mori J., J. Pharm. Soc. Jap., **72**, 826 (1952).
19. Haugaard G., Kroner T., J. Am. Chem. Soc. **70**, 2135 (1948).
20. v. Klobusitzky, König P., Naunyn-Schmiedberg's Arch. exp. Pathol.-Pharmacol. **192**, 271 (1939).
21. Leyko W., Filipowicz B. — w druku.
22. Macheboeuf M., Rebeyrotte P., Dubert J., Brunerie M., Bull. Soc. Chim. Biol. **35**, 334, 346 (1953).
23. Markham R., Smith J. D., Biochem. J. **49**, 407 (1951), **45**, 294 (1949).
24. Peniston Q., Agar H., Mc Carthy J. M., Anal. Chem. **23**, 994 (1951). (1951).
25. Rockland L. B., J. Anal. Chem. **24**, 223 (1952).
26. Svensson H., Brattsen L., Ark. Kemi, **1**, 401 (1949/50).
27. Wieland T., Wirth L., Angew. Chem. **62**, 31, 473 (1950), **63**, 171 (1951).
28. Wieland T., Angew. Chem. A. **60**, 313 (1948).
29. Wuhmann F., Die Bluteiweisskörper des Menschen, Basel, (1947).
30. Wunderly Ch., Chimia, **7**, 145 (1953).

P. SZAFRAŃSKI

Cykl pentozowy glikozy

W ciągu ostatnich kilku lat poglądy na przemianę cukrową rozwinęły się w nowych kierunkach.

Coraz większe nagromadzenie faktów odbiegających od klasycznego schematu Embdena-Meyerhofa-Parnasa (EMP) spowodowało, że przypuszczenia o istnieniu innych dróg metabolizmu cukrowego stały się coraz bardziej realne.

Badania te nawiązują do prac Warburga i Christiana (81) z 1931 r, w których stwierdzono, że ester glikozo-6-fosforowy (G-6-P) jest utleniany przez hemolizaty czerwonych krwinek konia.

W rok później ci sami autorzy podali (82), że podobne reakcje zachodzą przy użyciu wyciągu Lebedewa. Dalsze badania Warburga i współpracowników (83) dotyczyły mechanizmu działania częściowo oczyszczonej przez Negeleina i Gerischer'a (69) dehydrogenazy estru glikozo-6-fosforowego („Zwischenferment”). Wykazali oni również, że powstający przez utlenienie G-6-P kwas 6-fosfoglikonowy (K-P-G) jest zużywany przez wyciąg Lebedewa. Lipmann wykazał oksydacyjny charakter tej drogi (63), a dalsze badania Warburga i Christiana (84) oraz Dickens'a (16, 17, 18) wskazały na fosfopentozę jako na przejściowy produkt bezpośredniego utleniania fosfoglikozy. Podobne wyniki uzyskali Engelhardt i Barchasz (25) oraz Barchasz (2) badając przemianę fosfoglikozy w ekstraktach z drożdży. Na podstawie tych wyników Engelhardt kilkanaście lat temu sugerował możliwość istnienia nowej drogi przemiany cukrowej.

Badania Lipmanna (63) nad wpływem kwasu bromooctowego na oddychanie wyciągów z drożdży wykazały brak wpływu tego inhibitora na oddychanie, jakkolwiek w warunkach beztlenowych hamowanie było wyraźne. Doświadczenia (6) na tkankach mózgu i mięśni w obecności fluorku i kwasu jodooctowego dały podobne wyniki. Ponieważ kwas jodooctowy i fluorek hamują glikolizę prawie całkowicie wyniki te

wykazały, że istnieje droga spalania glikozy niezależna od dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego, czy enolazy. Na podstawie tych danych przyjął się pogląd sformułowany przez Dickensa w 1938 r. (17), że oksydacyjna przemiana glikozy polega na kolejnym utlenianiu pojedynczych węgli końcowych, aż do triozy z ominięciem glikolizy.

W 1944 r. Emerson, Stauffer i Umbreit (26) podali hipotezę, że u roślin występują dwa szlaki spalania cukrowców. Jeden prowadzi przez glikolizę do całkowitego spalania w cyklu kwasów trójkarboksylowych, drugi zgodnie ze schematem podanym przez Dickensa (17) poprzez kolejną dekarboksylację. Po tych pracach przez szereg lat bardzo niewiele uwagi poświęcono możliwości występowania bezpośredniej drogi utleniania glikozy. Dopiero wykazanie przez Rackera w 1948 r. istnienia tej drogi u *E. coli*, następnie stwierdzenie przez Scotta i Cohena (78), że ester rybozo-5 fosforowy jest produktem utlenienia fosfoglikozy oraz wykazanie przez Horeckera i współpracowników (42), że pierwszym etapem utlenienia kwasu 6-fosfoglikonowego jest 5-fosforybuloza, spowodowało, że badania nad nową drogą przemiany cukrowej stały się bardziej intensywne.

Uzyskiwane początkowo wyniki nie przyniosły jednak spodziewanych wyjaśnień. Okazało się, że odbiegają one znacznie od siebie w różnych warunkach doświadczeń i przy stosowaniu różnych substratów. Dodając np. do nieoczyszczonych preparatów enzymatycznych fosfopentozę jako źródło fosfotriozy oraz aldehyd glikolowy uzyskiwano nagromadzenie estru ksylozo-1-fosforowego (64). Zmieniając aldehyd glikolowy na octowy stwierdzono powstawanie 5-fosfodezoksyrybozy (71). Dodając D i L — aldehydu glicerolowego uzyskano tworzenie się 1-fosfofruktozy i 1-fosfosorbozy (68). Preparaty enzymatyczne z fosfopentozą i erytrozą syntetyzowały ester sedoheptulozo-1-fosforowy. W zależności od warunków przeprowadzanych reakcji wykazywano również powstawanie takich związków jak: monofosfoheksoza, dwufosfoheksoza (22, 23), monofosfoheptuloza i dwufosfoheptuloza (43, 29, 44, 7) a także dwufosforybuloza (7). Niejasną była również rola dwuwęglowego fragmentu, który powstawał podczas tych reakcji. Wyniki te skłoniły do większego oczyszczania preparatów enzymatycznych i wreszcie do izolowania możliwie czystych enzymów.

Decydującym jednakże w tych pracach było zastosowanie znaczących związków, co pozwoliło w znacznym stopniu wyjaśnić mechanizm procesów enzymatycznych i pomogło uporządkować poznane reakcje w jeden cykl (45, 72, 37, 19). Cykl ten nazywano rozmaicie np. monofo-

sforowy cykl glikozy, oksydacyjny cykl, oraz pentozowy cykl cukrowców. To ostatnie określenie wydaje się, przyjęło się powszechnie.

Enzymy przemiany pentozowej znaleziono w preparatach zwierzęcych (3, 71, 77, 43, 29, 22, 5), roślinnych (4, 1, 73, 5, 77) oraz u szeregu drobnoustrojów (38, 39, 37). Aktywność tych enzymów waha się w różnych narządach. Czynne są wyciągi z mięśnia sercowego (46), natomiast bardzo mało aktywne z mięśnia szkieletowego (46, 20). Dużą aktywność wykazują preparaty ze szpiku kostnego, śledziony, nerki, nadnerczy i wątroby (46, 21, 57). W tej ostatniej około połowy metabolizowanej glikozy spala się w cyklu pentozowym (8). W korze nadnercza znaleziono bardzo aktywną dehydrogenazę 6-fosfoglikozy (58).

Jakkolwiek specyficznym kofermentem dehydrogenaz przemiany pentozowej jest nukleotyd trójfosfopirydynowy (TPN) a w glikolizie dwufosfopirydynowy (DPN) to jednak zarówno w przypadku pierwszym jak i w drugim są wyjątki. Np. u niektórych roślin (kiełki grochu) dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerolowego pracuje nie tylko z DPN, lecz także i z TPN (35). U niektórych szczepów bakteryjnych natomiast znaleziono (85, 15), że kofermentem dehydrogenazy 6-fosfoglikozy jest DPN.

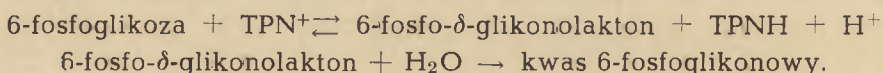
Warunkiem włączenia glikozy zarówno w przemiany glikolityczne jak i w cykl pentozowy jest jej fosforylacja na 6-ym węglu. Reakcje te katalizują kinazy przenoszące resztę fosforanową z trójfosfoadenozyny (ATP) na cząsteczkę cukru. Może to być zarówno glikokinaza jak i heksokinaza, której specyficzność nie ogranicza się wyłącznie do glikozy. Pierwszym enzymem należącym do przemiany pentozowej jest dehydrogenaza G-6-P.

Dehydrogenaza estru glikozo-6-fosforowego i glikonolaktonaza

Dehydrogenaza estru glikozo-6-fosforowego występuje w tkankach zwierzęcych (21, 30, 31, 32) oraz u szeregu drobnoustrojów (86, 14). Wprowadzony przez W a r b u r g a termin „Zwischenferment” bywa używany jeszcze do dziś. Metoda otrzymywania dehydrogenazy G-6-P z drożdży została opisana przez N e g e l e i n a i G e r i s c h e r a (69) a następnie przez K o r n b e r g a (60). Znacznie oczyszczone preparaty zostały otrzymane przez G l a s e r a i B r o w n a (28), którzy przebadali również niektóre własności tego enzymu. Stwierdzili oni, że optymalne pH dla działania dehydrogenazy G-6-P wynosi 8,5 przy czym jest ona hamowana przez jony fosforanowe. Na zasadzie kompetycji hamująco na ten enzym działa 6-fosfo-D-glikozamina. Specyficznym ko-

fermentem dehydrogenazy G-6-P jest TPN (83, 60) jakkolwiek u niektórych mikroorganizmów jak np. *Leuconstoc mesenteroides* (14), *Pseudomonas fluorescens* (86), *Mycobacterium tbc. var. hom.* (40) akceptorem wodorów okazał się DPN. Dehydrogenaza G-6-P z *L. mesenteroides* reaguje zarówno z DPN jak i z TPN (14). Dehydrogenaza z *P. fluorescens* redukuje DPN poprzez dehydrogenazę specyficzną dla TPN, z której wodory przenoszone są przez transhydrogenazę związaną z nukleotydem dwufosfopirydynowym. Do działania dehydrogenazy G-6-P nie są potrzebne jony (72), aczkolwiek enzym ten wyodrębniony z *E. coli* aktywowany jest przez Mg^{++} lub Ca^{++} (79). Dehydrogenaza fosfoglikozy jest często stosowana do ilościowego oznaczania TPN na zasadzie jego redukcji mierzonej przy 340 m μ . W podobny sposób można oznaczyć ilość estru glikozo-6-fosforowego. Enzym ten używany jest również do oznaczania ATP w układzie, w którym obok ATP występuje heksokinaza, glikoza i TPN. W ten sam pośredni sposób na podstawie zmiany absorpcji przy 340 m μ można wnioskować o aktywności heksokinazy. Podobnie przeprowadza się oznaczanie estru fruktozo-6-fosforowego oraz związanej z tym izomerazy fosfoheksozowej. Dehydrogenaza G-6-P może być również użyta do oznaczania glutationu na zasadzie jego redukcji.

Mechanizm działania dehydrogenazy G-6-P badany był początkowo przez *W a r b u r g a* i współpracowników (83) a następnie przez *L i p m a n n a* i *C o r i* (12). Ci ostatni wykazali, że reakcja utlenienia G-6-P przebiega w dwóch stadiach: 1) odwodorowanie pyranozowej formy fosfoglikozy do δ -laktonu kwasu 6-fosfoglikonowego z utworzeniem TPNH, 2) hydrolityczne otwarcie powstałego laktonu do kwasu 6-fosfoglikonowego. Ilustrują to następujące schematy:

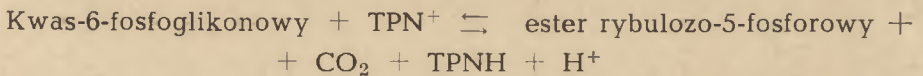


H o r e c k e r i *S m y r n i o t i s* (47) badali odwracalność pierwszej reakcji w układzie, w którym występowała dehydrogenaza G-6-P, δ -glikonolakton i TPNH oraz dehydrogenaza kwasu izocytrynowego i kwas izocytrynowy potrzebny do regeneracji TPNH. Równowaga ta jest przesunięta w kierunku utlenienia G-6-P, jednakże odwracalność tej reakcji jest wyraźna. Stwierdzono, że powstający z fosfoglikozy δ -glikonolakton ulega nieenzymatycznej hydrolizie i że okres półtrwania laktonu w pH 7,4 wynosi około 1,5 min. *B r o d i e* i *L i p m a n n* (9) stwierdzili ostatnio, że hydroliza, która przebiega stosunkowo wolno w środowisku obojętnym, jest katalizowana przez specyficzny enzym delaktonizujący. Obecność jego stwierdzono w preparatach z bakterii, drożdży i wątroby.

Dehydrogenaza kwasu 6-fosfoglikonowego (K-P-G)

Badania nad dalszą przemianą kwasu fosfoglikonowego zostały zapoczątkowane przez *Warburga i Christiana* (83), którzy stwierdzili następnie (84), że koenzymem biorącym udział w tej reakcji jest TPN. Jednakże u niektórych szczepów bakteryjnych akceptorem wodorów okazało się również DPN (40, 85, 15). Dehydrogenaza K-P-G została następnie wyizolowana z drożdży przez *Horeckera i Smyrniotisa* (48) oraz z *E. coli* przez *Rackera* (72), *McNaira*, *Scotta i Cohena* (67). *Lipmann* (63) wykazał, że przemiana kwasu fosfoglikonowego ma charakter oksydatywnej dekarboksylacji i sugerował, że w reakcji powstaje ester arabinozo-5-fosforowy. Jednakże badania *Dickensa* (17, 18) wykazały, że gromadzącą się w reakcji fosfopentozą jest 5-fosforyboza (R-5-P) ponieważ zużywają ją wyciągi drożdżowe, które nie rozkładają 5-fosfoarabinozy. *Scott i Cohen* (78) potwierdzili powstawanie estru rybozo-5-fosforowego jako produktu utlenienia kwasu 6-fosfoglikonowego, a *Horecker i Smyrniotis* (49) wyizolowali R-5-P z preparatów drożdżowych. Jednakże przy użyciu oczyszczonej dehydrogenazy kwasu fosfoglikonowego (42) okazało się, że bliższym produktem utleniania K-P-G jest nie fosforyboza, lecz ester rybulozo-5-fosforowy.

Zbadany przez *Horeckera i współpracowników* mechanizm działania dehydrogenazy kwasu fosfoglikonowego (49, 50, 51) wygląda następująco:



Mechanizm ten został potwierdzony przy pomocy reduktywnej karboksylacji 5-fosforybulozy w obecności TPNH i znaczonego dwutlenku węgla (51). Według *Horeckera i współpracowników* (49, 50) utlenienie kwasu fosfoglikonowego zachodzi na węglu 3. Reakcje te przypominają oksydacyjną dekarboksylację innych hydroksykwasów jak np. izocytrynowego i jabłkowego. Podobnie jak w tamtych przypadkach podczas utleniania K-P-G prawdopodobnie powstaje niewyosobniony ketozwiązek przyczym wspólną cechą tych reakcji jest ich aktywacja przez Mg^{++} lub Mn^{++} . Koenzymem dekarboksylazy kwasu izocytrynowego i jabłkowego jest także TPN.

Przyjmując hipotezę *Horeckera*, przypisujemy enzymowi biorącemu udział w tej reakcji dwie następujące funkcje: 1)-odwodorowanie KPG do kwasu 3-keto-6-fosfoglikonowego i 2) dekarboksylację powstałego produktu z utworzeniem fosforybulozy.

Kwas 3-keto-6-fosfoglikonowy nie został jednakże wyizolowany. U e h a r a (72) sugeruje inną drogę utleniania K-P-G. Prowadziłaby ona poprzez kwas 2-keto-fosfoglikonowy, który rozpadałby się na kwas hydroksypirogronowy i fosforiozę, a następna rekondensacja zdekarboksylowanego kwasu hydroksypirogronowego z fosfortriożą dawałaby ester rybulozo-5-fosforowy. Tego rodzaju hipoteza mogłaby być poparta przez wykazanie odwrotnej drogi, a mianowicie włączenie znaczonego dwutlenku węgla z utworzeniem kwasu fosfoglikonowego.

Jednakże odwrócenie dekarboksylacji takich ketokwasów, jak kwas pirogronowy, czy hydroksypirogronowy zachodzi tylko w bardzo małym stopniu. Można przypuszczać wobec tego, że pośrednim związkiem w oksydatywnej dekarboksylacji kwasu fosfoglikonowego jest kwas 3-keto-6-fosfoglikonowy.

Fosfopentoizomeraza

Katalizuje ona odwracalną reakcję między estrem rybulozo-5-fosforowym i rybozo-5-fosforowym z przesunięciem równowagi na korzyść tego ostatniego. Równowaga jaka ustala się odpowiada stosunkowi 1:3. Izomeraza fosfopentozowa została znaleziona w roślinach (52) u zwierząt (53) oraz w drożdżach (49). Enzym ten zawiera grupę sulfhydrylową, jest jednak mało wrażliwy na działanie kwasu jodooctowego.

Ponieważ początkowym produktem oksydatywnej dekarboksylacji kwasu fosfoglikonowego jest fosforybuloz, izomeraza fosfopentozowa katalizuje powstawanie estru rybozo-5-fosforowego, który poza cyklem pentozowym jest potrzebny do syntezy kwasów nukleinowych oraz nukleotydów odgrywających rolę kofermentów. U roślin występuje fosfopentokinaza (10), która przenosi resztę fosforanową z ATP na fosforybulozę. Utworzona dwufosforybuloz jest akceptorem dwutlenku węgla w procesie fotosyntezy.

Transketolaza

Jest to enzym rozkładający fosfopentozę zgodnie z równaniem:

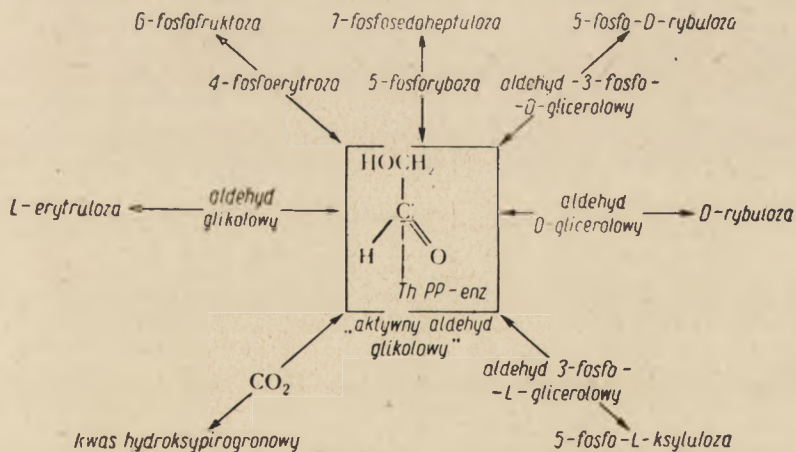
$$5\text{-fosforybuloz} + 5\text{-fosforyboz} \rightleftharpoons 7\text{-fosfosedoheptuloz} + \text{aldehyd}$$

$$3\text{-fosfoglicerolowy.}$$

Znacznie oczyszczona transketolaza została wyizolowana przez R a c k e r a i współpracowników z drożdży piekarskich (74) oraz przez H o r e c k e r a i innych ze szpinaku i wątroby (52). Występowanie transketolazy stwierdzone zostało poza tym w komórkach bakteryjnych (86, 40). Enzym ten zawiera pirofosforan tiaminy (ThPP) jako gru-

pę prostetyczną niezbędną do swego działania (52, 74). Poza fosfotiami-
ną aktywność enzymu uzależniona jest od obecności Mg^{++} (54). Kokar-
boksylaza w środowisku kwaśnym jest dosyć luźno związana z biał-
kiem i można pozbyć się jej stosując wytrącanie enzymu przy tym
oddziaływaniu lub dializę wobec roztworu kwasu etylenodwuamino-
czterooctowego (wersen). Podany przez H o r e c k e r a i współpra-
cowników (55) oraz R a c k e r a (75) mechanizm działania transketo-
lazy oparty zresztą na badaniach wielu innych autorów (86, 7) polega
na przeniesieniu dwuwęglowego fragmentu z estru rybulozo-5-fosforo-
wego na 5-fosforybozę co prowadzi do powstania 7-fosfodeoheptulozy
i trozy zidentyfikowanej jako oldehyd 3-fosfoglicerolowy¹.

Dwuwęglowa reszta aldehydowa w połączeniu z enzymem określa
się jako „aktywny aldehyd glikolowy”. Specyficzność transketolazy
okazała się stosunkowo niska. Zarówno prekursorami jak i akceptorami
„aktywnego aldehydu” może być wiele związków. Wśród donato-
rów dwuwęglowego fragmentu są takie jak: kwas hydroksypirogrono-
wy (37), 6-fosfofruktoza (75), 7-fosfodeoheptuloza, L-erytruloza (54),
5-fosfo-D-rybulosa, D-rybulosa, 5-fosfo-L-ksyluloza (37). Akceptorami
aktywnego aldehydu mogą być: aldehyd glikolowy, glicerolowy, 3-fos-
foglicerolowy, 5-fosforyboza (53) 5-fosfodezoksyryboza (72), 4-fosfoery-
troza (37). Tak więc transketolaza jest tranferazą o reakcje w których
może uczestniczyć ilustruje załączony rys. 1.

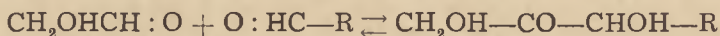


Rys. 1 Mechanizm działania transketolazy.

Wydaje się, że transketolaza wymaga do swego działania obecności
grupy alkoholowej i aldehydowej w substracie, przy czym kondensacja

¹ Przypuszcza się obecnie (80a), że substratem dla transketolazy nie jest 5-fosforybulosa, a 5-fosfoksyluloza. Miałyby ona powstawać z 5-fosforybulozy pod działaniem odpowiedniej izomerazy.

jaka zachodzi między aldehydem glikolowym i akceptorem ma charakter kondensacji acyloinowej w wyniku której powstaje α -oksyketon:



Mała specyficzność transketolazy sprawia, że może być ona użyta do syntezy wielu związków organicznych.

Jak widać z załączonego rysunku droga powstawania fosfopentoz prowadzi nie tylko poprzez kwas fosfoglikonowy. Pentozy mogą tworzyć się również w obecności transketolazy jeżeli istnieje jakieś źródło „aktywnego aldehydu” oraz odpowiedni akceptor. Potencjalnym źródłem dwuwęglowego fragmentu jest seryna, która na drodze transaminacji przechodzi w kwas hydroksypirogronowy (80), a ten z kolei może być prekursorem aldehydu glikolowego.

Transaldolaza

Enzym ten katalizuje rozpad estru sedoheptulozo-7-fosforowego zgodnie z reakcją:

7-fosfosedoheptuloza \rightleftharpoons 4-fosfo-D-erytroza + dwuhydroksyaceton,
 dwuhydroksyaceton + aldehyd 3-fosfoglicerolowy \rightleftharpoons 6-fosfofruktoza.
 Transaldolaza została znaleziona zarówno u zwierząt (72), roślin (1) jak i u drobnoustrojów (38). H o r e c k e r i S m y r n i o t i s (56) oraz R a c k e r i inni (74) znacznie oczyścili transaldolazę z drożdży oraz zbadali własności tego enzymu.

Pierwsze doniesienia o występowaniu fosfoheptulozy w przemianie cukrowej u drożdży sięgają 1938 r. (76). Przez kilkanaście lat nie pamiętano o fosforylowanej heptulozie i dopiero sugestie B e n s o n a (7) o możliwościach udziału fosfoheptulozy w fotosyntezie zwróciły powtórnie uwagę na ten związek. H o r e c k e r i S m y r n i o t i s (43) wykazali, że ester sedoheptulozo-1-fosforowy może powstawać przy udziale aldolazy z fosfodwuhydroksyacetonu i erytrozy. H o r e c k e r (44) podał również, że wobec aldolazy mięśniowej z fosfotetrozy i fosfortriozy tworzy się dwufosfosedoheptuloza. Synteza heptulozy może więc być katalizowana przez transaldolazę, aldolazę oraz transketolazę. Reakcje te wyjaśniły zagadkę powstawania heptoz w przemianie cukrowej.

Specyficzność działania transaldolazy okazała się znaczna. Donatorami dwuhydroksyacetonu mogą być tylko 7-fosfosedoheptuloza lub 6-fosfofruktoza, akceptorami natomiast tego związku może być aldehyd 3-fosfoglicerolowy i 4-fosfoerytroza (56). Do chwili obecnej nie zostało ustalone czy transaldolaza zawiera jakiś koezym, jak również brak

bliższych danych o postulowanym związku dwuhydroksyacetonu z enzymem t. z. „aktywnym dwuhydroksy-acetonie”.

Utworzona pod wpływem działania transaldolazy 6-fosfofruktoza w obecności fosfoheksozoizomerazy zostaje zamieniona na ester glikozo-6-fosforowy. Fosfofruktoza powstaje również w cyklu pentozowym w wyniku działania trysketolazy jeżeli akceptorem aldehydu glikolowego jest 4-fosfoerytroza. Powstały z kolei ester glikozo-6-fosforowy ulega powtórnym cyklicznym przemianom uwidocznionym na rys. 2.

Energetyczny efekt

Wiadomości na ten temat są niewystarczające. Ponieważ w cyklu pentozowym istnieją tylko dwa stadia związane z utlenieniem (G-6-P i K-P-G) zysk energetyczny ograniczy się do tych reakcji. Zakładając, że trzem fosforylacjom odpowiada jeden atom tlenu potrzebny do utlenienia cząsteczki TPNH czy DPNH można przypuszczać, że spalaniu jednego węgla glikozy towarzyszy powstanie sześciu cząsteczek ATP. Tak więc spalanie całej cząsteczki glikozy w cyklu pentozowym dałoby 36 cząsteczek ATP brutto. Glikoliza natomiast wraz z końcowym spalaniem w cyklu Krebsa licząc od glikozy dostarcza 38 cząsteczek ATP netto. W porównaniu więc z tą drogą przemiany cukrowców cykl pentozowy jest mniej energiodajny (41).

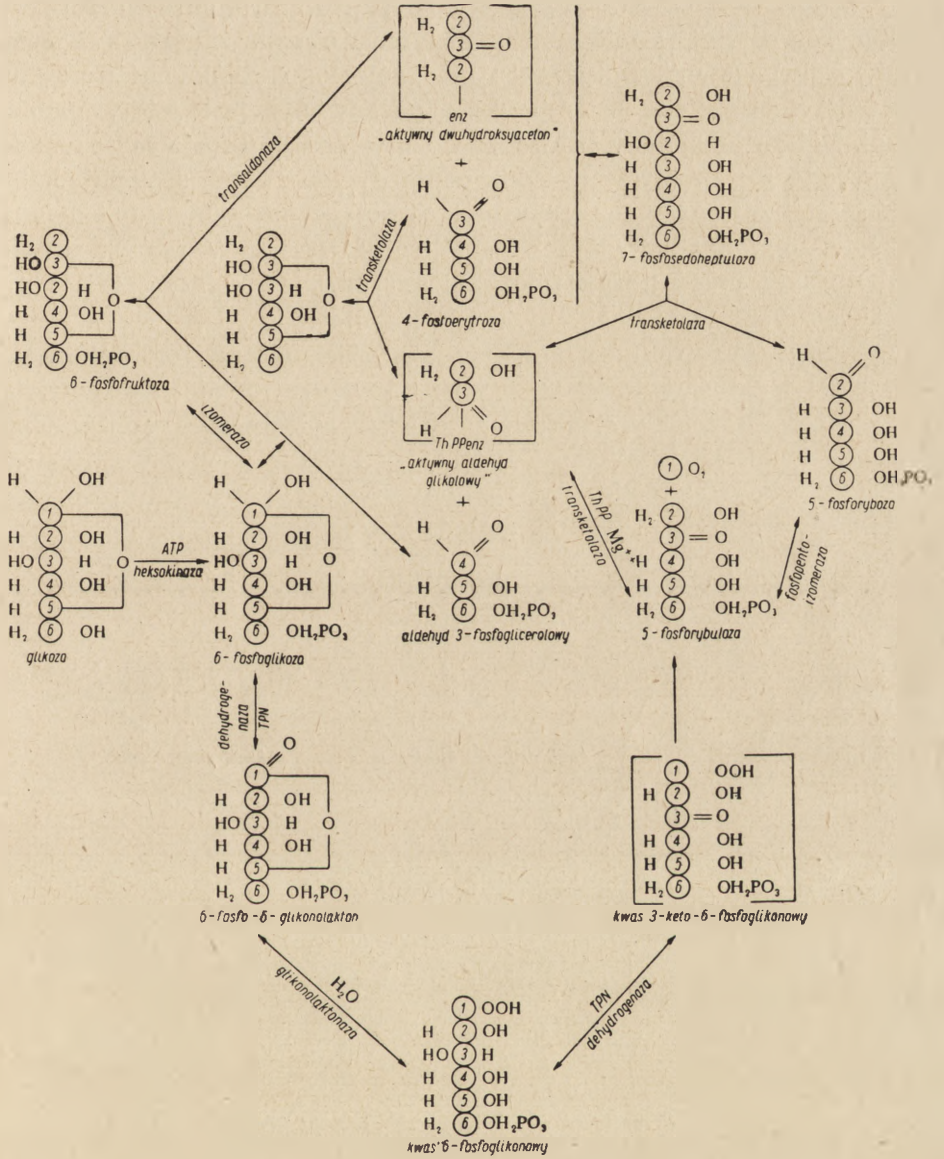
Regulacja hormonalna

Obserwacje G l o c k i M c L e a n (32) dotyczące aktywności enzymów cyklu pentozowego w tkankach zwierząt wskazują, że droga ta jest regulowana hormonalnie. Autorzy ci wykazali, że aktywność enzymów utleniających bezpośrednio glikozę jest związana z płcią szczura. Jest ona wyższa w wątrobie samic. Poziom tych enzymów wzrasta również w gruczole mlecznym w okresie laktacji. Tego rodzaju badania muszą być jednak prowadzone z dużą ostrożnością. G l o c k i M c L e a n stwierdzili, że ograniczone pobieranie pokarmu znacznie obniża aktywność dehydrogenazy 6-fosfoglikozy i kwasu 6-fosfoglikonowego w wątrobie szczura (33). Równocześnie spada zawartość kwasów rybonukleinowych (19, 33). Aktywność wspomnianych dehydrogenaz w wątrobie ulega także zmianom sezonowym, przy czym ilość ich wzrasta latem a maleje zimą. Prace eksperymentalne (33, 34) wskazują, że podczas cukrzycy wywołanej alloxanem poziom dehydrogenaz, biorących udział w cyklu pentozowym maleje w wątrobie szczura do około

$\frac{1}{3}$ ilości znajdujących u zwierząt kontrolnych a równocześnie spada poziom kwasów rybonukleinowych. Tyroksyna wzmagą prawie dwukrotnie aktywność obu dehydrogenaz, podczas gdy tiouracyl nie wywołuje większych zmian w stosunku do całkowitej aktywności enzymatycznej wątroby. Podawanie krystalicznego hormonu wzrostowego nie powoduje wyraźnych zmian w zawartości dehydrogenazy 6-fosfoglikozy w wątrobie. In vitro krystaliczna insulina, hormon wzrostowy oraz D, L-tyroksyna nie wpływają na aktywność obu omawianych dehydrogenaz.

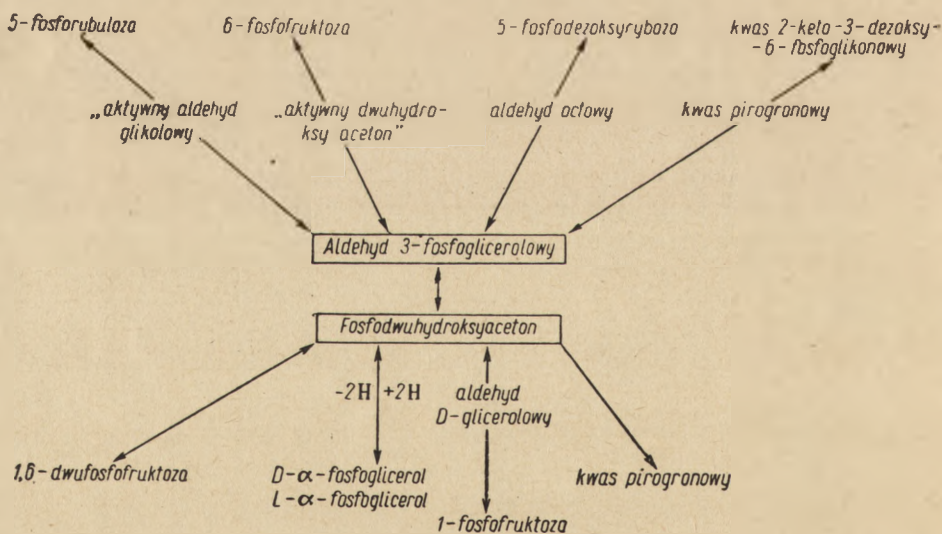
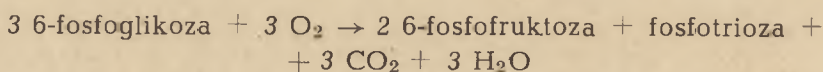
Omówienie cyklu pentozowego

Bezpośrednie utlenianie glikozy w odróżnieniu od poznanych dobrze przemian cukrowych jest procesem kołowym. Fosfoglikoza, która jest początkowym produktem, w tym cyklu ulega przemianom prowadzącym do powtórnego utworzenia tego związku. Omawiane reakcje przedstawione są na rys. 2. Ufosforylowana na węglu 6 pyranozowa postać glikozy ulega pod działaniem dehydrogenazy i TPN utlenieniu do kwasu 6-fosfoglikonowego. Proces ten przebiega bez udziału jakichkolwiek jonów, chociaż może być aktywowany przez różne związki. Przejściowym produktem w tej reakcji jest δ -lakton kwasu 6-fosfoglikonowego, który pod wpływem glikonolaktonazy przechodzi w K-P-G. Powolna delaktonizacja zachodzi również bez udziału enzymu, jednakże występowanie aktywnej glikonolaktonazy w komórkach szeregu organizmów świadczy o udziale tego fermentu w omawianej reakcji. Dalsza przemiana K-P-G prowadzi przez niewyzolowany związek, który w/g H o r e c k e r a jest kwasem 3-keto-6-fosfoglikonowym. Dekarboksylacja tego kwasu daje w wyniku 5-fosforybulozę. Biorąc tu udział dehydrogenaza jest związana jak i w poprzedniej reakcji z TPN. Enzym ten posiada dwie funkcje: 1) odwodorowuje kwas fosfoglikonowy i 2) odłącza dwutlenek węgla. Po tej oksydatywnej dekarboksylacji K-P-G utworzona 5-fosforybuloza ulega częściowo działaniu fosfopentoizomerazy, częściowo zaś transketolazy. (patrz oddendum str. 9.) Równowaga jaka ustala się między 5-fosforybulozą a 5-fosforybozą odpowiada około 75% fosforybozy. Charakterystycznym jest fakt, że uczestnicząca w tej reakcji izomeraza pomimo obecności grup sulfhydrylowych nie jest hamowana przez kwas jodoctowy. W wyniku działania transketolazy 5-fosforybuloza zostaje rozłożona na aldehyd 3-fosfoglicerolowy oraz dwuwęglowy fragment (p. ¹) str. 333). Związkiem tym jest aldehyd glikolowy związany z enzymem i fosfotiaminą, która jest koenzymem transketolazy. Utworzony produkt nosi nazwę „aktywnego aldehydu glikolowego”. Reaguje on z kolei z 5-fosforybozą dając w wyniku 7-fosfosedohaptulozę



Rys. 2

i wolną transketolazę Reakcja transketolazowa katalizatora jest przez Mg^{++} . Powstała fosfoheptuloza zostaje rozbita przez transaldolazę na dwa związki. Jednym z nich jest 4-fosfoerytroza, drugim dwuhydroksyaceton. Ten ostatni w połączeniu z enzymem określa się jako „aktywny dwuhydroksyaceton”. Dotychczas nie znaleziono koenzymu transaldolazy i przypuszcza się, że ferment ten pozbawiony jest reszty białkowej. Dalsze przemiany prowadzą do utworzenia 6-fosfofruktozy. Może ona jednak powstawać w cyklu pentozowym dwoma drogami. Jedna z nich katalizowana przez transaldolazę polega na kondensacji dwuhydroksyacetonu z aldehydem 3-fosfoglicerolowym. W reakcji drugiej katalizowanej przez transketolazę bierze udział 4-fosfoerytroza, która jest akceptorem „aktywnego aldehydu glikolowego”. Utworzona w obu przypadkach fosfofruktoza pod wpływem izomerazy fosfohekozowej przechodzi w 6-fosfoglikozę. G-6-P ulega kolejnym cyklicznym przemianom. Procesy te zostały wyjaśnione dzięki zastosowaniu odpowiednio znaczonych związków. Rys. 2 tłumaczy reakcję syntezy i rozpadu w oparciu o badania izotopowe. Ogólna reakcja cyklu w której zachodzi spalanie trzech atomów węgla wygląda następująco:



Rys. 3. Przemiana fosfotriozy.

Wspólne produkty przemiany cyklu pentozowego i innych przemian cukrowych sprawiają, że zajął się szlaki metaboliczne przebiegają obok siebie na zasadzie równowagi. Centralnym punktem większości

znanych przemian cukrowych jest fosfotrioza. Rys. 3 przedstawia możliwości metaboliczne aldehydu 3-fosfoglicerolowego.

Na odcinku fosfotriozy w cyklu pentozowym współzawodniczą niewątpliwie dwa enzymy: transaldolaza i dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerolowego. Od aktywności obu tych enzymów zależeć będzie intensywność krzyżującej się w tym miejscu przemiany glikolitycznej i pentozowej. Należy podkreślić zasadnicze znaczenie glikolizy jako beztlenowej drogi przemiany cukrowej w tkankach zwierzęcych do kwasu pirogronowego, a u roślin i drobnoustrojów do alkoholu lub innych produktów. Przemiany te w przeciwieństwie do cyklu pentozowego hamowane są kwasem jodoctowym i fluorkiem. Przy porównawczych badaniach obu tych dróg próbowano oznaczać całkowitą ilość TPN i DPN w badanym materiale. Próby te jednak nie dały zadawalających rezultatów (19). Utworzona w cyklu pentozowym fosfotrioza może również ulegać kondensacji z drugą cząsteczką aldehydu fosfoglicerolowego dając w wyniku 1,6-dwufosfofruktozę. Związek ten może być metabolizowany zgodnie z drogą E. M. P. Może on jednak przejść pod wpływem fosfatazy w 6-fosfofruktozę, a ta z kolei w fosfoglikozę. Drogę tą sugeruje H o r e c k e r ze współpracownikami (55) oraz K o c z e t o w, który badał przemianę wyciągów z wątroby szczura (59). Powiązanie cyklu pentozowego z innymi szlakami metabolicznymi jest jeszcze możliwe na etapie kwasu fosfoglikonowego. Odkryta przez E n t n e r a i D o u d o r o f f a oraz innych (27, 66, 86, 61, 62) nowa droga spalania glikozy jest zgodna w dwu pierwszych stadiach z cyklem pentozowym (G-6-P i K-P-G). Dalsza przemiana kwasu 6-fosfoglikonowego w/g wspomnianych autorów biegnie poprzez kwas 2-keto-3-dezoksy-6-fosfoglikonowy do kwasu pirogronowego i aldehydu 3-fosfoglicerolowego. Takie powiązanie różnych szlaków metabolicznych przebiegających obok siebie na zasadzie równowagi ma olbrzymie znaczenie w tym przypadku, gdy szereg elementów lub jeden z nich zostaje wykluczony z przemiany. Powoduje to aktywację innej drogi metabolicznej, która w danych warunkach jest możliwa. Wykrywanie nowych cukrów a także różnorodność przemian jakim mogą one ulegać rozszerza coraz bardziej poglądy na przemianę węglowodanów oraz świadczy o olbrzymim bogactwie metabolicznym żywych organizmów.

LITERATURA

1. Axelrod, B. Bandurski, R. S. Greiner, C. M., i Jang, R., *J. Biol. Chem.* **202**, 619 (1953).
2. Barchasz, A. P., D. A. N., **23**, 466 (1939). — podaje A. P. Barchasz i M. J. Timofiejewa w *Biochimija* **20**, 623 (1955).
3. Barchasz A. P., Demianowskaja, N. S., D. A. N. **54** 427 (1946).
4. Barchasz, A. P., i Timofiejewa, M. J., *Biochimija* **17**, 611 (1952).
5. Barchasz, A. P., Timofiejewa, M. J., *Biochimija* **20**, 623 (1955).
6. Barker, S. B., Shorr, E. Malam, M., *J. Biol. Chem.* **129**, 33 (1939).
7. Benson, A. A., Bassham, J. A., Calvin, M. Hall, A. G., Hirsch, H. E., Kawaguchi, S. Lynch, V. Tolbert, N. E., *J. Biol. Chem.* **196**, 703 (1952).
8. Bloom, B., Stetten De Witt, Jr., *J. Biol. Chem.* **212**, 555 (1955).
9. Brodie, A. F., Lipmann, F., *J. Biol. Chem.* **212**, 677 (1955).
10. Calvin, M., 3-ème Congrès International de Biochimie, Rapports, Bruxelles, 111 (1955).
11. Colowick, S. P., Kaplan, N. O., Neufeld, E. F., Ciotti, M. M., *J. Biol. Chem.* **195**, 95 (1952).
12. Cori, O., Lipmann, F., *J. Biol. Chem.* **194**, 417 (1952).
13. De Moss, R. D., Bard, R. C., Gunsalus, I. C., *J. Bacteriol.*, **62**, 499 (1951).
14. De Moss, R. D., Gunsalus, I. C., Bard, R. C., *J. Bacteriol.* **66**, 10 (1953).
15. De Moss, R. D., *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, Suppl. **1**, 207 (1953).
16. Dickens, F., *Nature*, **138**, 1057 (1936).
17. Dickens, F., *Biochem. J.* **32**, 1626 (1938).
18. Dickens, F., *Biochem. J.* **32**, 1645 (1938).
19. Dickens, F., 3-ème Congrès International de Biochimie, Rapports, Bruxelles, 126 (1955).
20. Dickens, F., Glock, G. E., *Nature*, **166**, 33 (1950).
21. Dickens, F., Glock, G. E., *Biochem. J.* **50**, 81 (1951).
22. Dische, Z., *Naturwiss.*, **26**, 252 (1938).
23. Dische, Z., w „Phosphorus Metabolism“, I., Johns Hopkins Press, Baltimore, 1953 — podaje E. Racker w *Adv. Enzym.* **15**, 141 (1954).
24. Dische, Z. Pollaczek, E., Congrès Intern. Biochim., Paris, 289 (1952).
25. Engelhardt, W. A., Barchasz, A. P., *Biochimija*, **3**, 500, 1938. — podaje A. P. Barchasz, N. S. Demianowskaja w D. A. N., **54**, 427 (1946).
26. Emerson, R. L., Stauffer, J. F., Umbreit, W. W., *J. Am. Botany*, **31**, 107 (1944).
27. Entner, N., Doudoroff, M., *J. Biol. Chem.* **196**, 853 (1952).
28. Glaser, L., Brown, D. H., *J. Biol. Chem.* **216**, 67 (1955).
29. Glock, G. E., *Biochem. J.*, **52**, 575 (1952).
30. Glock, G. E., McLean, P., *Nature*, **170**, 119 (1952).
31. Glock, G. E., McLean, P., *Biochem. J.* **55**, 400 (1953).
32. Glock, G. E., McLean, P., *Biochem. J.* **56**, 171 (1954).
33. Glock, G. E., McLean, P., *Biochem. J.* **61**, 390 (1955).
34. Glock, G. E., McLean, P., *Biochim. et Biophys. Acta*, **16**, 446 (1955).

35. Gibbs, M., *Nature*, **170**, 164 (1952).
36. Gunsalus, I. C., Gibbs, M., *J. Biol. Chem.* **194**, 871 (1952).
37. Gunsalus, I. C., Horecker, B. L., Wood, W. A., *Bacter. Rev.* **19**, 79 (1955).
38. Heller, J., Szafranski, P., *Bull. de l'Acad. Polon. des Scien. Cl. II.* — III, 29 (1955).
39. Heller, J., Szafranski, P., *Acta Biochim. Polon.*, **4**, 435 (1955).
40. Heller, J., Szafranski, P., *Acta Biochim. Polon.* (1956) — w druku.
41. Heller, J. doniesienie referatowe (1955).
42. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., Seegmiller, J. E., *J. Biol. Chem.*, **193**, 383 (1951).
43. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2123 (1952).
44. Horecker, B. L., w „Mechanism of Enzyme Action” *Johns Hopkins Press*, Baltimore, 1953 — podaje E. Racker w *Adv. Enzym.* **15**, 141 (1954).
45. Horecker, B. L., *Brewers Digest*, **28**, 214 (1953).
46. Horecker, B. L., w „Phosphorus Metabolism” *J. Johns Hopkins Press*, Baltimore (1951).
47. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *Biochim. et Biophys. Acta.*, **12**, 98 (1953).
48. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *J. Biol. Chem.* **193**, 371 (1951).
49. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *Arch. Biochem.* **29**, 232 (1950).
50. Horecker, B. L., *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, Suppl. **1**, 137 (1953).
51. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *J. Biol. Chem.* **196**, 135 (1952).
52. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1009 (1953).
53. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2123 (1952).
54. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., Klenow, H., *J. Biol. Chem.* **205**, 661 (1953).
55. Horecker, B. L., Gibbs, M., Klenow, H., Smyrniotis, P. Z., *J. Biol. Chem.* **207**, 393 (1954).
56. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., *J. Biol. Chem.* **212**, 811 (1955).
57. Horecker, B. L., Seegmiller, J. E., *J. Biol. Chem.* **194**, 261 (1952).
58. Kelly T. L., Nielson, E. D., Johnson, R. B., Vestling, C. S., *J. Biol. Chem.* **212**, 545 (1955).
59. Koczeto, G. A., *Biochimija*, **20**, 220 (1955).
60. Kornberg, A., *J. Biol. Chem.* **182**, 805 (1950).
61. Kovachevich, R., Wood, W. A., *J. Biol. Chem.* **213**, 745 (1955).
62. Kovachevich, R., Wood, W. A., *J. Bioch. Chem.* **213**, 757 (1955).
63. Lipmann, F., *Nature*, **138**, 588 (1936).
64. Lohmann, K., *Angew. Chem.*, **49**, 327 (1936).
65. Lohmann, K., *Biochem. Z.* **254**, 332 (1932).
66. Mac Gee, J., Doudoroff, M., *J. Biol. Chem.*, **210**, 617 (1954).
67. McNair Scott, D. B., Cohen, S. S., *Biochem. J.* **55**, 23 (1953).
68. Meyerhof, O., Lohmann, K., Schuster, P., *Biochem. Z.*, **286**, 319 (1936).
69. Negelein, E., i Gerischer, W., *Biochem. Z.* **284**, 289 (1936).
70. Nordal, A., Benson, A. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5054 (1954).
71. Racker, E., *J. Biol. Chem.* **196**, 347 (1952).
72. Racker, E., *Adv. Enzym.*, **15**, 141 (1954).
73. Racker, E., *Nature*, **175**, 4449, 249 (1955).

74. Racker, E., de la Haba, G., Leder, I. G., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1010 (1953).
75. Racker, E., de la Haba, G., Leder, I. G., *Arch Biochem. Biophys.* **48**, 238 (1954).
76. Robison, R., MacFarlane, M. G., Tazelaar A., *Nature*, **142**, 114 (1938).
77. Sable, H. Z., *Biochim. et Biophys. Acta.* **8**, 687 (1952).
78. Scott, D. B. M., Cohen, S. S., *J. Biol. Chem.* **188**, 509 (1951).
79. Scott, D. B. M., Cohen, S. S., *Biochem. J.* **55**, 23 (1953).
80. Sprinson, D. B., Chargaff, E., *J. Biol. Chem.* **164**, 411 (1946).
- 80a. Srere, P. A., Cooper, J. R., Klybas, V., Racker, E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **59**, 535 (1955).
81. Warburg, O., Christian, W., *Biochem. Z.* **242**, 206 (1931).
82. Warburg, O., Christian, W., *Biochem. Z.* **254**, 438 (1932).
83. Warburg, O., Christian, W., Griese, A., *Biochem. Z.* **282**, 157 (1935).
84. Warburg, O., Christian, W., *Biochem. Z.* **292**, 287 (1937).
85. Wood, W. A., Schwerdt, R. F., *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, Suppl. 1. 165 (1953).
86. Wood, W. A., Schwerdt, R. F., *J. Biol. Chem.*, **206**, 625 (1954).

A. PIGOŃ

Zakład Cytofizjologii U. J., Kraków.

Metody manometryczne opracowane w Laboratorium Carlsberg

Laboratorium Carlsberg. W r. 1875 duński piwowar, J. C. Jacobsen przeznaczył część dochodu z Browaru Carlsberg, który był jego własnością, na utworzenie pracowni naukowej, nazwanej Laboratorium Carlsberg. Pracownia ta miała cele czysto naukowe, nie była związana tematyką badań z przemysłem browarnianym. Po śmierci Jacobsena browar stał się własnością fundacji; majątkiem tej fundacji dysponuje Duńska Akademia Nauk. Browar i fundacja Jacobsena istnieją do dziś. Do dzisiaj też Laboratorium Carlsberg otrzymuje z tej fundacji, za pośrednictwem Duńskiej Akademii Nauk, pieniądze potrzebne na opłacenie personelu, zakup aparatury, czasopism i książek, i na inne wydatki związane z prowadzonymi badaniami.

Laboratorium Carlsberg składa się z dwóch oddziałów: chemicznego i fizjologicznego. Biblioteka, i częściowo administracja, są wspólne. Prócz tych dwóch oddziałów, które stanowią trzon Laboratorium, istnieją okresowo bardziej specjalne, mniejsze oddziały, np. oddział cytochemiczny, istniejący obecnie (pod kierownictwem H. Holtera), czy oddział fizjologii drożdży, który został zwinięty po II wojnie światowej.

Duńska Akademia Nauk dysponuje pieniędzmi fundacji i wybiera dyrektorów oddziałów, którzy zazwyczaj spełniają tę funkcję dożywotnio. Przyjmowanie pozostałego personelu należy do kompetencji tych dyrektorów. Dyrektorami oddziału chemicznego byli poprzednio Kjeldahl, a po nim Sørensen. Obecnie jest nim K. Linderström-Lang. Dyrektorem oddziału fizjologicznego byli Hansen i Schmidt, znany oceanograf, którego nazwisko wiąże się z badaniami biologii węgorza. Obecnie dyrektorem jest O. Winge, genetyk, pracujący głównie nad drożdżami. Zestawie-

nie tych nazwisk wzbudza podziw dla umiejętnego doboru ludzi. Jak widać, dyrektorami Laboratorium Carlsberg są uczeni o światowej sławie. Co ważniejsze, ludzie ci doszli do swych najpiękniejszych osiągnięć naukowych już jako dyrektorzy Laboratorium.

W oddziale chemicznym, a ostatnio też w oddziale cytochemicznym, opracowano różne metody ultra-mikroanalizy, które znalazły szerokie zastosowanie w biochemii. Metody te w większej części są rezultatem współpracy dwóch uczonych, których fotografie zamieszczamy. Są to Kaj Linderström-Lang, dyrektor oddziału chemicznego, i Heinz Holter, dyrektor oddziału cytochemicznego Laboratorium. W tym artykule przedstawiam metody manometryczne. Prócz nich opracowano jeszcze wiele innych metod, np. mikro-miareczkowanie, które znalazło bardzo szerokie zastosowanie, m. in. w znanych badaniach Linderström-Langa nad lokalizacją enzymów trawiennych w komórkach przewodu pokarmowego, metodę oznaczania zmian ciężaru właściwego („gradient tube”) zastosowaną do pomiaru aktywności niektórych enzymów proteolitycznych, itd.

Nurek kartejuszowski

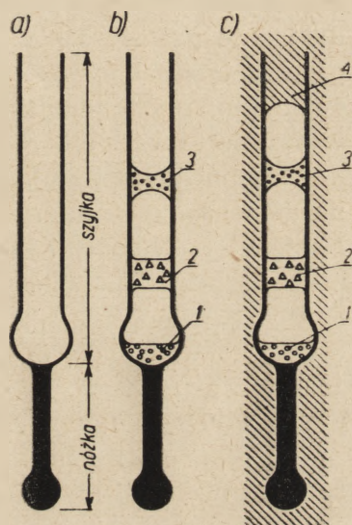
Zasada. Nurek kartejuszowski w formie, jaką mu nadali pracownicy Laboratorium Carlsberg, przedstawia takie same możliwości i tę samą dokładność pomiaru co aparat Warburga, jednak ilość materiału doświadczalnego potrzebna tutaj jest przeszło tysiąc razy mniejsza.

Klasyczny nurek kartejuszowski jest laleczką szklaną, obciążoną odpowiednio ołowiem, lecz poza tym wypełnioną powietrzem. Laleczka ma w głowie otwór, zaciągnięty cienką błoną gumową. Zanurzona w naczyniu z wodą laleczka powoli opada na dno. Gdy jednak w naczyniu zmniejszy się ciśnienie, powietrze zawarte wewnątrz laleczki rozpręży się, błona gumowa wydyma się nieco, i laleczka unosi się ku powierzchni. Przy zwiększeniu ciśnienia w naczyniu (np. przez włączenie korka lub dmuchanie ustami) powietrze wewnątrz laleczki zmniejsza objętość, a woda wciska do wnętrza błonę gumową; w rezultacie laleczka nurkuje. Tę zasadę wykorzystali Linderström-Lang i Glick (1937) i Linderström-Lang (1937) do pomiaru niewielkich zmian objętości gazu. Laleczkę zastępuje rurka szklana, średnicy około 1 mm, długość około 12 mm, zatopiona i obciążona na jednym końcu. Wewnątrz rurki znajduje się gaz (zazwyczaj powietrze) i krople cieczy, zamykające szyjkę. Menisk tych kropli działa jak błona gumowa klasycznego nurka kartejuszowskiego. Zmiany ciśnienia w naczyniu, w którym nurek pływa, powodują zmiany objętości zawar-

tego w nim gazu i przesuwanie się kropli cieczy w szyjce nurka. Na początku doświadczenia nurek napełniamy w odpowiedni sposób, i umieszczamy w naczynku, w którym ciśnienie daje się regulować i dokładnie mierzyć (do 1 mm słupa wody). Zmieniając ciśnienie w tym naczynku doprowadza się nurka do unoszenia się wewnątrz płynu, tak, że nurek ani nie tonie ani nie pływa przy powierzchni. Ciśnienie, przy którym nurek się unosi, nazwiemy ciśnieniem równowagi. Po jakimś czasie, np. po 10 minutach, ponownie doprowadzamy nurka do stanu unoszenia się wewnątrz płynu; tym razem jednak, jeżeli objętość gazu w nurku uległa zmianie, ciśnienie równowagi jest inne niż na początku doświadczenia. Powtarzając taki pomiar kilka razy, wyznaczamy z dużą dokładnością szybkość, z jaką zachodzi zmiana objętości fazy gazowej wewnątrz nurka. Ze względu na małe wymiary, mieszanie płynu wewnątrz nurka jest zbyt trudne; dyfuzja zachodzi szybciej niż badany proces.

Zasadę nurka przedstawioną powyżej ogłosili Linderström-Lang i Glick w 1937 r. W oparciu o tę pracę rozwinięto metodę pomiaru nurkiem karteuzjuszowskim też poza Laboratorium Carlsberg (np. Boell, Needham i Rogers, 1939). Laboratorium Carlsberg pozostało jednak niewątpliwie najważniejszym ośrodkiem, gdzie tę metodę bardzo wszechstronnie opracowano, udoskonalono, i zastosowano do wielu różnych zagadnień. W obecnym stanie, metoda nurka karteuzjuszowskiego pozwala na bardzo precyzyjne i niezbyt trudne technicznie pomiary, dając wszystkie możliwości badawcze aparatu Warburga. Ponadto, można ją stosować też w pracach, które aparatem Warburga nie dałyby się wykonywać ze względu na małą ilość dostępnego materiału doświadczalnego.

Jak wykonać nurka. Jak wspomniałem, nurek na kształt cienkościennej kapilarnej rurki szklanej, średn. około 1 mm, długości około 12 mm. Jeden koniec tej rurki jest zatopiony i obciążony „nóżką”, skutkiem czego nurek pływa w pozycji pionowej. Nurki robi się ze szkła,



Rys. 1. Napełnianie nurka karteuzjuszowskiego

a. nurek. b. nurek przygotowany do umieszczenia w naczynku flotacyjnym. 1 — kropla denną, np. materiał badany. 2 — kropla zamykająca, 1/10 N KOH. 3 — kropla zamykająca, olej parafinowy. c. nurek unosi się w środowisku flotacyjnym. 1, 2, 3 — jak poprzednio, 4 — kropla wylotowa ze środowiska flotacyjnego.

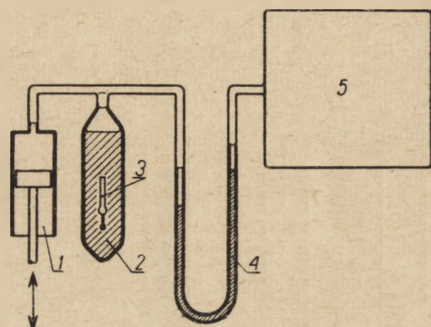
spełniającego następujące warunki: 1. szkło musi się dobrze obrabiać w płomieniu, nie może to więc być szkło, które przy długim ogrzewaniu „krystalizuje” skutkiem wydzielania się krzemionki, ani też szkło bardzo trudno topliwe. 2. Nawet przy długotrwałym ogrzewaniu szkło nie może wydzielać gazu; niektóre gorsze gatunki szkła wytwarzają przy ogrzewaniu w swym wnętrzu banieczki gazu. 3. W ścianie rurek, z których wyciągamy kapillary na nurki nie może być nitek powietrza. Do obliczenia zmiany objętości fazy gazowej w nurku musimy znać dokładnie gęstość szkła, z którego nurek jest zrobiony; każda bańka gazu w tym szkle wprowadza błąd do obliczeń. Dobre szkło laboratoryjne (np. rurki jenajskie z czerwonym paskiem) zwykle spełniają wszystkie te warunki.

Z odpowiedniej rurki szklanej wyciągamy na palniku Bunsena lub na dmuchawce kapillary o średnicy takiej, jakiej chcemy mieć nurki. Następnie zatapiamy kapillarę, rozdmuchując nieco dno, i przytapiamy nóżkę szklaną (bez baniek powietrza). W robocie posługujemy się mikro-palnikiem, np. zrobionym z igły do strzykawek. Ostatnią operacją jest równe obcięcie kapillary, tak by szyjka nurka miała około 10 — 12 mm długości i nadanie nurkowi odpowiedniego ciężaru przez przytapianie szkła do nóżki. Gotowy nurek jest pokazany na rysunku 1a.

Napełnienie. Do pomiaru oddychania nurek napełniamy np. w taki sposób: W kropli płynu na dnie nurka umieszczamy materiał doświadczalny (np. pierwotniak, jajo lub zarodek zwierzęcia wodnego). Szyjkę nurka zamyka się kroplą NaOH lub KOH izotonicznego z roztworem, w którym jest badany przedmiot. Przy pracy z organizmami słodkowodnymi używamy 1/10 N KOH; różnica w stężeniu jest praktycznie bez znaczenia. Słupek powietrza rozdziela materiał badany i kroplę ługu. Powyżej kropli ługu zamykamy szyjkę nurka kroplą oleju parafinowego, która uniemożliwia parowanie wody z nurka. Tak napełnionego nurka umieszcza się w naczynku flotacyjnym, połączonym z manometrem. W naczynku znajduje się stężony roztwór soli, w którym powietrze źle się rozpuszcza. Skutkiem tego ubytek powietrza w nurku spowodowany jest jedynie zużyciem tlenu przez oddychającą komórkę, gdyż wytworzony CO_2 zostaje wiązany przez ług. Z różnych środowisk flotacyjnych najlepsza jest mieszanina roztworów azotanu i chlorku sodu, zaproponowana przez H o l t e r a. Płyn ten zawiera też niewielką ilość taurocholanu sodu, który obniżając napięcie powierzchniowe, ułatwia przesuwanie się w szyjce nurka menisku: roztwór soli/powietrze. Górna część szyjki nurka jest wypełniona tym roztworem soli do głębokości 1,5 — 2 mm (kropla wylotowa). W czasie robienia nurka musimy mu nadać odpowiedni ciężar, dodając lub ujmując

szkło do nózki, tak by nurek mógł się unosić w płynie. Ostateczna regulacja pozornego ciężaru nurka odbywa się przez wprowadzanie roztworu soli do szyjki nurka na odpowiednią głębokość, np. odciągając powietrze cienką pipetką.

Termostat. Naczynie, w którym nurek się znajduje (naczynie flotacyjne) jest połączone z manometrem wodnym i urządzeniem, pozwalającym zmieniać precyzyjnie ciśnienie w tym naczyniu. Druga gałąź manometru jest połączona ze „sztuczną atmosferą”, którą stanowi duża pusta butla, obciążona ołowiem. Naczynie flotacyjne i sztuczna atmosfera są umieszczone w zbiorniku wodnym o pojemności około 100 l. Temperatura tej kąpielii wodnej daje się regulować z dokładnością do 0.01°C. Silne mieszadło zapewnia wyrównanie temperatury w całym zbiorniku wodnym. W ten sposób zapobiega się zmianom objętości gazu spowodowanym zmianami temperatury otoczenia i zmianami ciśnienia barometrycznego w czasie doświadczenia. Schemat aparatury pomiarowej przedstawia rys. 2.



Rys. 2. Schemat aparatury pomiarowej.

1 — urządzenie do zmiany ciśnienia w naczyniu flotacyjnym. 2 — naczynie flotacyjne. 3 — nurek unosi się w środowisku flotacyjnym (płyn Holtera), 4 — manometr wodny wskazuje ciśnienie równowagi, 5 — sztuczna atmosfera, 2 i 5 umieszczone są we wspólnym termostacie wodnym, którego tu nie pokazano

Pomiar. Bezpośrednim rezultatem pomiaru jest zmiana ciśnienia, potrzebna dla doprowadzenia nurka do stanu unoszenia się wewnątrz cieczy w miarę upływu czasu doświadczenia (ΔP). Ze zmiany ciśnienia wyliczamy interesującą nas zmianę objętości fazy gazowej w nurku, (ΔV), która nastąpiłaby, gdyby początkowe ciśnienie (P) nie zostało przez nas zmienione. Można przyjąć, że przy stosowanych ciśnieniach, niewiele różniących się od 1 atm. gaz wewnątrz nurka zachowuje się jak gaz doskonały. Dla obliczenia zmiany objętości fazy gazowej (ΔV) musimy znać jeszcze objętość gazu w nurku na początku doświadczenia, (V), gdy nurek unosi się wewnątrz cieczy pod ciśnieniem P . Jeżeli gaz nie rozpuszcza się w kroplach, stanowiących ładunek nurka, to

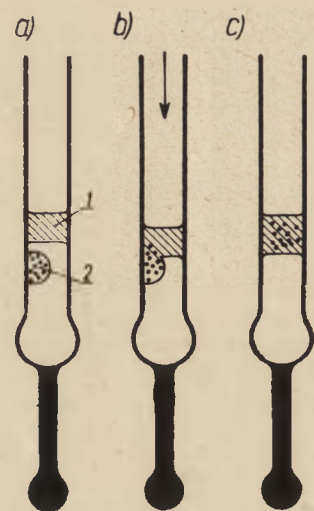
$$\Delta V = \frac{V \Delta P}{P}$$

Obliczenie zmiany objętości fazy gazowej w nurku jest nieco trudniejsze, gdy nurek zawiera gaz dobrze rozpuszczający się w kroplach płynu, stanowiących ładunek nurka (woda, olej dość dobrze rozpuszczają

np. CO_2). Obliczenie objętości fazy gazowej opiera się na prawie Archimedesesa: unoszący się nurek waży tyle, co wyparty przez niego roztwór soli. Znając gęstość roztworu soli, gęstość szkła, z którego nurek jest zrobiony, ciężar nurka, objętość i gęstość kropli płynu stanowiących ładunek nurka, wyliczamy łatwo objętość powietrza w unoszącym się nurku.

Modyfikacje napełniania. Przy napełnieniu nurka tak, jak wyżej opisano, można mierzyć np. oddychanie. Jest to pomiar najprostszy, tak

jak w aparacie Warburga. Prócz pomiaru oddychania aparat Warburga daje jeszcze inne możliwości; można w czasie pomiaru przeprowadzać pewne reakcje. W tym celu w aparacie Warburga musimy stosować flaszki o dość skomplikowanej budowie. W nurku, mieszanie różnych płynów w czasie pomiaru uzyskujemy łatwo przez odpowiednie napełnienie. Kropla zamykająca szyjkę przesuwa się w niej przy zmianach ciśnienia. Natomiast kropla leżąca na ścianie nurka tak, że szyjka nie jest nią zamknięta („kropla boczna”), nie przesuwa się przy zmianach ciśnienia. Umieszczając w nurku blisko siebie kroplę boczną i kroplę zamykającą (rys. 3a) możemy je zmieszać w czasie pomiaru przez chwilowe zwiększenie ciśnienia (jeśli kropla zamykająca jest położona nad kroplą boczną) lub przez zmniejszenie ciśnienia (gdy kropla zamykająca jest położona pod kroplą boczną). Proces mieszania dwóch kropeł w nurku przez zwiększenie ciśnienia przedstawia rys. 3.



Rys. 3. Schemat przedstawiający mieszanie dwóch kropeł w nurku w czasie pomiaru.

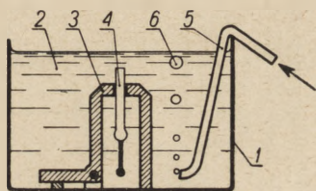
a. krople przed zmieszaniami. 1 — kropla zamykająca, 2 — kropla boczna. b. pod wpływem ciśnienia, które symbolizuje strzałka, kropla zamykająca przesuwa się w szyjkę i miesza z kroplą boczną. c. — obie krople zmieszane

W niektórych wypadkach aparatu Warburga używamy do pomiarów w atmosferze innej niż powietrze. Wymaga to przepuszczania gazu przez flaszki i manometry co umożliwia system kurków szklanych. Takie same

doświadczenia można przeprowadzać i w nurku. Napełnienie nurków odbywa się wówczas w komorze z masy plastycznej, wypełnionej wodą. Zewnętrzne powierzchnie pipetek i wewnętrzną powierzchnię szyjki nurka pokrywa się materiałem nie zwilżanym przez wodę (silikon). Stosujemy to zresztą i przy zwykłych doświadczeniach, gdyż nurek pokryty wewnątrz silikonem daje dokładniejsze pomiary i łatwiej go napełniać

(Schwartz, 1949, Waterlow i Borrow, 1949). W tych warunkach woda nie dostaje się do wnętrza nurka, uniemożliwiając jednak dostęp powietrza. Po umieszczeniu nurka w komorze pod powierzchnią wody, wypieramy z niego powietrze wprowadzając do nurka pipetkę, którą wtłaczamy potrzebny gaz (np. azot). Równocześnie woda w komorze nasycy się tym gazem. W czasie napełniania nurka przez wodę w komorze przepuszcza się banieczki gazu, użytego do napełniania nurka. Poprzez wodę wprowadza się do nurka pipetki, przy pomocy których umieszcza się w szyjce krople płynów, stanowiące ładunek nurka. Wreszcie po napełnieniu, jeszcze przez jakiś czas wprowadza się do górnej części szyjki nurka gaz (w naszym wypadku azot). Następnie pipetką odciąga się nieco gazu z szyjki nurka, tak że woda z komory dostaje się do szyjki i zatyka ją, pozwalając na wyjęcie nurka z komory. Wodę tę zastępujemy roztworem soli, w którym nurek jest zanurzony, a nurka umieszczamy w naczynku flotacyjnym. Sposób napełniania opisany powyżej i przedstawiony na rys. 4. wprowadzili Waterlow i Borrow w 1949. Poprzednio stosowany sposób opracowany w Laboratorium Carlsberg, nie jest już używany. Klasyczny sposób miał zastosowanie w latach wojny i w pierwszych latach powojennych, gdy nie było silikonu, bez którego napełnianie opisaną metodą często się nie udaje.

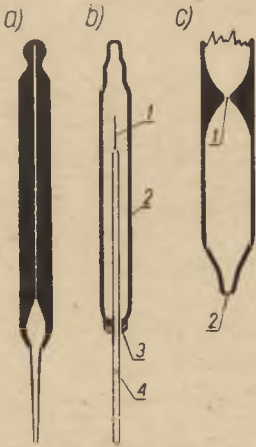
W większości doświadczeń rozpuszczalność gazu unoszącego nurek w środowisku jest tak mała, że praktycznie nie wpływa na wynik doświadczenia. W niektórych wypadkach, gdy np. w atmosferze gazowej wewnątrz nurka znajduje się CO_2 , istnieje niebezpieczeństwo, że gaz z nurka będzie „uciekał” do środowiska. Wówczas można w znacznym stopniu zahamować dyfuzję gazu, stosując korki szklane w nurku. Są to krótkie kawałeczki (około 2 mm długości) kapilarnej rurki, zatopione po obu końcach, dokładnie wypełniające szyjkę nurka, tak jednak, że dają się w niej swobodnie przesuwac. Średnica korka szklanego powinna być 50—80 μ mniejsza, od średnicy wewnętrznej szyjki nurka. Wewnątrz korka znajduje się powietrze; powietrza tego ma być tyle, by korek wrzucony do naczynka flotacyjnego bardzo powoli opadał na dno. Innymi słowy, korek zanurzony w środowisku flotacyjnym nie powinien prawie nic ważyć. Korek szklany, umieszczony w szyjce nurka pokazano na rys. 6.



Rys. 4. Nurek przygotowany do napełnienia innym gazem niż powietrze.

1 — komora z plastiku lub celuloideu, 2 — woda, wypełniająca komorę, 3 — uchwyt metalowy na nurka, 4 — nurek, 5 — rurka szklana, przez którą doprowadzamy gaz do wody, 6 — banieczki gazu, które nasycają wodę w komorze. Na rysunku nie pokazano pipetek służących do wprowadzania gazu do nurka i do napełniania nurka

Pipetki. By wykorzystać wszystkie możliwości jakie nurek daje, trzeba móc go napełniać możliwie precyzyjnie. Pracownicy Laboratorium Carlsberg wprowadzili kilka typów pipetek, umożliwiających napełnienie nurka i wprowadzenie do niego żywego materiału (pipetka z hamulcem), czy też bardzo dokładne odmierzenie płynu doświadczalnego (pipetka z przewężeniem).



Rys. 5. Pipetki do napełniania nurka.

a. Pipetka z kapilary szklanej do wprowadzania KOH i oleju. b. Pipetka z hamulcem, do materiału żywego, 1 — hamulec, 2 — osłona z grubszej rurki szklanej, 3 — kit, przy pomocy którego kapillara służąca jako pipetka (4) jest wtopiona w osłonę. c. Pipetka z przewężeniem (fragment w silnym powiększeniu). 1 — górne przewężenie. 2 — dolne przewężenie

Pipetki te do niezbyt dokładnego odmierzenia płynu, jakich używamy przy wprowadzaniu do nurka kropli oleju lub ługu, sporządzone są z grubościennych kapillar szklanych używanych np. w termometrach sztabowych. Jeden koniec kapillary zatapiamy i rozdmuchujemy w bańkę o dosyć cienkich ścianach. Z tej bańki wyciąga się następnie zakończenie pipetki. Na kapillarze od tyłu przyklejamy paseczek papieru milimetrowego, tak że słupek płynu w pipetce widzimy na tle tego papieru. Pipetkę przedstawia rysunek 5a.

Materiał żywy do nurka wprowadzamy w bardzo małej ilości wody (1 — 2 μ l). Wykonać to łatwo przy pomocy pipetki z hamulcem (H o l t e r 1943), przedstawionej na rys. 5b. Pipetka składa się z cienkościennych kapillary szklanej o takiej średnicy, że można ją łatwo wsunąć do szyjki używanego nurka. Kapillara ma jeden koniec równo obcięty i gładko obtopiony, lub nieco zwężony, zależnie od potrzeby. Drugi koniec kapillary wyciągnięty jest w bardzo cienką rureczkę, która działa jak hamulec dla przechodzącego powietrza. Kapillare zanurzamy szerokim końcem do wody; szybkość wchodzenia wody do rurki jest niewielki (1 — 5 mm na sek.), gdyż powietrze z rurki może uchodzić tylko bardzo wolno przez cienko wyciągnięty koniec. Kapillara jest wtopiona w osłonkę z grubszej rurki szklanej przy pomocy odpowiedniego kitu (np. kalafonia z woskiem, piceina). Osłonkę tę łączymy z węzłem gumowym. Materiał wciągamy do pipetki i wydmuchujemy go z niej ustami, poprzez węża gumowego. Trzeba uważać, by do wyciągniętego końca kapillary, który gra rolę hamulca, nie dostały się kropelki wody, gdyż powoduje to zazwyczaj zatkanie hamulca. Tylko czasami pomagają lek-

kie ogrzewanie osłony w miejscu, gdzie znajduje się hamulec, z równoczesnym dmuchaniem do pipetki.

Gdy konieczne jest bardzo dokładne odmierzenie wprowadzanego płynu, np. gdy wprowadzamy preparat enzymatyczny, którego aktywność chcemy oznaczyć, konieczne jest zastosowanie pipetki z przewężeniem (L e v y, 1936), której czynną część pokazano na rys. 5c. Rurka szklana, około 10 cm długości i 4 mm średnicy, wyciągnięta jest na jednym końcu w kapillare długości kilku centymetrów, tym cieńszą, im mniejszą objętość płynu mamy odmierzać naszą pipetką. Kapilara ta musi być jednak dostatecznie cienka, by dała się wprowadzić do szyjki nurka. Na końcu kapillary jest część czynna pipetki; widzimy ją na rys. 5c. Wylot pipetki jest silnie zawężony; powyżej jest drugie przewężenie światła kapillary. Oba przewężenia są tak dobrane, że menisk cieczy tworzący się w dolnym przewężeniu (2) przerywa się pod wyższym ciśnieniem (np. 100 mm Hg) niż menisk tworzący się w górnym (1) przewężeniu (np. 50 mm Hg). Jeżeli do pipetki naciągniemy jakiegoś roztworu powyżej przewężenia górnego a następnie wydmuchujemy ten roztwór niewielkim ciśnieniem (np. 20 mm Hg), wówczas roztwór wypływa z pipetki do chwili gdy menisk dojdzie do przewężenia górnego. Zastosowane ciśnienie — 20 mm Hg — nie może przerwać tego menisku, gdyż na to potrzeba ciśnienia przynajmniej 50 mm Hg. Gdy następnie zwiększymy ciśnienie np. do 70 mm Hg, wówczas roztwór wypływa dalej, aż do chwili gdy menisk dojdzie do przewężenia dolnego. Ciśnienie 70 mm Hg przerywa wprawdzie menisk w przewężeniu górnym, lecz nie może go przerwać w silniejszym przewężeniu na końcu pipetki; tu dopiero ciśnienie 100 mm Hg lub więcej przerywa menisk cieczy. W ten sposób otrzymujemy bardzo dokładnie odmierzoną objętość zawartą między przewężeniem górnym i dolnym, bez baniek powietrza, bez pryskania itd. Dokładność tej pipetki jest duża już, gdy obsługujemy ją ustami. Jeżeli pipetkę opróżnimy stale takim samym ciśnieniem, np. przy pomocy odpowiedniej pompy, dokładność odmierzenia daje się jeszcze poprawić. Z opisu widać, że pipetka przystosowana do odmierzenia roztworów wodnych może nie nadawać się np. do odmierzenia alkoholu, ze względu na różne napięcie powierzchniowe tych cieczy.

Pipetki kalibrujemy w różny sposób, w zależności od wymaganej dokładności: 1. ważąc wodę wydmuchaną z pipetki (zwykle potrzeba kilkunastu objętości pipetki na jedno ważenie), 2. odmierzając pipetką roztwór soli niehygroskopijnej o znanym stężeniu; po wysuszeniu ważymy sól, 3. najdokładniejszy sposób kalibrowania pipetek polega na odmierzaniu pipetką stężonego mianowanego roztworu (np. 1 N), który

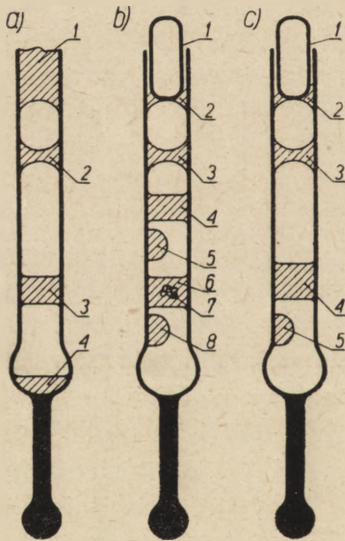
następnie odmiareczkowujemy mianowanym rozcieńczonym roztworem (1/100 N) z mikrobiurety (jodometria lub alkalimetria).

Przy napełnianiu nurka pipetki są umocowane dokładnie pionowo w odpowiednim statywie, a nurek umieszczony w specjalnym uchwycie daje się podnosić i opuszczać pionowo przy pomocy koła i szyny zębatej. Wprowadzenie pipetki do nurka jest więc raczej nasuwaniem nurka na nieruchomą pipetkę.

Zastosowania. Nurek kartejzuszowski ma bardzo szerokie możliwości zastosowania w badaniach biochemicznych i fizjologicznych. Przykładowo przedstawię tu trzy pomiary: oddychania, współczynnika oddechowego, i oznaczenia aktywności enzymu (oksydaza cytochromu, dekarboksylaza lizyny).

Pomiar oddychania wymaga bardzo prostego napełnienia. (Rys. 6a). W kropli dennej umieszczamy badany organizm, w szyjce nurka — kroplę zamykającą KOH i drugą kroplę zamykającą oleju parafinowego.

Rys. 6. Różne napełnienia nurka



a. nurek napełniony do pomiaru oddychania. 1 — kropla wylotowa ze środowiska flotacyjnego, 2 — kropla zamykająca z oleju parafinowego, 3 — kropla zamykająca z materiałem badanym, 4 — kropla dennej, KOH. Materiał badany można też umieścić w kropli dennej, a wówczas KOH znajduje się w kropli zamykającej (3).

b. nurek napełniony do pomiaru współczynnika oddechowego. 1 — korek szklany, utrudniający dyfuzję CO_2 z nurka, umieszczony w kropli wylotowej 2. ze środowiska flotacyjnego, 2 — kropla wylotowa, 3 — kropla zamykająca z oleju parafinowego, 4 — kropla zamykająca, 1/50 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 5 — kropla boczna, 0,2 N HCl, 6 — kropla zamykająca, zawierająca badany obiekt, np. amebę (7) w odpowiednim środowisku (np. woda stawowa), 8 — kropla boczna 1-N H_2SO_4 .

c. nurek napełniony do pomiaru aktywności dekarboksylazy lizyny. 1 — korek szklany, potrzebny ze względu na produkcję CO_2 w czasie reakcji enzymatycznej, 2 — kropla zamykająca ze środowiska flotacyjnego, w której umieszczono korek, 3 — kropla zamykająca z oleju parafinowego, 4 — kropla zamykająca: preparat enzymatyczny i bufor, pH = 5,85, 5 — roztwór lizyny w kropli bocznej.

Wytworzony przy oddychaniu CO_2 zostaje związany w KOH. Pomiar wykazuje szybkość pobierania tlenu.

Oznaczenie współczynnika oddechowego wymaga napełnienia bardziej skomplikowanego. (rys. 6b). W nurku znajduje się, idąc od dołu ku górze: 1. kropla boczna 1 N H_2SO_4 , 2. badany organizm w swym fizjologicznym środowisku w kropli zamykającej, 3. kropla boczna 0,2 N HCl, 4. kropla zamykająca szyjkę nurka z 0,02 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 5. kropla zamykająca oleju parafinowego, 6. kropla środowiska flotacyjnego

i szklany korek umieszczony w tej kropli. Przez pewien czas mierzymy szybkość zużycia tlenu przez oddychający organizm; wydzielony CO_2 zostaje związany w $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Następnie, przez silne zwiększenie ciśnienia mieszamy krople boczne (kwas siarkowy wzgl. kwas solny) z kroplą środowiska zawierającego organizm, i z kroplą $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Organizm badany zostaje zabity. Roztwór wodorotlenku baru ulega zakwaszeniu, a wytworzony węglan baru rozkłada się i wydziela związany dwutlenek węgla. Pomiar ciśnienia równowagi po zmieszaniu pozwala wyznaczyć ilość wytworzonego dwutlenku węgla. W rezultacie otrzymujemy dane do obliczenia współczynnika oddechowego. Główną trudność w takich doświadczeniach stanowi bezwęglanowe wprowadzenie $\text{Ba}(\text{OH})_2$ do nurka.

Aktywność enzymów możemy mierzyć przy pomocy nurka wówczas, gdy reakcję enzymatyczną da się przeprowadzić w ten sposób, że w rezultacie reakcji zachodzi zmiana objętości fazy gazowej. Tak np. enzymy oddechowe często oznaczano w małych ilościach materiału doświadczalnego przy pomocy nurka kartejuszowskiego (S c h w a r t z 1949, A n d r e s e n, H o l t e r i E n g e l 1951, H o l t e r i P o l l o c k 1952) też w pracowniach innych niż Laboratorium Carlsberg (B o e l l, 1945, H u m p h r e y i H u m p h r e y 1948). Podaję tu opis oznaczania dekarboksylazy lizyny, wykonany przy pomocy nurka kartejuszowskiego, i dla kontroli, przy pomocy aparatu Warburga, przez S c h w a r t z a (1949).

W nurku umieszczamy w kropli bocznej roztwór lizyny, i nieco powyżej — kroplę zamykającą zawierającą preparat enzymatyczny w buforze fosforanowym. Następnie, jeszcze wyżej w szyjce nurka umieszczamy kroplę zamykającą oleju parafinowego, kroplę środowiska flotacyjnego i w niej — korek szklany, gdyż w rezultacie reakcji w atmosferze wewnątrz nurka pojawi się dwutlenek węgla, który łatwo dyfunduje. (Rys. 6c). Przed zmieszanym, przez kilkakrotne pomiary ciśnienia równowagi, stwierdzamy stałość objętości fazy gazowej w nurku; ewentualnie mogłoby zachodzić pobieranie lub produkcja gazu przez nie oczyszczony preparat enzymatyczny. Po zmieszaniu kropli bocznej, zawierającej lizynę, z kroplą enzymu, oznaczamy szybkość produkcji dwutlenku węgla, która w tym wypadku jest miarą aktywności enzymu. S c h w a r t z oznaczał aktywność tego samego preparatu enzymatycznego w nurku i w aparacie Warburga; rezultaty dobrze się zgadzały.

Hodowla tkanek. W ostatnich czasach nauczyliśmy się wykonywać pomiary na komórkach, rosnących w hodowli tkanek (S h a n n o n D a n e s, 1955). W tym celu hodowle tkanek prowadzi się w krótkich kapillarach (około 1 mm długości) otwartych po obu końcach, o takiej

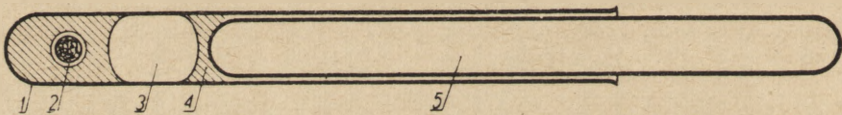
średnicy, że dadzą się umieścić w szyjce nurka. Wzrost hodowli odbywa się wewnątrz kapillary, którą trzyma się we flaszcze Carrela, w płynnej pożywce do hodowli tkanek. Na czas pomiaru kapillare umieszcza się w szyjce nurka w kropli pożywki. Hodowla tkanek wprost wewnątrz nurka nie daje rezultatów, gdyż objętość płynu jest tak mała, że nie pozwala na wzrost hodowli przez 48 godz., to znaczy przez okres czasu potrzebny do uzyskania dostatecznie dużej ilości komórek rosnących. Doświadczenia nad przemianą materii komórek w hodowli tkanek wymagają pracy w warunkach jałowych i pomiaru w temperaturze 37°C.

Zwiększenie czułości nurka

Zależność między zmianą ciśnienia równowagi a zmianą objętości fazy gazowej w nurku określa wzór podany już poprzednio:

$$\Delta V = \frac{V_{\Delta P}}{P}$$

Objętość fazy gazowej w nurku zwykle używanym wynosi około 10 μ l. Różnica ciśnienia równowagi, którą możemy odczytać wynosi 1 mm słupa wody, t. zn. $P \times 10^{-4}$. Stąd też najmniejsze zmiany dające się mie-



Rys. 7. Nurek przystosowany do pomiarów oddychania pojedynczych komórek, o czułości około 1000 razy wyższej od standartowego nurka karte-zjuszowskiego

1 — nurek, 2 — jajo jeżowca, którego oddychanie mierzono, w kropli wody morskiej, 3 — banieczka powietrza objętości 0.1 — 0.05 μ l. Banieczka ta stanowi „wrażliwą“ objętość nurka, 4 — kropla alkalicznego środowiska flotacyjnego, w której jest umieszczony korek szklany. Alkaliczność środowiska zapewnia pochłanianie CO_2 , 5 — korek szklany, pusty wewnątrz. Korek ten przyczynia się do zmniejszenia ciężaru nurka skutkiem czego „wrażliwa“ objętość gazu w nurku jest bardzo mała. Nurek pływa pionowo, korkiem na dół.

żyć są rzędu 10^{-3} μ l. Zwiększyć czułość nurka możemy zmniejszając objętość gazu wewnątrz nurka lub zwiększając dokładność pomiaru ciśnienia równowagi (w rezultacie, dokładność pomiaru ΔP). Obie te metody zastosował Z e u t h e n w swoich mikro-nurkach. Ponieważ zmniejszanie objętości gazu w nurku jest ograniczone ciężarem nurka (zbyt mała objętość gazu nie wystarcza do uniesienia nurka w płynie) Z e u t h e n zastosował duży, pusty korek wsunięty głęboko w szyjkę nurka. Korek ten unosi nurka; ponieważ jednak korek jest całkowicie

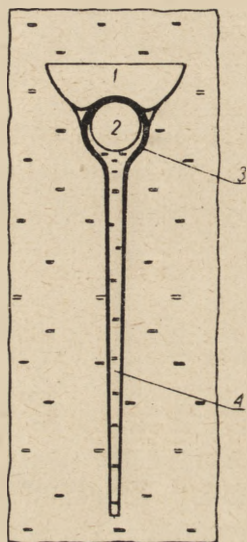
zamknięty, gaz w nim zawarty nie reaguje na zmiany ciśnienia. „Wrażliwa” objętość gazu jest bardzo mała (0.1 — 0.05 μ l); ta mała objętość reaguje na zmiany ciśnienia i doprowadza nurka do stanu unoszenia się; nie wystarczyłaby ona jednak do podniesienia nurka, gdyby nie było lekkiego korka. W nurku *Z e u t h e n a* wrażliwa objętość gazu jest 100 \times mniejsza niż w nurku zwyczajnym. Ponieważ jednak manometr opisany przez *Z e u t h e n a* pozwala mierzyć bardzo drobne zmiany ciśnienia (około 1/25 mm słupa wody) wrażliwość aparatu jest bardzo duża; około 1000 razy większa niż zwykłego nurka kartejuszowskiego. Przy pomocy tego przyrządu dało się mierzyć bardzo drobne zmiany w szybkości oddychania, które towarzyszą podziałowi komórki (badano jaja bezkręgowców morskich, *Z e u t h e n*, 1955).

Waga pływakowa

Innym zastosowaniem zasady nurka kartejuszowskiego jest waga pływakowa. (*Z e u t h e n* 1948). W wypadku nurka ze zmiany ciśnienia równowagi wnioskujemy o zmianie objętości fazy gazowej w nurku; ciężar nurka w czasie pomiaru nie powinien ulegać zmianom. W wadze pływakowej, odwrotnie, objętość gazu jest stała, a zmieniamy ciężar pływaka. W swej obecnej postaci waga pływakowa ma kształt kulistej kolbki z bardzo długą i cienką szyjką (rys. 8). Do bańki szklanej przyklejony jest kołnierzyk z polystyrenu, który służy za szalkę wagi. Waga jest zanurzona w wodzie i wypełniona nią tak, że w bańce szklanej zostaje tylko niewielki pęcherzyk powietrza, jak to pokazano na rys. 8. Pęcherzyk ten jest tak dobrany, że przy ciśnieniu bliskim atmosferycznego (różnica nie powinna wynosić więcej niż kilkanaście cm słupa wody) waga unosi się wewnątrz płynu, tak jak to opisano przy nurku (ciśnienie równowagi). Jeśli na szalkę położymy jakiś znany ciężarek, ciśnienie równowagi ulegnie zmianie tym więcej, im silniej waga została obciążona. W ten sposób można oznaczyć ciężar pozorny (ciężar ciała zanurzonego, oznaczany skrótem RW) dużych, pojedynczych komórek lub całych organizmów. Na bardzo małej wadze daje się ważyć połówkę komórki *Amoeba proteus* (*M a z i a* i *P r e s c o t t*, 1954), stratę ciężaru ameby głodzonej (*H o l t e r* i *Z e u t h e n*, 1948) itp. Na wadze odpowiednio większej można ważyć jaja i kijanki płazów (*L ö v t r u p*, 1953), lub jeszcze większe organizmy.

Podobnie jak w wypadku nurka, waga pływakowa jest tym czulsza, im mniejsza jest banieczka powietrza, która ją unosi. Trzeba więc robić wagi bardzo lekkie, ze szkła bardzo cienkiego. Ostatnio zastosowano

jako materiał na szalki wag pływakowych bardzo lekki plastik, który do pewnego stopnia unosi szklaną część wagi, tak że odpowiednio mniejsza bańka powietrza wystarcza, by wagę podnieść z dna naczynka flotacyjnego. Jak widać, rozwiązanie jest nieco podobne jak przy mikronurku Zeuthena. Pierwsze modele wagi pływakowej miały talerzyk szklany, gdyż w tym czasie nie było w Danii polistyrenu (wojna i pierwsze lata powojenne). Taka cała szklana waga jest ciężka, i trzeba dużego pęcherzyka powietrza by ją unieść. Czułość wagi byłaby więc niewielka. Zeuthen zastosował tu więc zamknięty zbiornik powietrza, który służył tylko do zmniejszenia ciężaru zanurzonej wagi. „Wrażliwa” objętość gazu była dzięki temu mała (rys. 9.)



Rys. 8. Waga pływakowa w jej obecnej postaci, zanurzona w wodzie

1 — szalka z polistyrenu, na której umieszcza się ważony przedmiot, 2 — bańeczka powietrza, dzięki której waga może się unosić w wodzie, 3 — szklana część wagi rozdmuchana w bańkę, 4 — nóżka wagi pusta w środku (rurka), poprzez którą zmiany ciśnienia w naczynku flotacyjnym przenoszą się na bańeczkę gazu 2.

Waga pływakowa pozwala nie tylko oznaczać ciężar pozorny. Ważąc ten sam przedmiot, np. amebę, w dwóch środowiskach o różnej gęstości (np. w wodzie i w roztworze skrobi) można dość dokładnie wyznaczyć objętość, ciężar w powietrzu i gęstość tej ameby. Ciężar pozorny (RW) zależy, według prawa Archimedesza, od ciężaru, objętości i od gęstości środowiska: $RW = \text{ciężar} - \text{objętość} \times \text{gęstość środowiska}$. Znając gęstość dwóch środowisk użytych przy pomiarach, i odpowiednie wartości RW, obliczamy ciężar w powietrzu i objętość. Procedura ta nie jest jednak często używana w Laboratorium Carlsberg, gdyż opracowano tam inne, prostsze mikrometody oznaczania objętości (Holter, 1945) i gęstości (Lövtrop, 1950). Wreszcie, wagę pływakową można zastosować do pomiarów szybkości przenikania wody przez błonę komórkową, posługując się albo D_2O jako wskaźnikiem (pomiar szybkości dyfuzji wody), albo mierząc zmianę ciężaru pozornego komórki umieszczonej w roz-

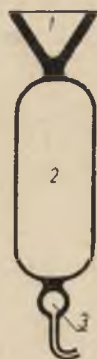
tworze hipertonicznym związku, nie wnikającego do komórki (Lövtrop i Pigoń, 1951, Prescott i Zeuthen 1953).

Bliższe dane dotyczące metod tu przedstawionych można znaleźć w podręczniku Glic'ka (1949) i w oryginalnych pracach, ogłaszanych w wydawnictwie Laboratorium Carlsberg:

K. Linderström-Lang: On the theory of the Cartesian diver micro respirometer. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 24.333—398. 1943.

H. Holter: Technique of the Cartesian diver. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 24.399—478.1943.

Obie te prace w gwarze pracowników Laboratorium Carlsberg nazywa się biblią, gdyż jest w nich zawarte wszystko, co trzeba wiedzieć. Niestety, na nazwę tę zasługują i dlatego, że pewna część danych dotyczących techniki jest już przestarzała. Metoda nurka kartezjuszowskiego jest stale udoskonalona i poprawiona. Nowsze osiągnięcia dotyczące techniki znaleźć można w pracach podanych w spisie literatury. Zasadnicze reguły metody zawarte są w pracach, wymienionych wyżej.



Rys. 9. Stary model wagi pływakowej, cały szklany

1 — szalka wagi, 2 — duża, całkowicie zamknięta objętość gazu, która zmniejsza ciężar wagi zanurzonej, 3 — mała bańka szklana, otwarta do środowiska flotacyjnego poprzez cienką szklaną kapilare. W tej bańce znajduje się „wrażliwa” objętość gazu.

Waga pływakowa, jej wykonanie, użycie i kalibrowanie zostały opisane przez Zeuthena:

E. Zeuthen: A Cartesian diver balance weighing reduced weights (R. W.) with an accuracy of $\pm 0.01 \gamma$. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 26.243—266. 1948.

LITERATURA

Andresen N., Fr. Engel, and H. Holter (1951) Succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase in Chaos chaos. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 27.408—420.

Boell, E. J. (1945) Respiratory enzymes in Paramecium. I. Cytochrome oxidase. Proc. Nat. Acad. Sci. 31. 396—402.

Boell, E. J., J. Needham, and V. Rogers. (1939) Morphogenesis and metabolism: Studies with the Cartesian diver ultra-micromanometer. I. Proc. Roy. Soc. London. B. 127.322—356.

Glick, D. (1949). Techniques of histo- and cytochemistry. Interscience Publ., New York 3.

Holter, H. (1943). Technique of the Cartesian diver. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 24.399—478.

Holter, H. (1945). A colorimetric method for measuring the volume of large amoebae. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 25. 156—167.

Holter, H., and B. M. Pollock (1952). Distribution of some enzymes

in the cytoplasm of the Myxomycete, *Physarum polycephalum*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 28.221—245.

H o l t e r, H., and E. Z e u t h e n (1948). Metabolism and reduced weight in starving *Chaos chaos*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. 26.277—296.

H u m p h r e y, B. A., and G. F. H u m p h r e y (1948). Studies in the respiration of *Paramecium caudatum*. Jour. Exp. Biol. 25.123—134.

L e v y M. (1936). Studies on enzymatic histochemistry. XVII. A micro Kjeidahl estimation. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 21.101—110.

L i n d e r s t r ö m - L a n g, K. (1937). Principle of the Cartesian diver applied to gasometric technique. Nature. 140.108.

L i n d e r s t r ö m - L a n g, K. (1943). On the theory of the Cartesian diver micro respirometer. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 24.333—398.

L i n d e r s t r ö m - L a n g, K., and D. G l i c k (1937). Micromethod for determination of choline esterase activity. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 22.300—322.

L ö v t r u p, S. (1950). Observations on the Cartesian diver balance technique. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 27.125—136.

L ö v t r u p, S. (1950). Determinations of density of Amoebae by means of a starch density gradient. C. R. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 27. 137—144.

L ö v t r u p, S. (1953). Energy sources of amphibian embryogenesis. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 28. 371—399.

L ö v t r u p, S. and A. P i g o ñ (1951). Diffusion and active transport of water in the amoeba *Chaos chaos* L. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 28.1—36.

P r e s c o t t, D. M. and D. M a z i a (1954). The permeability of nucleated and enucleated fragments of *Amoeba proteus* to D₂O. Exp. Cell Res. 6. 117—126.

P r e s c o t t, D. M. and E. Z e u t h e n (1953). Comparison of water diffusion and water filtration across cell surfaces. Acta Physiol. Scand. 28.77—94.

S c h w a r t z, S. (1949). The use of a silicone coating on the Cartesian diver microgasometer. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 27. 79—92.

S h a n n o n D a n e s, B. (1955). Metabolism of cells grown in tissue culture. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim. 29. 209—221.

W a t e r l o w, J. C., and A. B o r r o w (1949). Experimental observations on the Cartesian diver technique. C. R. Trav. Carlsberg. Ser. Chim. 27. 93—123.

Z e u t h e n, E. (1948). A Cartesian diver balance weighing reduced weights (R. W.) with an accuracy of $\pm 0.01 \gamma$. C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 26. 243—266.

Z e u t h e n, E. (1955). Mitotic respiratory rhythms in single eggs of *Psamm-echinus miliaris* and of *Ciona intestinalis*. Biol. Bull. 108. 366—385.

W. NIEMIERKO

Sprawozdanie z II Międzynarodowej Konferencji w Gandawie poświęconej biochemii lipidów

W okresie między 27-ym a 30-ym lipca 1955 r. odbyła się w Gandawie Międzynarodowa Konferencja poświęcona problemom biochemii lipidów. Była to druga z rzędu konferencja dotycząca tych problemów urządzona przez Komitet Organizacyjny Sympozjów Biochemii Lipidów działający w Gandawie pod przewodnictwem prof. dr R. R u y s s e n a.

Konferencja miała miejsce w dniach bezpośrednio poprzedzających III Międzynarodowy Kongres Biochemiczny w Brukseli, co w dużej mierze ułatwiło wzięcie w niej udziału bardzo licznej rzeszy wybitnych badaczy z całego świata. Dla scharakteryzowania Konferencji Gandawskiej pod tym względem wystarczy przytoczyć kilka nazwisk jej uczestników, jak A r t o m (U.S.A.), B e r g s t r ö m i B o r g s t r ö m (Szwecja), F r a z e r (Anglia), D. G r e e n (U.S.A.), K l e n k (N.R.F.), L o v e r n (Anglia), L y n e n (N.R.F.), O c h o a (U.S.A.) i innych, dobrze znanych nie tylko specjalistom z dziedziny biochemii lipidów, lecz również i ogółowi biochemików.

W związku z uczestnictwem w Kongresie Brukselskim, do Gandawy przybyła również kilkunastoosobowa delegacja radziecka. Ze strony Polski w Konferencji wzięli udział I. R e i f e r i W. N i e m i e r k o. Ogólna ilość uczestników wynosiła około 250 osób.

Obrady toczyły się równocześnie w czterech sekcjach, które były poświęcone następującym problemom:

Sekcja I dotyczyła właściwości fizyko-chemicznych lipidów, ich budowy oraz metod ich rozdzielania i analizy.

Sekcja II zajmowała się metabolizmem, w szczególności zaś biosyntezą lipidów, oraz układami enzymatycznymi, działającymi w tych procesach.

Sekcja III była poświęcona fosfolipidom oraz zagadnieniom trawienia, chłonięcia i transportu tłuszczów.

Sekcja IV obejmowała różne problemy, związane z biochemią lipidów.

Ogólna ilość wygłoszonych komunikatów wyniosła około 80. Ilość ta była mniej więcej równomiernie podzielona na wymienione wyżej sekcje.

W Sekcji I znaczna ilość doniesień dotyczyła metod chromatograficznego rozdzielania lipidów, a zwłaszcza fosfolipidów, identyfikacji ich składników i prób ich ilościowego oznaczania. Słuchając komunikatów odnosiło się wrażenie, że ilość prac poświęconych analizie lipidów w ciągu lat ostatnich ogromnie wzrosła, nie mniej jednak trudności, na które napotykają badacze, są tak znaczne, iż szczegóły budowy lipidów są jeszcze bardzo dalekie od wyświetlenia. Zagadnienia te w sposób syntetyczny przedstawił Lovern w swoim treściwym komunikacie zatytułowanym „Niepewności w strukturze lipidów”.

Niewątpliwie najwięcej zainteresowania wzbudziły posiedzenia Sekcji II. Przedstawione komunikaty dotyczyły najbardziej palących zagadnień dynamiki przemian lipidowych, badanych głównie od strony udziału w nich poszczególnych enzymów i koenzymów.

Jednym z bardzo ciekawych doniesień był komunikat P. H e l e i P o p j a k a o enzymatycznej syntezie kwasów tłuszczowych w roztworach. Autorzy ci, wykonując swoje badania na preparacie z gruczołów mlecznych królika, prześledzili poszczególne etapy syntezy kwasów tłuszczowych z kwasu octowego i wyświetlili rolę nukleotydu dwufosfopirydynowego w tych procesach. Komunikat był ilustrowany wykresami przedstawiającymi wyniki chromatograficznego rozdzielania powstających kwasów tłuszczowych, co pozwoliło stwierdzić zjawianie się w czasie tej biosyntezy wszystkich członków szeregu parzystych kwasów tłuszczowych.

Dwa następne, również bardzo ciekawe komunikaty Lynena i jego współpracowników dotyczyły specyficzności enzymów biorących udział w przemianach kwasów tłuszczowych, ich rozmieszczenia w tkankach zwierzęcych i ich aktywności w poszczególnych narządach i tkankach.

Komunikat S t e r n a i O c h o a był poświęcony procesom enzymatycznego rozpadu i syntezy kwasu acetoctowego. W badaniach tych autorom udało się otrzymać w stanie krystalicznym krotonazę, która jest wobec tego pierwszym uzyskanym krystalicznym enzymem cyklu kwasów tłuszczowych. Autorzy przedstawili dane o właściwościach tego enzymu, jego aktywności, rozmieszczeniu w poszczególnych tkankach i sposobach wyizolowania.

Dalsze komunikaty tej sekcji dotyczyły aktywacji enzymów utle-

niających kwasy tłuszczowe (Rossi), właściwości lipazy (komunikaty Bergströma i Desnuella), przemian kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcuchów węglowych (Weitzel), przemian kwasu propionowego (Ochoa), biosyntezy cholesterolu (Popjak) i biogenezy kwasów wielonienasyconych (Klenk).

Bardzo ciekawy komunikat wygłosił Favarger, w którym przedstawił wyniki swoich badań nad biosyntezą kwasów tłuszczowych w żywym zwierzęciu. Autor wstrzykiwał myszom roztwory octanu, względnie glukozy zawierające C^{14} i już po trzech minutach (!) wykrywał węgiel promieniotwórczy w kwasach tłuszczowych jelita, płuc, wątroby i tkanki tłuszczowej. Zasługuje na uwagę fakt, że na podstawie aktywności promieniotwórczej można było sądzić, że synteza kwasów tłuszczowych szybciej zachodzi w tkance tłuszczowej, niż w wątrobie.

W sekcji trzeciej komunikaty dotyczyły głównie następujących zagadnień. Po pierwsze omawiano metabolizm fosfolipidów i czynności lecytynaz, przy czym przedstawione były prace zarówno z dziedziny hydrolitycznego rozpadu fosfolipidów w różnych tkankach, jak i ich syntezy badanej za pomocą fosforu promieniotwórczego. Po drugie, omawiano chłonięcie i przemiany steroli. Większa jednak część prac przedstawionych w tej sekcji dotyczyła jednego z wciąż jeszcze najbardziej aktualnych problemów biochemii lipidów, mianowicie zagadnienia trawienia i chłonięcia tłuszczów. Konferencja zgromadziła szereg wybitnych przedstawicieli tego kierunku badań. W komunikatach przedstawiono wyniki bądź popierające, częściowo przynajmniej, pogląd o chłonięciu zemulgowanych, ale nie zhydrolizowanych tłuszczów (Frazer), bądź wskazujące na to, że hydroliza przynajmniej do dwu lub jednoglicerydów zawsze ma miejsca, i że tłuszcze są przyswajane głównie w tej właśnie postaci (Ahrens, Bergström, Borgstrom). Wyniki, uzyskane przez tych ostatnich autorów są bardzo przekonujące i dawne krańcowe poglądy Frazera nie są obecnie popierane nawet przez niego samego. Żmudne i bardzo gruntowne badania nad chłonięciem tłuszczów zostały przeprowadzone przez grupę badaczy z Los Angeles (Morehouse i współpracownicy). Badacze ci stosując związki piętnowane węglem radioaktywnym mogli między innymi stwierdzić, że glicerydy kwasów tłuszczowych o stosunkowo krótszych łańcuchach są dość odporne na hydrolizę i te właśnie glicerydy mogą być częściowo wchłaniane bez uprzedniego rozszczepienia.

Komunikaty sekcji czwartej dotyczyły bardzo różnych zagadnień. Między innymi Lesser i współpracownicy przedstawili ciekawą metodę oznaczania ogólnej zawartości tłuszczów u człowieka. Metoda polega na wdychaniu w układzie zamkniętym powietrza z domieszką cyklo-

propanu. Znając rozpuszczalność tego związku w tłuszczach i wodzie (52 : 1) można było, po ustaleniu się równowagi, z ilości pochłoniętego cyklopropanu obliczyć zawartość tłuszczów w ciele. Autorzy przytaczają na poparcie dokładności i przydatności swojej metody cały szereg bardzo przekonujących doświadczeń kontrolnych wykonywanych na szczurach. W doświadczeniach tych wyniki uzyskane metodą cyklopropanową były zgodne z wynikami uzyskanymi za pomocą bezpośrednich analiz chemicznych.

Le B r e t o n omówił swoje ciekawe badania nad rozmieszczeniem tłuszczów, fosfolipidów i steroli w elementach strukturalnych komórek wątroby. T h o m a s s o n przedstawił obszerny materiał dotyczący biologicznej wartości około 20 naturalnych tłuszczów i olejów i ich wpływ na zahamowanie procesów wzrostowych u szczura. Kilka komunikatów było poświęconych kwasom tłuszczowym egzogenicznym. Szczególnie ciekawe w tej dziedzinie są prace H o l m a n a nad metabolizmem wielonienasyconych kwasów. Autor przyjmuje istnienie w organizmie dwóch grup kwasów tłuszczowych, jak gdyby niezależnych od siebie fizjologicznie i biochemicznie. Jedna z nich jest grupa kwasu linolowego (dwa wiązania podwójne), z którego może się wytworzyć kwas arachidonowy, druga jest grupa kwasu linolenowego (trzy wiązania podwójne), z którego powstają w organizmie kwasy z pięcioma i sześcioma wiązaniami. Ogromne trudności metodyczne w analizie chemicznej tego rodzaju związków zmuszają jednak do pewnej dozy sceptycyzmu w stosunku do wyników tych nie wątpliwie jednak ciekawych badań.

Z pozostałych komunikatów tej sekcji zwracały na siebie uwagę ciekawe prace S m i t s a i E d g a r a poświęcone lipidom tkanki nerwowej. Jedna z nich dotyczyła zawartości gangliozydów w mózgu, druga — roli sfingolipidów w procesach mielinizacji włókna nerwowego.

W ostatnim dniu obrad odbyło się jedno posiedzenie plenarne. Na tym posiedzeniu David Green wygłosił piękny odczyt o katabolizmie i anabolizmie kwasów tłuszczowych. W odczycie tym, opartym na badaniach pracowni Lynena, Ochoa, Lehningera i innych wybitnych biochemików, Green przedstawił pięć zasadniczych dobrze obecnie poznanych etapów reakcji, które prowadzą do powstawania kwasu tłuszczowego C_n-2 i acetylu CoA, z kwasu tłuszczowego C_n , bądź w kierunku odwrotnym. W referacie swoim Green omówił te etapy od strony enzymatycznej.

Poza posiedzeniami naukowymi jedno z posiedzeń było poświęcone sprawom organizacyjnym. Zostało m. i. uchwalone, 1) że ilość członków

w przyszłych konferencjach nie powinna przekraczać 250 osób, 2) że następna konferencja ma się odbyć w roku 1956 w Brukseli w okresie bezpośrednio poprzedzającym Międzynarodowy Kongres Fizjologiczny, 3) że każdy z uczestniczących w konferencji krajów ma mieć w komitecie organizacyjnym swoich przedstawicieli. Ze strony Polski na przedstawiciele zostali wybrani dr Paulina Włodawer i prof. dr W. Niemierko.

Na zakończenie tego krótkiego omówienia konferencji należy podkreślić, że organizacja jej była wzorowa. Czas przeznaczony na wygłaszanie komunikatów był wystarczająco duży i każdy z autorów miał możliwość przedstawić wyniki swoich badań z dostateczną ilością niezbędnych szczegółów. Konferencja zgromadziła pokaźną liczbę specjalistów i doskonałych znawców w dziedzinie biochemii lipidów. Skutkiem tego dyskusja tocząca się po poszczególnych komunikatach nie nosiła charakteru formalnego, jak to po części bywa na dużych międzynarodowych kongresach, lecz przeciwnie była niezmiernie ożywiona i bezpośrednia. Chwilami miało się wrażenie, że jest się obecnym w gronie dobrze znających siebie osób przeprowadzających twórczą naradę roboczą.

Wszystkie wygłaszane komunikaty, jak i cała dyskusja były nagrane na stilo, ponadto, każdy z uczestników dyskusji był proszony o niezwłoczne dostarczenie najważniejszych jej tez. Wszystkie te dane będą służyły jako materiały do obszernej publikacji, która pod redakcją Popjaka ukaże się w druku w roku 1956. Publikacja ta będzie zawierała pełne teksty wszystkich komunikatów oraz całą dyskusję.

W czasie trwania konferencji urządzony był pokaz aparatury naukowej oraz wystawa najnowszego piśmiennictwa biochemicznego. Ponadto dla uczestników konferencji w przerwach pomiędzy posiedzeniami zorganizowane były wycieczki celem zwiedzenia Gandawy oraz zobaczenia bezcennych dzieł sztuki flamandzkiej zgromadzonych w muzeach i kościołach.

Zarówno wysoki poziom naukowy samej konferencji jak i doznane w czasie zwiedzania miasta wrażenia estetyczne złożyły się na to, że pobyt w Gandawie pozostawił po sobie niezatarte wrażenie.

L. JANOTA

BADANIA R. K. CLAYTONA NAD FOTOSYNTEZĄ, ODDYCHANIEM
ORAZ REAKCJAMI TAKTYCZNYMI *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

Bakterie fotosyntetyczne stanowią jeden z wyjątkowo ciekawych obiektów badań naukowych. Mimo, iż duża ilość prac została im poświęcona, metabolizm ich nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Brak również do tej pory wyczerpującej odpowiedzi na pytanie co jest bezpośrednim powodem reakcji taktycznych tych bakterii. Jednym z wielu badaczy zajmujących się bakteriami fotosyntetycznymi jest Roderick K. Clayton. W 1955 roku opublikował on w *Archiv für Mikrobiologie* trzy prace ciekawe zarówno ze względów tematycznych jak i metodycznych.

Zasadniczym celem tych prac było określenie i wyjaśnienie zależności pomiędzy reakcjami taktycznymi (reakcjami na światło i tlen) i metabolizmem *Rhodospirillum rubrum*. Aby ustalenie i wyjaśnienie takiej zależności było możliwe, koniecznym było zbadanie metabolizmu tych bakterii w ciemności i na świetle, a w szczególności w oparciu o wyniki przeprowadzonych doświadczeń, podanie równań z danymi liczbowymi dla oddychania i fotosyntezy.

Uzależnienie reakcji taktycznych od metabolizmu, a nawet bardziej szczegółowo, bo od pewnych określonych procesów metabolicznych, autor oparł na porównaniu zachowania się bakterii w różnych warunkach świetlnych i tlenowych (obserwacje mikroskopowe) z przebiegiem procesów metabolicznych w tychże warunkach. Dodatkowe dane autor uzyskał na drodze porównania wpływu pewnych związków chemicznych jak błękitu metylenowego, chlorku trójfenylotetrazolu i 2,4 dwunitrofenolu na reakcje taktyczne i procesy metaboliczne badanych bakterii. Omawiane prace R. K. Claytona rozwiązują postawione przez niego zagadnienie.

Hipoteza, iż reakcje taktyczne *R. rubrum* są powodowane pewnym przejściowym zakłóceniem towarzyszącym spadkowi intensywności metabolizmu została potwierdzona, o ile rozumiemy tu metabolizm jako asymilację przez komórki dwutlenku węgla. Prace te stanowią jednocześnie podstawę do dalszych badań, które rozwiązałyby zależność między reakcjami taktycznymi a asymilacją dwutlenku węgla bardziej szczegółowo.

Badania te powinny by wyjaśnić, który związek występujący w reakcjach metabolicznych wywołuje bezpośrednio reakcje taktyczne. Związkiem tym wg hipotezy autora mógłby być kwas tiooktanowy, względnie zasadnicze znaczenie miałby stosunek jonów żelazowych do żelazawych w cytochromie, lub innym podobnym związku. Bardzo duża wartość prac R. K. Claytona polega nie tylko na tym, iż zasadniczy ich cel został ogólnie osiągnięty. Są one dobrym przykładem badań nad wymianą gazową związaną z oddychaniem i fotosyntezą, które dzięki wykorzystaniu danych z literatury, zastosowaniu odpowiednich metod, a szczególnie pomysłowej

interpretacji otrzymywanych wyników, pozwoliły na dalece posunięte wyjaśnienie skomplikowanego metabolizmu bakterii fotosyntetycznych.

Na podkreślenie zasługuje również krytyczne podejście do stosowanych metod i sprawdzenie słuszności swych zastrzeżeń metodami dodatkowymi, jak np. w pracy drugiej zastosowanie aparatu Benjamina R. P e t t r i e. Jednakże mimo wspomnianej już dużej wartości prac R. K. C l a y t o n a zawierają one fakty, a zwłaszcza interpretacje pewnych faktów mogące wzbudzić pewne zastrzeżenia, względnie nadające się do szczegółowego przeanalizowania.

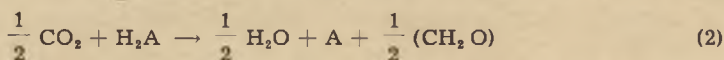
W pracy pierwszej pt. „Fotosynteza i oddychanie u *Rhodospirillum rubrum*” autor przedstawił 1) ogólne równania obrazujące fotosyntezę i oddychanie tlenowe badanych bakterii zużywających różne substraty organiczne, w warunkach wykluczających jednoczesne występowanie obu procesów, 2) wpływ cyjanunku, błękitu metylenowego, chlorku trójfenylotetrazolu i 2,4-dwunitrofenolu na oddychanie i fotosyntezę, 3) intensywność oddychania endogenego bakterii w różnych warunkach, oraz 4) porównanie pewnych aspektów metabolizmu *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas spheroides*, oraz *Rhodopseudomonas capsulatus*.

Do badań autor zastosował manometryczną metodę W a r b u r g a - B a r c t o f t a w modyfikacji S c h a t z a z 1952 r. pozwalającą na jednoczesny pomiar pobierania tlenu, asymilacji lub wydzielania dwutlenku węgla oraz wiązania dwutlenku węgla przez ług powstający w naczyniu wskutek zużycia przez bakterie anionu soli sodowej kwasu organicznego dodanej jako substratu. Doświadczenia mające na celu określenie wymiany gazowej w czasie oddychania przeprowadzane były przy całkowitym zaciemnieniu, w atmosferze powietrza z dodatkiem 3% dwutlenku węgla. W czasie doświadczeń mających na celu określenie wymiany gazowej związanej z fotosyntezą, naczynia były oświetlone 25-cio watowymi lampami, przy czym intensywność oświetlenia była kontrolowana. W tym wypadku pomiary były prowadzone w atmosferze azotu z dodatkiem 3% dwutlenku węgla. Do pomiarów używano zawiesinę bakterii w 0,003 M NaHCO₃ o gęstości 0,04 ml komórek na 1 ml zawiesiny. Przed pomiarem bakterie były przez dwa dni głodzone w celu zmniejszenia intensywności oddychania endogenego.

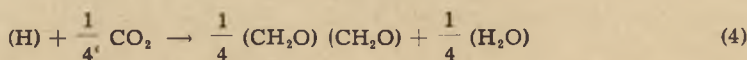
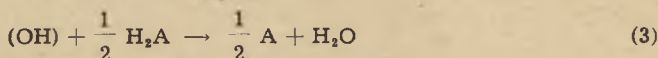
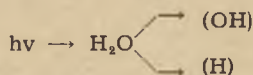
W niektórych doświadczeniach prócz pomiarów wymiany gazowej autor wykonał również oznaczenia węgla w zużywanym substracie wg metody O s b u r n a i W e r k m a n a z 1932 r. Metoda ta pozwalała wykryć 0,2 mg — atomu węgla.

We wstępie do swej pierwszej pracy autor omówił ostatnie dane z literatury na temat metabolizmu bakterii fotosyntetycznych, a w szczególności równania obrazujące oddychanie i fotosyntezę.

a) Oddychanie



b) Fotosynteza

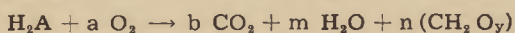


Równania te wg autora muszą być przyjęte z pewnym zastrzeżeniem. Po pierwsze materiał komórkowy powstający w procesie syntezy może mieć wzór sumaryczny inny niż $(\text{CH}_2\text{O})_y$, „ $\text{H}_2\text{A} \rightarrow \text{A}$ ” jest również pewnym symbolem, a ilość elektronów przeniesiona z mola utlenianego substratu może być różna. W końcu substancją redukowaną może być nie tylko dwutlenek węgla, ale i pewne produkty pośrednie, powstające z niecałkowicie utlenionego „ H_2A ”.

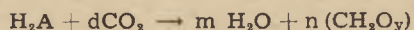
Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń autor miał określoną tylko całkowitą ilość zużytego substratu, całkowitą ilość pochłoniętego tlenu, oraz całkowitą ilość wydzielonego lub pochłoniętego dwutlenku węgla. Wobec powyższego nie mógł on ani oddychania ani fotosyntezy przedstawić w dwóch równaniach rozbijających omawiane procesy na część związaną z utlenianiem i z redukcją.

Ogólne równanie obrazujące oddychanie i fotosyntezę są sformułowane przez autora w sposób następujący:

a) Oddychanie



b) Fotosynteza



W tabelicy 1 podany jest zużywany substrat i wartości a , b , m , n , y dla oddychania oraz substrat i wartości d , m , n , y dla fotosyntezy. Dla obu procesów został również podany procent asymilowanego węgla, który autor obliczył dzieląc ilość atomów węgla zasymilowanego przez ilość dostarczoną w substracie. Ogółem więc w tabelicy 1 autor uzyskał na drodze doświadczalnej jedynie wartości a , b i d .

Omawiając tabelicę 1 autor wyjaśnia, iż duże wahania dla wartości „ y ” (np. gdy substratem jest octan sodu $y = 0,73$ lub $0,66$) wynikają z tego, że nawet niewielkie różnice w wartościach „ a ” i „ b ” powodują duże różnice dla „ y ”.

Oddychanie endogenne zostało uwzględnione jedynie, gdy substratem był kwas kapronowy (był on używany bardzo powoli). W innych wypadkach oddychanie endogenne było tak słabe, iż mogło nie być brane pod uwagę.

Autor podkreślił również duże wahania procentu asymilowanego węgla, wyciągając jednak ogólny wniosek, iż hodowla znajdująca się w gorszych warunkach fizjologicznych (rozkładająca substrat mniej intensywnie) mniej wydajnie przenosi energię z procesów utleniania na procesy asymilacyjne, innymi słowy, na mol zużytego substratu zużywa więcej tlenu i asymiluje mniej węgla.

Uwaga autora odnośnie różnic dla wartości „ y ” jest całkowicie słuszna, ale należałoby również omówić różnice doświadczalnie otrzymanej wartości „ a ”. Np. gdy substratem jest kwas octowy „ a ” w jednym wypadku równa się $0,72$, w drugim — $1,17$, gdy substratem jest kwas jabłkowy wartości „ a ” wynoszą $1,07$ i $1,71$, gdy kwas bursztynowy $1,68$ i $2,18$. Co prawda autor podaje również odpowiednie wartości średnie otrzymane z dziesięciu czterech czy też siedmiu pomiarów, ale przy pozostałych sześciu kwasach przytoczone wyniki odnoszą się tylko do pojedynczych oznaczeń. To samo można powiedzieć o wartości „ b ”.

Sprawa ta jest o tyle ważna, że wartości „ m ”, „ n ” i „ y ” są całkowicie uzależnione od wartości „ a ” i „ b ” i przy dużym błędzie w oznaczeniu tych ostatnich cały obraz oddychania przy danym substracie może wyjść w sposób niezgodny z rzeczywistością. Poza tym autor przyjmuje, iż w produkcji otrzymywanym na drodze syntezy stosunek węgla do wodoru jest stały i wynosi $1 : 2$, a stosunek tlenu do węgla jest zmienny (CH_2O_y) . Przyjmując sytuację odwrotną autor otrzymałby inne wartości dla „ m ” i odpowiednio inne wartości dla wodoru zawartego w syntetyzowanym produkcie.

Wreszcie nie jest wykluczone, że powstający produkt komórkowy ma inny stosunek i wodoru i tlenu do węgla niż (CH_2O) np. (CH_2O_y) . W tym wypadku znając tylko wartość a i b nie możnaby obliczyć „ m ”, „ z ” i „ y ”.

Tablica 1

Dane liczbowe dotyczące ogólnych równań oddychania i fotosyntezy *R. rubrum*

O d d y c h a n i e

| S u b s t r a t | a | b | m | n | y | %C |
|---------------------------|------|------|------|------|------|----|
| kwask octowy | 0,72 | 0,87 | 0,87 | 1,13 | 0,73 | 56 |
| kwask octowy | 1,17 | 1,29 | 1,29 | 0,71 | 0,66 | 35 |
| kwask octowy śr. z 10 | 0,93 | 1,08 | 1,08 | 0,92 | 0,68 | 46 |
| kwask kapronowy | 4,7 | 2,8 | 2,8 | 3,2 | 0,94 | 53 |
| kwask pyrogronowy | 0,90 | 1,51 | 0,51 | 1,49 | 0,85 | 50 |
| kwask jabłkowy | 1,07 | 2,20 | 1,20 | 1,80 | 0,85 | 45 |
| kwask jabłkowy | 1,71 | 2,86 | 1,86 | 1,14 | 0,74 | 28 |
| kwask jabłkowy śr. z 4 | 1,36 | 2,52 | 1,52 | 1,48 | 0,78 | 37 |
| kwask bursztynowy | 1,68 | 2,36 | 1,36 | 1,64 | 0,78 | 41 |
| kwask bursztynowy | 2,18 | 2,80 | 1,80 | 1,20 | 0,80 | 30 |
| kwask bursztynowy śr. z 7 | 1,92 | 2,52 | 1,52 | 1,48 | 0,86 | 37 |

F o t o s y n t e z a

| S u b s t r a t | d | m | n | y | %C |
|---------------------------|-------|------|------|------|-----|
| kwask octowy śr. z 10 | -0,21 | 0,2 | 1,8 | 0,77 | 90 |
| kwask kapronowy | 1,5 | -1,5 | 7,5 | 0,86 | 125 |
| kwask pyrogronowy | -0,70 | -0,3 | 2,3 | 0,83 | 77 |
| kwask jabłkowy śr. z 4 | -1,24 | 6,25 | 2,75 | 0,83 | 69 |
| kwask bursztynowy śr. z 7 | -0,68 | -0,3 | 3,3 | 0,89 | 82 |

Z danych przedstawionych przez autora w tablicy 1 możnaby wyciągnąć jeszcze dodatkowe wnioski: 1) współczynnik oddechowcy *Rhodospirillum rubrum* jest trochę wyższy niż obliczony z równania całkowitego spalania danego substratu (np. przy kwasie octowym współczynnik obliczony równa się 1, otrzymany równa się 1,1 do 1,2), 2) porównując procent ilości asymilowanego węgla przy oddychaniu i fotosyntezie, procent ten jest dużo większy dla fotosyntezy.

W następnym rozdziale autor omawia wpływ cyjanku sodu na oddychanie oraz endogenny metabolizm *Rhodospirillum rubrum*. Na wykresie 1 autor przedstawił wpływ różnych stężeń cyjanku na zużywanie w procesie oddechowym przez *R. rubrum*

kwasu bursztynowego. Po 100 min. bakterie niezatrute zużyły cały substrat, wtedy też hamujące działanie cyjanku na zużywanie substratu jest największe.

Na tej podstawie wszystkie następane dane co do hamującego działania badanych związków chemicznych autor uzależnił od maksymalnej wartości zużycia substratu przez bakterie niezatrute po 100 min. zakładając, że równa się ona 1,0.

W tabelicy 2 autor podał dane obrazujące wpływ różnych stężeń cyjanku na zużycie kwasu bursztynowego w procesie oddychania przez komórki niegłodzone, głodzone dwa, cztery i siedem dni. Wartość „r” wyobraża ilość moli kwasu bursztynowego rozłożonego przez ml komórek w ciągu godziny, „a” ilość moli tlenu zużytego na mol rozłożonego kwasu bursztynowego, „a — end” jest wartością „a”, od której została odjęta ilość tlenu zużytego w oddychaniu endogennym.

Omawiając tabelicę 2 autor stwierdza, że w wypadku intensywnego metabolizmu egzogenego metabolizm endogeny jest tak słaby, że może być nieuwzględniony. Wniosek ten autor opiera na danych oznaczonych I, odnoszących się do komórek niegłodzonych. Z drugiej strony powołując się na doświadczenie II i V (komórki głodzone przez dwa i siedem dni), autor pisze, że gdy metabolizm egzogeny jest słaby, metabolizm endogeny zaznacza się wyraźniej.

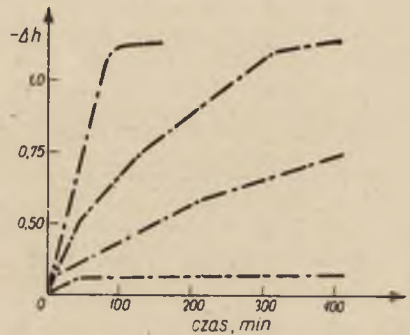
W tym wypadku przynajmniej, gdy stężenie cyjanku przekracza $0,5 \times 10^{-4}$ M należy uwzględnić poprawkę na oddychanie endogenne. Powyższe wnioski autora wydają mi się niecałkowicie słuszne. Komórki niegłodzone, niezatrute (doświadczenie I) intensywniej zużywają substrat niż komórki głodzone, niezatrute (doświadczenie II i III, IV i V) a ich oddychanie endogenne jest na ogół większe niż komórek głodzonych. Oddychanie endogenne jest najniższe u komórek głodzonych dwa dni, niezatrutych (dane z doświadczenia II).

Gdyby nie doświadczenie III można by powiedzieć, że oddychanie endogenne może być pominięte u komórek głodzonych przez dwa dni, niezatrutych, co wiąże się jednocześnie z silniejszym zużywaniem przez nie substratu w porównaniu z komórkami głodzonymi cztery i siedem dni (doświadczenie IV i V).

Jednakże w doświadczeniu III komórki znajdujące się w analogicznych warunkach co komórki w doświadczeniu II miały intensywniejsze oddychanie i egzogenne i endogenne.

Ogólnie można stwierdzić, iż cyjanek hamując oddychanie egzogenne zwiększa endogenne i w tym wypadku musi ono być koniecznie brane pod uwagę. Powyższe działanie cyjanku jest na ogół silniejsze u komórek dłużej głodzonych, ale w pewnych wypadkach ostatni wniosek nie jest słuszny np. dla doświadczenia II i IV.

Z danych przedstawionych w tabelicy 2 autor wyprowadza jeszcze jeden wniosek, a mianowicie, iż zwiększenie stężenia cyjanku powoduje większe zużycie tlenu na mol substratu. Wniosek ten jest całkowicie słuszny, jednakże tablica 2 nasuwa dodatkowe spostrzeżenia.



Wykres 1. Wpływ cyjanku na zużycie w procesie oddychania *R. rubrum* kwasu bursztynowego

| | |
|------------------|-----------------------------|
| krzywa 1 od góry | — bez cyjanku |
| krzywa 2 „ „ | — $1,2 \times 10^{-4}$ M CN |
| krzywa 3 „ „ | — $2,5 \times 10^{-4}$ M CN |
| krzywa 4 „ „ | — $5,0 \times 10^{-4}$ M CN |

Tablica 2

Wpływ cyjanku na zużywanie kwasu bursztynowego w procesie oddychania *R. rubrum*

| | | stęż. cyjanku Mol $\times 10^{-4}$ | r | a | a-end |
|-----|------------------------|---------------------------------------|-----|------|--------|
| I | Komórki niegłodzone | 0 | 70 | 1,68 | 1,08 |
| | | 0,8 | 60 | 1,74 | 1,00 |
| | | 1,5 | 23 | 1,72 | - 0,36 |
| II | Komórki głodzone 2 dni | 0 | 14 | 2,06 | 2,02 |
| | | 0,5 | 8 | 2,80 | 2,10 |
| | | 1,0 | 4 | 3,86 | 2,38 |
| | | 2,0 | 2 | 5,68 | 2,92 |
| III | Komórki głodzone 2 dni | 0 | 21 | 2,08 | 1,81 |
| | | 0,5 | 16 | 2,34 | 2,06 |
| | | 0,8 | 11 | 2,48 | 2,08 |
| | | 1,2 | 6 | 2,88 | 2,06 |
| IV | Komórki głodzone 4 dni | 0 | 10 | 2,20 | 1,96 |
| | | 0,8 | 3,5 | 2,52 | 2,12 |
| | | 1,5 | 2 | 2,92 | 2,14 |
| V | Komórki głodzone 7 dni | 0 | 5,5 | 2,60 | 1,94 |
| | | 0,8 | 2,1 | 4,14 | 2,18 |
| | | 1,5 | 1,2 | 8,6 | 3,46 |

Zmniejszenie się intensywności oddychania egzogenego zależy nie tylko od cyjanku, jak zauważyłam poprzednio, ale również od głodzenia komórek. Im dłużej są komórki głodzone, tym wykazują słabsze oddychanie egzogenne, oraz większe zużycie tlenu na mol substratu. A więc głodzenie działa w tym samym kierunku co zatrucie cyjankiem. Ponadto działanie cyjanku i głodzenie jakgdyby się akumulują, gdyż im komórki są dłużej głodzone tym następuje silniejszy spadek zużycia substratu pod wpływem cyjanku.

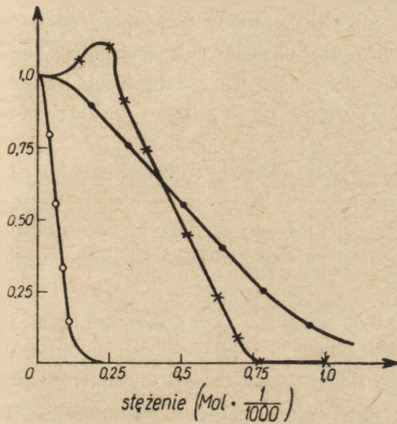
Po omówieniu wpływu cyjanku sodu na oddychanie *R. rubrum* autor przedstawił działanie 2,4-dwunitrofenolu, błękitu metylenowego, oraz chlorku trójfenylotetrazolu na oddychanie i fotosyntezę badanych bakterii. Doświadczenia autor przeprowadził na świetle, w atmosferze azotu + 3% dwutlenku węgla, w ciemności w atmosferze powietrza + 3% dwutlenku węgla, oraz na świetle w atmosferze powietrza + 3% dwutlenku węgla. Zużywanym substratem była sól sodowa kwasu L-jabłkowego. Intensywność światła była pięciokrotnie większa od wymaganej dla nasycenia procesu fotosyntezy.

Porównując wykres 2 oraz wykres 3 i 4 można stwierdzić, iż 2,4-dwunitrofenol hamuje zużywanie substratu w procesie fotosyntezy mniej więcej równie silnie jak w procesie tlenowego oddychania. Jednakże, gdy fotosynteza odbywa się w warunkach tlenowych hamujące działanie 2,4-dwunitrofenolu jest dużo słabsze i to nie

tylko na zużycie substratu, lecz i na asymilację węgla. Ponadto w warunkach tlenowych na świetle zachodzi pobieranie tlenu, które w nieobecności 2,4-dwunitrofenolu jest całkowicie zahamowane przez fotosyntezę.

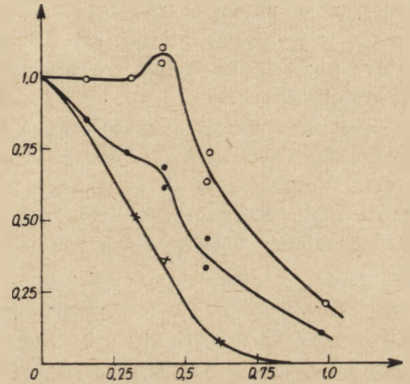
Dla wytłumaczenia ostatniego faktu autor przytacza hipotezę, iż dwunitrofenol do tego stopnia zahamował fotosyntezę, że tlen może współzawodniczyć z (OH) przy utlenianiu substratu.

Ogólne zmniejszenie hamującego działania dwunitrofenolu na świetle w obecności powietrza mogłoby być wytłumaczone denaturacją trucizny na drodze fotoche-



Wykres 2. Działanie dwunitrofenolu, błękitu metylenowego i tetrazolu na fotosyntetyczny rozkład przez *R. rubrum* kwasu L — jabłkowego

- — 2,4-dwunitrofenol
- — błękit metylenowy
- × — tetrazol



Wykres 3. Wpływ 2,4-dwunitrofenolu na rozkład kwasu L-jabłkowego w procesie oddychania *R. rubrum*

- — zużycie substratu
- — pobieranie tlenu
- × — asymilacja węgla

micznego utleniania tlenem powietrza. Jednakże brak jest danych potwierdzających to wyjaśnienie.

Autor zwraca również uwagę na to, iż w ciemności dwunitrofenol w stężeniu około 0,0004 M stymuluje pobieranie tlenu natomiast asymilacja węgla zmniejsza się stale wraz ze wzrastającym stężeniem trucizny. Gdy stężenie dwunitrofenolu wynosi 0,0001 M asymilacja jest zahamowana całkowicie, natomiast zachodzi jeszcze utlenianie substratu. Wyniki te są zgodne z poglądem, że dwunitrofenol hamuje przenoszenie energii na procesy asymilacyjne, przeszkadzając w magazynowaniu energii w „wysokoenergetycznych wiązaniach fosforowych”.

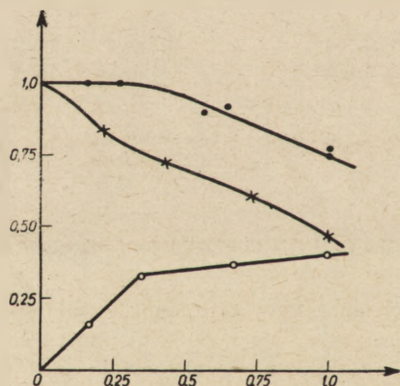
Porównując wykres 2 z wykresem 5 i 6 oraz 7 i 8 można zauważyć dużą analogię w działaniu błękitu metylenowego oraz chlorku trójfenylotetrazolu na oddychanie i fotosyntezę *R. rubrum*. Aby całkowicie zahamować zużywanie substratu w procesie oddychania muszą być zastosowane większe stężenia błękitu metylenowego i chlorku trójfenylotetrazolu niż stężenia wystarczające do zahamowania zużywania substratu, w procesie fotosyntezy. Wyżej wymienione działanie trucizn autor tłumaczy tym, że mogą one służyć jako akceptory wodoru dla utlenianego substratu. Tym samym hamują one przenoszenie energii i wykorzystanie jej w procesach asymilacji co widać

z przebiegu odpowiednich krzywych na wykresie 5 i 7. Dobrym wytłumaczeniem silnego hamowania fotosyntezy przez błękit metylenowy byłoby założenie, iż barwnik ten współzawodniczy z (OH) jako akceptor wodoru utlenianego substratu (podobnie jak w oddychaniu tlenowym, ale bez możliwości reoksydacji) lub z dwutlenkiem węgla jako akceptor wodoru redukującej substancji (H). Ponieważ jednak nie stwierdzono nagromadzenia się bezbarwnej formy błękitu metylenowego, brak jest danych podtrzymujących tę hipotezę. Podobnie jak w wypadku dwunitrofenolu, błękit metylenowy i tetrazol słabiej hamują metabolizm bakterii na świetle i w warunkach tlenowych, niż na świetle w atmosferze azotu lub w ciemności i obecności tlenu.

Wyżej streszczona dyskusja autora odnośnie działania dwunitrofenolu, błękitu i tetrazolu, mimo, że nie daje pełnego wytłumaczenia dla uzyskanych wyników, jednakże jest wysoce interesująca i być może stanie się podstawą dla następnych badań, które pozwolą na pełniejsze zrozumienie skomplikowanego metabolizmu bakterii fotosyntetycznych.

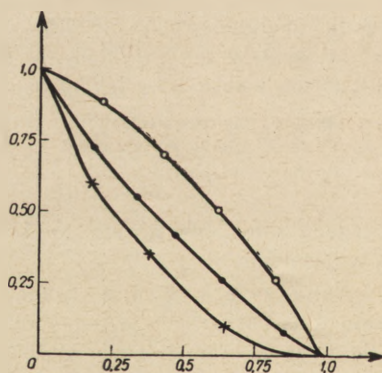
W pierwszej z dyskutowanych prac autor porównał również metabolizm *R. rubrum*, *Rhodospseudomonas spheroides* i *R. capsulatus* na świetle, w warunkach tlenowych. Podczas, gdy w warunkach tych bakterie *R. rubrum* nie są zdolne do pobierania tlenu, *R. spheroides* i *R. capsulatus* pobierają tlen w ilości 70% w stosunku do maksymalnego używania w ciemności.

Druga z omawianych prac pt. „Współzawodnictwo między metabolizmem zachodzącym w świetle i w ciemności u *Rhodospirillum rubrum*” miała na celu zbadanie i ilościowe określenie procesu fotosyntezy i oddychania w różnych warunkach oświetlenia i dostępu tlenu. Przy słabym świetle i w obecności tlenu współzawodniczą



Wykres 4. Wpływ 2,4-dwunitrofenolu na rozkład kwasu L-jabłkowego w procesie oddychania i fotosyntezy *R. rubrum*

Objaśnienia jak przy wykresie 3.



Wykres 5. Wpływ błękitu metylenowego na rozkład kwasu L-jabłkowego w procesie oddychania *R. rubrum*

Objaśnienia jak przy wykresie 3.

pomiedzy sobą dwa procesy: fotosynteza i oddychanie. Zużywany substrat może być częściowo utleniony tlenem powietrza za pośrednictwem cytochromu i tzw. „ciemnej oksydazy” częściowo zaś może być utleniony czynnikiem utleniającym (OH) powstałym z fotolizy wody za pośrednictwem cytochromu i tzw. „foto-oksydazy”. Aby jednocześnie określić intensywność fotosyntezy i oddychania w różnych warunkach

oświetlenia i dostępu tlenu należy zmierzyć w tych warunkach zużycie tlenu oraz substratu.

Ponieważ zastosowanie w niniejszej pracy gazometrycznej metody Warburga może wzbudzić szereg zastrzeżeń, autor przytacza te zastrzeżenia, które mu się nasunęły i przeprowadza szczegółową nad nimi dyskusję.

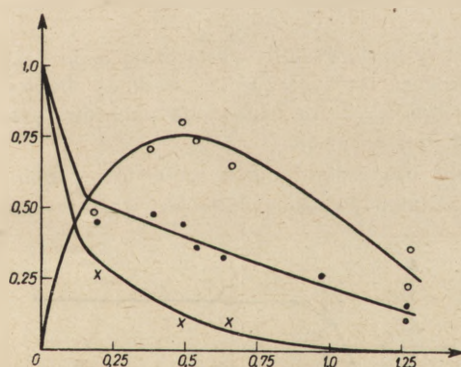
1) Uchwycenie współzawodnictwa pomiędzy fotosyntezą a oddychaniem byłoby niemożliwe, gdyby tlen był zużyty nie tylko do utleniania substratu, lecz również na drodze fotooksydacji, redukcji czynnikiem redukującym (H) lub w oddychaniu endogennym. Istnienie fotooksydacji lub redukcji czynnikiem (H) autor wyklucza na tej podstawie, iż silne oświetlenie hamuje prawie całkowicie pobieranie tlenu przez *R. rubrum*.

Oddychanie endogenne może być ograniczone do minimum przez dwudniowe głodzenie komórek.

2) Jednoczesna fotosynteza i oddychanie mogłaby zmienić przebieg tego ostatniego procesu.

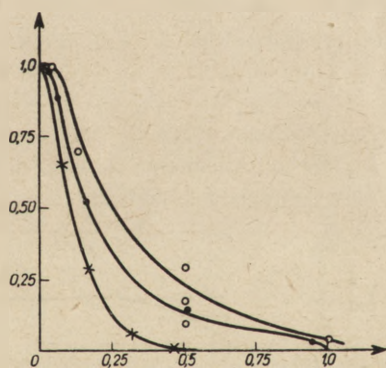
Dokonyjąc pomiaru nie tylko pochłanianego tlenu i zużywanego substratu, ale i asymilowanego lub wydzielanego dwutlenku węgla oraz ilości organicznego węgla w pożywce po skończonym doświadczeniu, autor stwierdził, że ogólna wymiana gazowa jest sumą wymiany gazowej określonej dla fotosyntezy i oddychania oddzielnie. Wobec powyższego oddychanie tlenowe w obecności fotosyntezy przebiega w sposób niezmienny.

3) Ponieważ przy słabym oświetleniu fotosynteza jest ograniczona szybkością absorpcji kwantów świetlnych, a przy małym dostępie tlenu oddychanie jest ograni-



Wykres 6. Wpływ błękitu metylenowego na rozkład kwasu L-jabłkowego w procesie oddychania i fotosyntezy *R. rubrum*

Objaśnienia jak przy wykresie 3.



Wykres 7. Wpływ chlorku trójfenylo-tetrazolu na rozkład kwasu L-jabłkowego w procesie oddychania *R. rubrum*

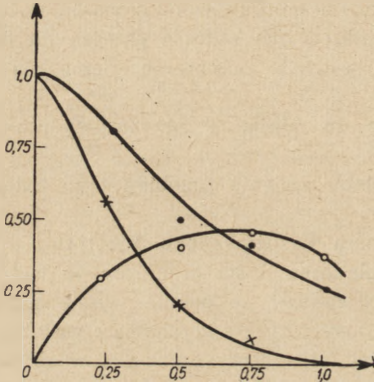
Objaśnienia jak przy wykresie 3.

czona szybkością dyfuzji gazu do komórek, intensywność światła i ciśnienie tlenu są we wszystkich doświadczeniach podane w uzależnieniu od wartości wystarczających do nasycenia fotosyntezy i oddychania.

4) Przy małym dostępie tlenu nie ma pewności, że jest on w równowadze z tlenem rozpuszczonym w pożywce, tym bardziej, że tlen rozpuszczony jest zużywany

przez bakterie. Poza tym ponieważ duża część tlenu jest w czasie doświadczenia zużyta (do 30%) dane odnośnie ciśnienia tlenu w poszczególnych doświadczeniach są średnimi ciśnieniami zmiennego (malejącego).

Aby określić wagę ostatniego zastrzeżenia autor oznaczał zużycie substratu przez bakterie przy różnym ciśnieniu tlenu w procesie oddychania metodą *W a r b u r g a*, oraz metodą *B e n j a m i n a R. P e t r i e*. W ostatniej metodzie dostęp

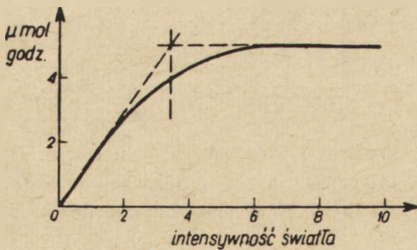


Wykres 8. Wpływ chlorku trójfenylnydotetrazolu na rozkład kwasu L-jabłkowego w procesie oddychania i fotosyntezy *R. rubrum*.

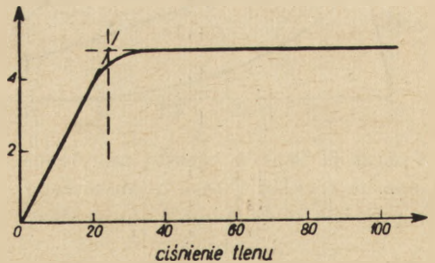
Objaśnienia jak przy wykresie 3.

autor oznacza na wykresie 9. Jest to intensywność, która odpowiada punktowi przecięcia się dwóch przedłużeń, prostych części krzywej.

6) Nierównomierne oświetlenie zawiesziny bakteryjnej może spowodować pobieranie tlenu przez komórki zacienione, mimo, że intensywność światła jest wystarczająca



Wykres 9. Zużycie substratu w procesie fotosyntezy *R. rubrum* przy różnej intensywności światła



Wykres 10. Zużycie substratu w procesie oddychania *R. rubrum* przy różnym ciśnieniu tlenu

do zupełnego wykluczenia oddychania tlenowego. Błąd wynikający z powyższego starał się autor wyeliminować biorąc do wszystkich oznaczeń zawieszinę o jednakowej niewielkiej gęstości: 0,01 ml komórek na ml zawiesziny.

$$I \text{ śr.} = \frac{1}{V} \int_v I_v d_v$$

Oznacza ona oświetlenie całej zawiesziny, gdy w jednostce objętości d_v intensywność światła wynosi I_v .

Intensywność światła wystarczająca do nasycenia procesu fotosyntezy dla „średniej” bakterii

określa się przez intensywność, która odpowiada punktowi przecięcia się dwóch przedłużeń, prostych części krzywej.

Pierwsze doświadczenia autora miały na celu ustalenie intensywności światła wystarczającej do nasycenia procesu fotosyntezy w warunkach beztlenowych, oraz ustalenie ciśnienia tlenu wystarczającego do nasycenia procesu oddychania tlenowego w warunkach pełnego zaciemnienia.

Tablica 3
Wyniki otrzymane z typowego doświadczenia

| Naczynie | I | C | Czas w min. wymagany do zużycia 10 μ moli substratu | Ilość μ moli O_2 zużyta na 10 μ moli substratu | ilość μ moli CO_2 wydzielona na 10 μ moli substratu |
|----------|---------|------|---|--|---|
| 1 | 0,165 | 0 | 600 | 0 | 2,7 |
| 2 | 0,165 | 0,42 | 200 | 8,0 | 9,8 |
| 3 | 0,165 | 0,83 | 135 | 9,5 | 11,3 |
| 4 | 0,165 | 4,2 | 128 | 9,8 | 11,2 |
| 5 | 0 | 4,2 | 128 | 11,5 | 12,6 |
| 6 | zmienne | 0 | | 0 | 2,8 |

Tablica 4
Wyniki otrzymane z typowego doświadczenia

| I | C | % substratu zużytego w oddychaniu | Ilość zużytego substratu w ciągu godziny | Ilość zasymilowanego w ciągu godziny |
|---------|------|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| 0,165 | 0 | 0 | 1,0 | 1,72 |
| 0,165 | 0,42 | 70 | 3,0 | 3,06 |
| 0,165 | 0,83 | 83 | 4,4 | 3,84 |
| 0,165 | 4,2 | 85 | 4,7 | 4,14 |
| 0 | 4,2 | 100 | 4,7 | 3,48 |
| zmienne | 0 | 0 | 4,9 | 8,43 |

Wyniki tych doświadczeń są przedstawione na wykresie 9 i 10. Z wykresów tych wynika, iż maksymalna szybkość zużycia substratu w procesie fotosyntezy wynosi 4,9 μ moli/godz. przy intensywności światła powyżej 3,6 jednostek, przy czym należy pamiętać, że 3,6 jednostek wystarcza dla „średniej” bakterii. Intensywność światła wystarczającego do nasycenia wszystkich bakterii musiałaby wynosić 6 jednostek. Maksymalna szybkość zużycia substratu w procesie oddychania wynosi 4,7 μ mol/godz. przy 24% powietrza w otaczającej atmosferze. Sposób interpretacji dalej otrzymanych wyników autor omówił na jednym doświadczeniu, którego wyniki przedstawione są na tablicy 3 i 4.

Doświadczenie obejmowało sześć różnych kombinacji o zmiennej intensywności światła i ciśnieniu tlenu. W czterech pierwszych naczyniach intensywność światła

wynosiła 0,6 jednostek czyli była 0,165 razy większa od intensywności wystarczającej do nasycenia procesu fotosyntezy u „średniej” bakterii. Wydaje mi się, że byłoby prościej powiedzieć, iż wynosiła 16,5% intensywności wystarczającej do nasycenia. Ciśnienie tlenu w tych naczyniach było następujące: 1) $C = 0$, 2) $C = 0,42$ czyli 0,42 razy ciśnienie wystarczające do nasycenia procesu oddychania, 3) $C = 0,83$, 4) $C = 4,2$. Naczynie piąte było trzymane w ciemności i w 100% powietrza, szóste w warunkach beztlenowych i przy różnych intensywnościach światła.

Na podstawie danych przedstawionych w kolumnie czwartej tab. 3 można zauważyć, iż przy słabym jednakowym oświetleniu szybkość zużywania substratu wzrasta wraz z coraz większym dostępem tlenu. Porównując zaś naczynie 34 i 5 widzimy, iż przy pełnym dostępie tlenu niezależnie od tego czy bakterie są słabo oświetlone czy nie szybkość zużycia substratu jest taka sama. Na podstawie danych przedstawionych w kolumnie piątej widać coraz większe zużycie tlenu na 10 μmoli substratu, które dochodzi aż do pełnej wartości związanej z oddychaniem, wynoszącej 11,5 $\mu\text{moli O}_2$.

Również wydzielanie dwutlenku węgla zwiększa się wraz z wzrastającym dostępem tlenu, prócz jednego niewielkiego obniżenia wydzielania w naczyniu 4. Na podstawie danych umieszczonych w tablicy 3 dla naczynia 5 i 6 autor ułożył dwa równania dla oddychania i fotosyntezy:

a) Oddychanie



b) Fotosynteza



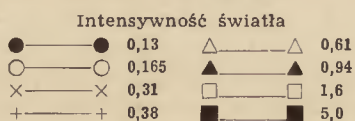
Dalej autor oblicza procent zużycia substratu w procesie oddychania rozumując w sposób następujący: jeżeli zużycie 10 μmoli octanu w procesie oddychania powoduje pobranie 11,5 μmoli tlenu, to pobranie 8,0 μmoli tlenu jest związane z zużyciem

$$\frac{8}{11,5} \times 10 \text{ czyli } 7,0 \text{ moli substratu.}$$

Trzy pozostałe μmole substratu muszą być zużyte w procesie fotosyntezy. Wydzielanie dwutlenku węgla oparte na wyżej przytoczonych reakcjach wyniosłoby: $(7,0 \times 1,26) + (3,0 \times 0,28) = 9,6 \mu\text{mola}$ co zgadza się mniej więcej z wartością 9,8 μmola otrzymaną doświadczalnie. W kolumnie trzeciej tablicy 4 autor podaje procent zużycia substratu w procesie oddychania dla poszczególnych naczyń. Początkowo wzrastają one bardzo gwałtownie, przy intensywności tlenu bliskiej intensywności wystarczającej do nasycenia oddychania powoli. Słabe światło w naczyniu czwartym powoduje, iż 15% substratu zużyte jest w procesie fotosyntezy.



Wykres 11. Procent substratu zużytego w oddychaniu *R. rubrum* w zależności od ciśnienia tlenu przy różnym oświetleniu



W kolumnie czwartej tab. 4 autor podaje całkowitą ilość μmoli substratu zużytej w ciągu godziny. Dane te są wyliczone z danych umieszczonych w kolumnie czwartej tablicy 3. Liczba 4,9 dla naczynia szóstego, ponieważ jest zgodna z liczbą odczytaną na wykresie 3, musi oznaczać szybkość zużycia substratu przy świetle, którego

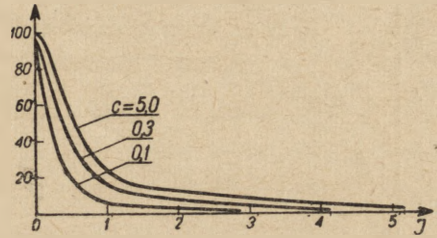
intensywność wystarcza do nasycenia procesu fotosyntezy. Porównując szybkość zużycia substratu w procesie oddychania (naczynie 5) i fotosyntezy (naczynie 6) można zauważyć, iż w naczyniu 4 odpowiednia szybkość powinna być nieco większa niż oznaczona.

W ostatniej kolumnie tablicy 4 podane są ilości μg atomów węgla asymilowane w ciągu godziny. Ilości te autor oblicza w sposób następujący: Przy zużyciu 10 μmoli substratu, zawierającego 20 μg atomów węgla wydziela się 9,8 μmoli CO_2 , a więc ilość węgla asymilowanego w czasie 200 minut wynosi $20 - 9,8 = 10,2$ μg atomów, w ciągu godziny 3,06 μg . Wartość 8,43 dla naczynia 6 została obliczona na podstawie równania dla fotosyntezy.

Wszystkie wyniki przeprowadzonych pomiarów autor wykorzystał do odpowiednich przeliczeń jak i w wyżej przytoczonym przykładzie i przedstawił na wykresach.

Wykres 11 obrazuje zależność pomiędzy procentem zużycia substratu w procesie oddychania a ciśnieniem tlenu przy różnych intensywnościach światła. Wykres 12 obrazuje zależność pomiędzy procentem zużycia substratu w procesie oddychania a intensywnością światła przy różnych ciśnieniach tlenu.

Z powyższych wykresów wynika, iż im większe jest ciśnienie tlenu, tym większy jest procent zużytego substratu w oddychaniu. Zależność ta jest bardzo wyraźna dopóki ciśnienie tlenu jest mniejsze niż wystarczające do nasycenia procesu oddychania przy całkowitym zaciemnieniu. Gdy ciśnienie



Wykres 12. Procent substratu zużytego w oddychaniu *R. rubrum* w zależności od intensywności światła przy różnym ciśnieniu tlenu



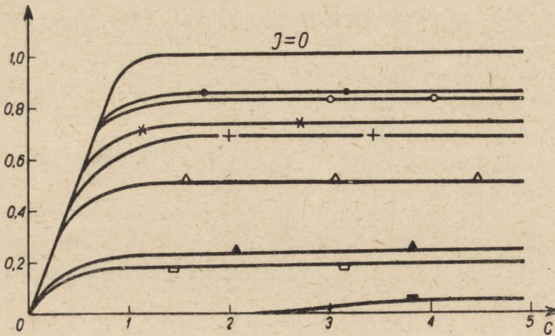
Wykres 13. Zużycie substratu przez *R. rubrum* w zależności od ciśnienia tlenu przy różnej intensywności światła

Objaśnienia jak przy wykresie 11

nie tlenu przekroczy powyższą wartość, procent zużycia substratu w oddychaniu zależy jeszcze od ciśnienia tlenu, ale bardzo nieznacznie.

Zależność tę można zauważyć wyraźniej na wykresie 12, z którego wynika, iż przy intensywności światła pięciokrotnie przewyższającej intensywność wystarczającą do nasycenia fotosyntezy, oddychanie tlenowe w nikłym procencie zachodzi jeszcze przy ciśnieniu tlenu $C = 5$, a przy ciśnieniu $C = 3$ lub 1 już nie zachodzi.

Zależność procentu zużytego substratu w oddychaniu od intensywności światła widoczna jest dobrze na obu omawianych wykresach. Przy intensywności światła wzrastającej od 0 do 1, czyli do wartości wystarczającej do nasycenia fotosyntezy, oddychanie tlenowe spada bardzo gwałtownie, powyżej tej wartości zużycie sub-



Wykres 14. Zużycie substratu w procesie oddychania *R. rubrum* w zależności od ciśnienia tlenu przy różnej intensywności światła

Objaśnienia jak przy wykresie 11

stratu w oddychaniu zmniejsza się powoli, ale nawet przy dużym dostępie tlenu jest stosunkowo nieznaczne. Na wykresie 13 autor przedstawił zależność pomiędzy całkowitym zużyciem substratu a ciśnieniem tlenu przy różnej intensywności światła. Z wykresu tego wynika, iż dopóki ciśnienie nie przekroczy wartości wystarczającej do nasycenia procesu oddychania w ciemności, wzrost ciśnienia tlenu powoduje szybki wzrost zużycia substratu. Jednakże dzieje się tak w warunkach zaciemnienia lub przy słabym dostępie światła. Im światło jest silniejsze, tym zależność pomiędzy całkowitym zużyciem substratu a ciśnieniem tlenu mniejsza. Gdy intensywność światła przekroczy wartość wystarczającą do nasycenia procesu fotosyntezy, zużycie substratu jest od początku większe niż maksymalne do oddychania, przy wzroście ciśnienia tlenu początkowo jeszcze wzrasta, lecz gdy C przekroczy 0,25 utrzymuje się na stałym poziomie lub nawet opada. Po przekroczeniu przez ciśnienie tlenu wartości $C = 1$ zużycie substratu jest prawie całkowicie zależne od światła. Pewne zmniejszenie zużycia substratu przy silnym oświetleniu i dużym ciśnieniu tlenu autor tłumaczy w dyskusji możliwością zatrucia produktami fotooksydacji.

Proszę sobie jednak przypomnieć, iż autor zastrzegł uprzednio, że fotooksydacja nie występuje u *R. rubrum* (gdyby występowała nie można by na podstawie zużycia tlenu ustalić stosunku pomiędzy oddychaniem a fotosyntezą).

Jeżeli nawet fotooksydacja u *R. rubrum* jest minimalna, a przy ciśnieniu tlenu prawie żadna, zagadnienie jej występowania powinno być bliżej opracowane.

Wykresy 14 i 15 przedstawiają wpływ różnej intensywności światła oraz wzrastającego ciśnienia tlenu na zużycie substratu w oddychaniu i fotosyntezie. Wykresy

stratu w oddychaniu zmniejsza się powoli, ale nawet przy dużym dostępie tlenu jest stosunkowo nieznaczne.

Na wykresie 13 autor przedstawił zależność pomiędzy całkowitym zużyciem substratu a ciśnieniem tlenu przy różnej intensywności światła. Z wykresu tego wynika, iż dopóki ciśnienie nie przekroczy wartości wystarczającej do nasycenia procesu oddychania w ciemności, wzrost ciśnienia tlenu powoduje szybki wzrost zużycia substratu. Jednakże dzieje się tak w warunkach zaciemnienia lub przy słabym dostępie światła. Im światło jest silniejsze, tym zależność pomiędzy



Wykres 15. Zużycie substratu w procesie fotosyntezy *R. rubrum* w zależności od ciśnienia tlenu przy różnej intensywności światła

Objaśnienia jak przy wykresie 11

te są jakgdyby rozbiciem wykresu 13 z wykorzystaniem danych określających procent zużycia substratu w oddychaniu i w fotosyntezie w różnych warunkach świetlnych i tlenowych. Wynika z nich ogólny wniosek, podkreślony przez autora w dyskusji, iż badane bakterie chętniej wykorzystują substrat w fotosyntezie niż w oddychaniu tlenowym.



Wykres 16. Asymilacja węgla przez *R. rubrum* w zależności od ciśnienia tlenu przy różnej intensywności światła

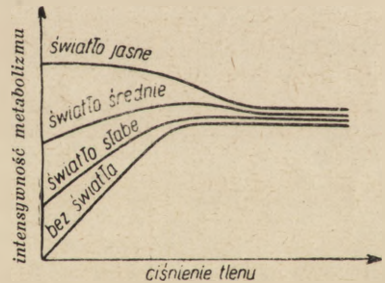
Objaśnienia jak przy wykresie 11

Przy silnym świetle, nawet, gdy ciśnienie tlenu jest duże, zużycie substratu w oddychaniu jest minimalne. Odwrotnie, nawet przy dużym ciśnieniu tlenu, a dość słabym świetle już zachodzi fotosynteza. Można to zrozumieć biorąc pod uwagę wyniki badań Kamena i Vernona, iż fotooksydaza" biorąca udział w fotosyntezie jest bardziej aktywna niż „ciemna oksydaza” biorąca udział w oddychaniu tlenowym.

Wykres 16 różni się od wykresu 13 tym, iż zamiast danych dotyczących zużycia substratu zawiera dane odnośnie całkowitej asymilacji węgla. Ponieważ zużycie substratu w fotosyntezie związane jest z dużo większą asymilacją węgla niż zużycie substratu w oddychaniu, w obecności światła wartości r_c są dużo większe niż wartości r . Na wykresie 16 widać jeszcze silniejszy wpływ fotooksydacji niż na wykresie 13.

Już w 1948 r. A. Manten sformułował hipotezę, iż fotoaktywnej reakcji *Rhodospirillum rubrum* towarzyszy spadek intensywności fotosyntezy. Hipoteza ta została potwierdzona badaniami Thomasa (1950) i Claytona (1953). W następnych swych pracach Clayton rozwinął hipotezę Mantena i podał ją w sposób następujący: ponieważ reakcje taktyczne wykazują przystosowania się, muszą być one związane z pewnym przejściowym zakłóceniem towarzyszącym nagłemu spadkowi intensywności metabolizmu.

Gdyby hipoteza ta była prawdziwa można by było określić specyficzny związek,

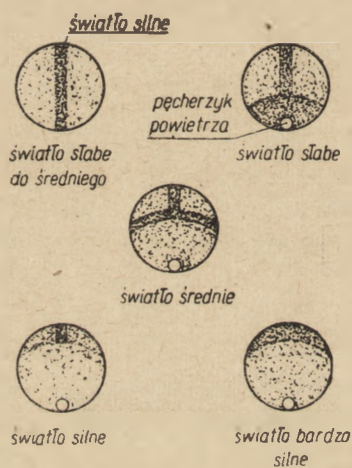


Wykres 17. Uzależnienie intensywności metabolizmu od ciśnienia tlenu przy różnym oświetleniu. Wykres oparty na obserwacjach reakcji taktycznych *R. rubrum*

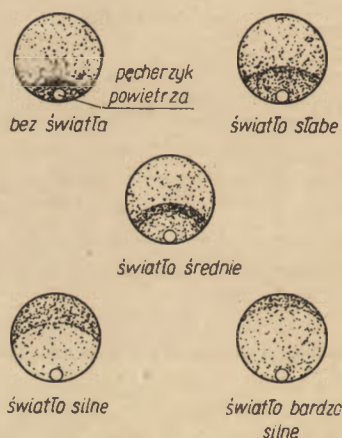
który po przekroczeniu krytycznego stężenia wywołuje reakcje taktyczne. W trzeciej z dyskutowanych prac mimo, iż nie udało się jeszcze autorowi znaleźć wyżej wymienionego związku, jednakże przedstawił on szereg danych przemawiających za słusznością swej hipotezy.

Bakterie, których reakcje taktyczne autor obserwował, umieszczone były w zamkniętej komorze o stałej temperaturze, oświetlone zmieniającym się, lecz kontrolowanym światłem. Światło przed dojściem do bakterii przechodziło przez szkielek pokryte aluminium. Częściowe usunięcie aluminium pozostawiło część szkieleka w kształcie krzyża, nieosłoniętą. Część ta przepuszczała o 20% więcej światła niż pozostałość. Aby móc obserwować jednocześnie fotosyntezę autor zabarwił zawiesinę bakteryjną czerwieńią fenolową, która na skutek wzrostu alkaliczności pożywki zmieniała swe zabarwienie. Przy odpowiednim dobraniu buforów autor mógł odczytać zmiany pH do 0,2. Alkalizowanie pożywki było powodowane uwalnianiem się jonów sodowych z zużywanego substratu.

Na rys. 1 przedstawiona jest reakcja bakterii na tlen wprowadzony w pęcherzyku powietrza w zmiennych warunkach świetlnych. O ile przy całkowitym zaciemnieniu bakterie wykazują bardzo silną pozytywną aerotaksję, w miarę co raz silniejszego



Rys. 1. Aerotaksja *R. rubrum* przy różnej intensywności światła



Rys. 2. Wpływ tlenu na fototaksję *R. rubrum*

go oświetlenia aerotaksja pozytywna przechodzi w negatywną. W świetle pośrednim bakterie ustawiają się w pewnej odległości od pęcherzyka powietrza tworząc jakby łuk, tzw. wstęgę w kształcie spirillum. Przesuwanie się bakterii jest odwracalne, a ich ustawienie charakterystyczne dla danej intensywności światła zachodzi w ciągu kilku sekund.

Na rys. 2 przedstawiona jest reakcja bakterii na światło, oraz wpływ tlenu wprowadzonego w pęcherzyku powietrza na fototaksję. W warunkach beztlenowych fototaksja jest wyłącznie pozytywna. Po wprowadzeniu na końcu oświetlonej silniej linii pęcherzyka powietrza następuje zanik fototaksji, która jest jakgdyby maskowana przez aerotaksję pozytywną lub negatywną zależnie od oświetlenia całkowitego.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji autor określił dla *R. rubrum* trzy cha-

Tablica 5

Charakterystyczne intensywności światła dla *R. rubrum* w obecności różnych substratów

| S u b s t r a t | Ilość przeprow. oznaczeń | I_s^t/I_s^s | I_a/I_s^s |
|------------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| kwas octowy | 13 | 1,3 | 0,7 |
| kwas propionowy | 4 | 4,2 | 0,8 |
| kwas masłowy | 3 | 1,5 | 0,6 |
| kwas walerianowy | 3 | 1,7 | 0,6 |
| kwas kapronowy | 3 | 1,7 | 0,7 |
| kwas jabłkowy | 3 | 1,7 | 0,9 |
| kwas bursztynowy | 3 | 1,9 | 1,0 |
| kwas fumarowy | 3 | 1,8 | 1,0 |
| kwas mlekowy | 3 | 1,3 | 0,7 |

Tablica 6

Wpływ chemikalii na reakcje taktyczne i metabolizm *R. rubrum* w obecności kwasu L — jabłkowego

| | | Fototaksja | Światło i war. beztlenowe | | aero- taksja | Światło i war. tlenowe | |
|----------------------|-----|------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | | asy- milia- cja węgla | utlenia- nie sub- stratu | | asy- milia- cja węgla | utlenia- nie sub- stratu |
| Błękit | 0 | + | + | + | + | + | + |
| metylenowy | 0,2 | — | — | — | + | + | + |
| Mol $\times 10^{-3}$ | 0,5 | — | — | — | ± | ± | + |
| | 1,0 | — | — | — | — | — | + |
| Tetrazol | 0,2 | + | + | + | + | + | + |
| Mol $\times 10^{-3}$ | 0,5 | ± | + | + | + | + | + |
| | 1,0 | — | — | — | — | — | + |
| Dwunitrofenol | 0,2 | + | + | + | + | + | + |
| Mol $\times 10^{-3}$ | 0,5 | + | + | + | + | + | + |
| | 1,0 | ± | ± | ± | + | + | + |

Charakterystyczne intensywności światła: wystarczającą dla nasycenia procesu fotosyntezy — IS_s^s , dla nasycenia fototaksji IS_s^t oraz intensywność przy której następuje przejście aerotaksji pozytywnej w negatywną. Intensywności te wahały się w różnych doświadczeniach do 50%, ale stosunki pomiędzy nimi w obecności tego samego substratu były bardziej stałe (wahania do 20%). Zostały one przedstawione na tablicy 5.

Przed omówieniem tej tablicy chciałabym tylko zauważyć, iż wahania w charakterystycznych intensywnościach światła tłumaczą brak ilościowych określeń przy rys. 1 i 2. Z danych przedstawionych na tablicy 5 widać, iż niezależnie od substratu używanego w doświadczeniu intensywność światła wystarczająca dla nasycenia fototaksji jest większa niż wystarczająca do nasycenia fotosyntezy. Stosunek pomiędzy nimi jest wyjątkowo duży przy kwasie propionowym. Światło wywołujące przejście aerotaksji pozytywnej w negatywną jest na ogół najslabsze.

Na tablicy 6 autor przedstawił wpływ błękitu metylenowego, chlorku trójfenylocetrazolu i dwunitrofenolu na reakcje taktyczne i metabolizm *R. rubrum*. W kolumnach odnoszących się do fototaksji i aerotaksji znak „+” oznacza silnie zaznaczoną reakcję taktyczną, „±” słabe nagromadzenie bakterii, „—” brak reakcji taktycznej. W kolumnach odnoszących się do asymilacji węgla i zużycia substratu znak „+” oznacza intensywność procesu większą niż dziesiąta część maksymalnej intensywności, „±” intensywność pomiędzy zero a dziesiątą częścią maksymalnej, „—” brak asymilacji czy też zużycia substratu. Asymilacja i zużycie substratu podane są na świetle w warunkach beztlenowych i na świetle w warunkach tlenowych. Z wyników przedstawionych na tablicy 6 wynika, iż te same stężenia stosowanych czynników chemicznych, które hamują asymilację węgla, hamują również reakcje taktyczne.

W obszernej dyskusji dołączonej do pracy trzeciej autor omawia szczegółowo uzyskane i przedstawione wyniki. Na podstawie danych znajdujących się w tablicy 6 możnaby było wnioskować, iż reakcje taktyczne *R. rubrum* są wywoływane reakcją biorącą udział w procesach anabolicznych. Należy jednak wziąć pod uwagę, iż w obecności stosowanych związków proces utleniania jest do pewnego stopnia zmieniony. Gdyby na skutek tej postulowanej zmiany było zahamowane przenoszenie energii na procesy anaboliczne, asymilacja byłaby zahamowana jednocześnie z ustaniem reakcji taktycznych niezależnie od tego czy reakcje te byłyby wywołane procesami anabolicznymi czy normalnym utlenianiem. Wobec powyższego trzymając się narazie hipotezy, iż reakcje taktyczne *R. rubrum* związane są ze spadkiem intensywności metabolizmu autor rozważa z tego punktu widzenia ogólne wnioski wyciągnięte z obserwacji reakcji taktycznych. Są one następujące:

- 1) Przy słabym lub średnim oświetleniu występuje fototaksja pozytywna (reakcja na spadek oświetlenia).
- 2) Niezależnie od warunków nigdy nie zachodzi fototaksja negatywna (reakcja na wzrost oświetlenia).
- 3) Gdy ciśnienie tlenu przekroczy wartość krytyczną następuje zanik fototaksji.
- 4) Przy całkowitym zaciemnieniu i w słabym świetle występuje pozytywna aerotaksja (reakcja na spadek ciśnienia tlenu).
- 5) Przy średnim oświetleniu bakterie tworzą wstęgę w kształcie „spirillum” (reakcja na wzrost lub spadek ciśnienia tlenu).
- 6) Przy silnym świetle występuje aerotaksja negatywna (reakcja na wzrost ciśnienia tlenu).

Aby wyżej przytoczona hipoteza była słuszna pierwsze trzy obserwacje wymagają spadku intensywności metabolizmu (t. zn. tego procesu metabolicznego, który jest związany z występowaniem reakcji taktycznych) wraz ze zmniejszającą się intensywnością światła we wszystkich warunkach. Spadek ten musiałby być mały lub żaden przy ciśnieniu tlenu powyżej jego krytycznej koncentracji. Zgodnie z obserwacją czwartą w ciemności i w słabym świetle intensywność metabolizmu musiałaby spadać wraz ze spadkiem ciśnienia tlenu, a zgodnie z obserwacją szóstą w silnym świetle intensywność ta spadałaby wraz ze wzrostem ciśnienia tlenu. Według obserwacji

piątej przy średnim oświetleniu intensywność metabolizmu powinna być maksymalna, gdy ciśnienie tlenu ma wartości pośrednie. Zarówno wzrost jak i spadek ciśnienia tlenu powinien w tych warunkach powodować spadek intensywności metabolizmu.

Wymienione zależności pomiędzy intensywnością metabolizmu a ciśnieniem tlenu przy różnym oświetleniu zostały w sposób schematyczny przedstawione na wykresie 17. Porównując wykresy 13 i 16 z wykresem 17 autor stwierdza, iż przebieg krzywych przedstawionych na wykresie 16 jest podobny do przebiegu krzywych przedstawionych na wykresie 17 z czego wynika, iż zamiast mówić o metabolizmie ogólnie można reakcje taktyczne uzależnić od asymilacji węgla.

Pozostaje do wyjaśnienia jedynie brak zbieżności krzywych na wykresie 16 przy większych ciśnieniach tlenu. Powyższą trudność autor tłumaczy zahamowaniem reakcji taktycznych na skutek procesów fotooksydacji, które nie wywierają wpływu na metabolizm. Jednakże, gdy przypomnimy sobie dyskusję na temat przebiegu krzywych na wykresie 16 przeprowadzoną przez autora w poprzedniej pracy, pewne ich pochYLENIE przy wyższych ciśnieniach tlenu autor tłumaczył właśnie fotooksydacją. Wynikałoby z tego wbrew ostatniemu twierdzeniu autora, że fotooksydacja działa hamująco : na reakcje taktyczne i na asymilację, jednakże na asymilację słabiej. Zgodnie z wymienioną już uwagą na temat zagadnienia fotooksydacji, po raz drugi nasuwa się konieczność bliższego jej opracowania.

W dalszym ciągu dyskusji autor rozważa, który związek biorący udział w metabolizmie mógłby wywoływać bezpośrednio reakcje taktyczne. Związkiem tym mógłby być kwas tiooktanowy, względnie decydujący wpływ miałby stosunek jonów żelazowych do żelazawych w cytochromie lub innym podobnym związku. Była już o tym mowa we wstępie do niniejszej dyskusji. Jednakże dopiero następne prace wyświetlą ten interesujący problem.

LITERATURA

1. R. K. C l a y t o n: Photosynthesis and Respiration in *Rhodospirillum rubrum* Archiv für Mikrobiologie, 22, 180 — 194, (1955)
2. R. K. C l a y t o n: Competition between light and dark Metabolism in *Rhodospirillum rubrum*, Archiv für Mikrobiologie, 22, 195 — 203 (1955)
3. R. K. C l a y t o n: Tactic Responses and Metabolic Activities in *Rhodospirillum rubrum*, Archiv für Mikrobiologie, 22, 204 — 213 (1955)

KOMUNIKATY POLSKIEGO TOWARZYSTWA FIZJOLOGICZNEGO

Sprawozdanie z Konferencji Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego na temat fizjologii zatoki szyjnej i histaminy*

(Lublin, dnia 27 — 28. X 1955 r.)

Otwarcie Konferencji poprzedziło słowo wstępne przewodniczącego Oddziału lubelskiego PTF kol. W. Hołobuta, oraz krótkie zagajenie prezesa Zarządu Głównego PTF kol. T. Baranowskiego.

Pierwszy dzień obrad prowadzonych pod przewodnictwem prof. Fr. Czubałskiego poświęcony był fizjologii zatoki szyjnej z referatem głównym Kol. W. Hołobuta, po którym wygłoszone zostały cztery pokrewne referaty problematycznie.

W. Hołobut: Fizjologia zatoki szyjnej. We wstępnej części referatu autor podaje historię poznawania czynności zatoki szyjnej, podkreślając znaczenie dawnych prac Czermaka, Heringa oraz J. P. i C. Heymansów. Następnie przechodzi autor do bardziej szczegółowego omówienia na tle zebranej współczesnej literatury obcej, oraz danych doświadczalnych własnych i swych współpracowników roli chemorepcji kłębka (glomus caroticum), oraz mechano-repcji ściany zatoki szyjnej.

Omawiając zagadnienia chemorepcji kłębka autor przytacza klasyczne doświadczenia C. Heymansa i współpracowników, oraz u. v. Eulera i towarzyszy wyjaśniające role hipoksemii i hiperkapnii jako adekwatnych bodźców dla odruchowego mechanizmu regulującego na tej drodze oddychanie. Prof. Hołobut podał ocenie wzajemny stosunek odruchowej chemoreceptywnej komponenty regulującej oddychanie do komponenty regulującej je na tle automatycznej czynności ośrodka oddechowego. Następnie autor omawia efekt szeregu środków farmakologicznych działających na narząd krążenia i oddechowy poprzez chemoreceptory kłębka szyjnego (lobelina, acetylocholina, nikotyna, cjaniki, środki analeptyczne). Nieco dłużej autor zatrzymuje się nad wykrytym przez siebie działaniem histaminy na kłębek szyjny, dokonując analizy mechanizmu tego działania. Zdaniem autora histamina obniża ciśnienie tętnicze krwi, oraz hamuje ruchy oddechowe dodatkowo jeszcze przez bezpośredni wpływ na chemoreceptory, o czym świadczą doświadczenia z perfuzją izolowanej zatoki szyjnej, oraz wzmożona łimpulsacja z nerwów Heringa, obserwowana w czasie zapaści histaminowej. Mechanizm powyższego odruchowego działania histaminy polega na czynnym rozszerzeniu tętnic obwodowych, o czym świadczą pomiary ruchu krwi dokonane metodą Cybulskiego-Klissieckiego. Przy końcu tej części referatu omówione zostają najważniejsze teorie, dotyczące istoty pobudzenia chemoreceptorów.

Druga część referatu dotyczy tu odruchowej czynności wywołanej mechanorepcją zatoki szyjnej. W części tej uwzględniono fakty uzyskane przez prof. Ho-

*) Na podstawie uchwały Sekretariatu Naukowego Wydziału II PAN „Postępy Biochemii“ z numerem bieżącym przejmują druk przeglądowych i sprawozdawczych materiałów Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (Redakcja „Postępów Biochemii“).

ł o b u t a i W. S t ą ż k ę, dotyczące poznania hemodynamicznej strony zjawisk zachodzących przy odruchach depresyjnych i presyjnych zatoki szyjnej. Pomiarami szybkości ruchu krwi w tętnicach, oraz pomiarami objętości wyrzutowej serca stwierdzono osłabienie czynności serca i rozszerzenie naczyń obwodowych w odruchach depresyjnych zatoki, zaś przeciwne efekty w odruchach presyjnych, jak np. w odruchu okluzji obu tętnic szyjnych wspólnych. Końcowa część referatu zawiera omówienie właściwego, adekwatnego bodźca dla mechanoreceptorów, jakim wydaje się być nie sam wzrost ciśnienia w zatoce, lecz rozciąganie i opór na to rozciąganie kurczliwych i elastycznych elementów ścian zatoki.

W. S t ą ż k a (Zakład Fizjologii Akad. Med. Lublin) mówił o „Pobudliwości odruchowej zatoki szyjnej przy różnych ciśnieniach”. W 15 doświadczeniach, przeprowadzonych na psach w narkozie ewipanowej, podnoszono ciśnienie wewnątrz izolowanej i unerwionej zatoki szyjnej przy pomocy systemu perfuzyjnego od zera do różnych wysokości. Obserwowano zawsze depresję ciśnienia tętniczego. Wartości progowe ciśnienia wewnątrzżatokowego wynosiły od 74—90 mm Hg. Czulość odruchu depresyjnego była największa w zakresach ciśnienia normalnego oraz dodatkowo jeszcze w zakresie od 200—240 mm Hg. Krzywa wykresu jest w tych miejscach najbardziej stroma.

Depresyjny odruch zatoki szyjnej, zabezpieczający stałość ciśnienia krwi, ma dwustopniowy charakter, jaki umożliwia z jednej strony czułe niwelowanie zmian ciśnienia, zachodzących w obrębie wartości fizjologicznych, jak również z drugiej strony nadmiernie wysokich. W większości wypadków depresje ciśnienia zachodziły bez zwolnienia akcji serca.

Co się tyczy zależności reakcji oddechowych od stopnia podrażnienia baroreceptorów, to wartość progowa ciśnienia wewnątrzżatokowego dla zmian oddychania wynosiła od 90—100 mm Hg. Jest zatem wyższą od wartości progowej dla efektu depresyjnego w narządzie krążenia. Upośledzenie oddychania uzewnętrzniało się początkowo tylko zmniejszeniem amplitudy przy niskich i średnich ciśnieniach, zaś przy ciśnieniach powyżej 200 mm Hg występowało całkowite zahamowanie ruchów oddechowych.

W dyskusji nad referatem Kol. H a n o zwrócił uwagę, że jego zdaniem nie ma dotychczas możliwości metodycznych odróżnienia reakcji mechano- od chemoreceptyjnych. Kol. K a u l b e r s z, polemizując z Kol. H a n o, przytacza liczne dowody z piśmiennictwa, świadczące o istnieniu wyraźnej różnicy między chemo-, a mechanorecepcją. Odnośnie referatu W. H o ł o b u t a wyraża przypuszczenie, że rozstrzygnięcie zagadnienia wpływu histaminy na zatokę szyjną będzie zależało od dalszych badań prądów czynnościowych w poszczególnych włóknach nerwu Heringa.

Kol. G u t o w s k i podkreśla znaczenie stanu czynnościowego ośrodków naczynioruchowych w kształtowaniu się reakcji zatoki szyjnej, przy czym zwraca uwagę na staranność technicznego wykonania doświadczeń pracy H o ł o b u t a i S t ą ż k i.

Kol. S z a b u n i e w i c z polemizuje zarówno z wypowiedziami Kol. H a n o, jak również omawia krytycznie pracę S t ą ż k i, podnosząc znaczenie roli elastyczności w reakcjach uzyskanych przy wzroście ciśnienia w zatoce szyjnej.

Kol. W a ł a w s k i porusza zagadnienie roli elementów kurczliwych i sprężystych zatoki szyjnej w reakcjach przez nią wywoływanych. Obserwowany w doświadczeniach Kol. H o ł o b u t a wzrost amplitudy serca, jaki występuje przy odruchu okluzji uważa Kol. W a ł a w s k i za wyraz ogólnej adaptacji, krążenia, gdyż podobne zmiany akcji serca zachodzą, gdy przez zaciskanie dużych żył ograniczony jest

dopływ krwi do serca. Ponadto Kol. W a l a w s k i podnosi fakt, stwierdzenia dużej czułości zatoki szyjnej na wysokie ciśnienia w doświadczeniach S t a ż k i, czego jego zdaniem w warunkach klinicznych u ludzi się nie spozstrzega.

Kol. H o ł o b u t w odpowiedzi przyznaje słuszność i znaczenie uwag dysku-tantów, udziela wyjaśnień odnośnie roli sprężystości w reakcjach zatoki szyjnej oraz podkreśla mechanizm odruchowy, jaki zachodzi w zjawisku wzrostu amplitudy serca przy zaciśnięciu tętnic dogłowych.

Kol. S t a ż k a odpowiadając podaje uzupełniające dane odnośnie ukrwienia kłębka szyjnego, oraz znaczenie pulsujących bodźców na zatokę, jako najbardziej czułych.

T. J a c y n a - O n y s z k i e w i c z i W. H o ł o b u t (I Klinika Chirurgiczna Akad. Med. i Z. Fizjologii Akad. Med. Lublin) przedstawiają pracę p. t. Z m i a n y pobudliwości odruchowej zatoki szyjnej w operacjach chirurgicznych.

Autorzy badali wpływ mechanizmów odruchowych, wyzwalanych z zatoki szyjnej, w zakresie krążenia i oddychania w czasie zabiegów operacyjnych, wykonywanych w okolicy rozwidlenia tętnicy szyjnej wspólnej, jak wole, torbiel skrzelopochodna itp.

Ponadto z drugiej grupy chorych badano pobudliwość zatoki szyjnej na bodziec mechaniczny w czasie różnych typowych operacji chirurgicznych jamy brzusznej i kończyn.

W pierwszej grupie chorych u znacznej większości tj. w 15-tu przypadkach na 22, stwierdzono, że delikatne drażnienie mechaniczne ścian zatoki szyjnej (pociąganie pincetą, lub ucisk palcem) wywołuje nieznaczny spadek ciśnienia i zwolnienie tętna, a wzrasta ilość oddechów.

Po blokadzie zatoki jedno-procentową nowokainą wzrastają wyraźnie wskaźniki ciśnienia krwi, tętna i oddechów, zmiany te utrzymują się około 30 min. Powtórne drażnienie mechaniczne po blokadzie zatoki nie wywołuje już wyraźniejszych efektów depresyjnych.

Autorzy uważają, że zmiany w zakresie krążenia i oddychania pod wpływem bodźca mechanicznego są wyrazem wypadkowej obu składowych odruchu zatoki szyjnej, mechano- i chemorecepcji. W zakresie oddychania przeważa wyraźnie składowa chemorecepcji, w zakresie krążenia przeważa nieznacznie składowa barorecepcji, ponieważ efekty depresyjne są tłumione przez zamaskowane efekty presyjne napędu chemoreceptorowego. Depresyjna rola odruchu baroreceptownego ujawnia się w całej pełni dopiero po wyłączeniu jego drogą nowokainowej blokady zatoki: wskaźniki ciśnienia, tętna i oddechów wydatnie wzrastają. Nietypowy przebieg reakcji odruchowej zarówno na bodziec mechaniczny, jak i blokadę nowokainową u nielicznych chorych tej grupy, autorzy tłumaczą działaniem różnych czynników, mogących wpływać na krążenie i oddychanie jak: wpływy emocjonalne, zmieniona wrażliwość na środek znieczulający, wpływ premedykacji, czynnik hormonalny i inne.

U drugiej grupy chorych w czasie operacji wykonywanych w miejscu odległym od zatoki (przepuklina, żyłaki itp.) badano zachowanie się krążenia i oddychania po zastosowaniu bodźca mechanicznego, ucisk palcem, nieodstosowanej zatoki szyjnej. Spośród 15 chorych wyraźny efekt depresyjny wystąpił u 7-miu chorych, u 4-ch efekt ten był znikomy, a u pozostałych 4-ch całkowicie przeciwny. Większą rozbieżność wyników tej grupy autorzy tłumaczą trudnością kontroli bodźca mechanicznego pod względem jego wybiórczej dokładności w używanym w klinice sposobie badania. Autorzy w krótkim rysie dają przegląd dotychczasowych prób wykorzystania pobu-

dliwości odruchowej zatoki szyjnej w celach leczniczych, przede wszystkim we wstrząsie i dusznicy bolesnej, dając krytyczną ich ocenę.

Na podstawie swoich badań klinicznych autorzy uważają, że do prób leczniczych wywołania efektu depresyjnego drogą mechanicznego ucisku palcem należy odnieść się z dużą rezerwą. Natomiast blokadę nowokainową zatoki szyjnej w czasie operacji wykonywanych w jej okolicy (okolica wstrząsiorodna) uważają za postępowanie celowe i godne polecenia, jako sposób zabezpieczający przed wstąpieniem wstrząsu. W dyskusji Kol. Czarnocki zwraca uwagę na to, że receptory zatoki szyjnej są wrażliwe na działanie farmakologicznych środków znieczulających. Silniejsze działanie znieczulające od nowokainy posiada antistina która okazała się, jak wykazały badania Czarnockiego, Kiersza i Miętkińskiego, skutecznym środkiem zwalczającym wstrząs barwikowy. Ogólna hipotermia ustroju we własnych doświadczeniach na psach obniżała wrażliwość receptorów zatoki szyjnej w sposób widoczny dopiero po obniżeniu temperatury o $6-7^{\circ}$ a całkowite zniesienie pobudliwości zachodziło po obniżeniu o $9-10^{\circ}$.

J. Suchanek (Z. Fizjologii Ak. Med. Kraków) mówił o zmianach w obrazie morfologicznym krwi po obustronnym odnerwieniu zatok szyjnych (*sinus caroticus*).

Autor odnerwiał zatoki szyjne u psów sposobem Czernikowskiego, oraz dodatkowo smarował ściany odstąpiętych tętnic w okolicy zatoki 10 proc. roztworem fenolu.

Wpływ obustronnego odnerwienia zatok szyjnych na obraz morfologiczny krwi wyrażał się początkowo obniżeniem ilości krwinek czerwonych i hemoglobiny o 20 — 28 proc. wartości wyjściowych, następnie raptownym ich wzrostem, dochodzącym w drugiej połowie miesiąca do 20 proc. poziomu przedoperacyjnego. Ta zwiększona ilość czerwonych krwinek i hemoglobiny utrzymywała się przez okres 3 miesięcy. Równocześnie obserwowano spadek ilości retikulocytów w pierwszym tygodniu po odnerwieniu obu zatok, a następnie gwałtowny wzrost ich ilości pomiędzy 8 — 11 dniem. W drugiej połowie miesiąca zawartość retikulocytów powracała do normy. Wyniki zaobserwowane nie mają charakteru zmian, związanych z przebiegiem choroby pooperacyjnej.

W dyskusji Kol. Czubalski stwierdza, że praca jest ciekawa, jednak jego zdaniem wymaga pełniejszej analizy mechanizmu działania.

Kol. Walański wyraża wątpliwość, czy zmiany we krwi obserwowane przez autora są wynikiem odnerwienia zatoki szyjnej, która jest tylko drobnym fragmentem w mechanizmach regulacyjnych czynności szpiku kostnego.

Kol. Maśliński podkreśla metodyczną dokładność przeprowadzonych przez autora badań, niemniej jednak uważa, że badania powinny być uzupełnione przy pomocy hematokrytu gdyż nie można wykluczyć ewentualnego stanu zagęszczenia krwi na skutek długotrwałych zmian powstrząsowych.

Kol. Szabuniewicz uważa, że fakty uzyskane przez autora należy uznać za realne.

Kol. Kaulbersz wyjaśnia mechanizm obserwowanej erytrocytozy na drodze hipoksemii wywołanej odnerwieniem zatok szyjnych.

Kol. Suchanek wyjaśnia, że referat jego ma charakter doniesienia tymczasowego, oraz, że badania będą w dalszym ciągu prowadzone.

J. Rybacki (Z. Fizjologii Ak. Med. Lublin) przedstawił pracę p. t. „Wpływ odnerwienia zatoki szyjnej na obraz zapaści pohistaminowej”.

W 27 doświadczeniach, przeprowadzonych na psach, podawano histaminę w dawkach 0,3 — 1 mg dożylnie, lub do obu tętnic dogłowych jednocześnie, w warunkach zachowanego, względnie zniszczonego unerwienia zatok szyjnych. W przypadkach iniekcji histaminy dożylnie obserwowano w warunkach odnerwionych zatok różnice w zachowaniu się zmian ciśnienia tętniczego w porównaniu z podobnymi zmianami zachodzącymi w przypadku podania takiej samej dawki histaminy przy zatokach zachowanych. Polegały one na powolniejszym o 1 — 2 minut i późniejszym powrocie ciśnienia tętniczego do poziomu wyjściowego przy zatokach odnerwionych. Spadki ciśnienia pohistaminowe były w tej serii doświadczeń zawsze prawie jednakowej głębokości i zachodziły po jednakowym okresie latencji niezależnie od zachowania lub zniszczenia unerwienia zatok szyjnych. W pewnej ilości doświadczeń podawano histaminę jednocześnie do obu tętnic dogłowych w warunkach zatok żyjących i odnerwionych. W tych razach po odnerwieniu występował zawsze dłuższy o kilka sekund okres latencji pohistaminowego spadku ciśnienia tętniczego, przy czym spadek ten osiągnął swe maksimum o kilkadziesiąt sekund później, niż w przypadku iniekcji takiej samej dawki histaminy przy zatokach żyjących. Podobnie, jak przy dożylnym wprowadzaniu histaminy przebieg krzywej ciśnienia tętniczego miał charakter mniej stromy przy zatokach odnerwionych. Ciśnienie powracało wtedy do poziomu wyjściowego o średnio 2 min. później, niż przy zatokach zachowanych. Doświadczenia kontrolne, w których podawano histaminę w takich samych dawkach dożylnie, lub do obu tętnic dogłowych dwukrotnie, lecz bez odnerwiania zatok, wykazały brak jakichkolwiek różnic w obrazie przebiegu zapaści krążenia. Wyniki doświadczeń wskazują na rolę unerwienia zatoki szyjnej na tle ogólnego obrazu zapaści pohistaminowej. Po odnerwieniu zatok szyjnych obserwowano zawsze mniej sprawne, wolniejsze wyprowadzenie narządu krążenia z wywołanej zapaści. Należy przypuszczać, że w warunkach normalnych dużą rolę odgrywają tu włókna baroreceptorowe, które były niszczone razem z włóknami chemoreceptorowymi.

Prócz referatów po południu pierwszego dnia Konferencji odbyły się w Zakładzie Fizjologii Akademii Medycznej pokazy:

1) Pokaz metody mierzenia szybkości w tętnicy udowej przy pomocy fotochemotachometru Cybulskiego-Klisieckiego w doświadczeniu na psie uśpionym. 2) Pokaz metody badania odruchu oko-sercowego z równoczesnym zapisem reakcji naczynioruchowych przy pomocy pletyzmografii palcowej, oraz zmian oddechowych przy pomocy pneumografii (na ludziach). 3) Pokaz metody chromaksymetrycznej-ruchowej w badaniu na człowieku. 4) Pokaz metody tenciograficznej przy pomocy tenciografu Boulite na człowieku. 5) Pokaz metody badania odruchów warunkowych metodą Iwanow-Smołeńskiego z rejestracją graficzną.

Drugi dzień obrad poświęcony problemowi histaminy otworzył referat programowy Kol. J. Billewicz-Stankiewicz a. Obradom przewodniczył prof. Kaulbersz.

J. Billewicz-Stankiewicz przedstawił zagadnienie histaminy w fizjologii prawidłowej i patologicznej.

Autor w swym referacie zajął się trzema problemami:

1) histaminą jako mediatorem, przynoszącym impulsy nerwowe,
2) histaminą jako podniecią powstającą w czasie działania czynników agresji na powierzchnię skóry, a działającą na zakończenie czuciowe, oraz 3) mechanizmem pohistaminowego spadku ciśnienia krwi.

Z pierwszym problemem wiązały się prace, dotyczące rozmieszczenia histaminy

w układzie nerwowym i wykazujące, że układ nerwowy zawiera mniej więcej takie same ilości histaminy, jak i inne tkanki. Dalej autor dokonał przeglądu prac, które wykazały, że w czasie drażnienia antidromowego korzonków tylnych rdzenia powstaje substancja, będąca pośrednikiem między zakończeniami nerwowymi, a ścianą naczyń krwionośnych. W wyniku działania tej substancji zachodzi rozszerzenie się naczyń. Substancja ta posiada większość właściwości biologicznych i chemicznych histaminy, równocześnie wykazuje jednak pewne cechy odrębne, co nasuwa przypuszczenie, że nie jest z histaminą identyczna.

Problem drugi, jak wynika z prac omówionych w referacie można uznać za rozwiązany. Zarówno dawniejsze prace Lewisa i współpracowników, oparte na metodzie analogii, jak też nowsze wykazane przy pomocy środków przeciwhistaminowych (Parrót i inni) wykazały, że w wyniku zadziałania na skórę podnieć mechanicznych, termicznych, chemicznych i innych, powstaje w skórze histamina, wywołująca na drodze odruchu osiowego rozszerzenie naczyń.

Problem trzeci — pohistaminowy spadek ciśnienia krwi należy rozpatrywać jako rezultat oddziaływania histaminy na układ krążenia jako całości, przy czym, pożądanym byłoby ostateczne stwierdzenie, jaka komponenta w działaniu histaminy jest ważniejsza, sercowa, czy naczyniowa i jaka jest ich wzajemna zależność.

R. Kordecki i A. Trzebski — przedstawili pracę p. t. Działanie histaminy wprowadzonej metodą cewnikowania serca i aorty. (Z. Fizjologii Ak. Med. Warszawa).

15 psom wagi 8 — 16 kg wprowadzono w narkozie pentotalowej histaminę (5 μ g — 400 μ g) do v. femoralis oraz przy pomocy elastycznych cewników na przemian do aorty, do w. jugularis i do prawej komory serca oraz do lewej komory serca. Spadek ciśnienia po podaniu histaminy do v. femoralis występował po 12—19 sek., do prawej komory — po 8 — 12 sek., do aorty (poniżej łuku) — po 3 — 4 sek. Po wprowadzeniu histaminy cewnikiem do lewej komory serca w większości wypadków ani głębokości ani okres utajony spadku ciśnienia nie różniły się od efektu uzyskanego po podaniu tej samej dawki histaminy do aorty. W niektórych doświadczeniach obserwowano jednak zmiany świadczące o krótkotrwałym zatrzymaniu serca w rozkurczu. Zmiany te były nieregularne występowały tylko przy dużych dawkach. Aby wyjaśnić ten punkt wykonano serię doświadczeń wprowadzając histaminę bezpośrednio do lewej tętnicy wieńcowej przy pomocy metalowego zgłębnika wprowadzanego poprzez art. subclavia po otwarciu klatki piersiowej przy sztucznym oddechu. Dopiero w tych warunkach udawało się stwierdzić regularne zmiany na krzywej ciśnienia przemawiającego za nagłym krótkotrwałym porażeniem czynności lewej komory. Krzywa ciśnienia uzyskana w tych warunkach różni się jednak znacznie swym wyglądem od krzywej uzyskanej przy zwykłej drodze podawania histaminy.

Stwierdzono, że charakter krzywej pohistaminowej zmienia się z jednofazowej na dwufazową (dwie fazy spadku) o ile wylot cewnika w aorcie znajduje się doogonowo od ujścia art. coeliaca.

A. Trzebski mówił o ośrodkowym, presyjnym działaniu histaminy. (Z. Fizjologii Ak. Med. Warszawa).

W badaniach Taylora i Page (1951) i ostatnio Kovacha (1955) spostrzegano przy sposobności analizy ośrodkowego działania adrenaliny i noradrenaliny, wzrost ciśnienia krwi w naczyniach tułowia psa po podaniu histaminy do naczyń głowy, izolowanej pod względem humoralnym i zaopatrywanej w krew przez psa — donatora. W mniejszych doświadczeniach autora wykazano, że podobny efekt otrzymać można bez konieczności izolacji krążeniowej głowy. Stwierdzono także, że

wskutek działania ośrodkowego histaminy zmniejszeniu i skróceniu ulegają efekty hypotencyjne tej aminy.

Doświadczenia w liczbie 46, wykonano na 10 psach wagi 8—15 kg. Histaminę w dawce 20 — 200 μ g wprowadzano w 0,3 — 0,5 ml roztworu fizjologicznego w kierunku domózgowym do tętnicy szyjnej wewnętrznej, lub do tętnicy szyjnej wspólnej po uprzednim odnerwieniu pól recepcyjnych okolicy zatoki szyjnej (sposobem H e y m a n s a). Otrzymywano z reguły dwufazową odpowiedź ciśnieniową hipertenzyjno-hypotencyjną. Faza hypotencyjna zależna od obwodowego działania histaminy wynosiła od 74% do 89%, a czas jej trwania od 62% do 81% efektu uzyskanego po podaniu tej samej dawki do v. femoralis. W 7 doświadczeniach wystąpił jedynie efekt presyjny. Stałe zmiany opisanego typu stwierdzano u psów nienarkotyzowanych, unieruchomionych przy pomocy d-tubokuraryny. Faza presyjna dochodziła wówczas do 5 mm Hg. U psów znajdujących się pod narkozą barbiturową i przy nieodnerwionej okolicy zatoki szyjnej efekt hipertenzyjny występował słabiej lub nie pojawiał się zupełnie (13 doświadczeń). Benadryl w dawce 3—5 mg/kg wagi znosi ośrodkowe presyjne działanie histaminy. Podobnie działa dihydroergotamina (1/4 mg/kg wagi), przedłużając prócz tego działanie hypotencyjne histaminy.

Wysunięto przypuszczenie, że presyjne działanie histaminy stanowi wyraz ośrodkowego mechanizmu kompensacyjnego czynnego w przebiegu tzw. wstrząsu histaminowego.

T. Garbuliński i P. Strzelczyk (Z. Fizjologii Ak. Med. Wrocław) przedstawili pracę p. t. Dożylnie i dotętnicze wlewanie krwi we wstrząsie histaminowym.

Praca miała dać odpowiedź na pytanie, czy istnieje „obwodowe skrwawienie się” w zapaści pohistaminowej, oraz rzucić światło na pierwotną przyczynę spadku ciśnienia krwi po histaminie. We wstępnym założeniu przyjęto, że jeżeli będzie się w zapaści pohistaminowej, wystarczająco szybko uzupełniać łożysko naczyń wlewaniem krwi dożylnie lub dotętniczo, to spadek ciśnienia krwi rozwijający się normalnie z przyczyny naczyńowej, w tym wypadku nie powinien mieć miejsca. Dotętnicze wlewanie krwi dotlenowej miało ponadto wykazać, o ile niedotlenienie mięśnia sercowego wpływa na przebieg zapaści. Sztuczne utrzymywanie poziomu ciśnienia tętniczego na wys. 90 — 100 mm Φ Hg przez uzupełnienie opróżniających się tętnic krwią utlenowaną, zabezpieczało serce przed głodem tlenowym.

Doświadczenie z dotętnicznym wlewaniem krwi wykazało, że mimo posiadania wystarczających rezerw krwi utlenowanej, serce słabło natychmiast po wprowadzeniu histaminy do krwiobiegu, co wydaje się wskazywać na to, że niedomoga serca powstająca po dawce histaminy, nie jest uzależniona od braku tlenu w naczyniach wieńcowych serca. Także uzupełnianie krwią łożyska żylnego nie ma wpływu na przebieg spadku ciśnienia krwi po histaminie. Nie może być zatem mowy o wewnętrznym skrwawianiu się do naczyń własnych organizmu, jako o pierwotnej przyczynie wstrząsu histaminowego. W ciągu półtorej minuty (w okresie zapaści) wprowadzono dożylnie 400 mm krwi psu o wadze 5 kg. Wstrząsorodne działanie histaminy w zakresie układu krążenia skutecznie atakuje przede wszystkim serce i ono jedynie decyduje tu o pierwotnym spadku ciśnienia krwi. Analogiczne wyniki z pomocą tej metody winno się otrzymać we wstrząsie barwnikowym i innych chemicznych.

W. Wcisło (Z. Fizjologii Ak. Med. Kraków) — H e m o d y n a m i c z n e r e a k c j e w e w s t r z ą s i e h i s t a m i n o w y m.

W konsekwencji rozwoju ergometrii komór sercowych przystąpiono do zbadania dynamiki komór podczas histaminowego wstrząsu. U kilkudziesięciu morfiną zamro-

czonych i zwykle nieuszkodzonych psów wprowadzając dożylnie lub do lewej komory chlorowoderek histaminy (0,03 — 0,1 mg/kg), zapisując jednocześnie na kymografii: ciśnienie w tętnicach obwodowych i płucnej, przedsionku prawym i w żyłach obwodowych, objętość kończyn i ruchy oddechowe, a w wypadku otwarcia klatki piersiowej także wyrzut komory i ciśnienie w lewym przedsionku. Dla wnikliwszego poznania mechanizmu rozwoju pohistaminowych zaburzeń krążeniowych porównano je z hemodynamicznymi reakcjami ustroju na niektóre czynniki doraźnie obciążające krążenie, jak szybkie zmiany objętości krwi krążącej, hamowanie akcji serca drażnieniem nerwu błędnego oraz częściowe czopowanie łożyska naczyniowego, powodowane rozdymaniem baloników tkwiących na cewnikach w żyłę czczej dolnej, tętnicy płucnej, aortie piersiowej lub w komorach.

Z dotychczas przeprowadzonych obserwacji jasno wynika, że inny jest mechanizm działania histaminy, a inny czynników nerwowych, czy mechanicznych. Typową reakcją hemodynamiczną, występującą do 3 sekund po dożylowym, a nieco później, po dożylnym podaniu histaminy, jest nagły spadek ciśnienia w tętnicach obwodowych, przejściowy wzrost ciśnienia w prawym sercu i tętnicy płucnej. Pletyzmogram kończyny nie zmienia się, względnie wykazuje zastój krwi lub obkurczenie naczyń. Wspólny wyrzut komorowy z początku działania histaminy przelotnie wzrasta wskutek kilku większych prawokomorowych rzutów. Szybko potem wyrzuty sercowe stają się coraz mniejsze, przepełnione krwią komory wiotczą i rozszerzają się, a skurcze stają się coraz rzadsze i powolniejsze. Ciśnienie w przedsionkach nieco wzrasta lub pozostaje bez zmian, a to chyba głównie z powodu rozciągliwości ich ścian i okolicznych żył. Malejący wyrzut komorowy przy przepełnionych krwią przedsionkach jest jaskrawym dowodem niewydolności pompy sercowej. Ergometryczne pomiary komór wykazują więc niewątpliwy udział mięśnia sercowego, zwłaszcza lewej komory, w rozwoju pohistaminowych reakcji hemodynamicznych.

Kol. M i ę t k i e w s k i w dyskusji zwraca uwagę na znaczenie interoreceptorów w mechanizmie działania histaminy na krążenie. Z doświadczeń jego wspólnych z N o w a c z k i e w i c z e m i N o w a k o w s k i m wynika, że istnieje niewątpliwa wybiórczość interoreceptorów na różne ciała chemiczne, między innymi fakt, że oziębienie do 25° nie znosi hypotensyjnego działania histaminy, co świadczyło by o tym, że niektóre czynniki wstrząsotorodne niekoniecznie działają poprzez zmiany w metabolizmie zakończeń nerwowych.

Kol. J. H u r y n o w i c z mówi o pracach dotyczących wpływu histaminy i substancji przeciwhistaminowych na krzywą elektroencefalograficzną. Okazuje się, że histamina nie zmienia potencjału elektrycznego kory, natomiast środki przeciwhistaminowe zmieniają kształt krzywej w przebiegu padaczki u człowieka i doświadczalnej padaczki u zwierząt.

Kol. J. N a r ę b s k i w badaniach własnych również nie stwierdził wpływu histaminy na potencjał elektryczny mózgu, obserwował natomiast zmiany reobazy i chromaksji błędnikowej.

Kol. J. W a l a w s k i nawiązując do referatu programowego kol. B i l l e w i c z a - S t a n k i e w i c z a podaje, że włókna histaminergiczne działają przede wszystkim wówczas, gdy zachodzą zjawiska tzw. regulacji patologicznej. Dalej dodaje, że ze względu na krótkotrwałość hypotensyjnego działania histaminy określenie „zapaść histaminowa” jest bardziej właściwa niż „wstrząs histaminowy”. W odpowiedzi na referat kol. G a r b u l i n s k i e g o w związku z zagadnieniem co jest pierwotną przyczyną spadku ciśnienia, działanie histaminy na serce, czy też na naczynia Kol. W a l a w s k i podkreśla, że mamy niewątpliwie do czynienia ze zja-

wiskiem bardzo złożonym bezpośredniego wpływu humoralnego histaminy oraz działania odruchowego (R y ż e w s k i). Biorąc pod uwagę nowsze dane o budowie układu naczyń włosowatych i drobnych naczyń tętniczych (metarteriole i połączenia tętniczożylnne) należy przyjąć, że pod wpływem histaminy w pierwszym momencie zachodzi lepsze ukrwienie mięśnia sercowego. Rozszerzanie się zwieraczy naczyń włosowatych prowadzi do uogólnionego spadku ciśnienia. Podobnie do histaminy działają inne substancje jak np. odbiałczona ślina. Trudno przypuścić, aby ta ostatnia działała również na serce. Dyskusję czy histamina działa na serce czy na naczynia z punktu widzenia praktycznego uważać należy za mało istotną.

Kol. J. Billewicz-Stankiewicz mówi, że w związku ze spostrzeżeniem Kol. Trzebskiego, iż histamina podana dotętniczo daje krótszy efekt niż podana dożylnie, nasuwa się myśl o wychwytywaniu histaminy przez tkankę nerwową. Z tym łączyłaby się kwestia wpływu histaminy na metabolizm tkankowy. Jak można się przekonać z piśmiennictwa są to zagadnienia stosunkowo mało opracowane. W pracowni J. Billewicza-Stankiewicza Górny i towarzysze badali wpływ histaminy na oddychane izolowanej tkanki wątrobowej i mózgowej w aparacie Warburga. Przekonano się, że nie ma widocznych zmian zarówno przy stosowaniu dużych stężeń histaminy jak i małych. Łączyło by się to ze spostrzeżeniem Kol. Miętkiewskiego, iż w stanach hipotermii, gdy procesy utleniania są zwolnione, działanie histaminy pozostaje niezmienione. Wobec tego nasuwa się myśl, że mamy do czynienia z włączaniem się histaminy w jakieś inne ogniwa metabolizmu. Chodziłoby o zbadanie na jakie ogniwa histamina wpływa.

Kol. F. Czubalski uważa, że bezpośrednie doświadczenie sercowego, czy też naczyniowego działania histaminy, nie jest możliwe. Sam jest zwolennikiem poglądu naczyniowego za czym przemawiałyby również wyniki pracy Kordeckiego i Trzebskiego. Zagadnienie działania histaminy, jak wynika z pracy Hołobuta oraz Trzebskiego jest o wiele szersze niż kwestia sporna. Wyników dożylnego wprowadzania krwi w doświadczeniach Garbulińskiego i Strzelczyka nie można uważać za argument na korzyść tego czy innego poglądu. Interpretacja bardzo ładnych i ciekawych krzywych Kol. Wcisły jest do podważenia.

Kol. J. Walański w uzupełnieniu odpowiedzi Kol. Kol. Garbulińskiego i Strzelczykowi zaznacza, że strofantyna jest jedynym jadem działającym na serce, a nie na naczynia. Poza tym dodaje, że podczas histaminowego spadku ciśnienia krwi wytwarza się w ustroju z histaminy adrenalina nawet po usunięciu nadnerczy jak wykazała praca Kalety i Marczeńskiego. Pituitryna ma działanie przede wszystkim naczyniowe.

J. Billewicz-Stankiewicz i Cz. Popik (Z. Patologii Ogólnej Ak. Med. Lublin) — Analiza sympatykominyetycznego działania histaminy na izolowane jelito cienkie.

Autorzy wykazują przy pomocy metod biologicznych, że fazę hamowania ruchów wahadłowych izolowanego jelita cienkiego królika spowodowaną przez histaminę, odnieść należy do powstającej w tkankach sympatyny.

Histamina działając na izolowane jelito w stężeniu 1 : 120000 — 600 000 powoduje początkowo wzrost wysokości ruchów wahadłowych przy zwiększonym napięciu pętli, później wyraźne zahamowanie amplitudy skurczów poniżej wysokości wyjściowej przy zachowanym zwiększonym napięciu, lub też na tle napięcia, które powróciło do poziomu prawidłowego. Płyn Tyrode'a pobrany z bezpośredniego otoczenia pętli w okresie hamowania, przeniesiony do innego naczynka z drugą pętlą powoduje za-

hamowanie ruchów tej ostatniej. Płyn ten wstrzyknięty do tętnicy szyjnej kota w uspieniu uretanem powoduje wzrost napięcia trzeciej powieki, zaś przetaczany przez preparat naczyniowy żaby wywołuje wyraźne zmniejszenie liczby kropeł odpływającej cieczy.

Autorzy zwracają uwagę, że opisywane zjawisko stanowi fragment bardziej ogólnego biologicznego działania histaminy jako bodźca sekrecyjnego dla wydzielania sympatyny (adrenaliny) w różnych narządach.

J. Panasewicz z (Z. Fizjologii Ak. Med. Warszawa) — mówił o antyparabiotycznym działaniu chlorku potasu podawanego do ogólnego krwiobiegu w przebiegu wstrząsu histaminowego u kotów. Badania wykonano na 10 nieuspionych kotach w warunkach ostrych doświadczeń. Chlorek potasu, w dawce 0,25 ml 10% roztworu na 1 kg wagi, wstrzykiwano w przebiegu wstrząsu histaminowego dotętniczo w kierunku dosercowym, do tętnicy szyjnej wspólnej lewej, lub do tętnicy udowej. Dawka chlorku potasu była tak dobrana, że przy dotętnicznym podaniu nie wywierała hamującego wpływu na czynność serca. W doświadczeniach kontrolnych te same dawki chlorku potasu podawano do żyły udowej, lub do izolowanego obszaru naczyniowego amputowanej kończyny tylnej kota, z zachowanymi jedynie połączeniami nerwowymi. W wyniku doświadczeń stwierdzono, że chlorek potasu podawany do ogólnego krwiobiegu, dotętniczo, wywierał takie samo działanie pobudzające na chemoreceptory naczyniowe, jak po podaniu do izolowanego obszaru naczyniowego. Na podstawie 18 doświadczeń, wykonanych na 10 kotach, stwierdzono, że każdorazowe szybkie dotętniczne wstrzyknięcie małych dawek stężonego roztworu chlorku potasu w okresie hypotenzyjnego działania histaminy wywoływało reakcję dwufazową. W pierwszej fazie działania obserwowano na krzywej tętniczego ciśnienia krwi występowanie szybkich i przemijających wzrostów ciśnienia, wraz z pobudzeniem czynności oddechowej tj. takich samych zmian, jak przy pobudzeniu chemoreceptorów izolowanego obszaru naczyniowego kończyny tylnej kota, jednak o znacznie większym nasileniu. W drugiej fazie działania chlorku potasu obserwowano znaczną poprawę pracy serca, czynności oddechowej, oraz szybki i nieodwracalny wzrost tętniczego ciśnienia krwi średnio o 25 — 35% wartości wyjściowej. W 2 doświadczeniach na 18 wykonanych udało się uzyskać przez dotętniczne podanie KCl natychmiastowy powrót obniżonego ciśnienia do wartości wyjściowych, znosząc w ten sposób całkowicie hypotensyjne działanie histaminy. Chlorek potasu, podawany dotętniczo w przebiegu wstrząsu histaminowego u kotów, wykazywał więc odruchowe działanie antyparabiotyczne i przeciwwstrząsowe, wyzwalając z chemoreceptorów naczyniowych impulsacje pobudzające ośrodek naczynioruchowy, oddechowy i ośrodek pracy serca. Impulsacje powyższe powodowały na drodze odruchowej tomizację układu sercowo-naczyniowego poprawę czynności oddechowej, regulując objętość krwi krążącej przez podwyższenie napięcia naczyń, pobudzenie czynności serca i mobilizację krwi ze zbiorników. Chlorek potasu podawany w tych samych dawkach dożylnie nie wykazywał pobudzającego działania na dynamikę krążenia, powodując szybki spadek tętniczego ciśnienia krwi i zgon badanych zwierząt wskutek nagłego zatrzymania czynności serca.

J. Bugajski i J. Kaulbersz (Z. Fizjologii Ak. Med. Kraków) — Zawartość histaminy w soku żołądkowym uzyskanym po różnych czasach. Autorzy oznaczali poziom histaminy w soku żołądkowym u psów po bodźcach nerwowych i chemicznych. Po wstrzyknięciu 15 jednostek insuliny, a więc przez pośrednictwo nerwu błędnego, sok żołądkowy zawierał średnio 28 gamma histaminy na litr. W soku uzyskanym na drodze chemicznej przez podawanie psom bulionu, śred-

nia ilość histaminy była równa 10 gamma na litr. Stosując histaminę, jako bodziec wydzielniczy ilość jej w skou żołądkowym zależała od podskórnie wprowadzonej dawki.

a) po wstrzyknięciu małych dawek 0,01 mg/kg, co 10 min., średnia wynosiła 11,7 gamma na litr.

b) po dawkach 0,15 — 0,48 mg/kg, co godzinę średnia jej była równa 366,6 gamma na litr.

Sok spontaniczny zawierał średnio 10,3 gamma histaminy na litr. Autorzy przypuszczają zgodnie z Emmelinem i Kahlsönem, że histamina jest fizjologicznym pośrednikiem w procesie wydzielania soku żołądkowego.

Cz. Maśliński i Karczewski (Z. Patomorfologii PAN Warszawa) — Zapobieganie tzw. wstrząsowi histaminowemu przez drażnienie mózgu prądem elektrycznym. Świnki morskie drażnione prądem elektrycznym, stosując elektrody o specjalnej konstrukcji przykładane do skóry głowy w okolicy skroniowo-czołowej. Do drażnienia używano impulsów prostokątnych prądu zmiennego o natężeniu 5 — 15 mM, częstotliwości 50 c/s. Bezpośrednio po drażnieniu, trwającym zależnie od wagi zwierzęcia 10 do 15 minut wstrzykiwano dożylnie histaminę w dawce 0,66 mg/kg wagi. Dawka ta wywoływała zawsze śmiertelny (nieodwracalny) wstrząs u zwierząt kontrolowanych. W wyniku doświadczenia przeżyło 29 zwierząt doświadczalnych, natomiast 9 z nich padło — przy czym czas przeżycia po podaniu histaminy wydłużył się w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi 2 — 3-krotnie. Mechanizm tego zjawiska nie jest znany. Obecnie prowadzone są dalsze badania. Zabierając głos w dyskusji Kol. J. Kiersz podał, że w badaniach własnych stwierdził, że wprowadzenie histaminy do tętnicy udowej i nerkowej powoduje wzrost ciśnienia krwi. Wprowadzenie histaminy do wyizolowanego odcinka aorty brzusznej (praca współna z Wróblewskim) powoduje spadek ciśnienia, który jest jeszcze głębszy, gdy podwiązane zostają tętnice dochodzące do nadnerczy. Opierając się na pracach Czubalskiego oraz Billewicza-Stankiewicza i Popika to ostatnie zjawisko wyjaśnić można wyłączeniem działania adrenaliny. W związku z pracą Kol. Pana Sewicza dyskutant dodaje, że stężenie 10% roztworu chlorku potasu należy uważać za zbyt duże i bardzo odległe od warunków ustroju.

Kol. B. Gutowski mówi o złożoności pohistaminowego spadku ciśnienia i podkreśla celowość prac i dyskusji, które prowadzą do wyjaśnienia tego zjawiska. Wspomina również o interkonwersji histydyny.

Kol. A. Kłisiewicz przypomina, że spór o histaminę istnieje od przeszło 50 lat. Wykonano w tym zakresie już tysiące prac i nadal prowadzone są stale poszukiwania. U nas ostatnio koordynuje te prace Komisja Wstrząsowa, przy Ministerstwie Zdrowia, gdyż wstrząs histaminowy jest jednym z różnych wstrząsów zwalczanych przez lekarza. Jesteśmy tu w podobnej sytuacji — mówi dyskutant — jak hydraulik, który musi przecież wiedzieć czy to pompa się psuje i powoduje uszkodzenie, czy też uszkodzenie jest powodowane ucieczką płynu przez uszkodzone rury. Bez stwierdzenia tego, co się dzieje z krążeniem krwi, a jedynie zajmując się samym ciśnieniem nie rozstrzygniemy omawianych spraw. Dobrze stało się, że na tej Konferencji sprawę histaminy wprowadzono na porządek dzienny i, że coraz więcej młodych pracowników naukowych nią się zajmuje. Praca Kol. Wcisły jest dyskutantowi znana we wszystkich szczegółach i nie widzi on żadnego punktu, którego nie dałoby się wytłumaczyć z równoczesnym uwzględnieniem, że i serce i naczyńia są zaatakowane jednocześnie. Badanie to jest doskonałym uzupełnieniem badania spraw serca innymi metodami. Odnośnie badań Kol. Maślińskiego: gdy przy drażnieniu prądem obserwujemy źrenice widzimy, że one rozszerzają się co jest dowodem dzia-

łania na system sympatyczny. Zdarzało się to u kotów leżących od 20 minut z otwartą klatką piersiową, a po przeprowadzeniu prądu w zdumiewający sposób ożywiających się przy jednoczesnym rozszerzaniu się źrenic. Jest to dowodem, że prąd pobudza ten system rdzeniowy.

Kol. W a l a w s k i podkreśla, że wstrząs histaminowy u człowieka i zwierząt powstaje tylko w warunkach sztucznych i odznacza się krótkotrwałością. Wstrząs urazowy znacznie odbiega od histaminowego i nie jest z nim jednoznaczny. Wstrząs u człowieka leczymy podawaniem obwodowych środków naczyniowych i strofantyny. Dlatego spór, czy histamina działa na naczynia, czy też na serce nie jest istotny.

Kol. K l i s i e c k i stwierdza, że wstrząsy histaminowe występują w życiu, a szczególnie przy zmiążdżeniu tkanek po zbyt długim na nie ucisku. M. in. właśnie o zbadanie tych spraw zwrócono się do Komisji Wstrząsowej Ministerstwa Zdrowia.

Kol. T. J a c y n a - O n y s z k i e w i c z w odpowiedzi profesorów W a l a w s k i e m u zaznacza, że w klinice chirurgicznej spotykamy u ludzi wstrząs histaminowy. Odróżniamy wstrząsy pierwotne i wtórne. O ile wstrząs pierwotny jest urazowy o tyle wtórny jest toksyczny i uważamy go właśnie za histaminowy. Każdy wstrząs przy tzw. chorobie pooperacyjnej jest to chroniczny wstrząs histaminowy i tak go się dziś właśnie ujmuje. Leczy go się z pewnym skutkiem gdzie nie działają nawet środki nasercowe, a natomiast działa osocze, podawanie chlorków itp. Dlatego nie można mówić, że nie ma u człowieka wstrząsu histaminowego.

Kol. M o s k w a stwierdza w związku z pracą Kol. M a ś l i Ń s k i e g o, że efekty otrzymywane w referowanych badaniach nie występują w warunkach naturalnych. Np. po ataku epilepsji nie uda się wywołać natychmiast drugiego ataku, to samo dotyczy astmy oskrzelowej. Najlepsze jest tu prawdopodobnie tłumaczenie P a w ł o w a, który mówił o ponadprogowym wyczerpaniu nie kwestionując, że również tego prostszego mechanizmu nie trzeba tracić z oczu.

Kol. P y t a s z stawia pytanie: jeżeli nie ma analogii między wstrząsem histaminowym a innymi, to czy uprawiamy wobec tego sztukę dla sztuki? Odnośnie możliwości przejścia histaminy w adrenalinę — zgadza się z wnioskiem Kol. B i l l e w i c z a - S t a n k i e w i c z a, że histamina może wpływać na wydzielanie adrenaliny, ale chyba nie na przekształcanie.

Kol. J. W a l a w s k i podkreśla, że histamina podawana w kroplówce w sposób ciągły powoduje wydzielanie soku żołądkowego, lecz nie obniża ciśnienia krwi. We wstrząsie urazowym obok działania histaminy są również inne składniki. W odpowiedzi Kol. P y t a s z o w i zaznacza, że zdaniem niektórych badaczy histamina może przekształcać się w adrenalinę.

Kol. J. K a u l b e r s z — mówi, że dotychczas nie zostało zgodnie stwierdzone czy histamina obok kwasu solnego pobudza także wydzielanie pepsyny. Według szkoły Babkina pod wpływem histaminy nie zachodzi wydzielanie pepsyny, natomiast H a y d e jest przeciwnego zdania: przypuszcza on, że małe dawki histaminy wzmagają wytwarzanie pepsyny. Dalej dyskutant zaznacza, że histaminę można w pewnej mierze uważać za mediator wydzielania soku żołądkowego o czym świadczy w pewnym stopniu praca B u g a j e w s k i e g o. Pod wpływem histaminy powstaje w przewodzie pokarmowym nie tylko substancja adrenergiczna jak to przedstawili B i l l e w i c z - S t a n k i e w i c z i P o p i k, lecz również najprawdopodobniej acetylocholina, za czym przemawiają doświadczenia z zastosowaniem atropiny.

Wyniki obrad zebrał Kol. B. S z a b u n i e w i c z. Stwierdził on, że od czasu Zjazdu w 1954 r., na którym fizjology polscy ukazali swój dorobek, są

nowe osiągnięcia, o których możemy mówić i dyskutować. Nie wszystkie wygłoszone na Konferencji referaty wniosły coś nowego, wiele z nich jednak pokazało ciekawy dorobek. Szczególnie podkreślić należy referaty: Kol. S t a Ź k i, w którym wykreślony został nowy próg pobudliwości receptorów o przeciwieństwie do poprzednio znanego, Kol. S u c h a n k a, który choć powtarzał dawne doświadczenia, to jednak wykazał też pewne nowe dosyć interesujące metody, referat B u g a j e w s k i e g o, który dotyczył powstawania większej ilości histaminy podczas fazy wydzielniczej, wyniki B i l l e w i c z a - S t a n k i e w i c z a i P o p i k a dotyczące pohistaminowego adrenergicznego pobudzenia tkanek. Wśród ciekawszych wyliczyć też trzeba referat Kol. T r z e b s k i e g o i śmiałe poczynania na żywym człowieku wykonane przez Kol. J a c y n ę - O n y s z k i e w i c z a i H o l o b u t a.

W dyskusji ciągle przewijała się sprawa mechanizmu spadku ciśnienia, które zachodzi ze wstrząsem histaminowym, a także poruszane były sprawy dotyczące działania histaminy na zatokę tętnicy szyjnej.

Drugą sprawą, którą trzeba tu poruszyć to sprawy metodyczne. Wydaje się, że w niektórych pracowniach naszych mogą być wyprodukowane bardzo ładne prace. Na Konferencji przedstawiono wykresy, które można nazwać eleganckimi, jak np. pochodzące z pracowni lubelskiej, czy bardzo skomplikowane, wymagające doskonałości technicznej wykonanej przez Kol. W c i s ł ę. Praca o bardzo poważnym znaczeniu, szczególnie jeśli chodzi o sprawy związane z zatoką szyjną wykonano metodami w pełni fizjologicznymi^{*)}. W istocie rzeczy jednak dla badania interoreceptorów w obecnej fazie metodą z wyboru jest metoda elektrofizjograficzna. Z tego rodzaju prac nic tu nie widzieliśmy, a i wyniki, które reprezentował prof. H o ł o b u t niestety nie pochodzą z naszych pracowni. Cieszyć się należy, że pewne analizy także i tu będą przeprowadzone. W moim przekonaniu — mówił Kol. S z a b u n i e w i c z — jest to jednak za mało: powinniśmy się starać by w tych badaniach dotyczących recepcji wprowadzić metodę elektrofizjologiczną. Jej brak jest wielką bolączką nie tylko tych, którzy swe wyniki tu referowali, ale i całej fizjologii polskiej.

W metodyce fizjologii dzisiejszej da się wyróżnić, oprócz metod biochemicznych, dające bardzo dużo badania zmian czułościowych elektrycznych w elementach tkankowych. Trzeba tu przypomnieć mikro- i ultramikroelektrody, przy pomocy których można trafić do poszczególnych włókien mięsnych, a nawet do komórek motorycznych przednich rogów rdzenia. W tej dziedzinie nic jeszcze nie mamy. Uważam, że z naszej strony powinniśmy walczyć jak najenergiczniej o to, abyśmy mogli rozpocząć badania w tej dziedzinie. Oscylografiy znajdują się u nas w niektórych pracowniach, ale nie są używane. Trzeba je nie tylko używać, ale jeszcze i doskonalić się w tym użytkowaniu. Do tego potrzebna jest nie tylko pomoc ze strony Państwa, którą będziemy mieć w najbliższym czasie, ale też i wykształcenie pracowników. Dlatego konieczne jest, aby nasi młodzi pracownicy naukowcy mogli wyjechać zagranicę i tam nauczyć się tych badań. Szkoda, że w naszej dyskusji mały udział brały młode kadry naukowe. Sądząc z rozmów w kuluarach przypuszczać można, że dużą rolę odegrało tu raczej pewne onieśmienie, gdyż ich wypowiedzi w czasie przerw były niejednokrotnie śmiałe i ciekawe.

Podkreślić trzeba jeszcze jedną sprawę. Na zjazdach Towarzystwa, do roku 1954 nie odczuwało się ducha fizjologicznego. Duch ten uwydatnił się bardzo silnie na naszej sesji. Do wytworzenia tej odpowiedniej i korzystnej atmosfery bardzo pomogła

^{*)} dającymi nam wyniki pośrednie.

nam organizacja Zjazdu. Była ona sprawna: na każdym kroku można było odczuć życzliwość i opiekę organizatorów, którzy Zjazd zainicjowali i doprowadzili do skutku i którym w imieniu uczestników Zjazdu złożył Kol. Szabuniewicz serdeczne podziękowanie.

Kol. W. Hołobut dziękuje wszystkim obecnym za przybycie, wygłoszenie referatów, udział w dyskusji, przewodniczącym za kierowanie obradami i przeprasza za niedociągnięcia organizacyjne.

Kol. J. Kaubersz zamykając Konferencję dziękuje raz jeszcze Kol. Hołobutowi i jego współpracownikom za urządzenie Zjazdu i troskliwą opiekę nad uczestnikami.

Dyskusję ze stenogramu streścili: Prof. dr W. Hołobut i Doc. dr J. Billewicz-Stankiewicz.

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| H. Theorell — Istota i mechanizm działania enzymów utleniających | 299 |
| S. Golewski i K. Pilek — Jonoforeza, polarografia, nefelometria w badaniach nad kwasami nukleinowymi | 315 |
| P. S z a f r a ń s k i — Cykl pentozowy glikozy | 327 |

Z ZAGRANICZNYCH PRACOWNI

| | |
|---|-----|
| A. P i g o ń — Metody manometryczne opracowane w Laboratorium Carlsberg | 343 |
|---|-----|

KONGRESY I ZJAZDY MIĘDZYNARODOWE

| | |
|---|-----|
| W. N i e m i e r k o — Sprawozdanie z II Międzynarodowej Konferencji w Gandawie poświęconej biochemii lipidów | 359 |
|---|-----|

RECENZJE I STRESZCZENIA

| | |
|---|-----|
| L. J a n o t a — Badania R. K. C l a y t o n a nad fotosyntezą, oraz reakcjami taktycznymi <i>Rhodospirillum rubrum</i> | 365 |
|---|-----|

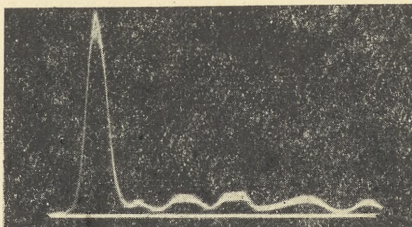
KOMUNIKATY POLSKIEGO TOWARZYSTWA FIZJOLOGICZNEGO

| | |
|---|-----|
| Sprawozdanie z konferencji Polskiego Tow. Fizjologicznego | 385 |
|---|-----|

Errata do zeszytu 1, tomu II, r.1956

„POSTĘPÓW BIOCHEMII”

- str. 166. Do podpisu pod rys. 4 dołączyć zdanie:
„Od lewej do prawej: A, α_1 , α_2 , β , γ ”
- str. 167. Rys. 5. Na osi odciętych oznaczono $^{\circ}\text{C}$ zamiast c.
- str. 168. Tabl. 2. W tytule przedostatniej rubryki jest znak $R_{(12)}$ zamiast $E_{(12)}$.
- str. 172. Rys. 6. Nie zamieszczono rysunku 6a, który wygląda jak następuje:



- str. 200. (nlb). W spisie rzeczy wydrukowano błędnie nazwisko autora. Zamiast Magdas winno być Magas.

Cena zł 15.—