

P O L S K A A K A D E M I A N A U K

KOMITET BIOCHEMICZNY

J. J. J. J. J.

ACTA
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M I I I

WARSZAWA 1956
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozolowski
Ignacy Reifer

RADA REDAKCYJNA

Tadeusz Baranowski, Irena Chmielewska, Józef
Heller, Edmund Mikulaszek, Włodzimierz Niemierko,
Bolesław Skarżyński, Janusz Supniewski,
Mieczysław Wierzuchowski.

ADRES REDAKCJI: Warszawa 10, ul. Śniadeckich 8

P. 1015



K. 213/65
<http://rcin.org.pl>

INDEKS AUTORÓW

A

Augustyniak J., patrz Wiewiórowski M., 345

B

Bicz W., Zastosowanie metody nurków Kartezjusza do badania przemiany gazowej komórek zwierząt stałocieplnych 183

Borkowski T., Chromatograficzna analiza aminokwasów w żółci 333

Bełżecka K. i Chmielewska I., — Wpływ glikozy na wykorzystanie przez organizm ludzki podanego dożylnie hydrolizatu białka krwi bydłowej . . . 497

C

Chmielewska I., patrz Bełżecka K. 497

Chojnacki T., Poziom wapnia i magnezu w płynie mózgowo-rdzeniowym . . . 521

Choraży M., Bilans azotowy u szczurów obarczonych mięsakiem 131

D

Drabikowski W., Zawartość kreatyny i fosfokreatyny w narządach żaby . . . 119

E

Eckstein M., patrz Gumińska M. 323

F

Filipowicz B., Golewski S., Pilek K., Skład kwasów rybonukleinowych trzustki prawidłowej 69

G

Galos-Biczowa B., patrz Ostrowski W., Krawczyk A. 649

Golewski S., patrz Filipowicz B., Pilek K. 69

Gumińska M., Eckstein M., Przeciwwakrzepowe działanie naftyłowych pochodnych indandionu-1,3 323

H

Homańska-Szafranowa H. i Oleksy J., Elektroforetyczny rozdział enzymów soku trzustkowego psa 663

J

Jachymczyk W. , patrz Kasprzykówna Z.,	299
Janicki J., Pawelkiewicz J., Nowakowska K. , Otrzymywanie koncentratów oraz krystalicznego witaminu B ₁₂ ze ścieków miejskich poddanych fermentacji metanowej	161

K

Kasprzykówna Z. i Jachymczyk W. , Saponiny trójterpenowe roślin rodziny <i>Compositae</i> . II. Saponina kwiatów słonecznika (<i>Helianthus annuus</i>)	299
Kączkowski J. , patrz Reifer I., Rumińska A	209
Keilin D. , Distribution and Diversity of Haemoglobin	439
Kleczkowska D. , patrz Reifer I., Solecka M	41
Klimek R., Skarżyński B., Szczepkowski T. W. , Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. III. Cytochrom w <i>Thiobacillus thioparus</i>	261
Kochańska Z., Shugar D. , W sprawie dezaminacji puryn podczas kwaśnej hydrolizy kwasów nukleinowych	591
Kowalczyk J. , Prosty aparat do elektroforezy bibułowej	251
Kowalska H. , patrz Opieńska-Blauth J., Pietrusiewicz M.	557
Kowalski E., Latalo Z., Niewiarowski S. , Plazminogen i plazmina. I. Badania nad aktywacją plazminogenu i inaktywacją plazminy	87
Kowalski E., Latalo Z., Niewiarowski S. , Plazminogen i plazmina. II. Wpływ jonów metali na czynność plazminy	109
Krawczyk A., Ostrowski W., Skarżyński B. , Polarograficznie czynne substancje w surowicy krwi	409
Kwiek S. , patrz Tysarowski W.,	55
Krawczyk A. , patrz Ostrowski W., Galos-Biczowa B.	649
Krawczyk A., Ostrowski W., Skarżyński B. , Połączenia witaminu B ₁₂ z białkami. V. Ciężar cząsteczkowy połączenia witamin B ₁₂ -białko z surowicy krwi bydłowej	401

L

Latalo Z. , patrz Kowalski E., Niewiarowski S.	87, 109
S. L. Φ v t r u p, The Induced Synthesis of Enzymes in Micro-Organisms	475

M

Maćkowski W. , patrz Narębska A.	271
Mann Tadeusz , Fruktaza w wydzielinie pęcherzyków nasiennych i jej rola w metabolizmie plemników	459
Mochnacka I., Szafranski P. , Aktywność transketolazy w tkance nerwowej gołębi z awitaminozą B ₁	539
Mozolowski W. , Słowo wstępne	435

N

Narębska A., Maćkowski W. , Wymiana jonów sodowych, potasowych i wapniowych na wofatyście P w roztworach zbliżonych składem jonowym do soków trawiennych człowieka	271
---	-----

Niemierko W., Badania nad metabolizmem <i>Galleria mellonella</i> L. i <i>Bombyx mori</i> L.	627
Niewiarowska A., patrz Ostrowski W.,	171
Niewiarowski S., patrz Kowalski E., Latało Z.	87, 109
Nowakowska K., patrz Janicki J., Pawelkiewicz J.,	161
Noworytko J., Sarnecka-Keller M., Chromatograficzna analiza aminokwasów wydalanych z moczem	309

O

Oleksy J., patrz Homańska-Szafranowa H.	663
Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Pietrusiewicz M., Nowe sposoby identyfikacji aminokwasów na chromatogramach jedno i dwukierunkowych	557
Ostrowski W., patrz Krawczyk A., Skarżyński B.,	401, 409
Ostrowski W., Krawczyk A., Galos-Biczowa B., Elektroforeza pasmowa w obecności adsorbentów	649
Ostrowski W., Niewiarowska A., Połączenia witaminu B ₁₂ z białkami. IV. Oczyszczanie i własności kompleksu witamin B ₁₂ -białko surowicy krwi bydlęcej	171

P

Parnas J. K., Prace wykonane w latach 1907—1939	3
Pawelkiewicz J., patrz Janicki J., Nowakowska K.,	161
Pawelkiewicz J., Badania nad biosyntezą związków kobalaminowych. Wyodrębnienie nowych kobalamin z komórek <i>Propionibacterium shermanii</i>	581
Pawelkiewicz J., Zodrow K., Wytwarzanie wolnych porfiryn przez <i>Propionibacterium shermanii</i>	225
Piechowska M., Pirofosforany podczas kopulacji u motyla wilczomlecza	547
Pietrusiewicz M., patrz Opieńska-Blauth J., Kowalska H.,	557
Pigoń A., Wielocukrowce w organizmie <i>Urostyla</i> w czasie życia aktywnego i encystacji	613
Pilek K., patrz Filipowicz B., Golewski S.,	69

R

Reifer I., Kleczkowska D., Solecka M., Badania nad wpływem jaryzacji na aktywność niektórych enzymów w pszenicach ozimych	41
Reifer I., Rumińska A., Kączkowski J., Wpływ żelazicyjanku potasu na <i>Datura stramonium</i> L. Plon liści, zawartość alkaloidów i niektórych innych składników	209
Reifer I. i Toczko K., Mikrometoda ilościowego oznaczania pięciu głównych alkaloidów opium	381
Rzendowska F., patrz Shugar D.,	595
Rumińska A., patrz Reifer I., Kączkowski J.,	209

S

Sarnecka-Keller M., patrz Noworytko J.,	309
Shugar D., patrz Kochańska Z.,	591
Shugar D., Rzendowska F., Badania nad fotochemią rybonukleazy	595

Shugar D. , patrz Szemplińska E., Szenberg A.,	607
Skarżyński B. , patrz Krawczyk A., Ostrowski W.,	401, 409
Skarżyński B. , patrz Klimek R., Szczepkowski T. W.,	261
Solecka M. , patrz Reifer I., Kleczkowska D.,	41
Szafrański P. , Enzymy cyklu pentozowego u <i>Mycobacterium tbc.</i> H 37 Rv	423
Szafrański P. , patrz Mochnacka I.	539
Szarkowska L. , Reduktaza <i>p</i> -chinonowa u motyla wilczomlecza <i>Celerio euphorbiae</i> L.	511
Szarkowski J. W. , Badania nad oddychaniem kielków pszenicy	529
Szemplińska E., Szenberg A., Shugar D. , Zastosowanie preparatów handlowych dezoksyrybonukleazy paciorkowcowej do celów histochemicznych	607
Szenberg A. , patrz Szemplińska E., Shugar D.,	607
Szczepkowski T. W. , patrz Klimek R., Skarżyński B.,	261

T

Toczko K. , patrz Reifer I.,	381
Tysarowski W. i Kwiek S. , Oznaczanie własności redukcyjnych układów biologicznych za pomocą kompleksu żelaza z kwasem etylenodwuaminoczworoctowym	55

W

Wiewiórowski M. i Augustyniak J. , Elektroforeza bibułowa białek nasion łubinu	345
Wojtczak A. B. , Związki fosforowe w wydalinach mola woskowego (<i>Galleria mellonella</i>). I. Identyfikacja	355
Wojtczak A. B. , Związki fosforowe w wydalinach mola woskowego (<i>Galleria mellonella</i>). II. Enzymatyczna hydroliza	369
Wojtczak L. , Niektóre zagadnienia związane z aktywnością enzymów oddechowych w czasie rozwoju jedwabnika morwowego, <i>Bombyx mori</i> L.	197

Z

Zodrow K. , patrz Pawelkiewicz J.,	225
Zalewski W. , Chromatograficzne oznaczanie cukrowców w krajowych owocach.	149

INDEKS RZECZOWY

A

Alkaloidy: wpływ żelazicyjnanu potasu na zawartość w <i>Datura stramonium</i> .	
I. Reifer, A. Rumińska, J. Kączkowski	209
Aminokwasy: chromatograficzna analiza wydalanych z moczem, J. Noworytko i M. Sarnecka-Keller	309
Aminokwasy: chromatograficzna analiza w żółci, T. Borkowski	333
Aminokwasy: nowa metoda identyfikacji w chromatogramach, J. Opieńska-Blauth, H. Kowalska, M. Pietrusiewicz	557
Aparat: do elektroforezy bibułowej, J. Kowalczyk	251
Awitaminoza B₁: aktywność transketolazy w tkance nerwowej gołębia	
I. Mochnacka i P. Szafrąński	539
Azotowy bilans: u szczurów obarczonych mięsakiem, M. Chorąży	131

B

Białka: hydrolizat, wpływ glikozy na wykorzystanie podanego dożylnie,	
K. Bełżecka i I. Chmielewska	497
Białka: nasion łubinu elektroforeza bibułowa, M. Wiewiórowski i J. Augustyniak	345
Bombyx mori: aktywność enzymów oddechowych w czasie rozwoju,	
L. Wojtczak	197
Bombyx mori: badania nad metabolizmem, W. Niemierko	627

C

Celerio euphorbiae: reduktaza p-chinonowa u motyla, L. Szarkowska	511
Celerio euphorbiae: pirofosforany podczas kopulacji, M. Piechowska	547
Chromatografia: aminokwasów nowa metoda identyfikacji, J. Opieńska-Blauth, H. Kowalska, M. Pietrusiewicz	557
Cukrowce: cykl pentozowy w <i>Mycobacterium tbc</i> H37Rv., P. Szafrąński	423
Cukrowce: chromatograficzne oznaczanie w owocach krajowych, W. Zalewski	149
Cukrowce: (wielu) w organizmie <i>Urostyla</i> w czasie życia aktywnego i encystacji, A. Pigoń	613
Cytochrom: w <i>Thiobacillus thioparus</i> , R. Klimek, B. Skarżyński, T. W. Szczepkowski	261

D

Dezoksyrybonukieaza paciorkowcowa: zastosowanie do celów histochemicznych, E. Szemplińska, A. Szenberg, D. Shugar	607
Drobnoustroje: indukowana synteza enzymów, S. L. Fvtrup	475

E

Elektroforeza: bibułowa, prosty aparat, J. Kowalczyk	251
Elektroforeza: bibułowa, rozdział enzymów soku trzustkowego, H. Homańska-Szafranowa, J. Oleksy.	663
Elektroforeza: pasmowa, w obecności adsorbentów, W. Ostrowski, A. Krawczyk, B. Galos-Biczowa.	649
Enzymy: wpływ jaryzacji pszenicy ozimej na aktywność, I. Reifer. D. Kleczkowska, M. Solecka	41
Enzymy: indukowana synteza u drobnoustrojów, S. L. Øvtrup	475
Enzymy: oddechowe, aktywność w czasie rozwoju <i>Bombyx mori</i> , L. Wojtczak	197
Enzymy: soku trzustkowego, rozdział elektroforetyczny, H. Homańska-Szafranowa, J. Oleksy	663
Etylenodwuaminoczeroctowy kwas: kompleks z żelazem, oznaczenie własności redukujących układów biologicznych za pomocą, W. Tysarowski i S. Kwiek	55

F

Fosfokreatyna: zawartość w narządach żaby, W. Drabikowski	119
Fosforowe: związki w wydalinach mola woskowego (<i>Galleria mellonella</i>). I. Identyfikacja, A. B. Wojtczak	355
Fosforowe: związki w wydalinach mola woskowego (<i>Galleria mellonella</i>). II. Enzymatyczna hydroliza, A. B. Wojtczak	369
Fotochemia: rybonukleazy, D. Shugar i F. Rzendowska	595
Fruktoza: w wydzielinie pęcherzyków nasiennych i jej rola w metabolizmie plemników, T. Mann	459

G

Galleria mellonella: badania nad metabolizmem. W. Niemierko.	627
Galleria mellonella: związki fosforowe w wydalinach. I. Identyfikacja, A. B. Wojtczak	355
Galleria mellonella: związki fosforowe w wydalinach. II. Enzymatyczna hydroliza, A. B. Wojtczak	369
Glikoza: wpływ na wykorzystanie podanego dożylnie hydrolizatu białka pełnej krwi bydłowej, K. Belżeczka, I. Chmielewska	497

H

Hemoglobina: występowanie i różnorodność, D. Keilin	439
Histochemia: zastosowanie dezoksyrybonukleazy paciorkowcowej, E. Szemplińska, A. Szenberg, D. Shugar	607

I

Indandion-1,3: przeciwzkrzepowe działanie naftyłowych pochodnych, M. Gumińska i M. Eckstein	323
Jony Na, K i Ca: wymiana na wofatyście P., A. Narębska i W. Maćkowski	271

K

Kartezjusza nurki: zastosowanie do badań przemiany gazowej komórek zwierząt stałocieplnych, W. Bicz	183
Kobalaminy: wyodrębnienie nowych z komórek <i>Propionibacterium shermanii</i> J. Pawelkiewicz	581
Kreatyna: zawartość w narządach żaby, W. Drabikowski	119

Ł

Lubin: elektroforeza białek nasion, M. Wiewiórowski i J. Augustyniak	345
---	-----

M

Magnez: poziom w płynie mózgowo-rdzeniowym, T. Chojnacki	521
Metabolizm: badania u <i>Galleria mellonella</i> i <i>Bombyx mori</i> , W. Niemierko	627
Mięsak: bilans azotowy u szczurów obarczonych, M. Chorąży	131
Mikrometoda: ilościowego oznaczania pięciu głównych alkaloidów w opium, I. Reifer i K. Toczko	381
Mocz: chromatograficzna analiza wydalanych aminokwasów, J. Noworytko i M. Sarnecka-Keller	309
Mózgowo-rdzeniowy płyn: poziom wapnia i magnezu, T. Chojnacki	521
Mycobacterium tbc. H37Rv: enzymy cyklu pentozowego, P. Szafrński	423

N

Nerwowa: tkanka gołębia, aktywność transketolazy przy awitaminozie B ₁ I. Mochnacka, P. Szafrński	539
Neukleinowe kwasy: deaminacja puryn podczas hydrolizy kwaśnej, Z. Kochańska, D. Shugar	591

O

Oddychanie: kielków pszenicy, J. W. Szarkowski	529
Opium: mikrometoda oznaczania pięciu głównych alkaloidów, I. Reifer i K. Toczko	381

P

Plazmina: wpływ jonów metali na czynność, E. Kowalski, Z. Latało, S. Niewiarowski	109
Plazmina: badania nad inaktywacją, E. Kowalski, Z. Latało, S. Niewiarowski	87
Plazminogen: badania nad aktywacją, E. Kowalski, Z. Latało, S. Niewiarowski	87
Plemniki: rola fruktozy w metabolizmie, T. Mann	459
Pirofosforany: podczas kopulacji u motyla <i>Celerio euphorbiae</i> , M. Piechowska	547
Porfiryny: wytwarzanie przez <i>Propionibacterium shermanii</i> , J. Pawelkiewicz, K. Zdzrow	225
Prace: J. K. Parnasa, wykonane w 1907—1939	3
Propionibacterium shermanii: wyodrębnienie nowych kobalaminy z komórek, J. Pawelkiewicz	581

Propionibacterium shermanii: wytwarzanie wolnych porfiryn, J. Pawełkiewicz, K. Zdrov	225
Przemiana: gazowa komórek zwierząt stałocieplnych, badanie metodą nurków Kartezjusza, W. Bicz	183
Pszenica: badania nad oddychaniem kielków, J. W. Szarkowski	529
Pszenica: wpływ jaryzacji na aktywność niektórych enzymów, I. Reifer, D. Kleczkowska, M. Solecka	41
Puryny: dezaminacja podczas hydrolizy kwaśnej kwasów nukleinowych, Z. Kochańska, D. Shugar	591

R

Redukcyjne: własność układów biologicznych, oznaczenie za pomocą kompleksu żelaza z kwasem etylenodwuaminoczworoctowym, W. Tysarowski i S. Kwiek	55
Reduktaza p-chinonowa: u <i>Celerio euphorbiae</i> , L. Szarkowska	511
Rybonukleaza: fotochemia, D. Shugar, F. Rzendowska	595
Rybonukleinowy kwas: skład w trzustce prawidłowej, B. Filipowicz, S. Gołewski, K. Pilek	69

S

Saponiny: kwiatów słonecznika, Z. Kasprzykówna i W. Jachymczyk	299
Surowica krwi: oczyszczenie i własności kompleksu witaminu B ₁₂ z białkiem, W. Ostrowski, A. Niewiarowska	171
Surowica krwi: ciężar cząsteczkowy połączenia witaminu B ₁₂ z białkiem, A. Krawczyk, W. Ostrowski, B. Skarżyński	401
Surowica krwi: polarograficznie czynne substancje, A. Krawczyk, W. Ostrowski, B. Skarżyński	409

T

Thiobacillus thioparus: cytochrom, R. Klimek, B. Skarżyński, T. W. Szczepkowski	261
Transketolaza: aktywność w tkance nerwowej gołębia przy awitaminozie B ₁ , I. Mochnacka, P. Szafranski	539
Trzustka: prawidłowa, skład kwasów rybonukleinowych, B. Filipowicz, S. Gołewski i K. Pilek	69

U

Urostyl: wielocukrowce w organizmie w czasie życia aktywnego i encystacji, A. Pigoń	613
--	-----

W

Wapń: poziom w płynie mózgowo-rdzeniowym, T. Chojnacki	521
Witamin B₁₂: otrzymywanie ze ścieków miejskich, J. Janicki, J. Pawełkiewicz, K. Nowakowska	161

Witamin B₁₂ : kompleks z białkiem w surowicy, oczyszczenie i własności, W. Ostrowski, A. Niewiarowska	171
Witamin B₁₂ : połączenie z białkiem z surowicy krwi, ciężar cząsteczkowy, A. Krawczyk, W. Ostrowski, B. Skarżyński	401
Wofatyt P : wymiana jonów Na, K i Ca, A. Narębska i W. Maćkowski	271

Ż

Zelazicyjanek potasu : wpływ na plon liści i zawartość alkaloidów w <i>Datura stramonium</i> , I. Reifer, A. Rumińska, J. Kączkowski	209
Żółć : chromatograficzna analiza aminokwasów, T. Borkowski	333



Handwritten signature

PRACE JAKUBA KAROLA PARNASA**wykonane w latach 1907 – 1939****A. PRACE BADAWCZE**

1. R. Willstätter und J. Parnas
Über 2,6-Naphthochinon.
Ber. Chem. Ges. **40**, 1406-1415, 1907
2. R. Willstätter und J. Parnas
Über amphi-Naphthochinone. II.
Ber. Chem. Ges. **40**, 3971-3978, 1907
3. J. Parnas
Über Naphthochinone.
Dissertation. München, 1908, 9-95
4. J. Parnas
Über Kephalin.
Biochem. Z. **22**, 411-432, 1909
5. J. Parnas
Energetik glatter Muskeln.
VIII Internationaler Physiologen Kongress, Wien, 27-30 September 1910
6. J. Parnas
Energetik glatter Muskeln.
Pflügers Arch. ges. Physiol. **134**, 441-495, 1910
7. J. Parnas
Über fermentative Beschleunigung der Cannizaroschen Aldehydumlagerung durch Gewebssäfte. I.
Biochem. Z. **28**, 274-294, 1910
8. J. Parnas
Über Bildung von Glykogen aus Glycerinaldehyd in der Leber.
Zbl. Physiol. **26**, 671-672, 1912

9. J. Parnas
Über das Schicksal der stereoisomeren Milchsäuren im Organismus des normalen Kaninchens.
Biochem. Z. **38**, 53-64, 1912
10. J. Parnas und J. Baer
Über Zuckerabbau und Zuckeraufbau im Tierischen Organismus.
Biochem. Z. **41**, 386-418, 1912
11. J. Parnas
Über die gesättigte Fettsäure des Kephaling.
Biochem. Z. **56**, 17-20, 1913
12. J. Parnas und R. Wagner
Über den Kohlenhydratumsatz isolierter Amphibienmuskeln und über die Beziehungen zwischen Kohlenhydratschwund und Milchsäurebildung im Muskel. I.
Biochem. Z. **61**, 387-427, 1914
13. J. Parnas
Über das Wesen der Muskelerholung.
Zbl. Physiol. **30**, 1-18, 1915
14. J.K. Parnas und E. Laska-Mintz
Beeinflussen subminimale Reize den Ablauf chemischer Umsetzungen im isolierten Muskel?
Biochem. Z. **116**, 59-70, 1921
15. J. K. Parnas
Über den Kohlenhydratstoffwechsel der isolierten Amphibienmuskeln. II.
Biochem. Z. **116**, 71-88, 1921
16. J. K. Parnas
Über den Kohlenhydratstoffwechsel der isolierten Amphibienmuskeln. III. Der Umsatz in Muskeln pankreasdiabetischer Tiere.
Biochem. Z. **116**, 89-101, 1921
17. J. K. Parnas
Über den mechanischen Wirkungsgrad der in isolierten Amphibienmuskeln stattfindenden Verbrennungsprozesse. (Vorläufige Mitteilung)
Biochem. Z. **116**, 102-107, 1921
18. J. K. Parnas und Z. Krasińska
Über den Stoffwechsel der Amphibienlarven.
Biochem. Z. **116**, 108-137, 1921

19. J. K. Parnas und R. Wagner
Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl.
Biochem. Z. **125**, 253-256, 1921
20. R. Wagner und J. K. Parnas
Über die eigenartige Störung des Kohlenhydratstoffwechsels und ihre Beziehungen zum Diabetes mellitus. II. Eine klinisch-experimentelle Studie.
Z. ges. exp. Med. **25**, 361-384, 1921
21. J. K. Parnas und R. Wagner
Beobachtungen über Zuckerneubildung. I. Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlenhydratstoffwechselstörung angestellt wurden
Biochem. Z. **127**, 55-65, 1922
22. R. Wagner und J. K. Parnas
Zur Korrelation der Blutdrüsen.
Medizinische Klinik, **18**, 135-138, 1922
23. J. K. Parnas i W. Jasiński
Rozmieszczenie składników krwi niekoloidowych pomiędzy osocze i krwinki na podstawie analiz krwi rodzimej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **2**, 163-164, 1922
24. J. K. Parnas und W. v. Jasiński
Über die Verteilung von Zucker, Reststickstoff und Calcium im Blute.
Kli. Wo. **1**, 2029-2030, 1922
25. J. K. Parnas, A. Rosenblüth und R. Wagner
Über den Einfluss der Kohlehydrate auf den Grundumsatz. Nach Versuchen, die an einem Falle besonderer Kohlehydratstoffwechselstörung angestellt wurden. IV.
Z. ges. exp. Med. **38**, 445-457, 1923
26. J. K. Parnas i J. Heller
O zawartości amoniaku we krwi.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **4**, 150-161, 1924
27. J. K. Parnas et J. Heller
Recherches sur l'ammoniaque du sang.
C. R. Soc. Biol. **91**, 706-707, 1924

28. J. K. Parnas und J. Heller
Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute I.
Biochem. Z. **152**, 1-28, 1924
29. J. K. Parnas
Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute II.
Biochem. Z. **155**, 247-255, 1925
30. J. K. Parnas
Badania nad amoniakiem zawartym we krwi i nad jego pochodzeniem.
Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, w Warszawie. T. I. 272-274, 1925.
31. J. K. Parnas und M. Taubenhau s
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. III. Die Entstehung des Blutammoniaks.
Biochem. Z. **159**, 298-310, 1925.
32. J. K. Parnas und A. Klisiecki
Über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Blute. IV. Ist im kreisenden Blute Ammoniak vorhanden?
Biochem. Z. **169**, 255-265, 1926.
33. W. Mozołowski und J. K. Parnas
Über eine neue Form der Chinhydronelektrode.
Biochem. Z. **169**, 352-354, 1926.
34. J. K. Parnas
O amoniaku krwi, jego pochodzeniu i warunkach powstawania.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **6**, 156-158, 1926
35. J. K. Parnas
A vérben élvö ammoniákról és koletktozési médjáról.
Therapia II. Evfoljan Kvianyi Szám, 77-88, 1926
36. J. K. Parnas und A. Klisiecki
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. VI. Experimentelle Untersuchungen über die Faktoren, welche den Ammoniakgehalt des kreisenden Blutes beeinflussen, und über die Lokalisation der Ammoniakbildung und des Ammoniakschwundes beim Kaninchen.
Biochem. Z. **173**, 224-248, 1926

37. J. K. Parnas
On ammonia in blood, its formation and its physiological behaviour.
XII-th International Physiological Congress held at Stockholm,
August 3-6, 1926
Skandinav. Archiv, **49**, 199-200, 1926
38. J. K. Parnas
Existe-t-il des sels ammoniacaux dans le sang circulant?
Bull. Soc. Chim. Biol. **9**, 76-90, 1927
39. J. K. Parnas, Wł. Mozołowski
Badania nad przemianą azotową mięśnia. I i II.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **7**, 105-106, 112-113, 1927
40. J. K. Parnas und Wł. Mozołowski
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel
und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. I.
Biochem. Z. **184**, 399-441, 1927
41. J. K. Parnas und Wł. Mozołowski
Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang
mit Tätigkeit und Zustandsänderung.
Kli. Wo. **6**, 998-999, 1927
42. J. K. Parnas, Wł. Mozołowski i W. Lewiński
Powstawanie amoniaku w mięśniach a praca.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **7**, 167-168, 1927
43. J. K. Parnas, Wł. Mozołowski i W. Lewiński
Praca mięśniowa i amoniak krwi.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **7**, 168, 1927
44. J. K. Parnas, Wł. Mozołowski und W. Lewiński
Über die Ammoniakbildung im isolierten Muskel und ihren
Zusammenhang mit der Muskelarbeit.
Kli. Wo. **6**, 1710-1711, 1927
45. J. K. Parnas, Wł. Mozołowski und W. Lewiński
Über den Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Blute. IX. Der
Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit. III. Über
Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funk-
tion und Zustandsänderung.
Biochem. Z. **188**, 15-23, 1927
46. J. K. Parnas
Badania nad powstawaniem amonjaku i zależnością tej sprawy od
czynności i stanu mięśni.
Acta Biol. Exp. **1**, nr 3, 1-83, 1928

47. J. K. Parnas
Badania nad ciałami aminopurynowymi mięśni oraz uwagi o tzw. stonku jądrowo-plazmatycznym.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, 8, 104, 1928
48. J. K. Parnas, J. Jaworska, W. Lewiński i Wł. Mozołowski
O sprzężeniu dezaminacji beztlenowych z tlenowymi i o przypuszczalnej funkcji chemicznej zasad aminopurynowych zawartych w kwasach nukleinowych.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, 8, 212-215, 1928
49. J. K. Parnas
Über den Purinstoffwechsel des Muskels und über die Muttersubstanz des im Muskel entstehenden Ammoniaks. I.
Kli. Wo. 7, 1423-1424, 1928
50. J. K. Parnas
Über den Purinstoffwechsel des Muskels und über die Muttersubstanz des im Muskel entstehenden Ammoniaks. II.
Kli. Wo. 7, 2011-2012, 1928
51. J. K. Parnas
Présentation d'un appareil pour l'épuisement rapide des solutions aqueuses par des dissolvants légers que l'eau.
Bull. Soc. Chim. Biol. 11, 796-797, 1929
52. J. K. Parnas
Sur l'existence du lactacidogène.
Bull. Soc. Chim Biol. 11, 802-803, 1929
53. J. K. Parnas
Les composés puriques du muscle et leurs transformations physiologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 11, 803-804, 1929.
54. J. K. Parnas
Le métabolisme du muscle en activité.
C. R. Soc. Biol. (Réunion plénière), 101, 37-72, 1929
55. J. K. Parnas
Ammonia formation in muscle and its source.
Am. J. Physiol. 90, 467, 1929
56. J. K. Parnas
Über den Ammoniakgehalt des menschlichen Blutes.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 221, 508, 1929

57. J. K. Parnas
Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. VI. Der Zusammenhang der Ammoniakbildung mit der Umwandlung des Adeninnucleotids zu Inosinsäure.
Biochem. Z. **206**, 16-38, 1929
58. J. K. Parnas, W. Lewiński J. Jaworska und B. Umschweif
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Froschmuskel. VII.
Biochem. Z. **228**, 366-400, 1930
59. J. K. Parnas
Neue Untersuchungen über den Chemismus der Muskelkontraktion. Naturwissenschaften, **18**, 916, 1930
60. P. Ostern i J. K. Parnas
O rzekomej syntezie kwasu moczowego przez miążgę wątrobową.
Acta Biol. Exp. **5**, 19-31, 1930
61. J. K. Parnas i P. Ostern
O powstaniu amoniaku w sercu żabim przeżywającym.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **11**, 36-37, 1931
62. P. Ostern i J. K. Parnas
O powstawaniu amonjaku w związku z czynnością serca.
Acta Biol. Exp. **7**, 27-47, 1931
63. J. K. Parnas und P. Ostern
Über die Ammoniakbildung im isolierten Froschherzen. II.
Biochem. Z. **234**, 307-322, 1931
64. J. K. Parnas
Über die Muttersubstanz des im Blut und Muskel entstehenden Ammoniaks.
Biochem. Z. **239**, 18-20, 1931
65. J. K. Parnas
Über die postmortale Ammoniakbildung im Muskel.
Biochem. Z. **245**, 159-165, 1932
66. J. K. Parnas i P. Ostern
O mianowaniu farmakologicznym pochodnych adenozytowych w tkankach i wyciągach.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **12**, 62, 1932

67. J. K. Parnas i P. Ostern
O przemianie nukleotydu adeninowego w sercu i o związku tej przemiany z powstawaniem amoniaku w sercu.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **12**, 62-63, 1932
68. P. Ostern und J. K. Parnas
Über die Auswertung von Adenosinderivaten am überlebenden Froschherz.
Biochem. Z. **248**, 389-397, 1932
69. J. K. Parnas und P. Ostern
Über die Ammoniakbildung im Herzen. III. Über das Adeninnucleotid im überlebenden Froschherzen.
Biochem. Z. **248**, 398-402, 1932
70. R. Klimek und J. K. Parnas
Adenylsäure und Adeninnucleotid.
Biochem. Z. **252**, 392-396, 1932
71. J. K. Parnas
Über Ammoniakbildung in der Auftauungskontraktur und der Jodesigsäurekontraktur.
Kli Wo. **11**, 335, 1932
72. J. K. Parnas und P. Ostern
Über die Herzwirkung von Adeninderivaten, insbesondere von Nucleosiden und Nucleotiden.
Kli. Wo. **11**, 1551-1552, 1932
73. J. K. Parnas und R. Klimek
Adenylsäure und Adeninnucleotid.
Z. physiol. Chem. **217**, 75-78, 1933
74. R. Klimek und J. K. Parnas
Über die Reaktionen der Purinbasen mit Kupfersulfat und Alkali.
Z. physiol. Chem. **218**, 30-32, 1933
75. J. K. Parnas und J. Sieniawski
Eine photometrische Methode zur Bestimmung des Kohlenoxyds im Blute. I.
Biochem. Z. **266**, 102-106, 1933
76. J. K. Parnas
A propos des diastases déphosphorylantes et désaminantes des tissus musculaire et cardiaque. IVe Congres de Chimie Biologique, 8-10 Novembre 1933.
Bull. Soc. Chim. Biol. **15**, 1384-1385, 1933

77. J. K. Parnas, P. Ostern und T. Mann
Über die Verkettung der Chemischen Vorgänge im Muskel.
Biochem. Z. **272**, 64-70, 1934
78. J. K. Parnas
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. XI.
Biochem. Z. **274**, 158-162, 1934
79. J. K. Parnas, P. Ostern
Chemistry of anaerobic recovery in muscle.
Nature (London) **134**, 627, 1934
80. J. K. Parnas, P. Ostern, T. Mann
Linkage of chemical changes in muscle.
Nature (London), **134**, 1007, 1934
81. J. K. Parnas i P. Ostern
O mechanizmie glikogenolizy mięśniowej.
Przegląd Fizjologii Ruchu, **6**, 255-266, 1934
82. J. K. Parnas, P. Ostern i T. Mann
O istocie i funkcji fizjologicznej amonjogenezy mięśniowej i o sprzężeniu procesów chemicznych w mięśniu.
Roczniki Chemji, **14**, 1358-1376, 1934
83. J. K. Parnas, P. Ostern und T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. II.
Biochem. Z. **275**, 74-86, 1935
84. J. K. Parnas, P. Ostern und T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. III. Die Phosphatübertragung durch Brenztraubensäure.
Biochem. Z. **275**, 163-166, 1935
85. J. K. Parnas und W. Lewiński
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel. XXII. Über den Zusammenhang zwischen Ammoniakbildung und Muskeltätigkeit unter aeroben Bedingungen.
Biochem. Z. **276**, 398-407, 1935
86. J. K. Parnas i C. Lutwak - Mannowa
O źródłach amoniaku powstającego w mięśniu.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 112, 1935
87. J. K. Parnas und C. Lutwak - Mann
Über den Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Muskel. XXII.
1) Über die Methode zur Bestimmung der Adenosinriphosphorsäure.
2) Über die zweite ammoniakbildende Substanz des Muskelgewebes.
Biochem. Z. **278**, 11-12, 1935.

88. J. K. Parnas und P. Ostern
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. IX. Die Rolle der Phosphogene.
Biochem. Z. **279**, 94-98, 1935
89. J. K. Parnas i A. Klisiecki
O amoniaku krwi, jego pochodzeniu i kolejach fizjologicznych.
Pol. Gaz. Lek. **14**, 637-641, 1935
90. J. K. Parnas
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel.
Kli. Wo. **14**, 1017-1023, 1935
91. J. K. Parnas
El encadenamiento de los procesos quimicos en el musculo.
Resita del Circulo Medico Argentina y centros estudiantes de medicina, **35**, 410, 819-843, 1935
92. J. K. Parnas i T. Baranowski
Reakcja początkowa glikogenolizy mięśniowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 216-217, 1935
93. J. K. Parnas et T. Baranowski
Sur les phosphorylations initiales du glycogène.
C. R. Soc. Biol. **120**, 307-310, 1935
94. J. K. Parnas, C. Lutwak-Mannowa i T. Mann
Teoria sprzężenia procesów chemicznych w fermentacji alkoholowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 217-220, 1935
95. J. K. Parnas, C. Lutwak-Mann und T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Umsetzungen in der alkoholischen Gärung. II. Versuch einer Theorie.
Biochem. Z. **281**, 168-174, 1935
96. J. K. Parnas
L'enchaînement des processus enzymatiques dans le tissu musculaire.
Ve Congrès de Chimie Biologique, Bruxelles, 23-25 Octobre 1935.
Bull. Soc. Chim. Biol. **18**, 53-95, 1936
97. J. K. Parnas, B. Sobczuk et W. Mejbaum
Le mécanisme de la suppression de l'ammoniogenèse dans le muscle par l'acide pyruvique.
C. R. Soc. Biol. **121**, 701-704, 1936
98. J. K. Parnas et P. Ostern
Le mécanisme de la glycogénolyse.
Bull. Soc. Chim. Biol. **18**, 1471-1492, 1936

99. J. K. Parnas, W. Mejbaum et B. Sobczuk
Le mécanisme de l'action de la phlorhizine sur la glycogénolyse musculaire.
C. R. Soc. Chim, Biol. **122**, 1148-1152, 1936
100. J. K. Parnas
Uzupełniony schemat glikogenolizy mięśniowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **16**, 84-87, 1936
101. J. K. Parnas et I. Mochnacka
Le rôle de l'acide inosique dans la glycogénolyse musculaire.
C. R. Soc. Biol. **123**, 1173-1175, 1936
102. J. K. Parnas
Der Mechanismus der Glykogenolyse im Muskel.
Ergebnisse der Enzymforschung, **6**, 57-110, 1937
103. J. K. Parnas i I. Mochnacka
O funkcji kwasu inozynowego w przemianie mięśniowej.
Acta Biol. Exp. **11**, 1-2, 1937
104. J. K. Parnas, I. Mochnacka i Z. Augustin
O koenzymach glikogenolizy mięśniowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **17**, 164-165, 1937
105. J. K. Parnas et B. Umschweif
Sur le dosage des pentoses dans les nucléotides adényliques.
Bull. Soc. Chim. Biol. **19**, 325-335, 1937
106. J. K. Parnas
Uwagi o destylacji amoniaku przy wykonywaniu oznaczeń kjeldah-
lowskich w przyrządzie Parnasa i Wagnera.
Acta Biol. Exp. **11**, 107-110, 1937
107. J. K. Parnas und W. Szankowski
Über die gegenseitige Vertretbarkeit der Brenztraubensäure und
Oxalessigsäure als Wasserstoffakzeptoren in der Muskelglykolyse.
(Betrachtungen über den Zusammenhang zwischen aëroben und
anaërober Glykolyse.)
Enzymologia, **3**, 220-227, 1937
108. J. Hevesy, T. Baranowski, J. Guthke, P. Ostern
i J. K. Parnas
Badania nad glikolizą. Nowa metoda z zastosowaniem fosforu promie-
niotwórczego.
Sprawozdanie T-wa Naukowego we Lwowie, **18**, 88-95, 1938

109. G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostern und J. K. Parnas
Untersuchungen über die Phosphorübertragungen in der Glykolyse und Glykogenolyse.
Acta Biol. Exp. **12**, 34-39, 1938
110. J. K. Parnas
Über den Mechanismus der Muskelglykogenolyse.
J. Physiol. of the USSR, **24**, 277-293, 1938
111. J. Hevesy, T. Korzybski i J. K. Parnas
Badania nad przemianą kwasu adenilowego w ustroju zwierzęcym.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **18**, 112-113, 1938
112. T. Korzybski und J. K. Parnas
Über Abbau und Wiederaufbau der Adenylsäure im Warmblütermuskel.
Z. physiol. Chem. **255**, 195-204, 1938
113. J. K. Parnas
Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Modifikation von Parnas und Wagner.
Z. analyt. Chem. **114**, 261-275, 1938
114. J. K. Parnas
Über die Anwendung der radioaktiven Isotopen in der biologischen Forschung. Einleitung
Enzymologia, **5**, 137, 1938
115. J. K. Parnas
Über die enzymatischen Phosphorylierungen in der alkoholischen Gärung und in der Muskelglykogenolyse.
Enzymologia, **5**, 166-184, 1938
116. T. Korzybski et J. K. Parnas
Observations sur les échanges des atomes du phosphore renfermés dans l'acide adenosinetriphosphorique, dans l'animal vivant, a l'aide du phosphore marqué par du radiophosphore ³²P.
Bull. Soc. Chim. Biol. **21**, 713-716, 1939
117. T. Korzybski und J. K. Parnas
Über den Umsatz der Adenosintriphosphorsäure im lebenden Tier.
Acta Biol. Exp. **13**, 157-166, 1939
118. J. K. Parnas
L'application des isotopes radioactives pour l'exploration des échanges et des transformations biochimiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. **21**, 1059-1093, 1939

119. J. K. Parnas

Glykogenolyse.

Handbuch der Enzymologie, herausgegeben von F. F. Nord und R. Weidenhagen, New York, N. Y. — Berlin.

Akad. Verlagsg., Leipzig, 1940, 902-967.

B. PODRĘCZNIKI I PRACE REFERUJĄCE

1. J. Parnas

O związkach tłuszczowatych (lipoidach).

Nowiny Lekarskie, **25**, 591-596, 1913

2. J. K. Parnas

Wskazówki i objaśnienia do ćwiczeń z chemii lekarskiej. Kurs Uniwersytetu Warszawskiego.

Gebethner i Wolff, Warszawa, 1919. XIV + 144

3. J. K. Parnas

Nowe poglądy w nauce o odżywianiu. (O składzie jakościowym pożywienia).

Polskie Czasopismo Lekarskie, **1**, 14-15, 41-42, 60-61, 77-78, 97-98, 113-114, 128-129, 146-147, 1921

4. J. K. Parnas

Neue Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Frosche.

Biochem. Z. **114**, 1-11, 1921

5. J. K. Parnas

Chemja Fizjologiczna. Część I. Podstawy chemiczne fizjologii.

E. Wende i H. Altenberg, Warszawa-Lwów, 1922. XIII + 559

6. J. K. Parnas

Kurs praktyczny chemii fizjologicznej.

St. Köhler, Lwów, 1923. XV + 180

7. J. K. Parnas

Analiza chemiczna krwi.

Pol. Gaz. Lek. **1**, 251-252, 1922

8. J. K. Parnas

Methoden zur Beeinflussung der tierischen Entwicklung durch Gase und zur Bestimmung des respiratorischen Gaswechsels während der Entwicklungsvorgänge.

Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, herausgegeben von E. Abderhalden, 1923. Abteilung V. Teil 3 A 651-670

9. J. K. Parnas
Chemizm oddychania.
Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka.
Gubrynowicz, Lwów-Warszawa-Kraków, 1924. T. II. 123-157
10. J. K. Parnas
Czynność wątroby.
Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka.
Gubrynowicz, Lwów-Warszawa-Kraków, 1924. T. II. 261-282
11. J. K. Parnas
Mocz.
Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka.
Gubrynowicz, Lwów-Warszawa-Kraków, 1924. T. II. 283-301
12. J. K. Parnas
Skład i własności mleka.
Podręcznik Fizjologii wydany przez A. Becka.
Gubrynowicz, Lwów-Warszawa-Kraków, 1924. T. II. 335-340
13. J. K. Parnas
O nowych postępach w nauce o nowotworach złośliwych.
Przyroda i Technika, 4, 289-295, 1925
14. J. K. Parnas
Krew jako układ fizyczny.
Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich
w Warszawie. T. I. 272-274, 1925
15. J. K. Parnas
Polonica u obcych. (Nature o nauce polskiej.)
Przegląd Warszawski, nr. 48, 241-244, 1925
16. J. K. Parnas
Allgemeines und Vergleichendes des Wasserhaushaltes.
Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, herausgege-
ben von A. Bethe, G. Bergmann, G. Embden, A. Ellinger. J. Springer,
Berlin, 1926 17, Correlationen III, J. XVII, 137-160
17. J. K. Parnas
Energetyka czynności mięśniowej.
Przyroda i Technika, 5, 1-10, 1926.
18. J. K. Parnas
O Kwasicy.
Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, 5, 397-482, 1927

19. J. K. Parnas
Ernst Josef Leser.
Biochem. Z. **196**, 1-2, 1928
20. J. K. Parnas
Otto Warburg.
Pol. Gaz. Lek. **10**, 997-998, 1931
21. J. K. Parnas
The chemistry of muscle.
Annual Review of Biochemistry, **1**, 431-456, 1932
22. J. K. Parnas
The chemistry of muscle.
Annual Review of Biochemistry, **2**, 317-336, 1933
23. J. K. Parnas
Prace J. Zaleskiego nad zawartością amonjaku we krwi.
Roczniki Chemji, **13**, 640-644, 1933
24. J. K. Parnas
Prof. E. Embden.
Nature (London), **132**, 994-995, 1933
25. J. K. Parnas
Uwagi krytyczne do artykułu prof. F. Venuleta „Równowaga kwasowo-zasadowa a miarowość tętna”.
Warszawskie Czasopismo Lekarskie, **11**, 13-15, 1934
26. J. K. Parnas i Wł. Mozołowski
Podstawy chemiczne i fizjologiczne dietetyki.
Dietetyka, Delta, Warszawa, 1934, 3-64
27. J. K. Parnas
Reforma studiów lekarskich w Polsce.
Lekarz Polski, **10**, 107-108, 1934
28. J. K. Parnas
Propaganda zagraniczna nauki polskiej.
Wiadomości Literackie, **12**, nr 15 z dn. 14.4.1935
29. J. K. Parnas
Regulacja chemiczna funkcji ustrojowych.
Endokrynologia Lekarska, **1**, 3-10, 1936
30. J. K. Parnas
Przemiana materii.
Świat i Życie. Książnica Atlas, Lwów — Warszawa, 1936, T. IV.
441-456

31. J. K. Parnas
Tłuszcze.
Świat i Życie. Książnica Atlas, Lwów — Warszawa, 1936 T. IV.
1108-1116
32. J. K. Parnas
Trawienie.
Świat i Życie. Książnica Atlas, Lwów — Warszawa, 1936 T. IV.
1131-1144
33. J. K. Parnas
Węglowodany.
Świat i Życie. Książnica Atlas, Lwów — Warszawa, 1936 T. IV.
1256-1272
34. J. K. Parnas
Witaminy.
Świat i Życie. Książnica Atlas, Lwów — Warszawa, 1936 T. IV.
1378-1386
35. J. K. Parnas
O chemizmie rozkładu węglowodanów w mięśniu czynnym.
Roczniki Nauk Rolniczych i Leśnych, **40**, 385-401, 1936
36. J. K. Parnas
Laureaci Nobla: H. Dale i O. Loewi.
Gazeta Polska, 17 i 18 listop. 1936
37. J. K. Parnas
Chemia Fizjologiczna.
Podręcznik wydany pod redakcją J. K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937 T. I i II. XLIV + 575; XXVII + 682.
Następujące rozdziały pióra J. K. Parnasa:
a) Od redaktora. T. I. XXIII-XXX
b) Fizyko-chemia biologiczna. I. T. I. 1-28
c) Fizyko-chemia - biologiczna. II. T. I. 407-524
d) Cukrowce. T. I. 29-90
e) Funkcja pochodnych purynowych i przemiana purynowa. T. I.
311-318
f) Przyswajanie. T. I. 359-366
g) Tłumaczenie i wstęp do artykułu E. G. Holmes'a: Układ ner-
wowy, jego skład i przemiana. T. II. 269-278
h) wspólnie z B. Sobczukiem: Tkanka łączna, tkanki podporowe,
skóra i wydzieliny skóry. T. II. 285-299

- i) Przemiana pośrednia i tkankowa. T. II. 375-430
 - j) Wymiana oddechowa. T. II. 431-466
 - k) Odżywianie. T. II. 505-539
 - l) Dopiski i uzupełnienia. T. I. 207-209, 547-549; T. II. 621-636
38. J. K. Parnas
O mechanizmach przemian tkankowych.
Acta Biol. Exp. **11**, 292-307, 1937
39. J. K. Parnas
W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej.
Acta Biol. Exp. **11**, 357-368, 1937
40. J. K. Parnas
W sprawie nomenklatury ciał rujopędnych.
Endokrynologia Lekarska, **3**, 31-34, 1938

C. PRACE UCZNIÓW I WSPÓŁPRACOWNIKÓW WYKONANE W PRACOWNIACH I ZARĘDACH
KIEROWANYCH PRZEZ J. K. PARNASĄ

1. A. Baumann
Über den stickstoffhaltigen Bestandteil des Kephaling.
Biochem. Z. **54**, 30-39, 1913
2. M. H. Renall
Über den stickstoffhaltigen Bestandteil des Kephaling.
Biochem. Z. **55**, 296-300, 1913
3. R. Wagner
Lebertumor.
Wien. Med. Wo. **71**, 1129, 1921
4. R. Wagner
Lebertumor und Störung des Kohlehydratstoffwechsels.
Wien. Med. Wo. **71**, 1218-1219, 1921
5. R. Wagner
Zur Korrelation der Blutdrüsen.
Wien. Med. Wo. **71**, 1942-1944, 1921
6. A. Gruc i W. Jankowska
O wpływie parenteralnego podawania pepsyny na zawartość anty-
pepsyny we krwi i na wydzielanie soku żołądkowego.
Polski Przegląd Chirurgiczny, **3**, 281-286, 1924
7. A. Audova et R. Wagner
Sur le mode d'action de l'insuline.
C. R. Soc. Biol. **90**, 308-310, 1924

8. J. Dadlez et W. Jankowska
Recherche et le dosage de l'acide oxalique.
C. R. Soc. Biol. **90**, 310-311, 1924
9. W. Mozołowski
Sur la nature du sucre sanguin.
C. R. Soc. Biol. **90**, 311-313, 1924
10. A. Audova und R. Wagner
Ein Beitrag zur Kenntnis der Insulinwirkung.
Kli. Wo. **3**, 231-232, 1924
11. J. Heller
Sur la transformation des matières albuminoïdes pendant la métamorphose des lépidoptères *Deilephila euphorbiae*.
C. R. Soc. Biol. **90**, 1360-1361, 1924
12. L. Kriss
Über die nephelometrische Bestimmung von Calcium und Magnesium. I.
Biochem. Z. **158**, 203-204, 1925
13. L. Kriss
Über die nephelometrische Bestimmung von Calcium und Magnesium. II.
Biochem. Z. **162**, 359-365, 1925
14. W. Mozołowski i H. Hilarowicz
O istocie tzw. antypepsyny surowiczej.
Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich;
Warszawa, T. I. 272, 1925
15. J. Heller
Przemiana materji u owadów w czasie metamorfozy.
Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich,
Warszawa, T. I. 282-283, 1925
16. H. Hilarowicz i W. Mozołowski
W sprawie czynności hamujących trawienie pepsynowe i ich domniemanego znaczenia dla patogenezy wrzodu trawiennego żołądka.
Księga Pamiątkowa XII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich,
Warszawa, T. II. 28-29 1925
17. W. Mozołowski und H. Hilarowicz
Über das Wesen des sogenannten Serumantipepsins.
Biochem. Z. **164**, 295-311, 1925

18. J. Heller
Recherches sur le métabolisme nymphal des insectes. I.
C. R. Soc. Biol. **92**, 1006-1008, 1925
19. J. Heller
Recherches sur le métabolisme nymphal des insectes. II.
C. R. Soc. Biol. **93**, 1632-1634, 1925
20. J. Heller
Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. I. Stoffwechsel und Entwicklungsdauer bei *Deilephila euphorbiae*.
Pflügers Arch. ges. Physiol. **210**, 736-754, 1925
21. J. Heller
Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. II. Ein Respirationsapparat zur Untersuchung des Gaswechsels kleiner Tiere.
Biochem. Z. **165**, 411-419, 1925
22. W. Mozołowski
Insulina.
Przyroda i Technika, **4**, 114-117, 1925
23. J. Dadlez
O oznaczaniu kwasu moczowego w moczu.
Pol. Gaz. Lek. **4**, 104-106, 1925
24. H. Hilarowicz i Wł. Mozołowski
Über das Wesen des sogenannten Antipepsins des Blutes und über den diagnostischen Wert der Antipepsinuntersuchungen bei peptischen Magengeschwür.
Zbl. Chirurg. **52**, 2410-2413, 1925
25. J. Dadlez i H. Lenartowski
O wpływie naświetlań promieniami Roentgena na ilość kwasu moczowego we krwi i w moczu.
Pol. Gaz. Lek. **4**, 987-990, 1925
26. J. Heller
Chemische Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. III. Über die „subitane“ und „latente“ Entwicklung.
Biochem. Z. **169**, 208-234, 1926
27. B. E. Kalwaryjski
Über Samenfädenagglutination unter Einwirkung chemischer Agenzien.
Biochem. Z. **169**, 355-408, 1926

28. J. Dadlez
Über die Ausscheidung von intravenös eingeführten Calcium.
Biochem. Z. **171**, 146-155, 1926
29. J. Heller
Chemische Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten.
IV. Spinner und Schwärmer.
Biochem. Z. **172**, 59-73, 1926
30. J. Heller
Chemische Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten.
V. Über den Hungerstoffwechsel der Schmetterlinge.
Biochem. Z. **172**, 74-81, 1926
31. A. Klisiecki
Über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Blute. V. Der
Ammoniakgehalt des normalen Menschenblutes.
Biochem. Z. **172**, 442-446, 1926
32. H. Hilarowicz i Wł. Mozołowski
O istocie tzw. antypepsyny w surowicy krwi.
Polski Przegląd Chirurgiczny, **5**, 27-46, 1926
33. H. Hilarowicz und Wł. Mozołowski
Zur Antipepsinfrage.
Zbl. Chirurg. **53**, 2639-2651, 1926
34. J. Dadlez et W. Koskowski
Étude sur l'hyperthermie d'origine périphérique chez le chien.
XII-th International Physiological Congress, held at Stockholm 3-6
August 1926.
Skandiv. Archiv **49**, 1926
35. J. Dadlez i W. Koskowski
Z badań nad gorączką pochodzenia obwodowego.
Pol. Gaz. Lek. **5**, 703-704, 1926
36. A. Gruca i W. Jankowska
O zmianach w własnościach przeciwpeptycznych osocza krwi pod
wpływem pozajelitowego podawania ciał nieswoistych.
Pol. Gaz. Lek. **5**, 125-128, 1926
37. A. Gruca und W. Jankowska
Experimenteller Beitrag zur Pepsin- und sogenante Antipepsinfrage.
Z. ges. exp. Med. **52**, 692-706, 1926

38. A. Klisiecki
Über einen regelmässigen Unterschied in der Zusammensetzung des männlichen und weiblichen Menschenblutes.
Biochem. Z. **176**, 490-500, 1926
39. H. Hilarowicz
Über das Wesen der Botelhoschen Reaktion.
Z. ges. exp. Med. **53**, 121-137, 1926
40. A. Klisiecki, W. Mozołowski und M. Taubenhau
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute.
VII. Über den Ammoniakbildung im physiologisch stagnierendem Blute.
Biochem. Z. **181**, 80-84, 1927
41. W. Mozołowski und M. Taubenhau
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute.
VIII. Hängt die Ammoniakbildung im Blute mit der Anwesenheit von Cyanaten zusammen?
Biochem. Z. **181**, 85-95, 1927
42. J. Heller und E. L. Meisels
Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. VI. Röntgenografische Untersuchungen über den Entwicklungsvorgang.
Biologisches Zentralblatt, **47**, 257-264, 1927
43. E. L. Meisels und J. Heller
Über die röntgenologischen Beobachtung der Metamorphose bei Insekten. Versuche an der Schmetterlingsart *Deilephila euphorbiae*. Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen, **36**, 104-109, 1927
44. H. Hilarowicz und W. Jankowska-Hilarowicz
Über das Wesen und den Wert der diagnostischen Krebsreaktion nach Roffo.
Zbl. Chirurg. **54**, 1494-1498, 1927
45. J. Heller
Badania nad przeobrażeniem owadów.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **7**, 173-174, 1927
46. H. Hilarowicz
O istocie chemicznej i wartości klinicznej niektórych serologicznych odczynów rozpoznawczych przy raku.
Medycyna Doświadczalna i Społeczna, **7**, 149-194, 1927
47. Wł. Mozołowski
O zacyinach.
Przyroda i Technika, **6**, 433-442, 1927

48. Wł. Mozołowski und W. Lewiński
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. IV. Biochem. Z. **190**, 388-398, 1927
49. St. Chrzęszczewski i Wł. Mozołowski
Badania nad sprawą zależności wzajemnej między przemianą azotową a węglowodanową w mięśniu.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, 8, 31, 1928
50. St. Chrzęszczewski und Wł. Mozołowski
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. V. Der Verlauf der traumatischen Milchsäure- und Ammoniakbildung und ihre Abhängigkeit von hemmenden Faktoren.
Biochem. Z. **194**, 233-243, 1928
51. St. Chrzęszczewski i Wł. Mozołowski
Badania nad wzajemną zależnością powstawania kwasu mlekowego i amonjaku w mięśniach płazów.
Acta Biol. Exp. **2**, 47-60, 1928
52. Wł. Mozołowski
O źródle amonjaku krwi.
Lekarz Wojskowy, **12**, 41-57, 1928
53. J. Heller
Badania nad przeobrażeniem owadów.
Acta Biol. Exp. **2**, 225-315, 1928
54. J. Heller
Zur Auffassung des Unterschiedes zwischen subitaner und latenter Entwicklung von Schmetterlingspuppen.
Z. vergl. Physiol. **8**, 99-101, 1928
55. H. Hilarowicz und W. Janowska-Hilarowicz
Über das Wesen und den klinischen Wert der Krebsreaktion nach Roffo.
Z. Krebsforschung, **26**, 214-227, 1928
56. Wł. Mozołowski
Über die Quelle des im Muskel entstehenden Ammoniaks.
Kli. Wo. **7**, 2202-2203, 1928
57. Wł. Mozołowski i H. Hilarowicz
Uwagi o rzekomych własnościach antypeptycznych surowicy krwi.
Pol. Gaz. Lek. **7**, 409, 1928

58. Wł. Mozołowski
O budowie chemicznej hormonów.
Przyroda i Technika, 8, 49-51, 1929
59. Wł. Mozołowski
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung in Blute. X.
Über den Ursprung des Blutammoniaks.
Biochem. Z. 206, 150-157, 1929
60. J. Heller
Über den Harnstoffgehalt des Froschmuskels.
Biochem. Z. 209, 74-78, 1929
61. Wł. Mozołowski
O zaczynach proteolitycznych ustroju zwierzęcego.
Lekarz Wojskowy, 13, 573-580, 1929
62. Wł. Mozołowski
W sprawie udziału lekarzy w zawodach sportowych (ze szczególnym uwzględnieniem roli lekarza-chemika).
Przegląd sportowo-lekarski, 1, 56-60, 1929
63. Wł. Mozołowski
Zasady purynowe krwi i mięśni.
Księga Pamiątkowa XIII Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich,
Wilno. T. I. 295-296, 1930
64. P. Ostern
Über die Purinkörper im Kaninchenmuskels.
Biochem. Z. 221, 64-70, 1930
65. J. Jaworska
Ammoniak und Purinkörper bei Wärmestarre des Froschmuskels.
Biochem. Z. 221, 71-73, 1930
66. P. Ostern
Über die Ammoniakbildung im Froschherz. I.
Biochem. Z. 228, 401-406, 1930
67. T. Mann
O domniemanym udziale azotu amidowego białek krwi i mięśni
w przemianach chemicznych mięśnia pracującego.
Acta Biol. Exp. 6, 45-57, 1931
68. T. Mann
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel
und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung.
VIII. Über den angeblichen Anteil des Aminostickstoffs des Blut-

- und Muskeleiweisses an den chemischen Vorgängen im arbeitenden Muskel.
Biochem. Z. **231**, 33-38, 1931
69. Wł. Mozołowski, T. Mann i C. Lutwakówna
O powstaniu amoniaku w mięśniach zatrutych kwasem jodooctowym
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **11**, 35-36, 1931
70. U. Mroczkiewiczówna
O nukleotydach adeninowych.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **11**, 36, 1931
71. Wł. Mozołowski, T. Mann und C. Lutwak
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel
und deren Zusammenhang mit Funktions- und Zustandsänderung.
IX. Die Stellung der Ammoniakbildung in der Reihenfolge der chemischen Vorgänge im tätigen Muskel.
Biochem. Z. **231**, 290-305, 1931
72. U. Mroczkiewicz
Über die tierischen Adeninnucleotide.
Biochem. Z. **235**, 267-270, 1931
73. C. Lutwak
Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel
und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. X.
Über die Ammoniakbildung, welche den Zuckungen jodessigsäure
vergifteter Muskel entspricht.
Biochem. Z. **235**, 485-489, 1931
74. B. Umschweif
Über Pankreaspräparate.
Kli. Wo. **10**, 211-213, 1931
75. P. Ostern
Budowa czerwonego barwnika krwi.
Pol. Gaz. Lek. **10**, 892-894, 910-912, 1931
76. Wł. Mozołowski
Uwagi o sprawie wykrywania cukru gronowego w moczu.
Praktyka Lekarska, **6**, 1-4, 1932
77. B. Umschweif
Bemerkungen über Lipasebestimmungen in Fermentpräparaten.
Biochem. Z. **249**, 75-82, 1932

78. A. Nadel
Chemische Studien an der menschlichen Haut.
I. Untersuchungen an der Leichenhaut, kritik der Messmethoden.
Biochem. Z. **249**, 83-94, 1932
79. Wł. Mozołowski i T. Mann
Amoniogeneza w krwi żółwia.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **12**, 127-129, 1932
80. Wł. Mozołowski, T. Baranowski, J. Reis i B. Sobczuk
Amoniogeneza i rozpad grupy pyrofosforanowej w miazdze mięśni żaby.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **12**, 207-208, 1932
81. Wł. Mozołowski, J. Reis und B. Sobczuk
Ammoniakbildung und Pyrophosphatzerfall im Muskel.
Biochem. Z. **249**, 157-160, 1932
82. Wł. Mozołowski und T. Mann
Über die Ammoniakbildung im Schildkrötenblut. I.
Biochem. Z. **249**, 161-175, 1932
83. Wł. Mozołowski und T. Mann
Über die Ammoniakbildung im Schildkrötenblute. II.
Die Bildung eines phenolartigen Körpers, welche die Ammoniakbildung im hämolysierten Schildkrötenblut begleitet.
Biochem. Z. **250**, 487-488, 1932
84. Wł. Mozołowski
Nowe badania doświadczalne nad wydzielaniem moczu w nerce.
Pol. Gaz. Lek. **11**, 913-916, 1932
85. P. Ostern
Über die Darstellung der Muskeladenyl- und Inosinsäure.
Biochem. Z. **254**, 65-70, 1932
86. A. Nadel
Chemische Studien an der menschlichen Haut. II. Untersuchungen an der normalen und der pathologischen Menschenhaut.
Arch. Dermat. Syph. **165**, 507-524, 1932
87. A. Nadel
Chemische Studien an der menschlichen Haut. III. Über die sog. Rest-N-Differenz (Doppelstickstoff) des menschlichen Blutes sowie der menschlichen Haut und ihr Verhalten im Verlaufe mancher Hautkrankheiten.
Arch. Dermat. Syph. **167**, 53-64, 1933

88. I. Vogelfänger
Über das Vorkommen von Acetylcholin im Rinderblut.
Z. physiol. Chem. **214**, 109-110, 1933
89. Wł. Mozołowski
Przemiany chemiczne w mięśniu pracującym.
Lekarz Wojskowy, **21**, 193-204, 297-302, 1933
90. P. Ostern und T. Mann
Der Mechanismus der Desaminierungen im Herzen und im Skelettmuskel.
Biochem. Z. **260**, 326-353, 1933
91. R. Klimek
Adenylsäure und Adeninnucleotid. II.
Biochem. Z. **262**, 1-2, 1933
92. Wł. Mozołowski und B. Sobczuk
Ammoniakbildung und Pyrophosphatzerfall im Muskel. II.
Biochem. Z. **265**, 42-49, 1933
93. Wł. Mozołowski i B. Sobczuk
Rozpad kwasu adozynotrójfosforowego w mięśniu.
Przegląd Fizjologii Ruchu, **5**, 241-258, 1933
94. C. Lutwakówna i Wł. Mozołowski
Stan chemiczny mięśni znużonych w różnych temperaturach.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **13**, 204-205, 1933
95. C. Lutwakówna i Wł. Mozołowski
Zmiany chemiczne w mięśniach znużonych w różnych temperaturach.
Przegląd Fizjologii Ruchu **5**, 259-270, 1933
96. T. Mann
Der Mechanismus der Desaminierungen im Skelettmuskel.
Biochem. Z. **266**, 162-168, 1933
97. Wł. Mozołowski
Ogólne wiadomości z chemii gazów bojowych. I.
Praktyka Lekarska, **7**, 141-147, 1933
98. Wł. Mozołowski
Ogólne wiadomości z chemii gazów bojowych. II
Praktyka Lekarska, **8**, 33-49, 1934
99. A. F. Schütz und B. Umschweif
Über einige Reaktionen der Purinbasen mit Metallsalzen.
Biochem. Z. **268**, 326-330, 1934

100. T. Mann
Sind Methylguanidinoxalsäure (Kreaton), Methylguanidin und Oxalsäure natürliche Bestandteile des Muskelgewebes?
Biochem. Z. **268**, 339-344, 1934
101. T. Mann
O ciałach wywołujących raka.
Pol. Gaz. Lek. **13**, 69-70, 1934
102. P. Ostern
Über Di-adenosin-pentaphosphoräure (Herz-nucleotid).
Biochem. Z. **270**, 1-5, 1934
103. T. Mann
O kwasie askorbinowym czyli witaminie C.
Przyroda i Technika, **13**, 154-161, 1934
104. J. Reis
La nucléotidase et sa relation avec la désamination des nucléotides dans le coeur et dans le muscle.
Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 385-399, 1934
105. B. Umschweif
Sur les purines nucléoprotéidiques dans le muscle.
Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 543-549, 1934
106. A. Nadel
Hautkrankheiten und Serumlipase (Tributyrase). I. II.
Arch. Dermat. Syph. **170**, 253-262, 331-340, 1934
107. C. Lutwak und Wł. Mozołowski
Der Einfluss der Temperatur auf die chemische Zusammensetzung der anaerob ermüdeten Muskeln.
Biochem. Z. **272**, 157-166, 1934
108. F.A. Schütz
Zur Frage des natürlichen Vorkommens von 2-Oxy-6-aminopurin.
Biochem. Z. **273**, 52-55, 1934
109. T. Mann und P. Ostern
Über Ammoniakgehalt und Ammoniakbildung im Muskel. XXI. Über die Hemmung der Ammoniakbildung durch verschiedene alkalische Pufferlösungen.
Biochem. Z. **274**, 154-157, 1934
110. P. Ostern
O wchłanianiu jelitowym.
Pol. Gaz. Lek. **13**, 537-539, 560-563, 1934

111. T. Baranowski und Wł. Mozołowski
Die Saccharose im Harn bei einem Falle von Pankreaserkrankung.
Kli. Wo. **13**, 955-956, 1934
112. T. Baranowski
Oznaczenia czynności wydzielniczej nerki w przypadku sacharozurii
alimentarnej.
Pol. Gaz. Lek. **13**, 611-612, 1934
113. T. Baranowski
Krzywe glikemiczne w różnych stanach chorobowych.
Praktyka Lekarska, **8**, 173-186, 1934
114. P. Ostern
O przemianach kwasu adenilowego w tkankach.
Przegląd Fizjologii Ruchu, **6**, 267-318, 1934
115. P. Ostern
Über den Mechanismus der Jodessigsäurevergiftung.
Biochem. Z. **275**, 87-89, 1935
116. C. Lutwak-Mann
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. IV. Über
die Spezifität der Phosphoglycerinsäure als Phosphatdonator.
Biochem. Z. **275**, 167-168, 1935
117. P. Ostern und T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. V. Über
den Zusammenhang der Vorgänge der anaeroben Erholung mit der
Atmung.
Biochem. Z. **276**, 408-415, 1935
118. T. Mann
O mechanizmie fosforylacji w przemianie mięśniowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 110-111, 1935
119. P. Ostern, T. Baranowski i J. Reis
O funkcji fosfagenów w czynności mięśniowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 111-112, 1935
120. C. Lutwak-Mannowa
O przemianach chemicznych w mięśniu zatrutym kwasem jodo-
octowym.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 112, 1935
121. T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. VI. Die
Phosphatübertragung durch Phosphobrenztraubensäure.
Biochem. Z. **277**, 380-382, 1935

122. C. Lutwak-Mannowa i T. Mann
O sprzężeniu przemian chemicznych w fermentacji alkoholowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 220, 1935
123. J. Heller
Latencja poczwerek motyli a kwas adenilopyrofosforowy.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **15**, 221, 1935
124. P. Ostern, T. Baranowski et J. Reis
Sur la formation de l'acide adenosinetriphosphorique et sur la rôle
des phosphagènes.
C. R. Soc. Biol. **118**, 1414-1417, 1935
125. T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. VII. Die
Phosphatabspaltung aus Phosphoglycerinsäure im fluoridvergifteten
Muskelbrei.
Biochem. Z. **279**, 82-84, 1935
126. P. Ostern, T. Baranowski und J. Reis
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. VIII.
Phosphoglycerinsäure und Adenylsäure.
Biochem. Z. **279**, 85-93, 1935
127. C. Lutwak-Mann und T. Mann
Über die Verkettung der chemischen Umsetzungen in der alkoholi-
schen Gärung. I. Bildung und Spaltung der Adenosintriphosphorsäure
und deren Zusammenhang mit den Vorgängen der Zuckerspaltung.
Biochem. Z. **281**, 140-156, 1935
128. P. Ostern und T. Baranowski
Über die Verkettung der chemischen Vorgänge im Muskel. X. (Zug-
leich II. Mitteilung über Diadenosinpentaphosphorsäure).
Biochem. Z. **281**, 157-167, 1935
129. T. Mann
O zaczynach odszczepiających amoniak w mięśniu szkieletowym.
Kosmos, **60**, 113-158, 1935
130. T. Baranowski
Die Saccharose im Blute bei einem Falle von Pankreaserkrankung.
Kli. Wo. **14**, 1719-1722, 1935
131. T. Mann
O auksynach czyli ciałach regulujących wzrost roślin.
Przyroda i Technika, **15**, 13-19, 1936

132. P. Ostern i J. A. Guthke
Przemiany początkowe glikogenolizy i wyjaśnienie funkcji estru cukrowojednofosforowego.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **16**, 79-82, 1936
133. B. Sobczuk i W. Mejbaum
Mechanizm fosforylacji kwasu adenilowego przez kwas pyrogro-
nowy i fosforany.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **16**, 82-84, 1936
134. P. Ostern et J. A. Guthke
Les transformations initiales de la glycogénolyse.
La fonction de l'ester hexosemonophosphorique. I.
C. R. Soc. Biol. **121**, 282-285, 1936
135. J. Heller
Les composés phosphoriques chez la nymphe et le papillon de
Deilephila euphorbiae.
C. R. Soc. Biol. **121**, 414-416, 1936
136. P. Ostern, J. A. Guthke et J. Terszakowec
Les transformations initiales de la glycogénolyse.
La fonction de l'ester hexosemonophosphorique. II.
C. R. Soc. Biol. **121**, 1133-1135, 1936
137. P. Ostern, J. A. Guthke und J. Terszakowec
Über die Bildung des Hexose-monophosphorsäureesters und dessen
Umwandlung in Fruktose-diphosphorsäure-ester im Muskel.
Z. physiol. Chem. **243**, 9-37, 1936
138. C. Lutwak-Mann
Przemiany chemiczne w mięśniu pod wpływem zatrucia kwasem
jodoctowym.
Archiwum T-wa Naukowego we Lwowie, Dział III. **7**, z. 6, 1-34, 1936
139. B. Umschweif i K. Gibaylo
Zagadnienie występowania pyrofosforanu w tkankach zwierzęcych.
Acta Biol. Exp. **11**, 6-7, 1937
140. B. Umschweif i K. Gibaylo
Kommt Pyrophosphat im Muskel und in anderen Geweben vor?
Z. physiol. Chem. **246**, 163-170, 1937
141. J. Reis
O 5-nukleotydzacie.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **17**, 77-79, 1937

142. P. Ostern, J. A. Guthke und B. Umschweif
Phosphorylierung von Stärke durch Muskelextrakt.
Acta Biol. Exp. **11**, 118-119, 1937
143. P. Ostern, J. Guthke, W. Słobodzian und
J. Terszakowac
Wird Phosphoglukonsäure im Muskel umgesetzt?
Acta Biol. Exp. **11**, 120-121, 1937
144. J. Reis
O 5-nukleotydzacie.
Acta Biol. Exp. **11**, 122-123, 1937
145. B. Umschweif i K. Gibayło
Dalsze badania nad związkami wielofosforowymi w komórkach drożdżowych i w mięśniu szkieletowym.
Acta Biol. Exp. **11**, 124-126, 1937
146. P. Ostern und J. Guthke
Vergleichende Untersuchungen über die Glykogenolyse.
Acta Biol. Exp. **11**, 175-177, 1937
147. B. Umschweif i K. Gibayło
O występowaniu nowego związku wielofosforowego w komórkach drożdżowych.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie **17**, 165, 1937
148. K. Gibayło et B. Umschweif
Sur un constituant phosphorique minéral nouveau, découvert dans la levure, et sur la constitution des acides adénosine-polyphosphoriques.
C. R. Soc. Biol. **125**, 275-276, 1937
149. W. Szankowski
O związkach istniejących między glikogenolizą beztlenową a tlenową i o różnicach między przebiegiem tych procesów.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **17**, 184, 1937
150. B. Sobczuk
O roli kwasu pyrogronowego w glikogenolizie mięśniowej i o mechanizmie działania floryzyny na zahamowanie glikolizy.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **17**, 185, 1937
151. J. Reis
Über die spezifische Phosphatase der Nervengewebe.
Enzymologia. **2**, 110-116, 1937

152. P. Ostern und A.J. Guthke
Über die Darstellung der Phosphoglycerinsäure.
Z. physiol. Chem. **248**, 155-158, 1937
153. J. Reis
Über die Aktivität der 5-Nukleotidase in den tierischen und menschlichen Geweben.
Enzymologia, **2**, 183-190, 1937
154. P. Ostern i J. Terszakowec
O enzymatycznej syntezie kwasu adenozyino-5-fosforowego z adenozyiny.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **17**, 242-244, 1937
155. P. Ostern und J. Terszakowec
Über die enzymatische Synthese von Adenosin-5-monophosphorsäure (Muskeladenylsäure) aus Adenosin. I.
Z. physiol. Chem. **250**, 155-157, 1937
156. J. Reis
Badania nad swoistością fosfataz.
Archiwum T-wa Naukowego we Lwowie, Dział III.
8, z. 7, 1-19, 1937
157. P. Ostern, J.A. Guthke, B. Umschweif
Enzymatische Phosphorylierung von Stärke.
Enzymologia, **3**, 5-9, 1937
158. P. Ostern
Witaminy a hormony.
Polska Stomatologia oraz Przegląd Dentystyczny,
15, 279-296, 1937
159. P. Ostern
Tłuszczowce.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa
Delta, Warszawa, 1937, T. I. 91-143.
160. T. Mann
Karotenoidy.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J. K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T.I. 179-205.
161. T. Mann
Barwiki pirolowe.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J. K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T.I. 319-376.

162. T. M a n n
Melaniny i niektóre barwiki zwierzęce.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J. K. Parnasa,
Delta, Warszawa, 1937, T. I. 367-376.
163. T. M a n n
Utleniania i redukcje.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa,
Delta, Warszawa, T.I. 525-546.
164. P. O s t e r n
Trawienie jelitowe i kał.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 169-192.
165. T. B a r a n o w s k i
Wątroba.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 193-213.
166. P. O s t e r n
Chemia mięśnia.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 215-267.
167. J. R e i s
Chemia gałki ocznej.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 279-284.
168. C e c y l i a M a n n
Mleko.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J. K. Parnasa
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 467-480.
169. T. B a r a n o w s k i
Najważniejsze metody analizy krwi i moczu.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 593-620.
170. I. M o c h n a c k a
Tablice fizjologiczno-chemiczne.
Chemia Fizjologiczna, wydana pod red. J.K. Parnasa.
Delta, Warszawa, 1937, T. II. 637-649.

171. Z. Augustin
Badania porównawcze nad początkowym etapem glikogenolizy mięśniowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **18**, 95-96, 1938
172. P. Ostern, T. Baranowski, J. Terszakowec
Fosforylacja adenozyiny przez drożdże i znaczenie tego procesu dla fermentacji alkoholowej.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **18**, 96-99, 1938
173. P. Ostern, T. Baranowski und J. Terszakowec
Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs in der alkoholische Gärung.
Acta Biol. Exp. **12**, 40-44, 1938
174. P. Ostern, T. Baranowski und J. Terszakowec
Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung. II.
Z. physiol. Chem. **251**, 258-284, 1938
175. Z. Augustin
Vergleichende Untersuchungen über Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen.
Acta Biol. Exp. **12**, 45-49, 1938
176. Z. Augustin
Über die Anfangsvorgänge der Glykogenolyse im Muskel und im Herzen.
Z. physiol. Chem. **255**, 61-74, 1938
177. A. Nadel
Über das Verhalten von Eiweissverdauungsfractionene im Schulz-Daleschen Experiment. II.
Z. ges. exp. Med. **103**, 446-450, 1938
178. A. Nadel
Wartość i znaczenie prób uczuleniowych w rozpoznawaniu chorób alergicznych skóry.
Pol. Gaz. Lek. **17**, 586-589, 1938
179. P. Ostern, J. Terszakowec i St. Hubl
Powstawanie adenozyiny i rozpad kwasu nukleinowego w drożdżach.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **18**, 198-199, 1938
180. T. Baranowski
Badania nad przenoszeniem grup fosforanowych przez enzymy mięśniowe.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **18**, 199-200, 1938

181. P. Ostern, J. Terszakoweć und St. Hubl
Über die Phosphorylierung des Adenosins durch Hefe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die alkoholische Gärung. III. Bildung des Adenosins und Zerfall der Nucleinsäure in der Hefe.
Z. physiol. Chem. **255**, 104-125, 1938
182. T. Baranowski
Untersuchungen über phosphatübertragenden Enzyme im Muskelextrakt.
Acta Biol. Exp. **12**, 122-125, 1938
183. T. Korzybski
Nowe poglądy na rolę przysadki mózgowej w przemianie węglowodanów.
Endokrynologia Lekarska, **3**, 3-7, 1938
184. J. Reis
Über die Spezifität der Prostata-und Hodenphosphatase.
Enzymologia, **5**, 251-253, 1938
185. T. Baranowski
Über das Enzymsystem der Übertragung von Phosphatgruppen aus der Phosphoglycerinsäure auf Adenylsäure.
Enzymologia, **5**, 262-272, 1938
186. T. Baranowski
Badania nad przenoszeniem grup fosforanowych przez enzymy mięśniowe.
Archiwum T-wa Naukowego we Lwowie, Dział III **10**, z. 7, 1-50, 1938
187. W. Mejbaur
Über die Bestimmung kleiner Pentosemenge insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.
Z. physiol. Chem. **258**, 117-120, 1939
188. B. Sobczuk
Rola kwasu pyrogronowego oraz działanie floryzyny w glikogenolizie mięśniowej.
Archiwum T-wa Naukowego we Lwowie, Dział III. **11**, z. 3, 1-26, 1939
189. T. Baranowski
Skryształizowane białka mięśni królika.
Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie, **19**, 72-74, 1939
190. T. Baranowski
Protéines cristallisables de l'extrait musculaire de lapin.
C. R. Soc. Biol. **130**, 1182-1184, 1939

191. P. Ostern und St. Hubl
Darstellung von Glykogen.
Acta Biol. Exp. **13**, 89-90, 1939
192. W. Mejbaur
Mikrometoda oznaczania pentoz i zastosowanie jej do oznaczania ko-
zymazy i fosfokozymazy.
(Praca doktorska), 1939
193. I. Mochnacka
Procesy wstępne glikogenolizy.
(Praca doktorska), 1939
194. T. Baranowski
Über die Krystallisation von Myogen.
Acta Biol. Exp. **13**, 124-127, 1939
195. T. Baranowski
Die Isolierung von krystallisierten Proteinen aus Kaninchenmuskeln.
Z. physiol. Chem. **260**, 43-55, 1939

zebrała
Irena Mochnacka

Prace Jakuba Karola Parnasa wykonane w latach 1907 — 1939

- A. Prace badawcze
B. Podręczniki i prace referujące
C. Prace uczniów i współpracowników wykonane w pracowniach i zakła-
dach kierowanych przez J.K. Parnasa

UŻYTE SKRÓTY CZASOPISM:

- Acta Biol. Exp.* — *Acta Biologiae Experimentalis*
Am. J. Physiol. — *American Journal of Physiology*
Arch. Dermat. Syph. — *Archiv für Dermatologie und Syphilis*
Ber. Chem. Ges. — *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*
Biochem. Z. — *Biochemische Zeitschrift*
Bull. Soc. Chim. Biol. — *Bulletin de la Société de Chimie biologique*
C. R. Soc. Biol. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*
J. Physiol. of the USSR — *Journal of Physiology of USSR*
Kli. Wo. — *Klinische Wochenschrift*
Pflügers Arch. ges. Physiol. — *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*
Pol. Gaz. Lek. — *Polska Gazeta Lekarska*
Wien. Med. Wo. — *Wiener Medizinische Wochenschrift*
Zbl. Chirurg. — *Zentralblatt für Chirurgie*

- Zbl. Physiol.* — Zentralblatt für Physiologie
Z. analyt. Chem. — Zeitschrift für analytische Chemie
Z. ges. exp. Med. — Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medicin
Z. physiol. Chem. — Zeitschrift für physiologische Chemie
Z. vergl. Physiol. — Zeitschrift für vergleichende Physiologie

ТРУДЫ ЯКОВА КАРЛА ПАРНАСА
ИСПОЛНЕННЫЕ ИМ В 1907—1939 ГГ.

- A) Исследовательские труды
Б) Учебники и рефераты
B) Работы учеников и сотрудников, исполненные в лабораторных и научных учреждениях руководимых Я. К. Парнасом.

THE SCIENTIFIC WORK OF JAKUB KAROL PARNAS from 1907 to 1939

- A. Scientific investigations.
B. Textbooks and reviews.
C. Studies carried out by pupils and co-workers in laboratories and scientific centres directed by J.K. Parnas.

IGNACY REIFER, DANUTA KLECZKOWSKA, MARIA SOLECKA

BADANIA NAD WPŁYWEM JARYZACJI NA AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH ENZYMÓW W PSZENICACH OZIMYCH

Z Działu Biochemii Roślin Zakładu Biochemii PAN

Kierownik Działu: prof. dr I. Reifer

Kierownik Zakładu: prof. dr J. Heller

W ostatnich latach zostały podjęte próby wykazania różnic w procesach biochemicznych w kielkach pszenic ozimych i jaryzowanych przez porównanie aktywności niektórych enzymów. Według Oparina i Zjenczenki (7) oraz Sisakiana (9) jaryzacja powoduje przesunięcie równowagi procesów enzymatycznych syntezy i hydrolizy sacharozy w kielkach pszenicy ozimej w kierunku hydrolizy.¹⁾ Prace Richtera, Rancana i Pekiera (8), dotyczące aktywności katalazy wykazały rosnącą aktywność tego enzymu w ziarnach pszenicy ozimej w procesie jaryzacji osiągającą maksimum w 20 i 25 dniu. Filippienko (1) podaje, że różnice w aktywności katalazy utrzymują się również w zielonej roślinie, przy czym maksymalną aktywność osiąga katalaza podczas kwitnienia rośliny.

W naszym laboratorium podjęto badania w celu wykazania wpływu jaryzacji na działalność enzymów syntetyzujących i hydrolizujących sacharozę oraz katalazy w niektórych polskich odmianach pszenicy ozimej, uprawianych w naszych warunkach klimatycznych. Ponieważ uzyskane wyniki są na ogół odmienne od wyników wymienionych autorów, uznano za właściwe ogłosić je drukiem.

Dla badania syntezy sacharozy wprowadzono do kielka cukier inwertowany, a dla badania hydrolizy — sacharozę. Cukry wprowadzono do rośliny za pomocą infiltracji próżniowej według metody Kursanowa (4). Aktywność katalazy oznaczono w aparacie Warburga mierząc wydzielony

¹⁾ Synteza nie jest odwrotnością hydrolizy, jednak postanowiono utrzymać tę terminologię ze względu na to, że jest ona powszechnie stosowana przez wymienionych autorów.

tlen z wody utlenionej według zmodyfikowanej metody przez Grabiańską (3).

I. OPIS METODY INFILTRACJI PROŻNIOWEJ

Jednogramowe odważki kielków pszenicy umieszczano w woreczkach z gazy i wprowadzano do probówek o pojemności 30 ml (długości 10 cm, szerokości 2 cm). Do probówek odmierzano po 20 ml:

- 1) wody destylowanej (próba kontrolna)
- 2) 0,2 M roztworu cukru inwertowanego (mieszaniny glukozy i fruktozy)
- 3) 0,1 M roztworu sacharozy.

Po zamknięciu korkiem zaopatrzonym w zagiętą rurkę szklaną umieszczano probówki w ekzykatorze próżniowym, z którego za pomocą pompy wodnej usuwano powietrze. Ekzykator odłączano od pompy po 15 minutach od chwili ukazania się pęcherzyków powietrza w płynach, po czym wpuszczano powietrze powoli w ciągu 1—2 minut. Pod wpływem zwiększającego się ciśnienia roztwory, w których znajdował się badany materiał, przenikały do liści, co łatwo można było stwierdzić na podstawie zjawiania się oddzielnych ciemno zielonych plam zlewających się szybko w jedną całość. Po wyrównaniu ciśnień pozostawiano liście przez 5 minut w roztworach aż do pełnego wypełnienia przestrzeni międzykomórkowych roztworami. Następnie wyjmowano woreczki z kielkami z roztworów i szybko przemywano bieżącą wodą w celu usunięcia roztworów z powierzchni liści. Wyjmowano kielki z woreczków i osuszano bibułą filtracyjną, co sprowadza naważki do jednakowej wagi. Następnie umieszczano liście na bibule filtracyjnej w suszarce z przewiewem powietrza, gdzie w temperaturze 26—28° usuwano wodę infiltrowaną. Liście suszono tak długo, aż osiągały one swoją wagę wyjściową 1 g. Czas podsuszania wynosił 45—60 minut.

Po uzyskaniu wagi wyjściowej umieszczano próbki w szalkach Petriego, w które wstawiano małe szkiełko zegarkowe z wilgotną watą, aby zapobiec nadmiernemu parowaniu i utrzymać wyjściową wagę. Próby pozostawiano w ciemnym miejscu w temperaturze 22—24° na przeciąg 1 godziny. Po upływie oznaczonego czasu przenoszono próbki do zlewek z wrzącą wodą i przetrzymywano przez 3 minuty w celu zinaktywowania enzymów. Czas trwania przygotowania próby do analizy wynosił od 2—3 godzin.

Po oziębieniu zawartość zlewki splukiwano do homogenizatora typu Waring Blendor i rozdrabniano liście. Następnie homogenizat przenoszono ilościowo do kalibrowanego cylindra miarowego o pojemności 100 ml i uzupełniano wodą do kreski. Po przesączeniu przez gazę pobierano 2 ml

przesączu, odbiałczano wodorotlenkiem kadmu i oznaczano cukry redukujące metodą żelazicyjankową według Fujita Akiji i Danzo Iwatake (2) w modyfikacji Wolszlegier (11). Dla oznaczenia sacharozy poddano 10 ml przesączu godzinnej hydrolizie enzymatycznej preparatem inwertazy w temp. 56—60°C. Po rozcieńczeniu do objętości 25 ml pobierano do oznaczenia 5 ml roztworu, co odpowiada 2 ml wyjściowego przesączu.

Preparat zawierający inwertazę sporządzono z wodnego wyciągu drożdży suszonych w temp. 40—45°C przez strącenie acetonem. Dla hydrolizy używano 1 ml roztworu preparatu enzymatycznego zbuforowanego M/15 KH_2PO_4 o zawartości 1,2—1,3 mg acetonowego proszku.

Z ilości ml zużytego 0,005 N tiosiarczanu sodowego obliczono ilości cukrów redukujących i sacharozy (wyrażone jako glukoza). Poniżej podajemy przykład obliczenia stosunku syntezy do hydrolizy sacharozy (s/h).

Analiza wykazała, że przy przeliczeniu na 1 g świeżej masy:

- 1) próba infiltrowana wodą zawierała 15,570 mg cukrów redukujących i 0,870 mg sacharozy
tj. razem 16,440 mg cukrów.
- 2) próba infiltrowana 0,2 M cukrem inwertowanym zawierała 17,310 mg cukrów redukujących 2,000 mg sacharozy
tj. razem 19,310 mg cukrów.
- 3) próba infiltrowana 0,1 M sacharozą zawierała 17,860 mg cukrów redukujących 2,00 mg sacharozy
tj. razem 19,860 mg cukrów.

Wynika stąd, że do próby (2) wprowadzono 2,870 mg, a do próby (3) 3,420 mg cukrów. Dalej znajdujemy, że w ciągu 3 godzin doświadczenia w przeliczeniu na 1 g świeżej masy liści

zostało zsyntetyzowanej: $2,00 - 0,87 = 1,13$ mg sacharozy

tj. 39% wprowadzonego cukru

zostało zinvertowanej: $17,86 - 15,57 = 2,290$ mg sacharozy

tj. 60% wprowadzonego cukru.

Stosunek zatem syntezy do hydrolizy sacharozy wynosi:

$$s/h = \frac{1.13}{2.290} = 0.49$$

2. SPRAWDZENIE METODY INFILTRACJI PRÓŻNIOWEJ

Badania wpływu jaryzacji na zmianę stosunku syntezy do hydrolizy sacharozy rozpoczęto sprawdzeniem metody infiltracji próżniowej. W tym celu infiltrowano kilka równoległych prób jednorodnego materiału roślin-

nego wodą, cukrem inwertowanym i sacharozą. Wyniki badań wstępnych przedstawione są w tablicy 1.

Tablica 1

Wpływ infiltracji na zawartość cukrów redukujących w roślinach

Lp. odwa- żek	Infiltrowano	Waga 1 g mater. po infiltracji		na 0,02 g rośliny ml 0,005 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ślepa — ml zużyte)					
		po zewn. osuszeniu	po susze- niu w temp. 28°C	Jednocukry		Śred- nia	Jedno + Dwucukry		Śred- nia
1	wodą	1,217	1,016	1,11	1,09	1,10	1,33	1,38	1,35
2	„	1,209	1,008	1,08	1,11	1,09	1,39	1,36	1,36
3	„	1,199	1,021	1,13	1,10	1,11	1,36	1,40	1,38
4	cukrem inwerto- wanym	1,250	1,000	1,71	1,67	1,69	2,34	2,34	2,34
5	„ „	1,250	1,016	1,68	1,72	1,70	2,36	2,38	2,37
6	„ „	1,253	1,023	1,73	1,75	1,74	2,43	2,39	2,41
7	„ „	1,198	0,998	1,71	1,72	1,71	2,41	2,41	2,41
8	„ „	1,215	0,982	1,78	1,72	1,75	2,36	2,40	2,38
9	sacharozą	1,203	1,006	1,75	1,77	1,76	2,29	2,29	2,29
10	„	1,190	0,990	1,72	1,74	1,73	2,23	2,19	2,21
11	„	1,193	0,983	1,73	1,74	1,73	2,22	2,20	2,21
12	„	1,207	0,990	1,66	1,72	1,69	2,19	2,20	2,19
13	„	1,205	1,000	1,79	1,79	1,79	2,28	2,28	2,28

Jak wynika z tablicy 1 zawartość cukrów waha się nieznacznie. Różnice w wadze liści po suszeniu w temperaturze 28° nie przekraczają 5%.

3. METODA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI KATALAZY

Aktywność katalazy oznaczano w aparacie Warburga. Do oznaczeń użyto homogenizatu roślinnego. Do środkowego naczynka Warburga pipetowano po 2 ml homogenizatu a do bocznego odgałęzienia 1 ml 0.044 N wody utlenionej. Naczynka umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 7°C. Pomiarów ciśnienia dokonywano po 4 i 8 minutach od chwili wymieszania homogenizatu z wodą utlenioną. Odczyt ciśnienia tlenu po 8 minutach przeliczano następnie na mm³ tlenu w temperaturze 0°C przy ciśnieniu 760 mm Hg. Ilość wydzielonego tlenu była podstawą dla porównywania wyników.

Część doświadczalna

A. JARYZACJA PSZENIC OZIMYCH

Jaryzację odmian pszenicy ozimej: — Dańkowska Graniatka, Eka, Antonińska, Wczesna i Kujawianka — przeprowadzono według metody Ły-senki (6). Nasiona doprowadzono do około 40% wilgotności w stosunku do powietrznie suchej masy i lekko podkiełkowane ziarna jaryzowano w temperaturze 1—4°C przez 15—75 dni zależnie od odmiany badanych pszenic (10).

Jaryzację pszenicy ozimej: — Pszenica Śląska, Leszczyńska Wczesna i Dańkowska Graniatka — zbiór 1954 r. wykonano według sposobu opisanego przez Lewickiego (5). Wstępne przygotowanie materiału polegało na trzykrotnym zwilżaniu nasion w temperaturze 10—12°C i doprowadzeniu wilgotności ziarna do około 35% w stosunku do wagi ziarna, po czym jaryzowano materiał w temperaturze 1—4°C. W obu wypadkach nasiona mieszano co pewien czas w celu zwiększenia dopływu powietrza, koniecznego do normalnego przebiegu procesów oddychania oraz sprawdzano wilgotność i temperaturę.

Do doświadczeń używano kilkudniowe kielki pszenicy jaryzowanej i kontrolnej, które wyrosły w piasku, w wilgotności optymalnej, w warunkach pokojowych.

B. MORFOLOGIA

Różnice w wyglądzie roślin zaznaczyły się silnie w pierwszych dniach wzrostu. Pod względem wysokości różnice były nieznaczne i wahały się w granicach 1,5 cm, natomiast różnice w cechach morfologicznych były bardzo wyraźne i zgodne z opisem podanym przez Filippienko (1). Pierwszy liść u pszenic jaryzowanych tworzył płaską blaszkę liściową, podczas gdy u pszenic niejaryzowanych zwinięty był w rurkę. Dziesięciodniowe rośliny różniły się długością odpowiednich liści i ich ustawieniem w stosunku do osi wzrostu. U pszenic jaryzowanych liść zewnętrzny był zawsze krótszy od wewnętrznego i tworzył z nim kąt prosty, u roślin kontrolnych liść zewnętrzny był dłuższy i tworzył z osią wzrostu kąt ostry.

C. AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNYCH PRZEMIŁAN SACHAROZY

Badanie wpływu jaryzacji na zmianę stosunku syntezy do hydrolizy sacharozy przeprowadzono *in vivo* metodą infiltracji próżniowej na pszenicy ozimej odmian: Dańkowska Graniatka, Eka, Pszenica Śląska, Kujawianka, Antonińska Wczesna. Przebadano procesy syntezy i hydrolizy sacharozy w zielonych i etiolowanych kielkach pszenicy ozimej i jaryzowanej w wieku 4—18 dni. Wyniki doświadczeń przedstawiono w tablicach 2 i 3.

Tabli

Synteza i hydroliza sacharozy w zielonych kielkach pszenicy ozimej zwykłej
Wyniki podano w mg glukozy na 1 g świeżej tkanki

Odmiana pszenicy	wykazała	Wiek rośliny								
		4		5		6		7		
		K	J	K	J	K	J	K	J	
Dańkowska Graniatka jar. 40 d.	synteza	0,52	0,87	2,34	1,91				2,52	2,18
	hydrol.	3,48	2,09	1,47	1,74				1,39	1,87
	s/h	0,15	0,41	1,64	1,10				1,81	1,19
Dańkowska Graniatka jar. 75 d.	synteza			3,52	0,70				1,39	0,70
	hydrol.			4,43	1,57				2,69	2,09
	s/h			0,80	0,44				0,51	0,33
Eka jar. 40 d.	synteza					0,87	1,74			
	hydrol.					2,09	2,96			
	s/h					0,41	0,59			
Śląska jar. 40 d.	synteza			1,13	1,04				1,39	1,82
	hydrol.			2,26	2,69				4,35	3,13
	s/h			0,50	0,38				0,32	0,58
Kujawianka jar. 20 d.	synteza	1,13	1,83							
	hydrol.	3,39	2,17							
	s/h	0,33	0,84							
Antonińska Wczesna jar. 15 d.	synteza									
	hydrol.									
	s/h									
Antonińska Wczesna jar. 20 d.	synteza			2,69	1,74	1,65	1,82	2,43	2,43	
	hydrol.			2,18	3,83	2,87	2,35	6,00	3,48	
	s/h			1,24	0,45	0,57	0,77	0,40	0,70	
Antonińska Wczesna jar. 25 d.	synteza									
	hydrol.									
	s/h									

Tablica 3

Synteza i hydroliza sacharozы w etiolowanych kielkach pszenicy ozimej zwykłej i jaryzowanej. Cukry wprowadzono do kielka za pomocą infiltracji próżnicowej. Wyniki podano w mg glukozy na 1 g świeżej tkanki. (K — pszenica zwykła kontrolna; J — jaryzowana)

Odmiana pszenicy	wykazała	wiek rośliny w dniach											
		5		6		8		10		16		18	
		K	J	K	J	K	J	K	J	K	J	K	J
Dańkowska Graniatka	synt.	1,21	1,56	1,13	1,65	1,30	1,47	1,48	2,52				
	hydr.	6,35	1,56	4,00	4,69	4,26	2,61	3,13	2,17				
	s/h	0,19	1,00	0,28	0,35	0,30	0,56	0,47	1,16				
Śląska	synt.							1,56	1,21	1,04	1,48	2,00	1,65
	hydr.							2,00	2,83	3,74	1,30	4,78	2,69
	s/h							0,78	0,43	0,27	1,13	0,41	0,61

D. BADANIA NAD AKTYWNOŚCIĄ KATALAZY

Badania nad aktywnością katalazy w zależności od jaryzacji wykonano na kielkach pszenicy oraz na ziarnie. Na kielkach badano następujące odmiany: Antonińska Wczesna jaryzowana 20 i 30 dni, Pszenica Śląska jaryzowana 42 dni, Dańkowska Graniatka zbiór 1954 jaryzowana 40 dni. Półgramową naważkę kielków homogenizowano w homogenizatorze Cyklon ze 100 ml buforu fosforanowego o pH 6,9 rozcieńczonego wodą 1 cz. buforu i 3 cz. wody (skład buforu fosforanowego: 5 cz. 0,1 M KH_2PO_4 i 6 cz. 0,25 M Na_2HPO_4). Następnie sączone przez watę.

Tablica 4

Oznaczenie katalazy metodą manometryczną w kielkach i ziarnie pszenicy (każda podana wartość jest średnią z 3 równoległych odczytów)

Wielkość naważki	$\text{mm}^3 \text{O}_2$ po 8 minutach	
	Oznaczenie I	Oznaczenie II
0,5 g kielków	64	66
0,5 g kielków	77	77*)
1 g ziarna	46	46
2 g ziarna	70	68

*) Wartość średnia z 2-ch odczytów

Przesącz po ośmiokrotnym rozcieńczeniu używano do oznaczeń.

Aktywność katalazy podczas jaryzacji przebadano na ziarnach o 35% wilgotności wyjmowanych wprost z lodówki na pszenicach: Dańkowska Graniatka 40 dni jaryzacji i Leszczyńska Wczesna 20 dni jaryzacji. Brano jedno- lub dwugramowe naważki, wybierając ziarna o jednakowych kielkach; kontrolne podkiełkowywano do wielkości kielków jaryzowanych. Ziarna ucierano w porcelanowym moździerzu, przenoszono ilościowo do zlewki, przemy-

wając rozcieńczonym jak wyżej buforem fosforanowym w ilości 50 ml buforu na 1 g ziarna. Po jednogodzinnej ekstrakcji przesączono roztwór przez twardy sączek; przesącz brano do analizy.

Badania wstępne dotyczące powtarzalności wyników przedstawione są w tabelicy 4, wyniki zaś doświadczeń w tabelicach 5 i 6.

T a b l i c a 5

Aktywność katalazy w zielonych kielkach pszenicy
(wyniki podano w $\text{mm}^3 \text{O}_2$ po 8 minutach; każdy wynik jest średnią z 3 równoległych odczytów manometrycznych)

Odmiana pszenicy	Seria jaryzacji	Warianty	Wiek rośliny w dniach										
			5	7	8	11	13	15	16	19	20	22	24
Antonińska Wczesna	I	20 dni jaryzacji	74	—	—	—	—	27	—	—	26	—	—
	II	30 dni jaryzacji	—	—	—	—	—	25*	—	—	16	—	—
		Kontrolne	58	—	—	—	—	24*	—	—	12*	—	—
Pszenica Śląska	I	Jaryzowane	74	—	—	—	75	—	43	50	—	66	—
		Kontrolne	36	—	—	—	68	—	58	42	—	62	—
	I	Jaryzowane	44	80	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		Kontrolne	49	94	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dańkowska Graniatka	I	Jaryzowane	39	—	113	100	85*	—	—	—	61	—	75
		Kontrolne	27	—	94	103	85*	—	—	—	59	—	74*

*) — średnia z 2 odczytów.

T a b l i c a 6

Aktywność katalazy w ziarnie i w sześciodniowych kielkach pszenicy
(wynik podano w $\text{mm}^3 \text{O}_2$ po 8 minutach; każdy wynik jest średnią z 3 równoległych odczytów manometrycznych)

L. p.	Odmiana pszenicy	Seria jaryzacji	Badany materiał	Warianty	Okres jaryzacji w dniach											
					6	11	15	20	21	22	23	25	28	30	41	43
1	Dańkowska Graniatka	I	ziarno	Jaryzowane	—	93	—	—	—	91	—	111	108	101	—	72
				Kontrolne	—	87	—	—	—	81	—	87	51	49	—	55
II		ziarno	Jaryzowane	59	—	79	—	76	—	—	—	—	102	125	—	
			Kontrolne	70	—	57	—	51	—	—	—	—	52	74	—	
3	Leszczyńska Wczesna	II	kielki	Jaryzowane	—	—	—	—	80*	—	—	49	—	66*	67	—
				Kontrolne	—	—	—	—	74*	—	—	51	—	77	80	—
I		ziarno	Jaryzowane	—	104	—	109	—	—	165*	—	—	—	—	—	
			Kontrolne	—	82	—	61	—	—	99	—	—	—	—	—	

*) Wartość średnia z 2-ch odczytów

Dyskusja

Zarówno Oparin i Zjenczenko (7) jak i Sisakian (9) zaobserwowali, że jaryzacja powoduje zmianę stosunku syntezy do hydrolizy sacharozy. Autorzy ci dowodzą, że stosunek syntezy do hydrolizy sacharozy w roślinach jaryzowanych jest niższy od analogicznego stosunku u roślin niejaryzowanych.

Przytoczone w tablicy 2 wyniki naszych badań stosunku syntezy sacharozy do jej hydrolizy w kielkach 5-dniowych pokrywają się z wynikami doświadczeń Oparina i Zjenczenki z 3- i 5-dniowymi etiolowanymi kielkami jaryzowanych i kontrolnych nasion pszenicy Moskowska 02411 (s/h kontr. = 0,32, s/h, jar. = 0,21). Wartość jednak wyników naszych badań na kielkach 5-dniowych jest wątpliwa ze względu na to, że analizy przeprowadzone na kielkach 4-dniowych wykazują, że stosunek s/h zmienia się na wręcz przeciwny. Ponadto, jak wynika z badań na kielkach starszych (od 6 — 15 dnia wzrostu) nie zdołaliśmy wykazać żadnej regularności w stosunku syntezy/hydrolizy sacharozy w jaryzowanych i kontrolnych pszenicach ozimych w odróżnieniu od Sisakiana, który potwierdził swoje poprzednie prace. W badaniach bowiem nad pszenicą ozimą — Ukrainka — uzyskał on w kielkach 20-dniowych i starszych (w początkach krzewienia) wyraźne obniżenie stosunku s/h w liściach nasion jaryzowanych.

Celem wykluczenia procesu fotosyntezy, który prowadzi do nasilenia syntezy sacharozy w zielonych komórkach, wykonano kilka analiz na materiale etiolowanym. Jak wynika z tablicy 3 z wyjątkiem tylko jednego przypadku we wszystkich pozostałych obserwacjach stwierdzono, że wartość ilorazu synteza/hydroliza jest wyższa w kielkach nasion jaryzowanych.

Ilość wprowadzonych cukrów do rośliny metodą infiltracji próżniowej jest stosunkowo mała i wynosi około 3 mg na 1 g świeżej tkanki, jest to około 15—20% własnego cukru rośliny badanej. Z cukrów infiltrowanych około 50% sacharozy ulega hydrolizie i około 50% cukru inwertowanego przechodzi w dwucukier.

Ilości zsyntetyzowanej i zhydrolizowanej sacharozy w naszej pracy pokrywają się z doświadczeniami Oparina i Zjenczenki. Hydroliza sacharozy u tych autorów waha się w granicach od 10,4 — 26,1 mg, synteza zaś w granicach od 5,3 — 8,6 mg na 1 g suchego materiału w czasie 1 godziny. Przyjmując, że kielki zawierają przeciętnie 85% wody, wielkości syntezy i hydrolizy sacharozy są zatem porównalne.

Przedstawione w tablicach 5 i 6 wyniki aktywności katalazy w kielkach jaryzowanej pszenicy nie są zgodne z wynikami Filipienki (1) oraz

Richtera, Rancana i Pekiera (8). Filippienko podaje, że aktywność katalazy jest wyższa u roślin jaryzowanych niż u kontrolnych, przy czym najwyższą swą wartość ma w fazie kwitnienia, chociaż w czasie krzewienia i tworzenia łodyg różnice w aktywności katalazy są również znaczne. W naszym doświadczeniu nie stwierdziliśmy znacznych różnic w aktywności katalazy od 5—24 dnia wzrostu rośliny po jaryzacji. Na cztery analizy wykonane w piątym dniu wzrostu na trzech odmianach pszenicy (tabl. 5) trzy wykazują większą aktywność katalazy u pszenicy jaryzowanej. W miarę wzrostu rośliny różnice te nie zachowują się. U pszenicy Dańkowska Graniatka wyższa aktywność katalazy u roślin jaryzowanych występuje tylko 5 i 8 dnia wzrostu w pozostałych dniach jest na jednym poziomie z kontrolnymi. U pszenicy Antonińska Wczesna i Pszenica Śląska krzywa aktywności katalazy przebiega w sposób nieregularny.

Badano również sześciodniowe kielki wyrosłe z ziaren poddanych różnemu okresowi jaryzacji (tabl. 6, lp. 3). Według danych Richtera, Rancana i Pekiera (8) analizy te powinny wykazać większą ilość katalazy w roślinach, które wyrosły z ziaren poddanych jaryzacji przez 20 i 25 dni. Wyniki naszych badań nie wykazały jednak żadnych różnic na korzyść roślin jaryzowanych.

Natomiast zgodne wyniki z literaturą otrzymaliśmy jedynie w jaryzowanym ziarnie (tabl. 6, lp. 1, 2, 4). U pszenicy Leszczyńska Wczesna wyraźnie wzrasta aktywność katalazy w porównaniu z kontrolnymi w miarę jaryzacji. Również u pszenicy Dańkowska Graniatka występują różnice w aktywności katalazy, co jest zgodne z doświadczeniami Richtera i współautorów (8).

Streszczenie

1. Przebadano wpływ jaryzacji na stosunek syntezy do hydrolizy sacharozy oraz na katalazę w kilku odmianach pszenicy ozimej.

2. Stosunek syntezy/hydrolizy sacharozy oznaczono metodą infiltracji próżniowej. Aktywność katalazy badano manometrycznie na aparacie Warburga.

3. W odróżnieniu od danych w literaturze nie zdołano potwierdzić wpływu jaryzacji na zmianę stosunku syntezy do hydrolizy sacharozy w zielonych i etiolowanych kielkach pszenicy jaryzowanej w porównaniu z pszenicą niejaryzowaną.

4. Również w kielkach zielonych roślin jaryzowanych nie wykazano większej aktywności katalazy.

5. Jedynie ziarna w okresie jaryzacji wykazały większą aktywność katalazy zgodnie z danymi w literaturze.

L I T E R A T U R A

1. Filippienko I. *DAN SSSR*, nowa seria 4 (1936).
2. Fujita Akiji, Danzo Iwatake, *Bioch. Z.* 48, 242, 1931.
3. Grabianowska B., *Acta Bioch. Pol.* 1, 265, 1955.
4. Kursanow A. Ł., *Biochimia* 1, 269, 1936.
5. Lewicki S., *Jarowizacja zbóż*, PWRiL, Warszawa 1952.
6. Lysenko T., *Agrobiologia*, PWRiL, Warszawa 1950.
7. Oparin A. I., Zjenczenko W. A., *Problemy biochemii w miczurinskiej biologii Sbornik I, Izd. AN SSSR*, Moskwa—Leningrad 1949.
8. Richter A. A., Rancan W., Pekker, *DAN SSSR*, nowa seria 2, 1933.
9. Sisakian N., *Izwiestija Akademii Nauk SSSR*, 2, 1951, w przekładzie polskim: — *Problemy Biochemii*, zes. 8, PWRiL, Warszawa 1952.
10. Słaboński A., *Postępy Wiedzy Rolniczej*, 3—4, 168, 1949.
11. Wolszlegier D., *Przem. Chem.*, 9, 623, 1953.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЯРИЗАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ
ЭНЗИМОВ В ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЕ

Р е з ю м е

1) Было исследовано влияние яризации на отношение синтеза к гидролизу сахарозы, а также влияние яризации на активность каталазы в нескольких разновидностях озимой пшеницы.

2) Соотношение синтеза-гидролиза сахарозы определялось методом вакуум инфильтрации. Активность каталазы исследовалась манометрически на аппарате Варбурга.

3) В отличие от приводимых в литературе данных, не удалось доказать влияния яризации на изменение отношения синтеза к гидролизу сахарозы в зеленых и этиолированных ростках яризованной пшеницы в сравнении с пшеницей неяризованной.

4) В ростках яризованных зеленых растений также не обнаружено большей активности каталазы.

5) Одни лишь только зёрна в период яризации проявили большую активность каталазы, согласно данным, приводимым в литературе.

INFLUENCE OF VERNALISATION UPON THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES
IN WHEAT SEEDLINGS

S u m m a r y

1. The ratio of synthesis to hydrolysis of saccharose, as well as katalase activity, in vernalised wheat was investigated.
2. The synthesis/hydrolysis ratio was determined by the vacuum infiltration method. Katalase activity was estimated manometrically in the Warburg apparatus.

3. Contrary to previous investigations it was not possible to confirm the shift of the synthesis/hydrolysis ratio in green and etiolated vernalised wheat as compared with the control material.
4. Similarly, no increased katalase activity could be confirmed in green seedlings.
5. Only in the case of the seed itself the increased activity of katalase upon vernalisation could be confirmed.

Otrzymano 9. 9. 1955 r.

WIESŁAW TYSAROWSKI I STANISŁAW KWIEK

OZNACZANIE WŁASNOŚCI REDUKCYJNYCH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH ZA POMOCĄ KOMPLEKSU ŻELAZA Z KWASEM ETYLENODWUAMINOCZTEROOCYTOWYM

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Warszawie

Kierownik: Prof. dr J. Heller z Instytutu Gruźlicy.

Dyrektor: Prof. dr J. Misiewicz

W badaniach manometrycznych jeden z nas stwierdził (7), (8), że oddychanie gęstych zawiesin *Myc. phlei* wzmagają się po dodaniu kompleksu żelaza (Fe^{+3}) z kwasem etylenodwuaminoczytocytowym,*)**) poczynając od stężenia 10^{-2}M . Najwyższe pobudzenie zaobserwowano w stężeniu $7,5 \times 10^{-2}$ do 10^{-1}M ; dalszy wzrost stężenia zmniejsza zużycie tlenu. Wyrażono przypuszczenie (7), że kompleks żelaza z kwasem etylenodwuaminoczytocytowym (rys. 1) może być przenośnikiem elektronów w modelowych układach biologicznych. W dalszych badaniach stwierdzono (8) odwracalne przechodzenie kompleksu utlenionego (FeY^{-1}) w zredukowany (FeY^{-2}). Opierając się na tych własnościach wykorzystaliśmy oznaczenie stopnia redukcji FeY^{-1} , jako miernik zdolności redukcyjnych układów biologicznych.

Roztwór wodny FeY^{-1} wykazuje charakterystyczne właściwości oksydo-redukcyjne: 10%, różowy roztwór odbarwia się po dodaniu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ — wielokrotne wytrząsanie z powietrzem przywraca barwę wyjściową. Jeżeli do prawie bezbarwnego, około 0,03% roztworu FeY^{-1} oprócz czynnika redukującego (np. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ lub kw. askorbinowego) dodać o-fenantrolinę — mieszanina przyjmuje silne i trwałe czerwone zabarwienie, właściwe dla kompleksu żelaza dwuwartościowego z o-fenantroliną. Zabarcwienie

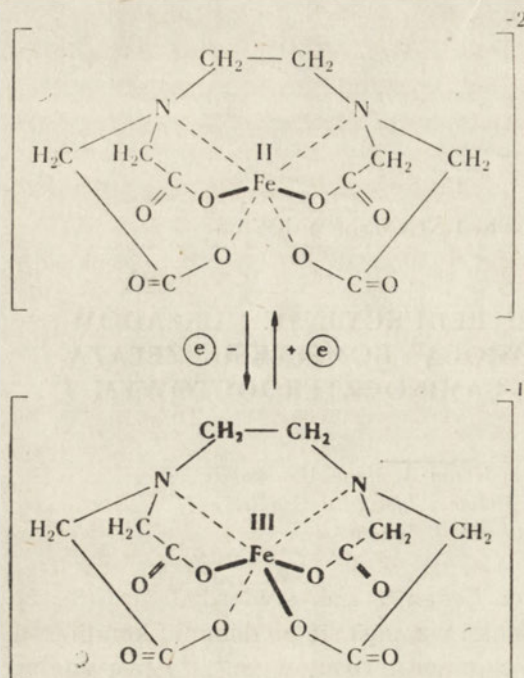
*) Używane skróty:

FeY^{-1} — kompleks żelaza Fe^{+3} z kwasem etylenodwuaminoczytocytowym;

FeY^{-2} — kompleks żelaza Fe^{+2} ;

EDTA — kwas etylenodwuaminoczytocytowy.

**) Własności EDTA i tworzenie kompleksów EDTA z metalami omówione są w osobnej pracy (9).



Rys. 1. Wzory strukturalne kompleksów żelaza Fe^{+3} i Fe^{+2} z EDTA (FeY^{-1} i FeY^{-2})

własności redukcyjnych układów biologicznych przy użyciu FeY^{-1} . Polega ona na oznaczaniu żelaza Fe^{+2} za pomocą o-fenantroliny w powstałym po redukcji kompleksie FeY^{-2} . o-Fenantroliny użyto z tego względu, że jest ona powszechnie stosowanym odczynnikiem do kolorymetrycznego oznaczania żelaza wykazującym wiele zalet w porównaniu z innymi odczynnikami; można je używać w szerokim zakresie pH, a także tworzy ona silne kompleksy z Fe^{+2} , cechujące się wysoką absorpcją molarną.

Jednoelektronowa redukcja FeY^{-1} jest niezależna od pH w zakresie od 4 do 6 (6). W tych granicach pH wartość potencjału oksydo-redukcyjnego wynosi $+0,117$ v. W pH 7,0 osiąga wartość ca $+0,100$ v. W pH powyżej 7,5 kompleks FeY^{-1} wiąże grupy OH^- , przy czym jego potencjał oksydo-redukcyjny maleje do wartości $\pm 0,08$ v. W pH około 10 zachodzi przyłączenie drugiej grupy OH^- ; potencjał oksydo-redukcyjny spada do $\pm 0,0$ v. W wyższych pH (12,3) przyłącza się dalsza grupa OH^- i dochodzi do wytrącenia wodorotlenku żelazowego. W pH poniżej 2,5 kompleks FeY^{-1} również ulega rozpadowi — wyzwala się wolny EDTA i wolny jon Fe^{+3} . Obecność jonów żelazowych podwyższa potencjał oksydo-redukcyjny roztworu.

to występuje, ponieważ EDTA słabiej wiąże Fe^{+2} niż o-fenantrolina. Sama o-fenantrolina bez czynnika redukującego, jak również czynnik ten bez o-fenantroliny nie zmieniają barwy roztworu FeY^{-1} .

Wychwytywanie Fe^{+2} z kompleksu FeY^{-2} przez o-fenantrolinę może być wykorzystane do oznaczenia zawartości kompleksów EDTA z żelazem w roztworze. Bez dodania czynnika redukującego można oznaczyć Fe^{+2} w FeY^{-2} , po jego dodaniu sumę żelaza w $\text{FeY}^{-1} + \text{FeY}^{-2}$. Na tej podstawie wykonując dwa oznaczenia można wyliczyć wzajemny stosunek kompleksów w badanej próbce.

Stwierdzenie redukcji FeY^{-1} w reakcji z o-fenantroliną było punktem wyjścia dla opracowania nowej metody oznaczania

Z powyższego wynika, że od stężenia jonów wodorowych w zakresie pH poniżej 3,5 i powyżej 6,5 zależy nie tylko potencjał oksydo-redukcyjny kompleksu ale również jego postać i trwałość. W fizjologicznym zakresie pH potencjał oksydo-redukcyjny FeY^{-1} jest wyższy niż błękitu metylenowego (ca 0,0 v), natomiast niższy niż żelazicyjanku (+ 0,4 v).

W obecnej pracy przedstawiona jest metoda badania własności redukcyjnych homogenatów tkankowych, zawiesin prątków kwasoopornych i preparatów mitochondriów za pomocą kompleksu FeY^{-1} .

Część doświadczalna

I. ODCZYNNIKI, PREPARATY I METODA ANALITYCZNA

A. Odczynniki

1. Sól sodową kompleksu FeY^{-1} otrzymaliśmy w stanie krystalicznym stosując metodę Brintzingera i współpracowników (1), opracowaną dla uzyskania soli kompleksu $\text{NH}_4\text{FeY} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Produktem wyjściowym była rekrytalizowana sól sodowa EDTA ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oraz alun żelazowo-amonowy. W przedstawionej metodzie używaliśmy 1% roztworu wodnego FeY^{-1} , przygotowanego z preparatu nie suszonego.

Wykonaliśmy analizę używanego preparatu oznaczając: stratę wody podczas suszenia do stałej wagi w 60°C a następnie w 110°C , zawartość azotu metodą Kjeldahla oraz ilość żelaza w preparacie zmodyfikowaną własną metodą, opisaną poniżej, stosując $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, jako czynnika redukującego. Utrata wagi w 60°C wynosiła 15,7%; po dalszym suszeniu w 110°C — 2,5%. Zawartość azotu w preparacie suszonym wynosiła 6,2% (śr. z 2-ch), teoretyczna 7,6%; żelaza — 11,8% (śr. z 4-ch), teoretycznie 15,2%.

Czystość stosowanego preparatu obliczona według zawartości azotu wynosi 82%, według zawartości żelaza 78%. Utrata ciężaru przy suszeniu w 110°C wskazuje, że nie zawiera on związanej wody.

2. Chlorowodorek o-fenantroliny — 1% roztwór wodny.

3. Bufor octanowy 2M pH 4,0.

B. Preparaty

1. Homogenaty z tkanek świnek morskich sporządzono po zabiciu zwierzęcia przez skrwawienie. Odważony kawałek narządu homogenizowano w oziębionym młynku Pottera w roztworze 0,033 M buforu fosforanowego pH 7,0 lub, zależnie od potrzeby, w roztworze 0,15 M NaCl. Narządy pochodziły od zwierząt różnej wagi, płci i wieku. Czas homogenizacji wynosił 2 — 5 minut.

2. Zawiesiny prątków *Myc. phlei* przygotowywano z hodowli na podłożu syntetycznym Sautona. Kozuchy wzrostowe zbierano na sączku szklanym, kilkakrotnie płukano wodą destylowaną, następnie rozbijano w kolbce z perełkami szklanymi i zawieszano w roztworze buforu fosforanowego 0,033 M pH 7,0 względnie w 0,15 M NaCl.

pH roztworów i zawiesin oznaczano przy pomocy elektrody szklanej w próbkach sporządzonych analogicznie do właściwych doświadczeń.

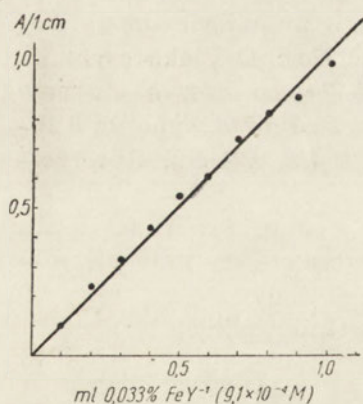
C. Metoda analityczna

1. Zawartość Fe^{+2} (jako kompleks z o-fenantroliną) oznaczaliśmy zmodyfikowaną metodą Mahlera i Elove (5). W celu zwiększenia pojemności stosowaliśmy bufor octanowy 2M zamiast 1M. Końcowe pH roztworów wynosiło 3. Standard żelaza przygotowano:

- a) z soli Mohra wg. sposobu opisanego w podręczniku Hawka, Summersona i Osera (3),
- b) z żelaza metalicznego.

Intensywność zabarwienia oznaczaliśmy na fotometrze Pulfricha używając filtra S_{50} . $A_{500}^{1)}$ oznaczone dla 5 mikrogramów Fe^{+2} w 8 ml roztworu w naczyniu 1 cm wynosi $0,127 (\pm 0,004$ — średnia z 10 oznaczeń). Objętość 8 ml była stale zachowywana w doświadczeniach. Z powyższych oznaczeń obliczono współczynnik liczbowy, przez który należy pomnożyć odczytaną absorpcję próbki dla otrzymania wyniku w mikrogramach Fe^{+2} ; wynosi on 39,4. Intensywność zabarwienia kompleksu o-fenantroliny z żelazem badana w czasie od 10 do 180 minut nie zmienia się. Jest to zakres czasu wystarczający zwykle do wykonania oznaczeń.

2. Oznaczanie ilości Fe^{+2} w kompleksie z EDTA oparliśmy na metodzie opisanej w poprzednim punkcie. Zależność ilości Fe^{+2} uwolnionego z FeY^{-1} za pomocą czynnika redukującego ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) od ilości dodanego kompleksu (krzywa na rys. 2) ma charakter prostej proporcjonalności. Oznaczanie kompleksu FeY^{-1} tą metodą jest zgodne z jego oznaczaniem na podstawie zawartości azotu.



Rys. 2. Zależność absorpcji od ilości FeY^{-1} . Odpowiednią ilość roztworu FeY^{-1} uzupełniono po dodaniu o-fenantroliny wodą destylowaną od objętości 3,0 ml; do każdej próbki dodano około 30 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

¹⁾ Symbolem A oznaczono gęstość optyczną.

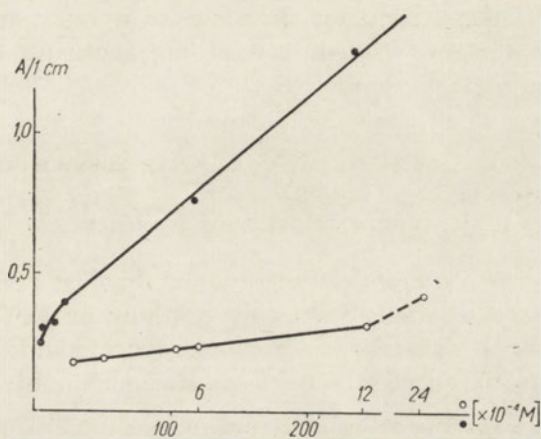
II. WYKONANIE OZNACZENIA

1. Wybór stężenia FeY^{-1}

Na rysunku 3 przedstawiono zależność redukcji FeY^{-1} w zawiesinach *Myc. phlei* od stężenia dodanego kompleksu. 10-krotny wzrost stężenia

Rys. 3. Wpływ stężenia FeY^{-1} na redukcję w zawieszynie *Myc. phlei*. Hodowla 9-dniowa o gęstości 106,6 mg N/100 ml. W każdej probówce umieszczono: 1 ml zawiesiny; 1 ml buforu fosforanowego 0,033 M pH 7,0; odpowiednią ilość roztworu FeY^{-1} ; 0,2 ml o-fenantroliny; H_2O destylowana do 3,0 ml; czas inkubacji 30 min. Na osi odciętych podano stężenie FeY^{-1}

o — krzywa dla wartości $1,2 \times 10^{-4}$ M — 23×10^{-4} M
 ● — krzywa dla wartości $0,024 \times 10^{-2}$ M — $2,28 \times 10^{-2}$ M



od $2,3 \times 10^{-3}$ do $2,3 \times 10^{-2}$ M wzmagą reakcję 3,3 razy, natomiast wzrost stężenia w zakresie od $1,2 \times 10^{-4}$ do $1,2 \times 10^{-3}$ M zwiększa tylko 1,9 razy. Z tego względu w przeprowadzonych badaniach zastosowaliśmy niższe stężenia kompleksu.

Ilość FeY^{-1} dodana do próbki w naszych warunkach odpowiada około 100 μg Fe, co równa się 1,8 mikroatomu Fe lub 1,8 mikromola FeY^{-1} . W próbce stężenie FeY^{-1} wynosi około 6×10^{-4} M. Ta ilość FeY^{-1} daje absorpcję 2,5 w przeliczeniu na 1 cm, a więc już poza górną granicą możliwości odczytywania w naczynkach 0,5 cm.

2. Sposób wykonania oznaczenia

Do szerokich probówek (średnica 18 mm — dodaje się 0,2 ml 1% roztworu o-fenantroliny, 1 ml badanego preparatu i 1,7 ml buforu fosforanowego 0,033 M, pH 7,0. Probówki umieszcza się na łaźni wodnej w temp. 37°C i po wyrównaniu temperatur (5 min.) dodaje się po 0,1 ml 1% roztworu FeY^{-1} . Objętość próbki inkubowanej wynosiła zawsze 3ml. Po odpowiednim czasie reakcję przerywa się przez dodanie 1 ml 20% kwasu trójchlorooctowego. (To postępowanie okazało się skuteczne także dla usuwania prątków kwasoopornych z zawiesiny).

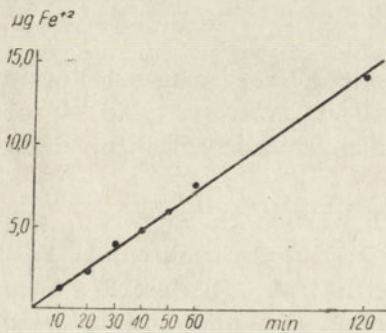
Następnie dodaje się 4 ml buforu octanowego 2 M o pH 4,0 i próbkę sączy się przez twardy sączek ilościowy Schleicher, Schüll Nr 589³. Czasami, zwłaszcza przy badaniu rozcieńczonych zawiesin prątków kwa-

soopornych, konieczne jest dwukrotne przesączenie. Absorbencję przesącza odczytuje się w fotometrze Pulfricha wobec wody. Wartość absorpcji próby ślepej bez czynnika redukującego wynosi zero. Zastosowane modyfikacje opisanej tu techniki podano przy odpowiednich doświadczeniach. Każdy wynik redukcji podany w naszej pracy jest średnią z dwóch równoległych oznaczeń. Zgodność ich wynosiła około 2%. Wielkości redukcji określone są w mikrogramach Fe^{+2} na 1 ml badanego materiału, względnie na 1 mg azotu na 1 godzinę. Tę ostatnią wartość oznaczamy symbolem QFe_N^{+2} .

III. WPLYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW

1. Redukcja w zależności od czasu

W osobnym doświadczeniu zbadano przebieg redukcji w zależności od czasu działania zawiesiny prątków na FeY^{-1} . Liniowy kształt krzywej na rys. 4 wskazuje na prostą proporcjonalność tej zależności. Wskazuje on również na to, że w czasie dwugodzinnej inkubacji preparat nie inaktywuje się pod wpływem zastosowanych stężeń FeY^{-1} jak i o-fenantroliny.



Rys. 4. Zależność redukcji FeY^{-1} od czasu inkubacji. 3-dniowa hodowla *Myc. phlei* na pożywce Sautona, pH 6,68. Gęstość zawiesiny nie oznaczona

wiązania Fe^{+2} . Natomiast przeprowadzenie tejże reakcji w warunkach beztlenowych umożliwia dodanie o-fenantroliny na końcu inkubacji (por. rys. 6).

Dodając o-fenantrolinę na początku badania otrzymuje się w warunkach beztlenowych wyniki o około 20% wyższe niż w tlenowych (por. tablica 1).

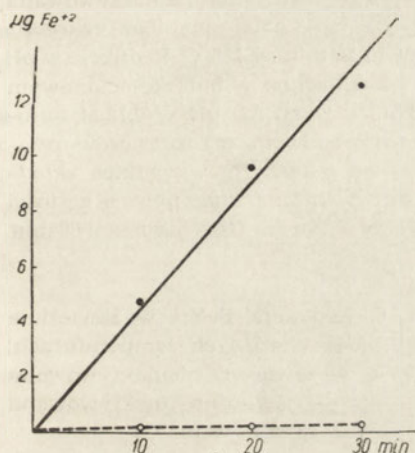
Również w atmosferze tlenku węgla wzmagają się redukcja FeY^{-1} , (tablica 2), w porównaniu do warunków tlenowych.

2. Wpływ warunków beztlenowych i o-fenantroliny

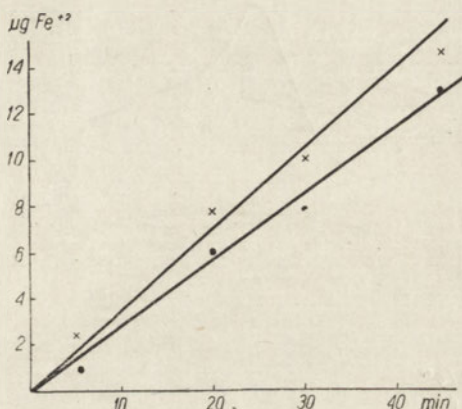
Kompleks FeY^{-2} powstający po redukcji FeY^{-1} ulega autooksydacji pod wpływem tlenu (4). Z tego względu dodawanie w warunkach tlenowych o-fenantroliny w końcu inkubacji prowadzi do wybitnego zmniejszenia ilości pojawiającego się Fe^{+2} (rys. 5). W warunkach podanej przez nas metody o-fenantrolina zapobiega autooksydacji FeY^{-2} wskutek silnego

3. Wpływ amidu kwasu jodooctowego

Amid kwasu jodooctowego w stężeniu 10^{-1} M okazał się silnym inhibitorem redukcji FeY^{-1} w homogenatach tkankowych. Wielkość zahamowania w różnych tkankach jest podobna i wynosi około 70% (por. tabela 1).



Rys. 5. Zależność redukcji FeY^{-1} od obecności o-fenantroliny w warunkach powietrza atmosferycznego; ● — o-fenantrolina dodana na początku inkubacji; ○ — o-fenantrolina dodana na końcu inkubacji; redukcja obliczona w $\mu g Fe^{+2}$ na 1 ml 5% homogenatu wątrobowego świnki morskiej



Rys. 6. Redukcja FeY^{-1} w obecności o-fenantroliny w warunkach tlenowych i bez o-fenantroliny w próżni; ● — o-fenantrolina dodana na końcu inkubacji. Probówki Thunberga, odpowietrzone; x — o-fenantrolina dodana na początku inkubacji. Probówki zwykle nieodpowietrzone; wyniki obliczone w $\mu g Fe^{-2}$ na 1 ml 5% homogenatu wątrobowego świnki morskiej

4. Wpływ pH

Wyniki badania redukcji FeY^{-1} przez *Myc. phlei* w różnych pH przedstawia rys. 7.

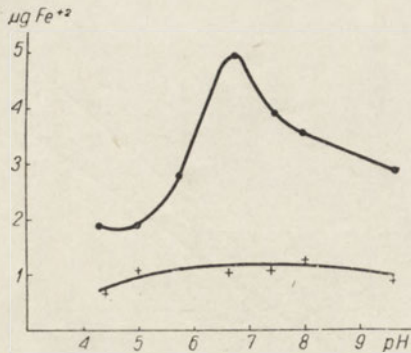
Począwszy od pH około 4,5 wielkość redukcji wzrasta, osiąga maksimum przy pH około 6,6 a następnie spada. Spadek po stronie zasadowej jest mniej stromy niż po stronie kwaśnej; wartość przy pH 9,6 jest wyższa niż w pH 4,5. Wielkość redukcji w zawiesinie *Myc. phlei* inaktywowanej ogrzewaniem nie wykazuje optimum w zależności od pH.

5. Wpływ temperatury

Rys. 8 i rys. 9 ilustrują redukcję FeY^{-1} w różnych temperaturach w zawiesinie *Myc. phlei* i homogenacie wątrobowym. Obie krzywe „enzy-

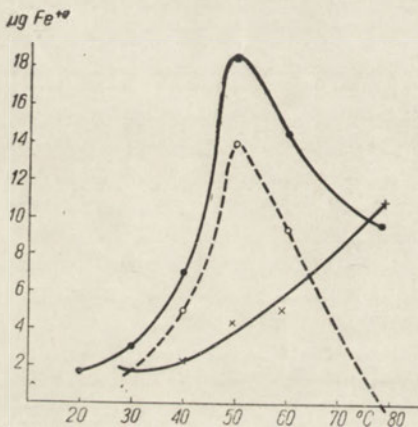
matyczne" wykazują optimum w temperaturze ok. 50°C, przy czym jest ono wyraźniejsze dla *Myc. phlei*.

Rys. 10 przedstawia szybkość redukcji kompleksu FeY^{-1} w pH 6,75 przez homogenat wątrobowy w różnych temperaturach. Redukcja w tem-



Rys. 7. Wpływ pH na redukcję FeY^{-1} w zawieszynie *Myc. phlei*;

● — ● — zawieszina nieinaktywowana
+ — + — zawieszina inaktywowana
cieplem 30 min. w 100°C. Redukcja w pH 4,1 i 4,98 badana w buforze octanowym 0,12 M, w wyższych pH w 0,12 M buforze fosforanowym. pH roztworów oznaczano po zmieszaniu wszystkich składników. Zawieszina *Myc. phlei* o gęstości 51,44 mg N/100 ml. Czas inkubacji 60 min.



Rys. 8. Redukcja FeY^{-1} w zawieszynie *Myc. phlei* w różnych temperaturach;
● — ● — zawieszina nieinaktywowana
x — x — zawieszina inaktywowana
30 min. w 100°C;

o --- o — redukcja „enzymatyczna”.
Wartości dla tej krzywej otrzymano z różnicy pomiędzy redukcją w homogenacie nieinaktywowanym i inaktywowanym.

Redukcja obliczona w $\mu g Fe^{+2}$ na 1 ml zawiesziny (0,41 mg N). Czas inkubacji 45 min., pH próbki 6,79. Używano termostatu Hoepfera z zasobnikiem zimna i łaźni wodnych. Temperaturę mierzono bezpośrednio w naczyniach z badanymi roztworami

peraturach 10 - 40°C jest proporcjonalna do czasu inkubacji. Odpowiednie punkty w tym zakresie leżą na prostych, przechodzących przez środek układu. W 50 i 60°C reakcja na początku inkubacji jest znacznie szybsza niż w późniejszym okresie. Największy kąt z osią „x” wykazuje krzywa redukcji w temperaturze 60°C. W 40°C szybkość redukcji jest nieco mniejsza, ale z kolei większa niż w 50°C

IV. REDUKCJA FeY^{-1} PRZEZ RÓŻNE PREPARATY

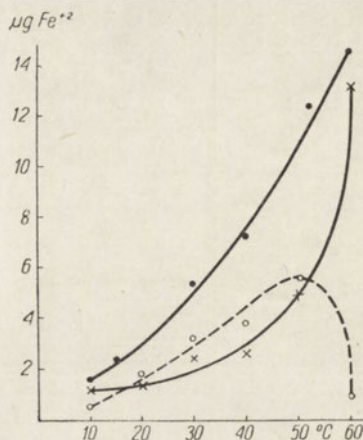
1. Homogenaty tkankowe

Kompleks FeY^{-1} redukowany jest przez materiał roślinny (homogenat młodej pszenicy), zawiesziny drobnoustrojów (*Myc. phlei*) oraz przez

różne tkanki zwierzęce. W tablicy 1 przedstawiono wartość redukcji w homogenatach różnych narządów świnki morskiej. Największą redukcję wykazuje wątroba, mniejszą nerka, najmniejszą mięśnie prażkowane. Wa-

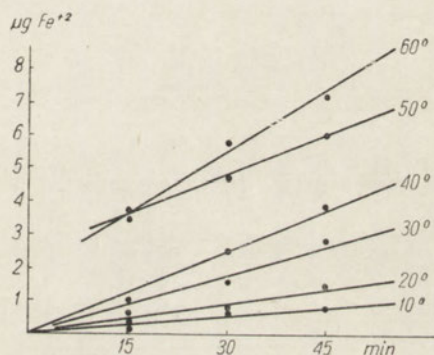
Rys. 9. Redukcja FeY^{-1} w 5% homogenacie wątrobowym świnki morskiej w różnych temperaturach

● — ● — homogenat nieinaktywny
 × — × — homogenat inaktywny 30 min. w 100°C;
 ● — ● — redukcja „enzymatyczna”. Wartość dla tej krzywej otrzymano z różnicy pomiędzy redukcją w homogenacie żywym i inaktywowanym. Czas inkubacji 45 min., pH próbki 6,75. Używano termostatu Hoepplera z zasobnikiem zimna i łaźni wodnych. Temperaturę mierzono bezpośrednio w naczyniach z badanymi roztworami



Rys. 10. Wpływ temperatury na szybkość redukcji FeY^{-1} w homogenacie wątrobowym.

5% homogenat wątrobowy świnki morskiej w 0,033 M buforze fosforanowym, pH próbki 6,75. Użyto termostatu Hoepplera z zasobnikiem zimna. Temperaturę mierzono bezpośrednio w naczyniach z badanymi roztworami



runki beztlenowe wzmagają redukcję najsilniej w homogenacie mięśniowym a następnie płucnym. Substraty takie, jak glicerol, cholina i bursztynian nie wzmagają wyraźnie redukcji w homogenacie wątrobowym.

2. Preparaty mitochondriów

Dogodnym materiałem do badania redukcji FeY^{-1} okazał się preparat mitochondriów wątroby szczura *) (tablica 3). W przeciwieństwie do homogenatów wątrobowych bardzo słabo redukuje on kompleks po inaktywacji cieplnej, a poza tym endogenna redukcja jest także bardzo niska. Dodatek niektórych substratów zwiększa redukcję około 10-krotnie.

*) Dziękujemy dr Kłopotowskiemu za użyczenie preparatów mitochondriów.

Tablica 1

Redukcja FeY^{-1} przez homogenaty narządów
świnki morskiej

Tkanka	$\mu\text{g Fe}^{+2}$ na 1 ml 20% homo- genatu na 1 godzinę		
	Powietrze		Odpowietrzzone
		$\text{CH}_2\text{ICONH}_2$ 10^{-1} M	
Wątroba	337,8	97,8	379,9
Nerka	173,2	43,3	205,2
Mięśnie	19,2	5,9	36,5
Jelito cienkie	38,2	12,8	68,5
Płuco	38,8	24,6	59,1

Tablica 2

Wpływ tlenu węgla na redukcję FeY^{-1} przez
homogenat wątrobowy

Faza gazowa	$\mu\text{g Fe}^{+2}$ na 1 ml homogenatu		
	Czas inkubacji w minutach		
	10	20	30
Powietrze atmosf.	4,2	9,8	11,3
Tlenek węgla	6,9	10,9	15,8

Tablica 3

Wpływ bursztynianu i choliny na redukcję
 FeY^{-1} przez mitochondria

Substrat	pH	$\mu\text{g Fe}^{+2}$	
		nie inaktywowane	inaktywowane 15 min. w 100°C
Bez substratu	6,40	0,7	0,0
Bursztynian	6,42	10,0	0,0
Cholina	6,40	6,4	0,0

Do każdej próbówki dodano: 1 ml 20% homogenatu, 0,2 ml 1% o-fenantroliny, 0,1 ml 1% FeY^{-1} . Do odpowiednich próbówek dodano ponadto 0,5 ml 6×10^{-1} M amidu kwasu jodoctowego. Uzupełniono buforem fosforowanym 0,033 M, pH 7,0 do objętości 3,0 ml. Próbówki Thunberga połączone, odpowietrzano jednocześnie przez 3 min. Wszystkie próbówki inkubowano w statywie przymocowanym do części ruchomej aparatu Warburga. Wstrząsano 60 razy na minutę

Do każdej próbówki dodano: 1 ml 5% homogenatu, 0,2 ml o-fenantroliny, 0,1 ml 1% FeY^{-1} i uzupełniono buforem fosforowanym 0,033 M, pH 7,0 do objętości 3,0 ml. Wstrząsano w aparacie Warburga (60 wstrząsów na minutę).

Tlenek węgla otrzymano z kwasu mrówkowego. Napelniono nim próbówki Thunberga trzykrotnie usuwając gaz za pomocą pompy olejowej i kolejno uzupełniając CO

Do odpowiednich próbówek dodano: 0,5 ml zawiesiny mitochondriów wątroby szczura w 0,25 M sacharozie (0,23 mg N); 0,1 ml 0,2 M MgCl_2 ; 0,3 ml 0,15 M KCl; 0,2 ml o-fenantroliny; 0,1 ml 1% FeY^{-1} ; bufor fosforanowy 0,033 M, pH 7,0 do 3,0 ml.

Substraty — końcowe stężenie 0,02 M.

Czas inkubacji 30 min. w temp. 38°C

3. Zawiesiny prątków kwasoopornych

Poza preparatami tkanek zwierzęcych i roślinnych przebadano szereg szczepów bakteryjnych spośród prątków kwasoopornych, a zwłaszcza *Myc. phlei*. W tablicy 4 przedstawiono wyniki doświadczeń z różnych dni i hodowli.

Tablica 4
Redukcja FeY^{-1} przez zawiesiny prątków kwasoopornych

Nazwa szczepu	$\text{QFe}^{+2}_{\text{N}}$	Wiek hodowli	Podłoże
<i>Myc. phlei</i>	23,7	3 dni	Sautona
<i>Myc. phlei</i>	23,8	—	Sautona
<i>Myc. phlei</i>	42,3	5 dni	Sautona
<i>Myc. phlei</i>	27,4	6 dni	Sautona
<i>Myc. phlei</i>	22,4	9 dni	Sautona
BCG Brazylijski	11,3	4 tyg.	kartofel
BCG Duński	13,4	4 tyg.	kartofel
BCG Francuski	8,1	4 tyg.	kartofel

*) $\text{QFe}^{+2}_{\text{N}} = \mu\text{g Fe}^{+2}$ na 1 mg azotu prątków na 1 godzinę

Dyskusja

Budowa kompleksu FeY^{-1} o charakterze zbliżonym do fizjologicznych przenośników elektronowych, predysponuje go do użycia w badaniach nad redukcją. Biorąc pod uwagę potencjał oksydo-redukcyjny, jest prawdopodobne, że ulega on redukcji na poziomie enzymów flawinowych, które mają potencjał bardziej ujemny niż FeY^{-1} . Wzmoczenie redukcji FeY^{-1} pod wpływem tlenku węgla, jak również warunków beztlenowych oraz hamowanie jej przez amid kwasu jodooctowego wskazuje na powiązanie redukcji FeY^{-1} z enzymatycznym łańcuchem przemian oksydo-redukcyjnych komórki.

Badanie redukcji przy użyciu opisanej przez nas metody jest proste technicznie. Dobrze opracowane oznaczenie żelaza za pomocą o-fenantroliny umożliwia ilościowe śledzenie procesów redukcji. Szybkość tworzenia się kompleksu Fe^{+2} z o-fenantroliną w obecności EDTA jest bardzo duża — praktycznie reakcja zachodzi momentalnie, podobnie jak i bez EDTA.

Porównanie stałych trwałości³⁾ kompleksów żelaza Fe^{+2} i Fe^{+3} z EDTA oraz o-fenantroliną wyjaśnia przebieg reakcji zachodzących przy użyciu

*) Stała trwałości K określa wzór:

$$K = \frac{[\text{kompleks}]}{[\text{metal}] [\text{związek kompleksotwórczy}]}$$

opisanej metody. Stała trwałości kompleksu EDTA z żelazem trójwartościowym FeY^{-1} wynosi $10^{25,1}$; kompleksu zredukowanego FeY^{-2} — $10^{14,2}$ (6), zaś kompleksu Fe^{+2} z o-fenantroliną — $10^{17,7}$ (2).

Liczby te wskazują, że układ FeY^{-1} -czynnik redukujący-o-fenantrolina jest specjalnie korzystny dla badania redukcji kompleksu FeY^{-1} . o-Fenantrolina z Fe^{+3} daje bardzo nietrwałe połączenie (praktycznie niewykrywalne), natomiast po przejściu atomu centralnego na niższy stopień utlenienia kompleks Fe^{+2} z o-fenantroliną ulega wybitnej stabilizacji.

A zatem, w układzie wprowadzonym przez nas dla badania redukcji, żelazo trójwartościowe pozostaje związane z EDTA, natomiast dwuwartościowe, w miarę powstawania łączy się z o-fenantroliną.

Wygodnym sposobem przedstawiania natężenia redukcji jest proponowany przez nas (patrz tablica 4) symbol QFe_N^{+2} . Pozwala on na sprowadzenie własności redukcyjnych różnych preparatów na jednostkę czasu i na te same jednostki wagowe badanego materiału biologicznego, umożliwiając bezpośrednio ich porównanie. Poważnym ułatwieniem jest możliwość odbiałczania preparatów przed oznaczeniem fotometrycznym.

W badaniach nad wpływem FeY^{-1} na oddychanie *Myc. phlei*, wzmożenie zużycia tlenu dało się zaobserwować przy użyciu wysokich stężeń kompleksu (ok. 5×10^{-2} M) (8). Mechanizm pobudzenia tłumaczono autooksydacją zredukowanego kompleksu FeY^{-2} . Opisana obecnie metoda pozwala śledzić redukcję FeY^{-1} z różnymi preparatami biologicznymi w znacznie niższych stężeniach kompleksu (6×10^{-4} M i niższe) oraz przy użyciu kilkakrotnie mniejszej ilości badanego materiału.

Stwierdzone kierunki oraz charakter wpływu temperatury, pH, warunków beztlenowych, tlenku węgla oraz amidu kwasu jodooctowego wskazują na zależność redukcji kompleksu FeY^{-1} od działania enzymatycznego łańcucha oksydo-redukcyjnego. Jedynie wpływ ciepła jest procesem bardziej złożonym. Krzywe na rys. 8, otrzymane z badania prątków nieinaktywowanych, jak i obliczone po odjęciu redukcji nieenzymatycznej mają przebieg podobny, natomiast w przypadku homogenatu wątrobowego (rys. 9) silna i rosnąca z temperaturą redukcja materiału inaktywowanego deformuje zupełnie przebieg zjawiska tak, że redukcję enzymatyczną można uzyskać tylko rachunkowo, jako różnicę. Odnosimy to do dużej zawartości rozpuszczonego białka w badanym roztworze.

Dla scharakteryzowania wielkości udziału dodanego FeY^{-1} w ogólnym procesie przenoszenia elektronów badanego materiału biologicznego można porównać ją ze zużyciem tlenu w równoległym doświadczeniu przeprowadzonym metodą Warburga. W zawiesinie całych komórek *Myc. phlei* $\text{Q}_{0_2\text{N}}$ (zużycie O_2 na 1 mgN na 1 godzinę) wynosi około 80 (własne badania nieogłoszone). Wartość QFe_N^{+2} (pojawianie się Fe^{+2} w czasie 1-godzinnej

inkubacji w μg na 1 mg N) w podobnych warunkach wynosi około 30 (tablica 4).

Z liczb tych wynika, że w pierwszym przypadku wiąże się około 3,6 mikromola tlenu. W układzie zawierającym FeY^{-1} redukuje się około 0,5 mikromola żelaza. Biorąc pod uwagę, że jedna cząsteczka tlenu przyjmuje cztery elektrony, a żelazo jeden elektron, możemy obliczyć, że na każde 28 elektronów przenoszonych w oddychaniu na tlen, jeden elektron w tym samym czasie jest przenoszony na FeY^{-1} . Na podkreślenie zasługuje fakt, że owe około 1/28 strumienia elektronów można badać z tą samą w przybliżeniu dokładnością, co pozostałe 27/28 w aparacie Warburga.

Streszczenie

Kompleks żelaza trójwartościowego z kwasem etylenodwuaminoczworoctowym (FeY^{-1}) ulega redukcji pod wpływem różnych układów biologicznych, przy czym żelazo trójwartościowe przechodzi w dwuwartościowe. Stopień redukcji można oznaczyć za pomocą o-fenantroliny, która wiąże żelazo dwuwartościowe. Na tej podstawie opracowano metodykę badania własności redukcyjnych materiałów biologicznych. Oznaczono wpływ stężenia FeY^{-1} , o-fenantroliny, pH, temperatury, warunków beztlenowych i amidu kwasu jodoctowego na redukcję kompleksu FeY^{-1} . Redukcja FeY^{-1} w homogenatach tkankowych świnki morskiej, w zawiesinie prątków kwasoopornych i preparatach mitochondriów wątroby szczura powiązana jest z enzymatycznym łańcuchem przemian oksydo-redukcyjnych.

L I T E R A T U R A

1. Brintzinger H., Thiele H., Müller U. *Z. anorg. allgem. Chemie* **251**, 285. 1934.
2. Grinberg A. *Wstęp do chemii związków kompleksowych* tłum. polskie 1954, wyd. Warszawa, 1955, 331.
3. Hawk P. B., Oser B. L., Summerson W. H., *Practical physiological chemistry* 12 Ed. The Blakiston Company Philadelphia 564, 1940.
4. Jones S. S., Long F. A., *J. Physic. Chemistry* **56**, 25, 1952.
5. Mahler H. R., Elove D. G., *J. Biol. Chem.* **210**, 165, 1954.
6. Schwarzenbach G., Heller J., *Helv. Chim. Acta* **34**, 576, 1951.
7. Tysarowski W., *Acta Physiol. Pol.* **5**, 597, 1954.
8. Tysarowski W., *Bull. Acad. Polon. Sci., CL. II*, **9**, 201, 1951.
9. Tysarowski W., *Postępy Biochemii* **1**, 341, 1955.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПОСРЕДСТВОМ КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ЭТИЛОДИАМИНОТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

Р е з ю м е

Комплекс трехвалентного железа с этилодиаминотетрауксусной кислотой (FeY^{-1}) восстанавливается под влиянием различных биологических систем, причем трехвалентное железо переходит в двухвалентное. Степень восстановления можно определить при помощи о-фенантролина, который связывает двухвалентное железо.

На этом основании разработан был метод исследования восстановительных свойств биологических материалов. Определено влияние концентрации FeY^{-1} , о-фенантролина, pH, температуры, безкислородных условий и амида иодоуксусной кислоты на редукцию комплекса FeY^{-1} .

Восстановление FeY^{-1} в гомогенатах тканей морской свинки, в суспензии кислотоустойчивых бактерий и в препаратах митохондрий печени крыс, связано с ферментатической цепью окислительно-редукционных (окислительно-восстановительных) превращений.

THE COMPLEX OF IRON AND ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID AS A NEW REAGENT FOR THE INVESTIGATION OF THE REDUCTION PROPERTIES OF BIOLOGICAL SYSTEMS

S u m m a r y

The complex of Fe^{+3} with ethylenediaminetetraacetic acid- FeY^{-1} undergoes reduction in the presence of various biological systems. Fe^{+3} in the complex is reduced to Fe^{+2} . The degree of reduction can be determined by using o-phenanthroline as a trapping agent for Fe^{+3} . This was the basis for developing a method for measuring the reducing properties of biological materials.

The effect on the reduction of FeY^{-1} complex of the following factors has been investigated: FeY^{-1} concentration, presence of o-phenanthroline and iodoacetamide, anaerobic conditions, pH, time and temperature.

The reduction of FeY^{-1} by guinea pig homogenates, suspensions of *Myc. phlei* and mitochondria of the rat liver appears to be connected with the enzymatic oxydo-reduction chain.

BRONISŁAW FILIPOWICZ, STANISŁAW GOLEWSKI, KAZIMIERZ PILEK

SKŁAD KWASÓW RYBONUKLEINOWYCH TRZUSTKI PRAWIDŁOWEJ

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi
Kierownik: Prof. dr Bronisław Filipowicz*

Wstęp

Zakład nasz prowadzi badania na temat zawartości i składu KN (kwasów nukleinowych) w różnych tkankach zwierzęcych prawidłowych i patologicznych. W tym celu opracowano polarograficzną metodę oznaczania adeniny w tkankach (10,11) i nefelometryczną metodę oznaczania puryn (19). Metoda ilościowego oznaczania nukleotydów purynowych i pirymidynowych w hydrolizatach KRN (kwasu rybonukleinowego) z tkanek, oparta na kolorymetrycznym oznaczaniu fosforu przy użyciu fotometru Pulfricha, omówiona jest w niniejszej pracy.

W jednej z poprzednich prac Zakładu (14) przebadano zawartość KRN i KDN (kwasu dezoksyrybonukleinowego) w trzustce ludzkiej.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie składu nukleotydów KRN trzustki ludzkiej prawidłowej. Narząd ten interesuje nas z racji jego podwójnej funkcji: gruczołu wewnętrznego wydzielania — (insuliny) i producenta enzymów trawiennych, a przy wytwarzaniu tych związków, kwasy nukleinowe odgrywają niepoślednią rolę.

Metody

Pierwsze próby przeprowadzano z poszczególnymi, czystymi preparatami handlowymi nukleotydów (L a R o c h e). Następnie do prób użyto mieszaniny czystych nukleotydów, potem mieszaniny nukleotydów otrzymanych przez hydrolizę alkaliczną handlowego KN drożdżowego (R i e d e l i H a ë n). W ten sposób ustalono rozmieszczenie nukleotydów na bibule po jonoforezie. W dalszym ciągu przystąpiono do oznaczania składu KRN trzustki ludzkiej prawidłowej.

W wyniku przeprowadzonych prób stwierdzono, że w naszych warunkach najdogodniejszym okazał się sposób postępowania polegający na: a) izolowaniu KN z tkanki, b) hydrolizie, c) oddzieleniu KDN od zhydrolizowanego KRN, d) jonoforetycznym rozdzielaniu mononukleotydów KRN wg metody Davidsona i Smellie (7). Dla kontroli wykonywano równolegle w tej samej próbce oznaczenie KRN metodą Schmidta i Thannhausera (21). Umieszczenie plam nukleotydów na bibule określano stosując technikę fotograficzną w nadfiolecie wg Markhama i Smitha (20), spalania na fosfor wykonywano wg Boulangera i Montreuil (1), a ilościowe oznaczenia fosforu przeprowadzano wg Fiske i Subbarowa (15). Połączenie tych metod przy wprowadzeniu pewnych własnych, opisanych poniżej, modyfikacji daje wyniki zupełnie zadowalające. Zgodność uzyskanych wyników sprawdzono polarograficznie i spektrofotometrycznie. Do rozdzielania elektroforetycznego zastosowano aparaturę własnego pomysłu opisaną poniżej.

Część doświadczalna

I. IZOLOWANIE KRN Z TRZUSTKI

Po odpreparowaniu tkanki łącznej, naczyń krwionośnych itp., pokrojoną na drobne kawałki trzustkę mielono i rozcierano w moździerz. Tak rozdrobioną masę rozważano w czterech probówkach wirówkowych po ok. 100 ml w ilości 10 g w każdej — łącznie 40 g świeżej tkanki. W celu odwodnienia i odlipidowania, papkę w probówkach zadawano mieszaniną acetonu (5 cz.) i chloroformu (1 cz.), oziębioną poniżej 0°C, biorąc na 1 g trzustki 8 ml mieszaniny. Zawartość probówek starannie mieszano przez 1 minutę i odwirowywano. Ekstrakt zlewano, a pozostałość poddawano ponownym ekstrakcjom. Czas wirowania — ok. 10 min., ilość odmywań — 5. Odwodnioną i odlipidowaną trzustkę suszono pod zmniejszonym ciśnieniem nad parafiną do stałej wagi. Po wysuszeniu określano procentową zawartość suchej substancji. Suchy preparat rozcierano w moździerz na drobny proszek przesiewając porcjami przez sito apteczne Nr 6 i przechowywano w szczelnie zamkniętej probówce. Suchy proszek trzustki w ilości odpowiadającej 1 g świeżej tkanki spalano ze stężonym H_2SO_4 i oznaczano zawartość fosforu całkowitego (P_c).

Przy wymienionych spalaniach wprowadzono pewną modyfikację. Ważna jest mianowicie kolejność dodawania odczynników. Tkanek najpierw zadawano stężonym kwasem azotowym i spalano na małym płomieniu, a gdy substancja w kolbce zaczynała czernieć dodawano jeszcze małymi porcjami (5 — 10 kropli) stężonego kwasu azotowego, aż do momentu przejaśnienia roztworu. Dopiero wtedy dodawano 5 ml 5 N kwasu

siarkowego i spalano dalej przez ok. $\frac{1}{2}$ godz. Tlenki azotu odpędzono dodatkami małych ilości wody destylowanej, a pod koniec spalania — dodatkami 2 ml 2^o/o-go roztworu mocznika. W wypadku mętnienia roztworu dodawano ok. 1,5 ml 5 N kwasu siarkowego. Przy takiej kolejności dodawania odczynników roztwór nie pieni się, co umożliwia dokładne spalanie.

W dalszym ciągu, w celu usunięcia P rozpuszczalnego w kwasach, odważkę proszku, odpowiadającą 5 g świeżej tkanki, zadawano w probówce wirówkowej poj. ok. 100 ml, 50 ml 10^o/o-go roztworu CCl_3COOH oziębnego poniżej 0°C i po dokładnym wymieszaniu bagietką, odwirowywano. Czynność tę powtarzano trzykrotnie, zlewając za każdym razem kwas z nad osadu do kolbki miarowej na 200 ml. Trzykrotne odmywanie CCl_3COOH jest wystarczające do całkowitego usunięcia z tkanki związków fosforu rozpuszczalnych w kwasach. Zawartość kolbki miarowej uzupełniano wodą destylowaną do kreski i pobierano z niej 10 ml do oznaczenia w kwasie zawartości odmytego fosforu ($\text{P}_{\text{CCl}_3\text{COOH}}$). Probówkę z pozostałym osadem ziębnono lodem i wlewano do niej ok. 50 ml wody destylowanej z lodem, mieszano i zobojętniano 2^o/o-ym roztworem amoniaku wobec γ -dwunitrofenolu (zmiana barwy w zakresie pH 4 — 5,4). Po odwirowaniu, wodę z nad osadu zlewano do kolbki miarowej poj. 100 ml i z tego pobierano 20 ml do spalania na fosfor ($\text{P}_{\text{H}_2\text{O}}$). Pozostały osad poddawano trzykrotnie jednogodzinnej ekstrakcji 10^o/o-ym roztworem NaCl na wrzącej łaźni wodnej, biorąc do każdej ekstrakcji po 20 ml roztworu NaCl i odwirowywano. W połączonych przesączach wytrącano nukleinian sodu podwójną objętością etanolu, i pozostawiano przez 24 godz. w lodówce, zaś w osadzie, pozostałym po ekstrakcji solą, oznaczano fosfor ($\text{P}_{\text{sol I}}$). Wprowadzono czterokrotne wytrącanie alkoholem, a nie jednorazowe, jak w metodzie Davidsona i Smellie gdyż, jak stwierdzono, jednorazowe wytrącanie powoduje zły rozdział nukleotydydów na bibule w czasie ich jonoforetycznego rozdzielania. Za każdym razem oznaczano fosfor zarówno w alkoholu po wytrąceniu i odwirowaniu osadu, jak też i w niewielkiej pozostałości jaka nie rozpuściła się w 10^o/o-ym roztworze NaCl. Przy podawaniu wyników analiz wprowadzono następujące skróty:

$\text{P}_{\text{sol I - IV}}$ — fosfor w pozostałości po ekstrakcjach 10^o/o-ym roztworem NaCl; kolejność ekstrakcji zaznaczano rzymską liczbą.

$\text{P}_{\text{Et I - IV}}$ — fosfor w przesączu alkoholowym po kolejnym strąceniu etanolem.

Odwirowany osad po ostatnim (czwartym) wytrąceniu alkoholem poddawano 18-godzinnej hydrolizie 0,3 N KOH w temperaturze 37°C. Klarowny hydrolizat zakwaszano następnie 60^o/o roztworem HClO_4 wobec papierka „Lachema“ do pH 1. Wytrącony osad odwirowywano, a roztwór doprowadzano 0,3 N KOH do pH 3 i pozostawiano do następnego dnia.

Małą ilość wytrąconego osadu odwirowywano powtórnie. Połączone osady zawierające KDN, $KClO_4$ i białko, spalano i j. w. oznaczano w nich fosfor (P_{osady}). Przesącz zawierający rozpuszczone nukleotydy KRN przelewano do kolbki miarowej poj. 10 ml i uzupełniano wodą do kreski. W części tego roztworu (2 ml) oznaczano całkowity fosfor rybonukleinowy (P_{KRN}), resztę zużywano do jonoforezy. Całkowity bilans fosforowy tej części pracy ilustruje zestawienie, odnoszące się do czterech trzustek ludzkich (tablica 1). Dane dotyczące badanych trzustek są następujące:

- Nr 1 Z. Z. ♀ lat 54, rozpoznanie sekc.: *Insufficiencia circulatoria*. Sekcja — 13 godz. po zgonie.
- Nr 2 B. A. ♂ lat 54, rozpoznanie sekc.: *Arteriosclerosis, Stenocardia. Infarctus myocardii*. Sekcja 25 godz. po zgonie.
- Nr 3 J. H. ♂ lat 26, rozpoznanie sekc.: *Glomerulonephritis subacuta. Hypertrophia cordis sin. Pericarditis sero-fibrinosa*. Sekcja — 10 godz. po zgonie.
- Nr 4 P. S. ♂ lat 46, rozpoznanie sekc.: *Glioblastoma multiforme lobi occipitalis et temporalis hemisphaerii sin. cerebri. Dilatio cordis. Steatosis renum*. Sekcja — 15 godz. po zgonie.

Tablica 1

Bilans fosforowy dla czterech trzustek ludzkich przy izolowaniu KRN metodą Davidsona i Smellie (7) po odlipidowaniu acetonem i chloroformem. Ilości P podane są w mg na 100 g świeżej tkanki

P	Trzustka Nr 1 mg%	Trzustka Nr 2 mg%	Trzustka Nr 3 mg%	Trzustka Nr 4 mg%
całkowity (Pc)	220,00	211,00	201,00	236,00
CCl_3COOH	83,00	81,00	81,00	87,50
H_2O	0,36	0,36	0,30	0,70
sól I	13,40	14,00	12,40	15,80
Et I	8,40	10,50	6,10	13,30
sól II	1,83	1,02	1,80	1,10
Et II	1,18	1,63	0,90	1,70
Sól III	1,43	1,10	1,40	1,40
Et III	1,20	$\Sigma_p = 127,80$	1,30	1,00
sól IV	2,00	1,16	—	1,30
Et IV	0,96	1,06	—	0,40
Osady	28,40	38,00	19,40	27,80
KRN	69,00	59,00	73,00	81,00
s u m a	211,16	210,07	197,60	233,00

Poniżej podano dla porównania wyniki analizy na fosfor (P) metodą Schmidta i Thannhausera (Tablica 2).

Tablica 2

Bilans fosforowy dla trzustki ludzkiej Nr 1 uzyskany metodą Schmidta i Thannhausera, po odlipidowaniu acetonem i chloroformem. Ilości P podane są w mg na 100 g świeżej tkanki. ΣP = suma fosforu nieorganicznego (P_N), dezoksyrybonukleinowego (P_{KDN}) i rybonukleinowego (P_{KRN})

P	mg%
całkowity (P_c)	220,00
CCl_3COOH	74,00
H_2O	0,50
Nieorganiczny (P_N)	12,30
KDN	52,60
KRN	69,10
	$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \Sigma P = 134,00$
S u m a	213,50

Otrzymane liczby (P_{KRN} — 69,00 i 69,10; ΣP — 127,80 i 134,00; suma — 211,16 i 213,50) mówią o znacznej zgodności wyników, uzyskanych dość odmiennymi metodami.

II. JONOFOREZA

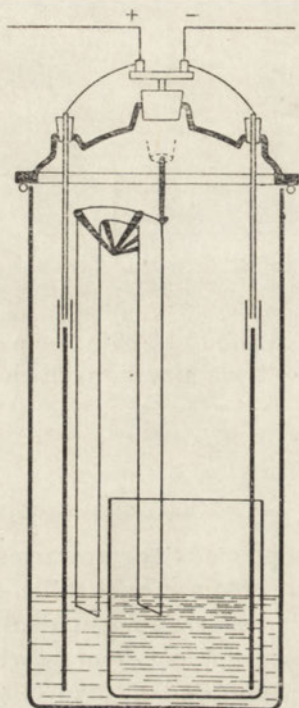
a. Nakraplanie na bibułę

Do jonoforezy nakraplano ilości substancji odpowiadające zawartości P_{KRN} w granicach od 30 do 100 μg . Trzeba w tym miejscu podkreślić, że nakraplanie większych ilości hydrolizatu utrudnia rozdzielanie nukleotydów na bibule. Plamy odpowiadające poszczególnym nukleotydom są wtedy rozlane, nieregularne, a obraz całości jest niejasny. Badany hydrolizat nakraplano na paski bibuły Whatmana Nr 1 (5 \times 50 cm). Używano do tego celu początkowo mikropipety dającej krople ok. 0,007 ml i każdą kroplę suszono lampą podczerwoną (temperatura suszenia ok. 80°C). Okazało się jednak, że umieszczanie zbyt małych kropli na bibule daje złe efekty, przypuszczalnie wskutek zbyt dużego zagęszczenia badanej substancji na małej powierzchni. W następnych próbach hydrolizat nakraplano większymi kroplami i nie suszono każdej kropli z osobna. Uzyskiwano w ten sposób plamę wyjściową o średnicy 3 — 4 cm. Po nakropieniu na pasek odpowiedniej ilości hydrolizatu i wysuszeniu jej, pasek spryskiwano roztworem buforowym. W tym celu rozpylacz szklany, napelniony buforem, włączano do przewodu tłoczącego pompy olejowej. Sposób ten pozwala na równomierne zwilżenie paska na całej długości. Wilgotny pasek (ale nie mokry!) zawieszano w aparacie do jonoforezy i poddawano elektroforezie w ciągu ok. 18 godzin.

b. Aparatura

Do jonoforezy zastosowano aparaturę własnego pomysłu. Budowę aparatu przedstawiono na rys. 1.

Aparat składa się z cylindra poj. ok. 4 litrów, do którego wstawiona jest zlewka o tak dobranej objętości, że po wlewaniu do naczynia zewnętrznego i wewnętrznego po 0,5 l roztworu buforowego, powierzchnie płynów



Rys. 1. Aparat do jonoforezy zastosowany w opisanej pracy. (Opis obok)

w obu naczyniach są na tym samym poziomie. Cylinder zamknięty jest pokrywą szklaną. W otworach pokrywy umieszczone są dwie elektrody węglowe i urządzenie do zawieszania pasków. Zawieszka ta zrobiona jest w ten sposób, że nadaje się do zawieszania pasków różnej szerokości, które opierają się na niej tylko krawędziami. Można ją przy tym podnosić lub opuszczać, w zależności od długości paska, tak aby jego końce zanurzone były w roztworze buforowym na głębokość ok. 1 cm. Sposób zawieszenia paska podany jest również w schemacie rys. 1.

c. Warunki i rozdział

Warunki w jakich elektroforeza bibułowa nukleotydów daje się przeprowadzać mogą być różne (16). W pracy niniejszej najlepsze wyniki uzyskiwano stosując roztwór buforowy octanowy o pH ok. 3,5 (950 ml 0,2 M CH_3COOH + 50 ml 0,2 M CH_3COONa), napięcie prądu stałego ok. 240 V, natężenie ok. 0,5 mA, temperatura pokojowa, bibuła — Whatmana Nr 1, paski 5×50 cm, czas trwania jonoforezy ok. 18 godz. Próbowano prowadzić jonoforezę

i w innych warunkach. w buforze cytrynianowym weromalowym, stosując różne napięcia przy stałych wymiarach paska, oraz zmieniając szerokość pasków przy stałym napięciu (tablica 3). Najlepsze wyniki otrzymano jednak w podanych wyżej warunkach.

d. Umieszczenie plam na bibule

Po zakończeniu jonoforezy pasek wyjmowano z aparatu, suszono (najwygodniej lampą podczerwoną) i określano na nim położenie plam odpowiadających poszczególnym nukleotydów. Dobre wyniki uzyskiwano przy użyciu wspomnianej wyżej metody fotografii w nadfiolecie wg Markhama i Smitha (20). Metoda ta oparta jest na spostrzeżeniu, że wszystkie pochodne puryn i pirymidyn wykazują silną absorpcję w nadfiolecie w sąsiedztwie 260 m μ . Bibuła filtracyjna jest przezroczysta w tym zakresie fal, tak, że możliwym jest naniesienie plam absorbujących substancji na

papier fotograficzny, przez zrobienie kontaktowej odbitki. Pożądane jest użycie filtru w celu uzyskania światła możliwie najbardziej monochromatycznego o ww. długości fali, zwłaszcza gdy materiały fotograficzne są

Tablica 3

Wpływ zmiany szerokości paska bibuły na napięcie, natężenie i moc prądu stałego w czasie jonoforezy. Bufor octanowy pH 3,5.

A — dla napięcia prądu stałego, nieobciążonego 1250 V

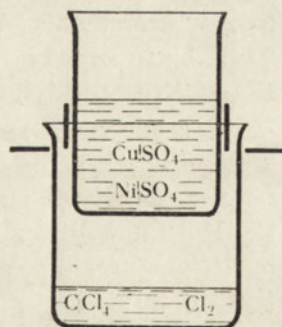
B — dla napięcia prądu stałego, nieobciążonego 750 V

Wymiary paska w cm	V	mA	W
A 1 × 50	1220	0,30	0,366
2,5 × 50	1000	0,73	0,730
3 × 50	950	0,84	0,798
4 × 50	890	1,00	0,890
5 × 50	810	1,12	0,907
B 1 × 50	730	0,17	0,124
2,5 × 50	620	0,40	0,248
3 × 50	600	0,50	0,300
4 × 50	560	0,58	0,325
5 × 50	540	0,68	0,367

czułe na większy zakres długości fal światła, emitowanego przez stosowaną lampę. Filtr taki składa się z dwóch zlewek kwarcowych umieszczonych jedna w drugiej (rys. 2).

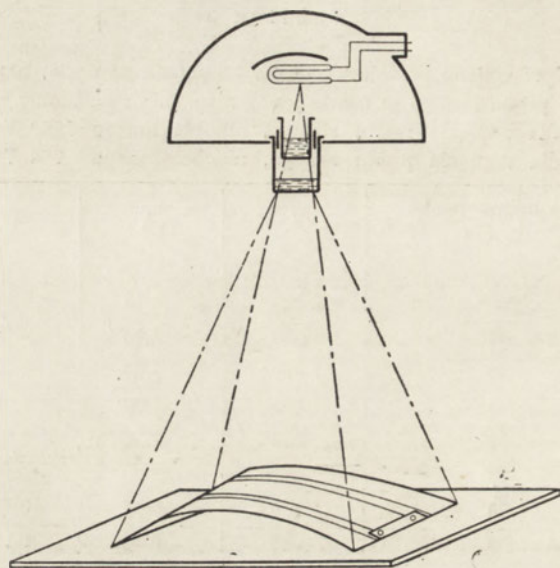
W dolnej zlewce znajduje się roztwór gazowego chloru w czterochlorowku węgla o warstwie grubości 1 cm, w górnej mieszanina wodnych roztworów siarczanów niklu i kobaltu ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 100 \text{ g/l} + \text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 350 \text{ g/l}$), o warstwie grubości 3 cm. Odległość między jedną warstwą a drugą wynosi 2 cm. Filtr wmontowany jest do lampy kwarcowej („Hanau”, 220 V, 2,5 A — lampę tę cechuje duża emisja światła o długości fali ok. 254 nm) w pozycji pionowej w odległości ok. 15 cm od U-rurki.

Wysuszony pasek bibuły przypinano pineskami do arkusza dykty odpowiednich wymiarów. Pod bibułę podkładano nieco szerszy pasek papieru fotograficznego. Nadaje się do tego celu papier fotograficzny krajowy Filmu Pol-



Rys. 2. Filtr optyczny stosowany w opisanej pracy

skiego B 34° 111C. Dla uzyskania dokładnego przylegania bibuły do papieru fotograficznego, dyktę wyginano łukowato i w takiej pozycji umocowywano na desce. Omówiony sposób ilustruje rys. 3.

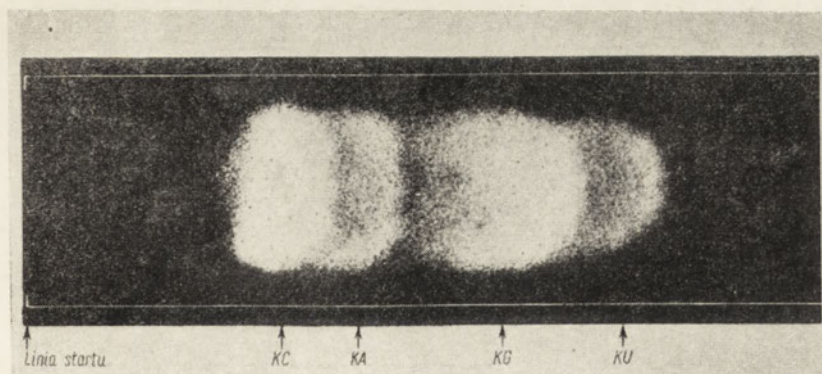


Rys. 3. Sposób wykonywania zdjęć elektroforetogramów w świetle nadfioletowym z użyciem filtru

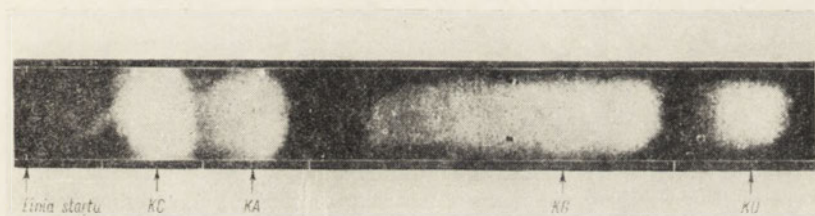
W dalszej kolejności zapalano lampę kwarcową, nagrzewano ją ok. 2,5 minut dla uzyskania pełnej emisji i dopiero po tym czasie naświetlano pasek przez 15—20 sek. Odległość paska od filtru ok. 1 m. Po naświetleniu zdjęcie wywoływano. Umieszczeniu plam na bibule odpowiadały jasne plamy na papierze fotograficznym. Stwierdzono w ten sposób obecność 4 plam odpowiadających poszczególnym nukleotydom KRN, rozmieszczonym w następującej kolejności od miejsca startu: (od strony lewej do prawej) kwas cytydylowy (KC), kwas adenylowy (KA), kwas guanylowy (KG) i kwas urydylowy (KU), (rys. 4 i 5).

W środowisku kwaśnym buforu octanowego o pH ok. 3,5, mononukleotydy jako aniony wędrują do anody, przy czym, jak wynika z kolejności rozmieszczenia, najwolniejszy jest KC, szybszy KA, jeszcze szybszy KG i najszybszy KU. Takie uszeregowanie nukleotydów KRN poddanych jonoforezie może być wytłumaczone załączonym poniżej wykresem (rys. 6) (6):

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



Rys. 4. Hydrolizat KRN trzustki wołowej nakroplony na bibułę w ilości odpowiadającej 60 μg PKRN. Pasek bibuły Whatmana Nr 1, 7×50 cm. Bufor octanowy, pH 3,5 napięcie 440 V, natężenie 1 mA. Jonoforeza 6 godzin



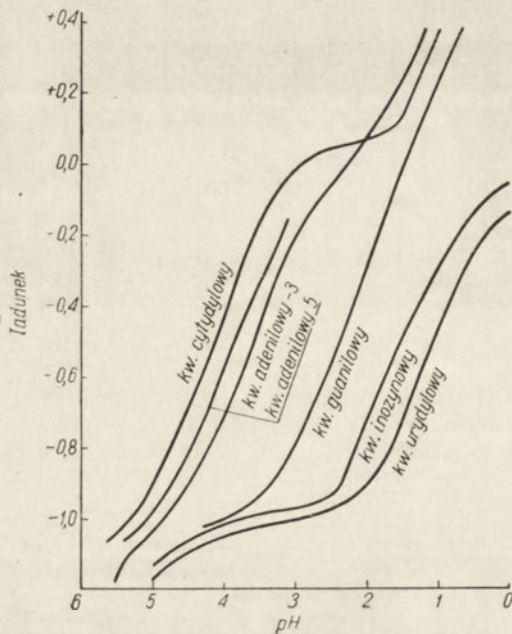
Rys. 5. Hydrolizat KRN trzustki wołowej nakroplony na bibułę w ilości odpowiadającej 100 μg PKRN. Pasek bibuły Whatmana Nr 1, 5×50 cm. Bufor octanowy pH 3,5 napięcie 240 V, natężenie 05 mA. Jonoforeza 20 godzin

szybkość ku anodzie jest największa i największe oddalenie od miejsca startu. Wykres tłumaczy również dlaczego na elektroforetogramie plamy KC i KA znajdują się blisko siebie, gdy plamy KG i KU są od nich znacznie oddalone jak to widać na rys. 5.

Porównując pasek bibuły z fotografią, zaznaczano lekko ołówkiem na bibule powierzchnie zajmowane przez plamy, z których każda odpowiadała jednemu z nukleotydów. Zaznaczone powierzchnie wycinano i spalano w celu oznaczenia fosforu zawartego w każdym z nukleotydów. Spalano również osobno te części bibuły, na których zdjęcie fotograficzne nie wykazało obecności związków purynowych i pirymidynowych.

III. SPALANIE BIBUŁY I OZNACZANIE ILOŚCIOWE NUKLEOTYDÓW

Powszechnie przyjęty sposób spalania bibuły przy oznaczeniach fosforowych zawodzi w przypadku gdy trzeba spalić większą powierzchnię bibuły Whatmana. Przyjęto zatem do tych celów sposób podany przez



Rys. 6. Zależność ładunku rybonukleotydów od pH wg Cohna (6).
Wykres tłumaczy rozmieszczenie na pasku bibuły płam nukleotydów
KRN poddanych jonoforezie. (Objaśnienia w tekście)

Boulangera i Montreuil (1), polegający na spalaniu w mieszaninie stężonych kwasów: siarkowego, nadchlorowego i azotowego.

Produkty spalania przenoszono ilościowo do kolbek miarowych na 50 ml i oznaczano P_{KRN} . Ilości P w poszczególnych plamach elektrofotogramu są bardzo niskie (w granicach od kilku do ok. 40 μg). Niemniej jednak przy użyciu kiuwet długości 5 cm można oznaczyć ok. 4 μg P_{KRN} w jednej plamie. Suma P oznaczona w każdej części bibuły, po odjęciu znalezionej uprzednio ilości P, przypadającej na bibułę czystą i używane odczynniki, daje P_{KRN} zawarty w jednym z czterech nukleotydów. Z kolei suma P_{KRN} , zawartego we wszystkich czterech plamach, powinna dać ilość P_{KRN} nakroploną pierwotnie do jonoforezy. Praktycznie uzyskuje się zadowalającą zgodność, jak to wynika z tablicy 4.

Od otrzymanych wyników oznaczeń fosforu odejmowano ilości fosforu zawarte w bibule i w odczynnikach. Dla bibuły Whatmana Nr 1 uzyskiwano na fotometrycznej ekstrakcji odpowiadające ok. 20 μg P na 250 cm^2 bibuły. Dla używanych ilości odczynników ekstrakcja odpowiadała ilości ok. 1,5 μg P.

Wyniki oznaczeń dla każdej z trzestek ujmowano w tablicę podobną do przykładowo podanej tablicy 4. W pierwszej kolumnie wypisane są

T a b l i c a 4

Bilans fosforowy paska bibuły z hydrolizatem KRN trzustki ludzkiej Nr 3, rozdzielonym na nukleotydy w czasie jonoforezy

Ilość hydrolizatu nakropiona na pasek odpowiadała $80 \mu\text{g P}_{\text{KRN}}$

L.p.	Części paska	Pow. w cm^2	P ilość ogólna μg	P bibuła + odcz. μg	P nukleotydów μg
	1	2	3	4	5
1	miejsce startu	31,00	8,60	2,50 + 1,50	4,60
2	KC	32,50	30,60	2,70 + 1,50	26,40
3	KA	21,50	13,20	1,70 + 1,50	10,00
4	KG	63,00	30,60	5,10 + 1,50	24,00
5	KU	32,00	14,00	2,60 + 1,50	9,90
6	reszta bibuły	73,00	11,20	6,10 + 1,50	3,60
	s u m a	253,00	108,20	20,70 + 9,00	78,50

$$\text{Pur/Pir} = \text{KA} + \text{KG}/\text{KC} + \text{KU} = 0,94$$

$$\text{KA/KU} = 1,01$$

$$\text{KG/KC} = 0,91$$

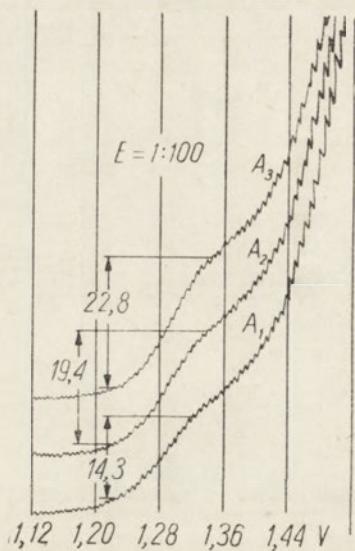
części paska: miejsce startu, w którym teoretycznie nie powinno być fosforu, dalej poszczególne nukleotydy i reszta bibuły. Kolumna 2 zawiera powierzchnie spalanych części paska w cm^2 . Suma tej kolumny powinna wynosić 250 cm^2 dla paska $5 \times 50 \text{ cm}$. Kolumna 3 podaje całkowite ilości P oznaczone na fotometrze. Od otrzymanych ilości należy odjąć liczby kolumny 4 tj. sumę P przypadającą na powierzchnię skrawka bibuły (licząc ok. $20 \mu\text{g P}$ na 250 cm^2) i P przypadającego na użyte odczynniki ($1,5 \mu\text{g}$). W wyniku otrzymuje się kolumnę 5, tj. ilości P netto, odpowiadające poszczególnym plamom. Suma tej kolumny, powinna dać ilość P_{KRN} nakropioną pierwotnie do jonoforezy. Przeciętne błędy w całkowitym bilansie fosforowym nie przekraczały 3%.

IV. KONTROLA WYNIKÓW METODĄ POLAROGRAFICZNĄ I SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

W celu skontrolowania wyników uzyskanych z oznaczenia fosforu przeprowadzono dodatkowe oznaczenie zawartości kwasu adenilowego po jonoforezie metodą polarograficzną opracowaną w Zakładzie.

W tym celu z paska bibuły, na którym w czasie jonoforezy rozfrakcjonowano hydrolizat KRN trzustki ludzkiej, wycięto plamę KA zawierającą

około 15 $\mu\text{g P}_{\text{KA}}$ (co odpowiada 168,0 $\mu\text{g KA}$) i eluowano ją 5 ml 0,1 N HCL przez 18 godzin w temp. 37°C. Z otrzymanego eluatu wprowadzono do naczynka polarograficznego 2 ml i przeprowadzono polarograficzne oznaczenie. Uzyskany wynik obrazuje krzywa



Rys. 7. Polarogram roztworu KA wyizolowanego jonoforetycznie z hydrolizatu KRN trzustki ludzkiej. Eluowano 5 ml 0,1 N HCL przez 18 godzin w temp. 37°C

A^1 rys. 7. Następnie do naczynka dolewano kolejno po 0,1 ml wzorca o stężeniu 277,6 $\mu\text{g KA}$ w ml i wykreślano drugą (A^2) i trzecią krzywą polarograficzną (A^3).

Sprawdzenie przeprowadzono na polarografie Heyrovsky'ego typ V 301.

Wyniki ilościowe obliczano z przyrostu wysokości fali po dodaniu wzorca wg znanego wzoru:

$$C_x = \frac{h_1 \cdot V_w \cdot C_w}{h_2 \cdot V_2 - h_1 \cdot V_1}$$

gdzie: C_x — stężenie substancji badanej
 h_1 — początkowa wysokość fali
 V_w — objętość dodanego wzorca
 C_w — stężenie " " "
 V_1 — początkowa objętość roztworu
 $V_2 = V_1 + V_w$
 h_2 — wysokość fali po dodaniu wzorca

Uzyskano następujące wyniki:

Metodą opisaną w niniejszej pracy znaleziono w plamie 168,0 $\mu\text{g KA}$.
 Ponieważ eluowano 5 ml 0,1 N HCL to na jeden ml wypada 33,6 $\mu\text{g KA}$.
 Metodą polarograficzną znaleziono w 1 ml 32,7 $\mu\text{g KA}$.

Przeprowadzono również kontrolne oznaczenie spektrofotometryczne. W tym celu wycięto plamę z KA (otrzymanym podczas jonoforezy hydrolizatu badanego KRN) o zawartości ok. 10 $\mu\text{g P}_{\text{KA}}$, hydrolizowano KA 5 ml 0,1 N HCL przez 4 godziny na wrzącej łaźni wodnej i oznaczano adeninę w nadfiolecie przy długości fali 262 m μ .

Do oznaczeń użyto spektrofotometru Unicam Cambridge SP 500. Ekstynkcja dla roztworu wzorcowego (13,5 $\mu\text{g adeniny/ml}$) wynosiła 0,290. Ekstynkcja dla roztworu badanego (10 $\mu\text{g P}_{\text{KA}}/5$ ml) wynosiła 0,197, co odpowiada 8,5 $\mu\text{g adeniny/ml}$.

Przeliczono P_{KA} na adeninę:

$$10 \mu\text{g P}_{\text{KA}}/5 \text{ ml} = 112 \mu\text{g KA}/5 \text{ ml} = 22,4 \mu\text{g KA}/\text{ml} = 8,7 \mu\text{g adeniny/ml}$$

Opisaną metodą znaleziono 8,7 μg adeniny/ml.

Spektrofotometrycznie znaleziono 8,5 μg adeniny/ml.

Rezultaty uzyskane omówionymi wyżej trzema metodami wykazują dość dobrą zgodność jak to widać z przytoczonych danych liczbowych.

Ostateczne wyniki opisaney pracy, wyrażone w stosunkach: puryn do pirymidyn (Pur/Pir), adeniny do uracylu (A/U) i guaniny do cytozyny (G/C) zebrane zostały w tablicy 5.

Tablica 5

Zestawienie ostatecznych wyników analizy składu KRN dla trzutek wołowych i ludzkich

Źródło KRN	Ilość P w μg				A/U	G/C	Pur/Pir	6 Am/ 6 K*)
	KC	KA	KG	KU				
Trzustka wołowa Nr 1	10,20	5,00	9,80	4,60	1,09	0,96	1,00	1,05
Trzustka wołowa Nr 2	20,40	12,00	19,80	9,10	1,32	0,97	1,08	1,12
Trzustka wołowa Nr 3	19,80	10,60	22,20	8,60	1,23	1,12	1,15	1,05
Trzustka wołowa Nr 4	31,80	17,30	37,80	13,40	1,29	1,18	1,22	0,96
średnia:					1,23	1,08	1,11	1,04
Trzustka ludzka Nr 1	39,80	16,30	37,70	14,20	1,14	0,95	1,00	1,08
Trzustka ludzka Nr 2	40,40	18,10	33,40	13,40	1,35	0,83	0,96	1,25
Trzustka ludzka Nr 3	26,40	10,00	24,00	9,90	1,01	0,91	0,94	1,07
Trzustka ludzka Nr 4	30,90	14,30	29,80	14,50	0,98	0,96	0,97	1,02
średnia:					1,12	0,91	0,97	1,10

*) 6 Am/6 K = KC + KA/KG + KU

Omówienie wyników

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki, wskazują, że opisana jonoforetyczna metoda pozwala na oznaczenie składu nukleotydów lub też zawartości puryn i pirymidyn w hydrolizacie KRN, przy pomocy dość prostych urządzeń i przy użyciu niewielkich ilości analizowanego materiału. Mimo, że zawartość P w poszczególnych nukleotydach, rozmieszczonych na pasku elektroforetogramu, jest bardzo mała, udało się uzyskać dość dobrą

zgodność między sumą P w poszczególnych nukleotydach, a ilością P_{KRN} w nakroplonym hydrolizacie (tablica 4).

W czasie izolowania badanego materiału, wyekstrahowany roztworem NaCl nukleoproteid wytrącano czterokrotnie etanolem w celu oczyszczenia. Przebieg procesu oczyszczania kontrolowano, oznaczając P zarówno w pozostałości poekstrakcyjnej (P_{s61}) jak i w płynie nad osadu (P_{Et}). W ten sposób ustalono ogólny bilans fosforowy (tablica 1), z którego wynika, że pierwsza ekstrakcja i pierwsze strącenie alkoholem nie są ilościowe (P_{s61I} i P_{EtI}). Z porównania tablicy 1 (KRN oznaczony metodą Davidsona i Smellie) i tablicy 2 (KRN oznaczony metodą Schmidta i Thannhau-sera) można przypuszczać, że przy oczyszczaniu traci się po drodze KDN, gdyż zawartości KRN, oznaczone dwiema różnymi metodami, są na ogół zbliżone. Zbyt małą ilość P_{KRN} trzustki Nr 2 (tablica 1) można tłumaczyć autolizą, analizę przeprowadzono bowiem dopiero w 25 godzin po zgonie, gdy inne trzustki analizowano znacznie wcześniej. Że autolizie ulegają przede wszystkim KRN (trzustki i śledziony), to wynika z naszych, nieogłoszonych jeszcze prac (B. Filipowicz i H. Poznańska). O szybkim znikaniu KRN w czasie autolizy zawiesiny trzustki wspominają również Kerr i współpr. (17, 18).

Godne uwagi są wyniki liczbowe tablicy 5. Z otrzymanych liczb wynika, że stosunki zawartości puryn do pirymidyn, gauniny do cytozyny i adeniny do uracylu są bliskie jedności. Pewne odchylenie od tej prawidłowości widać w stosunku adeniny do uracylu. Można to przypisać błędowi metody, można również przyjąć, że podczas jonoforezy traci się KU, gdyż w czasie wędrówki po bibule, związek ten przebywa najdłuższą drogę (patrz rys. 5).

Bardzo niską zawartość uracylu znaleźli w KRN trzustki Boulangier i Montreuil (1) oraz Chargaff ze współpracownikami (3,4). Znaleźli oni również mniej cytozyny, niż to wynika z naszych oznaczeń. Możliwe, że przy naszym dość dokładnym oczyszczaniu KRN (czterokrotna ekstrakcja solą i wytrącanie etanolem), odszczepiają się odgałęzienia łańcucha, co może wpłynąć na zmianę stosunku poszczególnych składników. Możliwe również, że u innych autorów przy preparowaniu KRN kwas cytydylowy ulega dezaminacji i przechodzi w kwas urydylowy. O takich możliwościach wspomina Kerr i współpr. (17, 18). Zdaniem tychże autorów kwas urydylowy łatwiej niż inne nukleotydy odszczepia się od łańcucha polinukleotydowego trzustki i pewna jego część ginie podczas preparowania. Nie bez znaczenia na stosunki ilościowe nukleotydów może być również proces autolizy, przebiegający w czasie pomiędzy śmiercią, a chwilą rozpoczęcia analizy tkanki. Niemniej Kerr i współpr. stwierdzili, że w KRN trzustki stosunek adeniny do uracylu jest bardzo bliski jedności.

Tego typu prawidłowości od dawna stwierdzono w KDN różnego pochodzenia (5,6). Prawidłowości te znalazły ostatnio pewne teoretyczne uzasadnienie, gdy wysunięto teorię o śrubowej budowie KDN i o wzajemnym wiązaniu się w pary: guaniny z cytozyną i adeniny z tyminą (8).

W KRN zauważyliśmy występowanie takich regularności w roku zeszytym, badając skład tych związków w trzustce zwierzęcej (12, 13). W tym samym czasie na występowanie podobnych prawidłowości zwrócili uwagę Elson i Chargaff (8), podczas badania KRN wątroby zwierzęcej. Były to pierwsze wzmianki na ten temat, wzmianki tym ciekawsze, że pozwalają one na snuce koncepcji o podobieństwie budowy obu rodzajów kwasów.

Należy dodać, że w poszukiwaniu wspólnych cech towarzyszących KRN różnego pochodzenia, Chargaff i współpr. (9) na podstawie uzyskanych ostatnio danych analitycznych, dochodzą do wniosku, że najbardziej powszechną prawidłowością jest stosunek grup aminowych w pozycji 6 (6 Am) do grup ketonowych w tejże pozycji (6 K). Stosunek ten jest bardzo bliski jedności.

W oparciu o te prawidłowości wymienieni autorzy wysuwają nowe koncepcje na temat budowy KRN. Stosunek 6Am/6K został obliczony i dla wyników uzyskanych w naszej pracy. Obliczenia te podane zostały w tablicy Nr 5; są one również bliskie jedności.

W opisanej pracy ustalono pewne, przeciętne wartości liczbowe charakteryzujące skład KRN trzustki ludzkiej prawidłowej. Wartości te zostaną wykorzystane do dalszych prac nad składem KRN i KDN trzustki patologicznej.

Streszczenie

Opisana praca miała na celu ustalenie składu nukleotydów kwasu rybonukleinowego trzustki prawidłowej, wołowej i ludzkiej.

Z tkanki, po zhomogenizowaniu, odwodnieniu i odlipidowaniu, ekstrahowano nukleoproteid 10%-ym roztworem NaCl. Ekstrakt zadawano alkoholem i wytrącony osad poddawano hydrolizie 0,3 N KOH. Z hydroliżatu wytrącano kwas dezoksyrybonukleinowy, $KClO_4$ i białko dodatkiem 60%-go roztworu $HClO_4$, a roztwór mieszaniny rybonukleotydów poddawano jonoforezie. Skrawki bibuły, zawierające poszczególne nukleotydy, spalano i oznaczano w nich zawartość fosforu rybonukleotydowego. Wyniki oznaczeń fosforu sprawdzono polarograficznie i spektrofotometrycznie.

Ustalono stosunki: adeniny do uracylu, guaniny do cytozyny, puryn do pirymidyn oraz grup aminowych w pozycji 6 do grup ketonowych w tejże pozycji. Stwierdzono, że stosunki te są bliskie jedności, co pozwala na wysuwanie hipotez na temat budowy KRN.

L I T E R A T U R A

1. Boulanger P., Montreuil J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 784, 791, (1951).
2. Chargaff E., *J. Am. Chem. Soc.* **72** 3825, (1950).
3. Chargaff E., *Federation Proc.* **10** 654, (1951).
4. Chargaff E., *J. Cell and Comp. Physiol.*, **38** 41, (1951).
5. Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D., *J. Biol. Chem.* **186** 51, (1950).
6. Cohn W. E., *J. Am. Chem. Soc.* **72** 1471, (1950).
7. Davidson J. N., Smellie R. M. S., *Biochem. J.* **52** 594, (1952).
8. Elson D., Chargaff E., *Nature*, **173** 1037, (1954).
9. Elson D., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **17** 367, (1955).
10. Filipowicz B., Leyko W., *Acta Physiol. Pol. Prace III Zjazdu*, **264** (1952).
11. Filipowicz B., Leyko W., *Bull. Soc. Sci. Lettres* **6** 1, (1953).
12. Filipowicz B., Golewski S., Pilek K., Skarżyński J., *Acta Physiol. Pol.* **5** 629, (1954).
13. Filipowicz B., Golewski S., Pilek K., *Biuletyn PAN, Cl. II*, **3** 7, (1955).
14. Filipowicz B., Leyko W., Więckowski W., *Acta Physiol. Pol.* **261** (1952).
15. Fiske C., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66** 375, (1925).
16. Golewski S., Pilek K. *Postępy Biochemii*, (przesłane do druku).
17. Kerr S. E., Seraidarian K., *J. Biol. Chem.* **180** 1203, (1949).
18. Kerr S. E., Seraidarian K., Wargon M., *J. Biol. Chem.* **181** 773, (1949).
19. Leyko W., Filipowicz B., *Roczniki Chemii* **29**, 1095 (1955).
20. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.* **49** 407, (1951); **45** 294, (1949).
21. Schmidt G., Thannhauser S. J., *Biol. Chem.* **160** 83, (1945).
22. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature* **171** 737, 964, (1953).

СОСТАВ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НОРМАЛЬНОЙ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Р е з ю м е

Цель описанной работы заключалась в определении состава нуклеотидов рибонуклеиновой кислоты нормальной воловьей и человеческой поджелудочной железы.

После гомогенизации, дегидрирования и липодегидразы ткани, из нее извлечен был, посредством 10% раствора NaCl, нуклеопротеид. К экстракту прибавлялся спирт и выпавший осадок подвергался гидролизу 0,3 N КОН. Посредством 60% раствора HClO₄ из гидролизата осаждалась дезоксирибонуклеиновая кислота KClO₄ и белок а раствор смеси рибонуклеотидов подвергался ионофорезу. Отрезки фильтровальной бумаги, содержавшие отдельные нуклеотиды сжигались и определялось содержание в них рибонуклеотидового фосфора. Результаты определений фосфора проверялись полярографически и спектрофотометрически.

Определены были соотношения: аденина к урацилу, гуанина к цитозину, пуринов к пиримидинам, а также аминовых групп в 6 позиции к кетонным группам в этой позиции.

Установлено, что эти соотношения приближаются к единице, что позволяет выдвинуть гипотезу относительно строения рибонуклеиновых кислот.

THE COMPOSITION OF RIBONUCLEIC ACIDS FROM NORMAL PANCREAS

S u m m a r y

The paper deals with the establishment of the nucleotide composition of ribonucleic acids from normal ox and human pancreas.

Nucleoproteide was extracted with 10% NaCl solution from homogenised anhydrated and defatted tissue. The extract was treated with alcohol and the precipitate hydrolysed with 0.3 N KOH. Desoxyribonucleic acid, $KClO_4$ and the protein precipitated on addition of 60% $HClO_4$ solution. The ribonucleotide mixture was separated by ionophoresis. Filter paper pieces containing the respective nucleotides were ignited and ribonucleotide phosphate was determined. The analytical results were checked polarographically and spectrophotometrically.

The adenine/uracil, guanine/cytosine, and purine/pyrimidine ratios, as well as the quantitative relationship between the amino and keto groups in the position 6, were established. As all these relationships approach unity, the authors are submitting new hypotheses concerning RNA structure.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several paragraphs of a document.

EDWARD KOWALSKI, ZBIGNIEW LATAŁŁO, STEFAN NIEWIAROWSKI

PLAZMINOGEN I PLAZMINA

I. BADANIA NAD AKTYWACJĄ PLAZMINOGENU I INAKTYWACJĄ PLAZMINY

Z pracowni Biochemii Klinicznej Instytutu Hematologii

Kierownik Pracowni: doc. dr E. Kowalski

Dyrektor Instytutu: doc. dr A. Trojanowski

Wstęp

Zainteresowanie układem fibrynolitycznym osocza ludzkiego wzrosło znacznie w ostatnich latach. Tłumaczy się to zarówno znaczeniem, jakie te procesy posiadają dla patologii i fizjologii ludzkiej, jak i możliwościami, jakie się otwierają w związku z zastosowaniem enzymów fibrynolitycznych, bądź ich aktywatorów w leczeniu choroby zakrzepowej i innych schorzeń.

Enzym fibrynolityczny osocza krwi ludzkiej, plazmina, występuje w nim w postaci nieczynnego prekursora, plazminogenu. Plazminogen może być aktywowany przez czynniki występujące w ustroju np. kinazy tkankowe (2), kinazy surowicze (21) i fermenty proteolityczne np. trypsynę, plazminę, (16), (12). Stwierdzono również aktywację fermentów fibrynolitycznych w czasie krzepnięcia (18), (19), (25), (26). Aktywacja następuje również pod wpływem czynników zewnątrzustrojowych np. chloroformu (7) a również przez różne substancje bakteryjne np. streptokinazy (10), (23) i stafylokinazy (11).

Należy zaznaczyć, że natura aktywacji plazminogenu w ustroju nie jest poznana. Tak np. kwestia, czy aktywacja plazminogenu streptokinazą jest natury stechiometrycznej (28), (31), (34) czy enzymatycznej (5), (16) jest ciągle jeszcze otwarta.

Sherry (31) przypuszcza istnienie kompleksu między streptokinazą i plazminogenem, natomiast Muellertz i Lassen (24) przyjmują, że streptokinaza nie aktywuje plazminogenu, lecz działa na inną substancję, proaktywator, która z kolei zamienia plazminogen na plazminę.

Ostatnio również Troll i Sherry (33) w oparciu o badania przeprowadzone na syntetycznych substratach rozkładanych przez plazminę estrach lizyny i argininy — zajęli stanowisko, że zamiana plazminogenu na plazminę przebiega w dwóch etapach. Pierwszym etapem jest reakcja stechiometryczna streptokinazy i proaktywatora, w wyniku której powstaje czynnik zamieniający enzymatycznie plazminogen na plazminę.

Należy zaznaczyć, że badania nad aktywacją plazminogenu innymi aktywatorami nie dały również jednoznacznych wyników (1), (22).

Celem niniejszej pracy było badanie wzajemnego oddziaływania streptokinazy i plazminogenu.

Materiał i metody

1) **Fibrynogen.** Preparaty fibrynogenu otrzymano ze szczawianowego osocza wołowego, pozbawionego protrombiny przez adsorpcję siarczanem baru. (10 l osocza — 1 kg BaSO₄). Następnie fibrynogen wytrącano siarczanem amonu przy 20% nasycenia. Osad dekantowano, wirowano i rozpuszczano w 0,9% NaCl doprowadzając do pH obojętnego. Po odwirowaniu klarowny płyn z nad osadu rozcieńczono dwudziestokrotnie wodą destylowaną, i dodawano 0,1 N kwas octowy do punktu izoelektrycznego (pH 5,3). Wytrącony fibrynogen, oddzielony przez dekantację i wirowanie rozpuszczono w 0,9% NaCl, alkaliczując do pH 7,8 i przechowywano w małych buteleczkach w temperaturze — 20°C do — 30°C.

Niektóre preparaty otrzymano z frakcji I, bezprotrombinowego osocza wołowego, którą oczyszczano dalej według Fergusona (8). Zawartość krzepnącego białka w różnych preparatach fibrynogenu oznaczono na podstawie porównania zawartości tyrozyny w roztworze fibrynogenu i otrzymanym z niego, po dodaniu trombiny, skrzepie rozpuszczonym w ługu (Seegers (30)). Zawartość krzepnącego białka wynosiła od 70% do 90%.

2) **Trombina.** Celem otrzymania trombiny, osad siarczanu baru otrzymany przy preparatyce fibrynogenu kilkakrotnie płukano 0,9% NaCl, po czym eluowano protrombinę 4% roztworem cytrynianu sodu i przeprowadzono protrombinę w trombinę za pomocą homogenizatów z mózgu królika w obecności wapnia w temperaturze 37°C. Po ukończeniu konwersji odrzucono strąty i skrzepy z resztek włóknika. Otrzymany w ten sposób płyn dializowano, następnie zamrażano i rozmrażano. Dzięki temu udało się usunąć dość znaczną ilość nieczynnego białka. Po odwirowaniu preparaty trombiny suszono przez liofilizację. Aktywność trombiny, mierzona wg. Seegersa (30) wynosiła od 10 do 40 jednostek IOWA na 1 mg suchej masy.

Do doświadczeń używano 0,1% — 0,2% roztworu trombiny.

3) **Kazeina.** Kazeinę otrzymano z odtłuszczonego mleka krowiego przez trzykrotne wytrącanie kw. octowym, odtłuszczenie i suszenie mieszaniną etanolu i eteru.

4) **Globina.** Preparat globiny ludzkiej pochodził z Działu Biochemii I. H. *)

5) **Suche frakcje I i III** uzyskane z osocza ludzkiego metodą Cohna otrzymano z Działu Biochemii I. H. *)

6) **Trypsyna krystaliczna** została otrzymana metodą Kunitza i Northropa (27) z trzustki wołowej.

7) **Streptokinaza (S).** Preparaty streptokinazy użyte do doświadczeń były otrzymane w Instytucie Hematologii przy współpracy z dr Gallis, mgr Serafińską i mgr Bujalską kilkoma sposobami: a) Szczep paciorkowca hemolitycznego hodowano na podłożu Todd-Hewett'a przez 12 godzin. Przesącz hodowli zakwaszono 6 N HCl do pH 1,5 i dodawano alkoholu etylowego do końcowego stężenia 50%. Osad dekantowano i wirowano, zawieszano w wodzie destylowanej doprowadzając ługiem do pH obojętnego, następnie wytrącano ponownie przez zakwaszenie do pH 1,5, płukano zakwaszoną wodą i suszono acetonem i eterem. b) Szczep paciorkowcowy hodowano na pożywce, której podstawą był hydrolizat trypsynowy krwi produkowany przez Instytut Hematologii. Otrzymaną hodowlę po 18 godz. doprowadzono 6 N HCl do pH 3,5, wirowano, osad zawieszano w wodzie, alkalizowano 1 N NaOH do pH 9 i odwirowywano wytrącone białko i bakterie. Otrzymany płyn z nad osadu wytrącano ponownie kwasem solnym przy pH 3,5 i uzyskany w ten sposób osad po zawieszeniu w niewielkiej ilości wody alkalizowano do pH 7,4 i liofilizowano. c) Do niektórych doświadczeń dla porównania używano „Distreptazy“ produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek, zawierającej prócz streptokinazy również streptodornazę. (dezoxyrybonukleazę). Wyniki podane w niniejszej pracy zostały uzyskane przy użyciu preparatu S opisanego w punkcie b).

Streptokinazę oznaczono nieznacznie zmodyfikowaną metodą Christensena (4) przy użyciu roztworów frakcji I i III w buforze boranowym, pH 7,8. Aktywność S mierzono w układzie:

0,5 ml roztworu S

0,1 ml trombiny

0,8 ml frakcji III 0,25%

1,0 ml frakcji I 1% (temperatura 37°C)

Za jednostkę przyjęto taką ilość S, która w ciągu dziesięciu minut powoduje upłynnienie skrzepu utworzonego z 1 mg fibrynogenu; a więc, o ile wyżej wymieniony skrzep uległ rozpuszczeniu w ciągu 10 minut

*) Dziękujemy doc. K. Zakrzewskiemu za udzielenie nam powyższych preparatów.

liczone, że w 1 ml roztworu S znajdowało się 10 jednostek. (Sucha frakcja I zawiera około 50% fibrynogenu). Ilość jednostek S w danym preparacie wyliczano przez interpolację pomiarów aktywności S w różnych rozcieńczeniach. Wszystkie oznaczenia wykonano w podwójnych próbach. Różnice odczytów pomiędzy poszczególnymi próbami nie przekraczały 10% wskaźnika f.

Aktywność preparatów streptokinazy, własnej produkcji wahała się od 80 do 400 jednostek na 1 mg suchej masy. Preparaty streptokinazy używane przez nas nie wykazywały aktywności fibrynolitycznej w stosunku do fibrynogenu wołowego ani proteolitycznej w stosunku do kazeiny i globiny.

8) **Plazminogen (P)**. Do doświadczeń użyto preparatów P otrzymanych z suchej frakcji III osocza ludzkiego według Kline'a (15). Część preparatów P otrzymano metodą własną. Metoda ta polega na ekstrakcji tłuszczowców z nieliofilizowanej frakcji III etanolem, acetonem i eterem na zimno. Z pozostałego suchego proszku wyciąga się plazminogen buforem boranowym i frakcjonuje się siarczanem amonu. Metoda ta będzie przedmiotem oddzielnego doniesienia.

Czynność preparatów plazminogenu oznaczano po aktywacji streptokinazy. Czynność proteolityczną mierzono przy użyciu kazeiny jako substratu wg przepisu Remmerta i Cohena (29). Czynność fibrynolityczną mierzono zmodyfikowaną metodą Christensena (4) w układzie:

0,25 ml P
0,25 ml S
0,1 ml trombiny
0,4 ml 0,25% fibrynogenu.

Ilość S używana do aktywacji wynosiła 40 do 200 jedn. Czas działania S na P wynosił 5 min. w temp. 37°C. Po tym okresie czasu wlewano trombinę i fibrynogen starannie mieszając. Czas rozpuszczenia skrzepu mierzono od momentu wiania fibrynogenu. Za jednostkę przyjęto taką ilość P, która po zamianie w wyżej wymienionych warunkach na plazminę powodowała rozpuszczenie skrzepu, utworzonego z 1 mg fibrynogenu w ciągu 10 min. O ile więc skrzep utworzony w powyższym układzie rozpuścił się w przeciągu 10 minut, w 1 ml roztworu plazminogenu znajdowały się 4 jednostki. Ilość jednostek w danym preparacie obliczano przez interpolację pomiarów aktywności P w różnych rozcieńczeniach.

Wszystkie oznaczenia wykonano w podwójnych próbkach. Różnice odczytów pomiędzy dwiema próbkami nie przekraczały 10% wskaźnika f.

Zaleta przyjęcia 10 minutowego czasu rozpuszczania standardowego skrzepu polega na tym, że przy czasach dłuższych np. 30 min. jak to przyjmuje Christensen zachodzi dość znaczna inaktywacja plazminy.

Preparaty plazminogenu uzyskane w naszej pracowni posiadały czynność fibrynolityczną, mierzoną naszą metodą od 30 do 200 jednostek na 1 mg białka, czynność proteolityczną od 0,5 do 1,5 jednostek Remmerta i Cohena na 1 mg białka. Wybór preparatu S nie jest bez znaczenia dla jednostkowania P.

Niektóre preparaty P wykazywały pewną czynność samoistną zarówno proteolityczną, jak i fibrynolityczną. Czynność ta nie przekraczała zwykle 10% aktywności fibrynolitycznej preparatu po jego aktywacji S.

9) **Bufor boranowy.** W większości oznaczeń i badań kinetycznych jako rozpuszczalnika używano buforu boranowego o składzie: 11,25 g H_3BO_3 , 4 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, 2,25 g NaCl, H_2O dest. do 1 litra, pH 7,8.

10) **Oznaczanie białka.** Białko w preparatach plazminogenu oznaczono metodą biuretową według Kibricka i Blonsteina (14), opierając się na krzywej standardowej sporządzonej w odniesieniu do preparatu liofilizowanej albuminy ludzkiej. Preparaty plazminogenu zawierały około 90% białka.

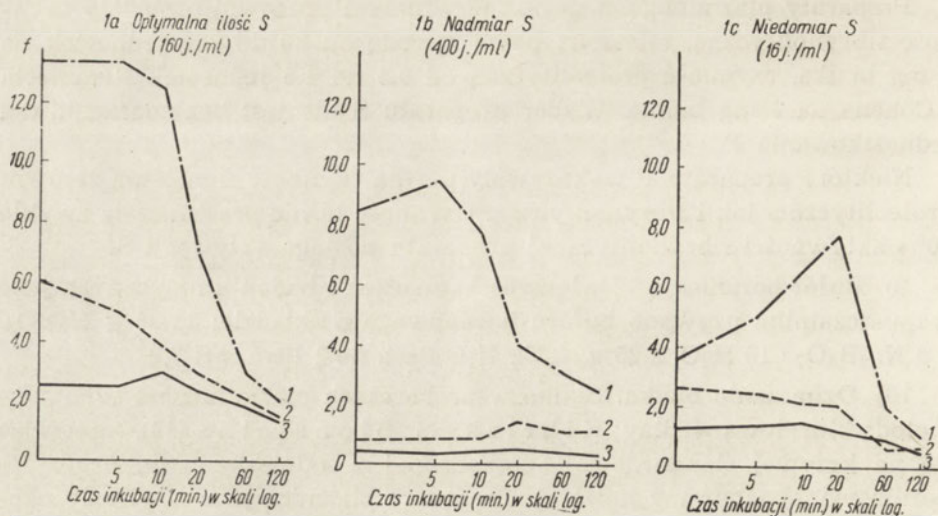
11) **Oznaczanie fibrylizy** we wszystkich doświadczeniach wykonywano w oparciu o technikę opracowaną dla oznaczania plazminogenu, (patrz punkt 8 str. 90). Większość wyników została wyrażona we wskaźniku fibrynolitycznym $f = \frac{1000}{t}$ sek.

12) **Oznaczanie proteolizy** wykonywano przeważnie w układach 0,5 ml P + 0,5 ml S lub 0,5 ml P + 0,5 ml S + 1,0 ml 2% kazeiny lub 2% globiny. Do inkubatu dodawano kwasu trójchlorooctowego do końcowego stężenia 3,3%. W przesączu oznaczano przyrost tyrozyny odczynnikiem Folin — Ciocalteu w modyfikacji miedziowej (13) w porównaniu z próbą kontrolną. Obliczano przyrost równoważnika tyrozyny w odniesieniu do całego układu, lub na 1 mg plazminogenu.

Część doświadczalna

I. WPŁYW CZASU INKUBACJI S I P NA AKTYWNOŚĆ FIBRYNOLITYCZNĄ PLAZMINY

W szeregu doświadczeń przebadano wpływ czasu inkubacji S i P na aktywność powstałej plazminy. Większość obserwacji przeprowadzonych przy pH 7,8 i temperaturze 37°C wskazuje na to, że optymalna ilość plazminy powstaje w czasie od 0 do 10 minut, licząc od momentu zmieszania obu substancji. Przeważnie już po upływie 20 minut od początku reakcji, a niekiedy już znacznie wcześniej po 2 — 3 minutach następował spadek czynności plazminy, zaznaczający się już bardzo wyraźnie po upływie 1 godziny.



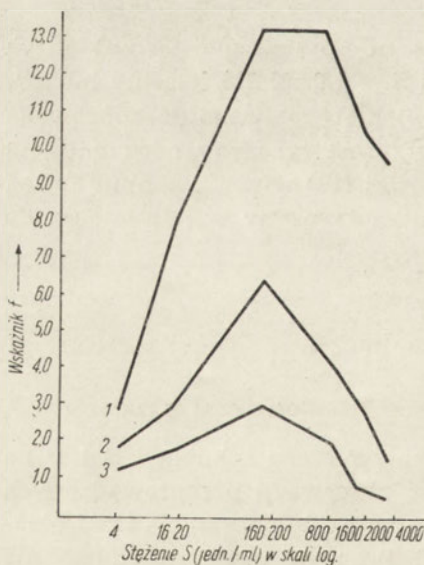
Rys. 1. Wpływ czasu inkubacji na interakcję S+P zależnie od ilości S. Stężenia P: 1) P — 1%; 2) P — 0,2%; 3) P — 0,02%

Wykres 1 a, b, c, ilustruje zachowanie się czynności plazminy w różnych okresach czasu, licząc od momentu zmieszania S i P przy uwzględnieniu różnych stężeń obu substancji. Z przeprowadzonych doświadczeń można wysnuć następujące wnioski:

1) Aktywność fibrynolityczna plazminy jest tym większa im większe jest wyjściowe stężenie P.

2) Aktywność fibrynolityczna plazminy wytworzonej w wyżej podanych warunkach doświadczalnych, zależy również od wyjściowego stężenia S; zarówno przy niskich, jak i przy bardzo wysokich stężeniach S uzyskuje się mniejszą aktywność plazminy, niż przy stężeniu optymalnym, wynoszącym w zależności od preparatu S od 100 do 800 j/ml. Optymalne stężenie S jest niezależne od stężenia P (wykres 2).

3) Czas, w którym powstała największa ilość plazminy wynosił praktycznie 0 w doświadczeniach,



Rys. 2. Maksymalna aktywność plazminogenu zależnie od stężenia streptokinazy.

Stężenia P: 1) P — 1%; 2) P — 0,2%; 3) P — 0,02%

w których użyto optymalnych stężeń S (wykres 1a). Użycie nadmiernie stężonej lub zbyt słabej S (wykres 1c) przedłuża czas powstania optymalnej aktywności plazminy, nawet niekiedy do 20 minut, licząc od początku doświadczenia.

4). Z doświadczeń zestawionych wynika, że szybkość spadku aktywności plazminy była na ogół proporcjonalna do aktywności plazminy powstałej w pierwszym etapie reakcji S + P (wykres 1 a, b, c.). Sama streptokinaza i plazminogen wolny od czynności samoistnej w powyższych warunkach inaktywowały się tylko bardzo nieznacznie.

II. WPLYW STĘŻENIA S NA AKTYWACJĘ PLAZMINOGENU NA PLAZMINIE

Jak już zaznaczono do maksymalnej aktywacji P konieczne jest pewne optymalne stężenie S. Wynosi ono niezależnie od stężenia P 160 j/ml (wykres 2). Zbyt mała ilość S wystarcza do pełnej aktywacji nawet przy dłuższym działaniu na P w temp. 37°C. Zbyt duże ilości S powodowały zahamowanie fibrynolizy; w obu wypadkach czas potrzebny do osiągnięcia optymalnej aktywności wydłużał się do 20 minut. Również inaktywacja powstałej plazminy była powolniejsza. (wykres 1 a, b, c.)

Tablica 1

Wpływ temperatury na stabilność streptokinazy i „inhibitora“

Preparat	Wyjściowa ilość jednostek	Ilość jednostek po ogrzaniu*)	Czas rozpuszczenia skrzepu w minutach**)	Wskaźnik f
S nieogrzana	3200	—	12'	1,30
— „ —	800	—	6'50''	2,45
— „ —	200	—	5'25''	3,07
— „ —	50	—	5'50''	2,85
S ogrzana 1 godz. 100°C	3200	180	12'	1,30

*) mierzona metodą rozcieńczeń wg. Christensena

**) mierzony w układzie P + S + trombina + fibrynogen

Stwierdzono, że działanie hamujące roztworów o dużym stężeniu S jest zależne od zawartości w tychże roztworach substancji bardziej ciepłostajnej od S. Dowodzi tego doświadczenie przedstawione w tablicy 1. Po ogrzaniu do temp. 100°C, czynność stężonego preparatu (3200 jedn./ml)

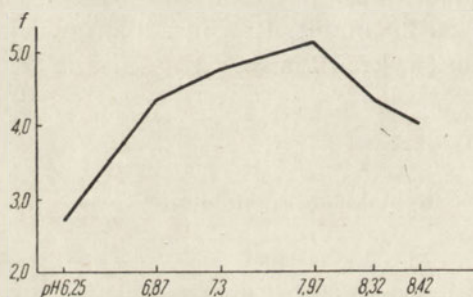
obniża się do wartości odpowiadającej 180 jednostkom zwykłego preparatu, badanego metodą rozcieńczeń. Aktywność plazminy powstałej przy użyciu ogrzewanego preparatu S, jest równa aktywności, jaką uzyskuje się za pomocą preparatu stężonego i nieogrzanego.

Doświadczenie to dowodzi, że działanie hamujące S zależy od obecności w preparatach streptokinazy inhibitora bardziej ciepłostalego od kinazy.

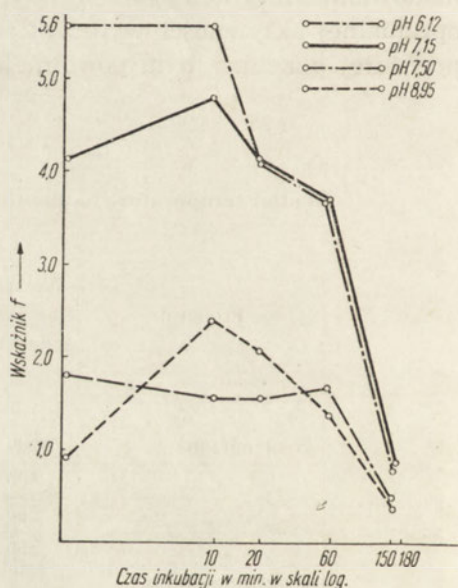
III. WPŁYW pH I TEMPERATURY NA REAKCJĘ P + S I NA INAKTYWACJĘ PLAZMINY

Optimum fibrynolitycznego działania plazminy leży przy pH 7,6, do 8 (wykres 3a).

Wykres 3b ilustruje zachowanie się czynności plazminy powstałej przez aktywację S w temp. 37°C, w zakresie pH od 6,25 do pH 9,0 w cza-



Rys. 3a. Czynność plazminy w zależności od pH $f = \frac{1000}{t}$ sek



Rys. 3b. Aktywacja plazminogenu i inaktywacja plazminy w różnych pH

sie od 0 do 180 minut. Z doświadczenia tego wynika, że czynność plazminy stopniowo spada we wszystkich pH, najszybciej jednak w tych pH, w których wyjściowa czynność plazminy była największa tj. w pH 7,5 — 8,0. Podobnie stwierdzono, że proteoliza w układzie SP jest najszybsza przy tym pH.

Czynność plazminy jest najwyższa w temp. 37°C, obniża się w wyższych temperaturach, znacznie obniża się w niższych.

Pod wpływem tych samych ilości plazminy, czas lizy skrzepów utworzonych z jednakowych ilości fibrynogenu, wynosił:

w temp. 10°C	—	180 min.
„ „ 20°C	—	40 „
w temp. 37°C	—	8 min.
„ „ 45°C	—	17 „

Aktywacja plazminogenu na plazminę zachodzi znacznie wolniej w temperaturze 10°C, niż w temperaturze 37°C. Działając optymalnymi ilościami S na P w temperaturze 10°C największe stężenie plazminy osiąga się już po kilku godzinach. Jeżeli natomiast aktywować plazminogen małymi ilościami S, czynność plazminy stopniowo wzrasta i osiąga optimum dopiero po kilku dniach. W temperaturze 10°C mała ilość S może prowadzić do powstania takich samych prawie ilości plazminy, co dawka optymalna S, jednak dopiero po dłuższym czasie inkubacji (tablica 2).

Tablica 2

Aktywacja plazminogenu na plazminę przez streptokinazę w temp. 10°C

Układ	Czasy rozpuszczania skrzepów (temp. 37°C) pod wpływem plazminy					
	przy czasach inkubacji układu P + S w temp. 10°C					
	15'	155'	20g	48g	72g	96g
P + S 160 j/ml	2'25''	2'15''	3'15''	3'30''	2'30''	3'15''
P + S 20 j/ml	6'	4'15''	3'30''	3'20''	2'45''	3'15''
P + S 4 j/ml	12'	9'	5'45''	4'30''	2'50''	3'15''
P + S 1 j/ml	18'	15'	14'	10'30''	6'45''	7'
P + bufor	22'	21'	22'	15'	12'	11'

IV. WPLYW PLAZMINOGENU I STREPTOKINAZY NA PLAZMINĘ UNIECZYNIONĄ W CZASIE INKUBACJI

Preparaty P inkubowane z S tracą stopniowo swoją czynność. Jeżeli do układu S + P po trzech godzinach inkubacji, kiedy spadek aktywności jest już wyraźny, dodać ponownie S czynność fibrynolityczna układu zwykle wzrasta nie osiągając jednak wyjściowych wartości. W doświadczeniach, które ilustruje wykres 4, aktywowano jednakowe ilości plazminogenu różnymi ilościami S. Im mniejsza była aktywność wyjściowa, tym powolniejszy był spadek czynności plazminy i tym większą można było uzyskać reaktywację dodatkiem optymalnej ilości streptokinazy. Zaznaczyć jednak należy, że w żadnym wypadku nie uzyskano wyjściowej aktywności. Reaktywacja nadmiernymi ilościami S była słabsza niż przy

użyciu ilości optymalnych. W próbkach P inkubowanych z nadmiarem S reaktywacja praktycznie nie zachodziła. Przekonano się również, że w miarę czasu inkubacji układu S + P spada zdolność jego reaktywacji



Rys. 4. Wpływ ponownego dodania streptokinazy do układu P+S, inkubowanego 170 min.

- A) Początkowa czynność fibrynolityczna w układzie S+P;
 B) Czynność fibrynolityczna po 170 min. inkubacji;
 C) Czynność fibrynolityczna układu po reaktywacji S — 800 j. ml;
 D) Czynność fibrynolityczna układu po reaktywacji S — 4000 j. ml

przez dodatek nowej ilości S. Tym niemniej po 24 godzinach inkubacji udaje się jeszcze reaktywować nieznacznie układ przez dodatek streptokinazy.

Wykonane metodą rozcieńczeń oznaczenia S, w inkubowanym układzie S + P, wykazują spadek zawartości S w czasie inkubacji (tablica 3). Nie jest wykluczone, że zjawisko to może zależeć od proteolitycznego działania plazminy. W doświadczeniach kontrolnych stwierdzono, że aktywność S spada pod wpływem działania trypsyny.

Tablica 3

Zachowanie się streptokinazy w czasie inkubacji S i P

Układ	Ilość jednostek S w 1 ml w czasie inkubacji w 37°C			
	0'	20'	70'	24 godz.
S	80 j	—	—	40 j
S+P 0,25%	3200 j	600j	400j	pon. 10 j
S+P 0,25%	160 j	40 j	10 j	ślady

bądź aktywacją plazminogenu przez resztki niezniszczonej S, bądź przez powstałą w układzie plazminę.

V. INAKTYWACJA SAMOISTNIE CZYNNEJ PLAZMINY

Jak już wspomniano, niektóre preparaty P. otrzymane w naszej pracowni posiadały samoistną czynność fibrynolityczną i proteolityczną. Przy inkubacji tych preparatów bez dodatku aktywatora stwierdzono, że czynność fibrynolityczna plazminy stopniowo spadała (w temp. 37°C). Spadek czynności był tym szybszy im większa była aktywność wyjściowa. W jednym z doświadczeń, które ilustruje tabela 4, badano zachowanie się

Tabela 4

Inaktywacja samoistna czynnej plazminy

Czas inkubacji	Czas rozpuszczania skrzepu		Wskaźnik		% Plazminy *) czynnej	
	I	II	I	II	I	II
0	2'40''	13'10''	6,26	1,26	100	79
3	2'40''	10'50''	6,26	1,53	100	100
6	3'10''	13'	5,27	1,28	73	81
9	3'40''		4,55		59	
10		14'45''		1,12		73
12	4'30''		3,70		44	
15	5'15''	19'	3,18	0,88	32	61
30	6'40''		2,50		22	
50		23'		0,73		54
60	9'30''		1,74		15	
120		45'		0,37		32
180	22'30''		0,74		6	

I stężenie plazminy 1,38% białka

II „ „ 0,35% „

*) obliczany na zasadzie oznaczenia jednostek metodą rozcieńczeń.

czynności fibrynolitycznej plazminogenu inkubowanego w 37°C w dwóch stężeniach: 1,38% i 0,35% białka. Jak wynika z tablicy spadek czynności plazminy jest znacznie większy w roztworze stężonym niż w rozcieńczonym.

VI. ZAPOBIEGANIE INAKTYWACJI PLAZMINY

Punktem wyjścia dla poniżej przedstawionego doświadczenia było założenie, że inaktywacja plazminy w czasie przechowywania jej w temp. 37°C zależeć może od samorzutnego proteolitycznego rozpadu cząsteczek. Postanowiono przebadać, jak wpływa dodatek zarówno różnych białek —

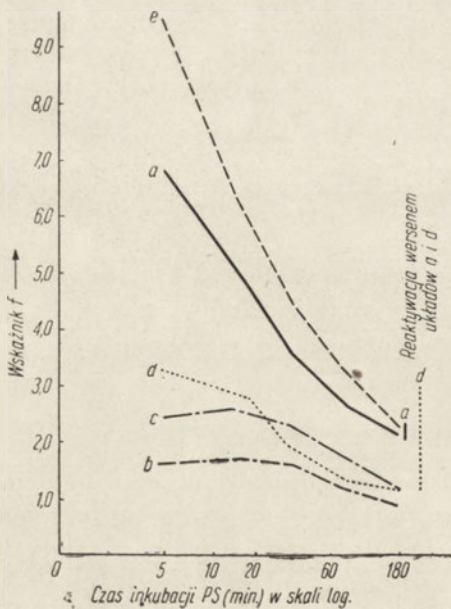
Tablica 5

Aktywacja plazminogenu przez skojarzone działanie trypsyny (T) i streptokinazy (S)

Układ	P+bufor	P + Trypsyna 100 $\mu\text{g/ml}$		P + Trypsyna 50 $\mu\text{g/ml}$		P + S 320 j/ml		P + S 8 j/ml	
		Czas lizy		Czas lizy		Czas lizy		Czas lizy	
		układ +bufor	układ +S 320 j/ml	układ +bufor	układ +S 320 j/ml	układ +bufor	układ +T 100 $\mu\text{g/ml}$	układ +bufor	układ +T 100 $\mu\text{g/ml}$
0'	4'35''	3'10''	2'	3'20''	2'10''	1'40''	1'15''	3'15''	3'20''
3'	4'50''	3'	—	4'	—	1'15''	—	3'10''	—
6'	5'15''	3'20''	2'30''	4'15''	2'15''	1'50''	2'	3'20''	2'30'
9'	5'45''	4'35''	3'	4'55''	2'45''	1'55''	2'20''	3'45''	3'
60'	21'30''	20'	7'30''	23'	4'30''	4'	4'45''	11'	9'30''
120'	45'	39'	8'15''	49'	5'	7'30''	5'45''	22'	11'45''

Objaśnienie: Do układów P + bufor; P + T; P + S dodawano po różnych odstępach czasu inkubacji a) buforu, b) trypsyny lub streptokinazy i mierzono natychmiast czynność fibrynolityczną plazminy.

substratów dla plazminy oraz inhibitorów takich, jak metale (17) na jej inaktywację w temp. 37°C. W tym celu po 5 min. inkubacji P+S w optymalnej ilości dodano do układu jednakowe ilości: a) buforu boranowego, b) kazeiny (do końcowego stężenia 0,4%), c) globiny (końcowe stężenie 0,4%), d) CuSO_4 (końcowe stężenie $2 \cdot 10^{-4}$ M), e) wersen (końcowe stężenie $2 \cdot 10^{-2}$ M) (wykres 5). Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, że dodatek kazeiny, globiny i siarczanu miedzi powoduje zarówno zahamowanie czynności fibrynolitycznej plazminy jak i zahamowanie jej inaktywacji. Po upływie 18 minut inkubacji próbowano reaktywować układ a) i d) dodatkiem



Rys. 5. Próby zahamowania inaktywacji plazminy

a) P+S+bufor; b) P+S+kazeina (końcowe stężenie 0,4%); c) P+S+globina (końcowe stężenie 0,4%); d) P+S CuSO_4 (końcowe stężenie $2 \cdot 10^{-4}$ M); e) P+S+wersen (końcowe stężenie $2 \cdot 10^{-2}$ M)

wersenu. Stwierdzono, że po reaktywacji w układzie d) powstaje znacznie większa czynność fibrynolityczna niż w układzie a), co przemawia za tym, że dodatek jonów miedzi chroni rzeczywiście plazminę od inaktywacji. Podobnie udało się wykazać, że dodatek kazeiny do samoistnie czynnej plazminy powoduje zarówno zahamowanie jej czynności fibrynolitycznej jak i zwolnienie inaktywacji.

Stwierdzono, że plazmina wytworzona we frakcji euglobulinowej osocza ludzkiego lub w roztworze frakcji III, otrzymanej według Cohna, nie traci swej czynności przez okres przynajmniej 1 godziny w temperaturze 37°C. Można by to tłumaczyć ochronnym działaniem białek w tych frakcjach osocza.

VII. PROTEOLIZA W INKUBATACH PLAZMINOGENU I STREPTOKINAZY

Stwierdzono, że w czasie inkubacji układu S + P w temperaturze 37°C, następuje przyrost niebiałkowych substancji azotowych, rozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym (tablica 6). Przyrost ten dawał się uchwycić

Tablica 6

Porównanie przyrostu równoważnika tyrozyny w układzie P + S i w układzie P + trypsyna w temp. 37°C

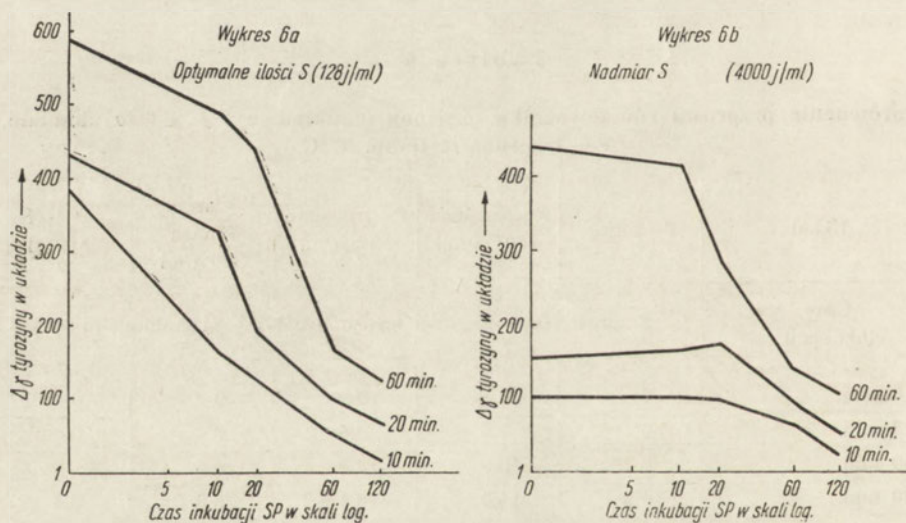
Układ	P+bufor	P+trypsyna 100 µg/ml	P+trypsyna 50 µg/ml	P+strepto- kinaza 320 j/ml	P + S 8 j/ml
Czas inkubacji	Przyrost równoważnika tyrozyny g/1 mg plazminogenu				
0 min.	0	0	0	0	0
3 min.	0	0,6	2,5	0	0
60 min.	0,25	10,0	10,1	0,6	—
120 min.	0,5	15,0	10,1	5,0	3,5

już po 6 minutach inkubacji i narastał stopniowo przez cały okres doświadczenia. Był on na ogół tym większy, im większe było stężenie P i S w inkubacie. Jak wykazano w doświadczeniach, w których stosowano duży nadmiar S i mało P, oraz odwrotnie, dużo P i mało S, przyrost tyrozyny może pochodzić zarówno z preparatów plazminogenu jak i streptokinazy. Podobnie można było stwierdzić przyrost równoważnika tyrozyny rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym w preparatach plazminogenu, które posiadały samoistną czynność i która w czasie przechowywania tych preparatów w temp. 37°C stopniowo malała.

Wydaje się, że przyrost tyrozyny w układzie S+P może częściowo zależeć od trawienia białek zanieczyszczających preparaty S + P, tym niemniej nie jest wykluczone, że może on być także związany z przejściem plazminogenu w plazminę, bądź z inaktywacją plazminy, bądź z trawieniem S przez plazminę. Fakt ten jest obecnie przedmiotem dalszych badań.

VIII. AKTYWACJA I INAKTYWACJA PROTEOLITYCZNEJ CZYNNOSCI PLAZMINY

Badano reakcje S + P mierząc czynność proteolityczną powstałej plazminy przy użyciu kazeiny jako substratu. Czas potrzebny na uzyskanie maksymalnej aktywności proteolitycznej plazminy po zmieszaniu S i P w temp. 37°C wahał się od 0 do 20 minut. W niektórych przypadkach stwierdzono pewne opóźnienie aktywacji czynności proteolitycznej plazminy w stosunku do czynności fibrynolitycznej tego enzymu. Natomiast inaktywacja obu czynności plazminy przebiegała podobnie (porównaj wykresy 1a i 6a oraz 1b i 6b).



Rys. 6 (6a, 6b). Wpływ czasu inkubacji układu SP na proteolityczną czynność plazminy, mierzoną za pomocą trawienia kazeiny przez 10, 20, 60 minut

Podobnie jak w doświadczeniach opartych na pomiarze czasu fibrynolizy, stwierdzono, że czynność proteolityczna powstałej plazminy zależy zarówno od stężenia P jak i od stężenia S. Przy małych stężeniach S, nawet przy dłuższym czasie inkubacji, otrzymano niskie wartości przyrostów produktów proteolizy. Stwierdzono również, że aktywacja dużymi ilościami S (4000 j/ml) daje niższą czynność proteolityczną niż ilości rzędu 200 j/ml.

IX. PORÓWNANIE AKTYWACJI PLAZMINOGENU STREPTOKINAZĄ I TRYPSYNĄ

Przy badaniu mechanizmu aktywacji plazminogenu streptokinazą wydawało się celowe porównać przebieg tejże aktywacji z aktywacją plazminogenu przez tripsynę. Stwierdzenie analogii kinetycznych przy użyciu obu aktywatorów pozwoliłoby traktować doświadczenia z tripsyną jako modelowe w stosunku do doświadczeń ze streptokinazą przy założeniu, że działanie tripsyny sprowadza się do dobrze zdefiniowanego działania enzymatycznego.

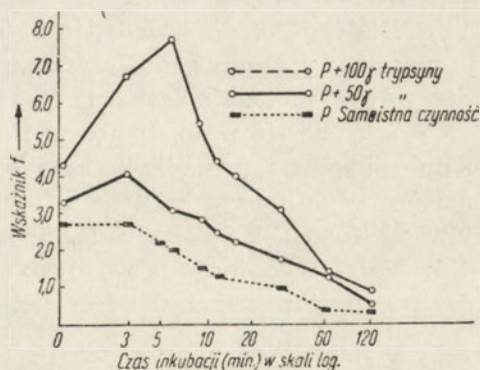
W doświadczeniu wstępnym stwierdzono, że duże ilości tripsyny (powyżej 100 μg na 1 ml) powodują szybkie rozpuszczenie skrzepów utworzonych z fibrynogenu wołowego. Dlatego też do doświadczeń nie używano wyższych stężeń tripsyny niż 100 μg na 1 ml — czas rozpuszczania kontrolnego bezplazminogenowego skrzepu wynosił wtedy 12 min. 50 gamma na 1 ml, czas lizy próbki kontrolnej 30 do 40 minut 20 gamma na 1 ml, czas lizy 60 minut.

Z przeprowadzonych doświadczeń nad aktywacją plazminogenu tripsyną, można wysunąć następujące wnioski:

1) Tripsyna aktywuje zarówno plazminogen pozbawiony samoistnej czynności fibrynolitycznej, jak też i plazminogen o dużej samoistnej czynności fibrynolitycznej. Czas inkubacji plazminogenu i tripsyny, po upływie którego powstaje maksymalna czynność plazminy, wahał się od 0 do 6 minut. Następnie czynność fibrynolityczna plazminy stopniowo zmniejszała się (wykres 7). Krzywe aktywacji plazminogenu tripsyną przebiegają więc podobnie do krzywych aktywacji plazminogenu przez streptokinazę.

2) Aktywacja plazminogenu przy użyciu ilości tripsyny rzędu 100 μg na 1 ml, nie osiągała tych wartości, jaką dawała optymalna ilość S. Można było natomiast zwiększyć aktywność plazminogenu, uprzednio traktowanego tripsyną poprzez dodatek optymalnej ilości S. Plazmina otrzymana przez działanie optymalnej ilości S na plazminogen nie zwiększała już swej aktywności pod wpływem tripsyny, natomiast dodatek tripsyny do układu P + małe stężenie S, powodował dalszą aktywację (tablica 5).

3) Stwierdzono, że w czasie działania tripsyny na plazminogen i to zarówno w okresie narastania czynności plazminy, jak i jej spadku, nastę-



Rys. 7. Aktywacja plazminogenu tripsyną

puje przyrost produktów hydrolizy białka rozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym.

Porównanie przyrostu rozpuszczalnego w kwasie równoważnika tyrozyny w układzie plazminogen-trypsyna i plazminogen-streptokinaza, uwiadczenia tablica 6. Jak wynika z tej tablicy przyrost równoważnika tyrozyny jest znacznie wyższy w układach zawierających trypsynę, niż w układach zawierających streptokinazę.

Dyskusja

Używane przez nas preparaty S i P choć znacznie oczyszczone, (aktywność w stosunku do ilości białka kilkadziesiąt razy większa w porównaniu z materiałem wyjściowym) nie były jednorodnie elektroforetycznie. Ponieważ brak dotąd zupełnie czystych preparatów S i P nie można wyciągać ostatecznych wniosków co do natury reakcji streptokinaza-plazminogen oraz mechanizmu inaktywacji plazminy, można jedynie wysuwać mniej lub więcej ugruntowane hipotezy. Wobec rozbieżności wyników znalezionych w piśmiennictwie posługiwaliśmy się preparatami streptokinazy i plazminogenu, otrzymanymi różnymi metodami. Stwierdzono rzeczywiście pewne różnice w zachowaniu się różnych preparatów zarówno co do ich aktywności, szybkości inaktywacji jak i proteolizy. Dlatego to, do doświadczeń umieszczonych w tej pracy używano preparatów plazminogenu, otrzymanych metodą własną, i streptokinazy, otrzymanej metodą opisaną na str. 89, w punkcie b).

Jak się okazało, porównanie preparatów otrzymanych metodą Kline'a i własną, wypadło na korzyść tej ostatniej. Do zalet naszej metody należy: 1) uniknięcie liofilizacji frakcji III, 2) duże oczyszczenie preparatów od tłuszczów i lipoprotein, 3) znaczne skrócenie czasu postępowania i 4) lepsza wydajność przy równym mniej więcej stopniu oczyszczania. Jako kryterium czynności fibrynolitycznej przyjęto wskaźnik fibrynolityczny $f = \frac{1000}{t}$ gdzie t = czas lizy w sek. Sposób oznaczania czynności fibrynolitycznej w czasie lizy lub jego odwrotności wydawał się słuszniejszy niż wyrażanie jej w jednostkach opartych na interpolacji z krzywej rozcieńczeń, ponieważ stwierdza się pewne różnice kinetyczne w układzie rozcieńczonym i stężonym.

Utrzymanie standardowych warunków przy oznaczaniu aktywności fibrynolitycznej P nastęrcza dość znaczne trudności. Należy zaznaczyć, że ściśle porównywalne mogą być tylko wyniki uzyskane przy użyciu jako substratu fibrynogenu pochodzącego z tej samej serii produkcyjnej. (Możliwe jest przechowywanie fibrynogenu w zamrażarce przez okres kilku miesięcy. Szkło użyte do oznaczeń winno być wolne od śladów metali)

(17). Ponadto spostrzeżono, że przekrój probówki posiada pewien wpływ na szybkość upłynniania się skrzepu. Wreszcie zauważono, że mniejszą rozbieżność pomiarów uzyskuje się przyjmując jako kryterium czas rozpuszczania skrzepu w ciągu 10 minut a nie 30 minut, jak podaje w oryginalnym przepisie Christensen (4). Przy złym mieszaniu próbki w chwili wlewania fibrynogenu powstać może niejednorodny skrzep, co zmienia wyniki pomiarów. Ilość trombiny przy oznaczaniu nie wydaje się posiadać istotnego znaczenia.

Zasadniczym zagadnieniem, do którego należy się ustosunkować na podstawie przeprowadzonych badań jest kwestia, czy reakcja $S + P$ ma charakter enzymatyczny, czy stechiometryczny. Jak już zaznaczono na wstępie sprawa ta jest ciągle jeszcze przedmiotem dyskusji w piśmiennictwie. Analiza danych doświadczalnych przemawia za naturą enzymatyczną tej reakcji. W przypadku gdyby S tworzyła stechiometryczne połączenia z P , postulowane przez różnych autorów (28), (34) optymalne stężenie S potrzebne dla wytworzenia plazminy byłoby różne dla różnych stężeń P . Tymczasem jak wynika z wykresu 2 optymalne stężenie S jest jednakowe dla różnych stężeń P . Ponadto stwierdzono podobieństwo aktywacji w temp. 37°C plazminogenu trypsyną do aktywacji streptokinazą (wykres 1, 7).

Doświadczenia nad aktywacją plazminogenu streptokinazą w temperaturze 10°C przemawiają również za enzymatyczną naturą tego procesu. W tej temperaturze przy stałym stężeniu P , małe stężenia S powodują powstanie takich samych ilości plazminy jak duże stężenia, jednak po odpowiednio dłuższym czasie reakcji. „Pozorną stechiometryczność“ reakcji $S + P$ w temp. 37°C można tłumaczyć naszym zdaniem tym, że powstała plazmina szybko inaktywuje się w tej temperaturze. Można tu szukać analogii z aktywacją trypsynogenu przez enterokinazę (20). Niektóre sprzeczności w piśmiennictwie dotyczące mechanizmu działania S , tłumaczą się faktem zawartości w preparatach S inhibitora, który hamuje plazminę (tablica 1). Inhibitor ten jest bardziej ciepłostály od streptokinazy. Przyjęcie istnienia tego inhibitora tłumaczy fakt, dlaczego bardzo duże stężenia S w układzie $S + P$, dają mniejszy efekt fibrynolityczny niż mniejsze ilości kinazy. Fakt ten jest zresztą opisywany przez wielu autorów (3), (9), (32).

Równoległe z powstaniem plazminy z plazminogenu przebiega reakcja inaktywacji plazminy. Fakt ten dał się zauważyć we wszystkich preparatach plazminy, powstałych drogą aktywacji streptokinazą, a również dotyczy on plazminy samoistnie aktywnej oraz powstałej przez aktywację plazminogenu, trypsyną.

We wszystkich doświadczeniach zauważono, że im większa jest wyjściowa czynność plazminy, tym szybciej następuje spadek jej aktywności

w czasie inkubacji w temp. 37°C. Zjawisko to było niezależne od układu doświadczenia z różnymi, zmiennymi, doprowadzającymi do maksymalnej aktywności (stężenie P, stężenie S, stężenie trypsyny, stężenie samoistnie czynnej plazminy, pH, temperatura). Nie znaleziono substancji zapobiegającej inaktywacji plazminy, która by jednocześnie nie hamowała czynności fibrynolitycznej tego enzymu. Badane substancje (wykres 5) hamują zarówno czynność fibrynolityczną plazminy jak i jej inaktywację. Są to inhibitory plazminy (siarczan miedzi) i jej substraty (kazeina, globina).

Inaktywacji plazminy towarzyszy przyrost niebiałkowych produktów rozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym. Te wszystkie fakty składają się do wysunięcia hipotezy, że inaktywacja plazminy jest procesem enzymatycznym. Mechanizm tej inaktywacji tłumaczyłaby koncepcja istnienia w preparatach plazminy dwu enzymów — jednego o czynności fibrynolitycznej, drugiego o czynności proteolitycznej; wzajemne oddziaływanie tych dwóch enzymów prowadziło do inaktywizacji (6), (25), (26), (33).

We wszystkich doświadczeniach stwierdzono przyrost rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym tyrozyny i to zarówno w czasie narastania aktywności w układzie S i P, jak i w miarę spadku aktywności plazminy aktywowanej samoistnie i streptokinazą. Wobec złożoności układów doświadczalnych i niejednorodności preparatów, nie można określić, skąd pochodzi przyrost niebiałkowych produktów.

Z opisanych obserwacji można wyciągać pewne wnioski dotyczące metody oznaczania streptokinazy, plazminogenu i plazminy: 1) optymalny czas inkubacji plazminogenu i streptokinazy powinien wynosić od 3 — 5 minut., w temp. 37°C; 2) optymalne stężenie streptokinazy wynosi od 100 do 800 jednostek na 1 ml; 3) przy oznaczaniu jednostek plazminy i streptokinazy powinno się przyjąć jako kryterium krótkie czasy lizy (10 min.); 4) przy porównawczym oznaczaniu aktywności preparatów plazminogenu należy uwzględnić stopień ich oczyszczenia, gdyż towarzyszące białka mogą wpływać w sposób nieswoisty na wynik oznaczenia fibrynolizy.

Streszczenie

I. Otrzymano własną metodą preparaty plazminogenu i streptokinazy.

II. Badano kinetykę reakcji pomiędzy plazminogenem i streptokinazą

III. Obserwacje i wnioski:

1. Optymalne stężenie streptokinazy wynosi od 160 do 800 jed. na 1 ml. Przy nadmiarze i niedomiarze streptokinazy powstaje mniejsza czynność plazminy.

2. Mniejsza aktywność plazminy przy stosowaniu do aktywacji plazminogenu nadmiaru streptokinazy jest uwarunkowana obecnością inhibitora w preparatach streptokinazy.
3. Optymalny czas reakcji streptokinazy z plazminogenem przy inkubacji tych substancji wynosi, zależnie od ich stężenia od 0 do 20 minut (temp. 37°C).
4. W niższych temperaturach (10°C) aktywacja plazminogenu streptokinazą przebiega znacznie wolniej niż w temp. 37°C.
5. W czasie reakcji streptokinazy z plazminogenem stwierdzono przyrost tyrozyny rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym.
6. Plazmina szybko ulega inaktywacji w temp. 37°C.
7. Szybkość inaktywacji plazminy jest wprost proporcjonalna do wyjściowej jej aktywności.
8. W temperaturach 10 i 20°C szybkość inaktywacji plazminy jest mniejsza niż w temp. 37°C.
9. Optimum pH dla inaktywacji plazminy leży w zakresie pH 7,5 — 8,1 tj. przy pH optymalnym dla aktywności plazminy.
10. Inaktywacji plazminy towarzyszy również przyrost tyrozyny rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym.
11. Obecność białek takich jak kazeina i globina chroni plazminę od inaktywacji, hamując jednocześnie czynność fibrynolityczną plazminy.
12. Dodatek CuSO_4 ($2 \cdot 10^{-4}$ M) hamuje czynność plazminy i zarazem zapobiega częściowo jej inaktywacji.
13. Streptokinaza inkubowana razem z plazminogenem stopniowo traci swą czynność.
14. Porównano kinetykę aktywacji plazminogenu streptokinazą i trypsyną.
15. W dyskusji wysunięto hipotezę roboczą dotyczącą mechanizmu aktywacji plazminogenu i inaktywacji plazminy. Wypowiedziano się za enzymatyczną naturą obu procesów.

Podziękowanie

Autorzy dziękują laborantce Teresie Teper za techniczną współpracę.

LITERATURA

1. Astrup T., *Biochemical J.* **50** 5, (1951).
2. Astrup T., Permin M., *Nature* **159** 681, (1947).
3. Christensen L. R., *J. General Physiology* **30** 465, (1947).
4. Christensen L. R., *J. Clinical Investigation* **28** 163, (1949).
5. Christensen L. R., McLeod C. M., *J. General Physiology* **28** 559, (1945).

6. Clifton E. C., Cannamela D. A., *J. Applied Physiology* **6**, 42, (1953).
7. Delezenne C., Pozerski E., *Comptes Rendues Soc. Biol.* **55**, 690, (1903).
8. Ferguson J. H. *Some Experiences with Blood Clotting Mechanism w Blood Cells and Plasma Proteins* ed. by J. L. Tullis, New York, 1953.
9. Fletscher A. P., *Biochemical J.* **56**, 677, (1954).
10. Garner R. L., Tillet W. S., *J. Experimental Medicine* **60**, 255, (1934).
11. Gerheim E. B., Ferguson J. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**, 261, (1949).
12. Jackson H. D., Mertz E. T., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**, 827, (1954).
13. Kabat E. A., Mayer M. M., *Experimental Immunochemistry*, Springfield, Illinois, 1948.
14. Kribrick A. C., Blonstein M., *J. Biological Chemistry*, **176**, 983, (1948).
15. Kline D. L., *J. Biological Chemistry* **204**, 949, (1953).
16. Kocholaty W., Ellis W. W., Jensen H., *Blood* **7**, 882, (1952).
17. Kowalski E., Latałło Z., Niewiarowski S., (w druku).
18. Kowarzyk H., *Nature*, **169**, 614, (1952).
19. Kowarzyk H., Buluk K., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 35, (1954).
20. Kunitz M., *J. General Physiology* **22**, 293, 429 (1939).
22. Lewis J. H., Ferguson J. H., *Revue d'Hematologie* **7**, 6, (1952).
23. Millstone H., *J. Immunology* **42**, 109, (1941).
24. Mullertz S., Lassen M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82**, 264, (1953).
25. Niewiarowski S., *Acta Physiologica Polon.* **3**, 375, (1952).
26. Niewiarowski S., *Acta Physiologica Polon.* **4**, 231, (1953).
27. Northrop J. H., Kunitz M., Herriot R. M., *Crystalline Enzymes*, New York, 1948.
28. Ratnoff O. D., *J. Experimental Medicine* **87**, 211, (1956).
29. Remmert L. M., Cohen P. P., *J. Biological Chemistry* **181**, 431, (1949).
30. Seegers W. H., *Blood Coagulation Enzymes* pod red. Sumnera i Myrbacka t. 1, cz. 2, str. 1108, New York, 1951.
31. Sherry S., *J. Clinical Investigation* **33**, 1054, (1954).
32. Tillet W. S., Johnson A. J., Mc Carty R., *J. Clinical Investigation* **34**, 169, (1955).
33. Trol W., Sherry S., *J. Biological Chemistry* **213**, 881, (1955).
34. Wassermann A. E., *Archives of Biochemistry and Biophysics* **4**, 158, (1952).

ПЛАЗМИНОГЕН И ПЛАЗМИН

I. Исследования активации плазминогена и активизация плазмина

Резюме

I. Путем собственного метода получены препараты плазминогена и стрептокиназа.

II. Исследовалась кинетика реакции между плазминогенами и стрептокиназом.

III. Наблюдения и выводы::

1) оптимальная концентрация стрептокиназа лежит в пределах от 160 до 800 ед. на 1 мл. При избытке и недостатке стрептокиназа возникает уменьшенная активность плазмина;

2) меньшая активность плазмينا при применении, для активации плазминогена, избытка стрептокиназа обусловливается наличием ингибитора в препаратах стрептокиназа;

3) оптимальная продолжительность реакции стрептокиназа с плазминогеном при инкубации этих веществ заключается в зависимости от их концентрации, в пределах от 0 до 20 минут (т. 37°C);

4) в низших температурах (10°C) активация плазминогена стрептокиназом протекает значительно медленнее, чем при т. 37°C;

5) во время реакции стрептокиназа с плазминогеном обнаружено было приращение растворимого в трихлоруксусной кислоте пирозина;

6) плазмин быстро подвергается инактивированию в т. 37°C;

7) скорость инактивирования плазмينا прямо-пропорциональна его исходной активности;

8) в температурах 10°C и 20°C скорость инактивирования плазмينا меньше, чем в температуре 37°C;

9) оптимум pH для инактивирования плазмينا лежит в пределах pH 7,5 — 8,1, т.е. при оптимальном для активности плазмينا pH ;

10) инактивированию плазмينا сопутствует также приращение пирозина, растворимого в трихлоруксусной кислоте;

11) наличие таких белков, как казеин и глобин предохраняет плазмин от инактивирования, тормозя одновременно фибринолитическую деятельность плазмينا.

12) добавление $CuSO_4$ ($2 \cdot 10^{-4}M$) тормозит активность плазмينا и одновременно предотвращает частично его инактивацию;

13) стрептокиназ инкубированный вместе с плазминогеном постепенно теряет свою активность;

14) произведено сравнение кинетики активации плазминогена посредством стрептокиназа и трипсина;

15) в дискуссии обсуждалась рабочая гипотеза, касающаяся механизма активирования плазминогена и инактивирования плазмينا. Был установлен энзиматический характер обоих процессов.

PLASMINOGEN AND PLASMINE

S u m m a r y

I. Plasminogen and plasmin preparations were obtained by the authors original method.

II. The kinetics of the plasminogen-streptokinase reaction is discussed.

III. Observations and results:

1) The optimal concentration of streptokinase is from 160 to 180 units per 1 ml. Both an excess and a deficiency of streptokinase decrease the plasmin activity.

2) Smaller plasmin activity, while using an excess of streptokinase for plasminogen activation, was caused by the inhibitor present in the streptokinase preparations.

3) Optimal streptokinase-plasminogen reaction time during the incubation of these substances varies from 0 to 20 minutes (at 37°C.), depending on the concentration of the reagents.

4) At lower temperature (10°C) plasminogen activation by streptokinase is much slower than at 37°C.

5) During the streptokinase-plasminogen reaction an increase of tyrosine soluble in trichloroacetic acid, was noted.

6) Plasmin was quickly inactivated at 37°C.

7) The inactivation rate of plasmin is proportional to its original activity

8) At 10° and 20°C. the inactivation rate of plasmin is not as great as at 37°C.

9) The optimum pH for plasminogen inactivation lies between 7.5 and 8.1, resembling that of plasmin activity.

10) Inactivation of plasmin is associated with an increase of tyrosine soluble in trichloroacetic acid.

11) Such proteins as casein and globin protect plasmin from inactivation, inhibiting at the same time the fibrinolytic activity of plasmin.

12) An addition of CuSO_4 inhibits plasmin activity and partially prevents its inactivation.

13) Streptokinase incubated with plasminogen loses its activity stepwise.

IV. The kinetics of trypsin and streptokinase activation of plasminogen were compared.

V. A working hypothesis was suggested on the activation mechanism of plasminogen. The enzymatic character of both processes seemed the most probable to the authors.

EDWARD KOWALSKI, ZBIGNIEW LATAŁŁO, STEFAN NIEWIAROWSKI

PLAZMINOGEN I PLAZMINA

II. WŁYW JONÓW METALI NA CZYNNOSĆ PLAZMINY

Z pracowni Biochemii Klinicznej Instytutu Hematologii

Kierownik pracowni: Doc. dr E. Kowalski

Dyrektor Instytutu: Doc. dr A. Trojanowski

Wstęp

Celem niniejszej pracy było badanie zachowania się plazminy wobec jonów różnych metali. Zagadnienie to nie było dotąd przedmiotem badań za wyjątkiem spostrzeżenia Rosenmanna (9) o hamowaniu fibrynolizy w układzie nieoczyszczonym przez chlorek cynku.

W pracy naszej stwierdziliśmy hamujący wpływ jonów różnych metali ciężkich na plazminę. Najsilniejszymi inhibitorami okazały się sole miedzi i złota. Mechanizm działania jonów metali na plazminę starano się poznać bliżej na przykładzie soli miedzi.

Material i metody

1. Fibrynogen, trombinę, plazminogen (P) i trypsynę otrzymano jak w poprzedniej pracy (5).

2. Do aktywacji plazminogenu używano preparatu streptokinazy (S) „Distreptazy“ produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowicy i Szczepionek.

3. Czynność fibrynolityczną mierzono jak poprzednio (5), wyrażając wyniki we wskaźniku fibrynolitycznym $f = \frac{1000}{t}$ sek.

4. Bufory. Doświadczenia wykonywano bądź w układach zawierających bufor boranowy o pH = 7,8 bądź weronalowo-octanowy w zakresie pH od 6,25 do 9,2 izotoniczny z osoczem (7), bądź w układach niebuforowanych, jedynie doprowadzonych do pożądanego pH za pomocą NaOH

4 HCl. Doświadczenia z solami srebra rtęci i ołowiu przeprowadzono w środowisku nie zawierającym jonów Cl.

5. Badanie hamującego wpływu jonów metali. Badania te przeprowadzono w układzie:

0,25 ml streptokinazy (200 jedn/ml).

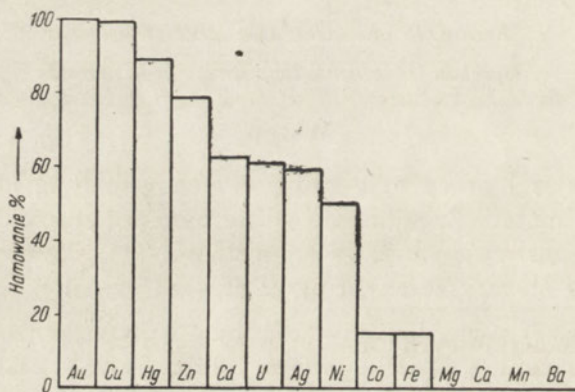
0,25 ml plazminogenu 3 min. inkubacji w 37°C

0,25 ml roztworu soli danego metalu lub buforu 3 min. inkubacji w 37°C

0,1 ml 0,1 % trombiny

0,8 ml 0,25% fibrynogenu

Czas rozpuszczenia skrzepu mierzono od momentu wiania fibrynogenu. Stopień zahamowania plazminy wyrażano przez porównanie wskaźnika fibrynolitycznego próbki kontrolnej ze wskaźnikiem fibrynolitycznym



Rys. 1. Hamowanie plazminy w % przez jony różnych metali (końcowe stężenie molowe metalu w układzie $3,3 \cdot 10^{-4}$ M)

próbki zawierającej jony badanego metalu. Wszystkie stężenia metali są podane w niniejszej pracy w molach i dotyczą układu: streptokinaza + plazminogen + metal. Wyniki doświadczeń kontrolowano przez pięciokrotne powtórzenie doświadczenia. Oznaczenia przeprowadzono w podwójnych próbkach. Różnice odczytów pomiędzy poszczególnymi próbkami nie przekraczały 10% wskaźnika fibrynolitycznego.

Część doświadczenia

1. Wpływ soli różnych metali na czynność plazminy. Jak wynika z wykresu 1, stwierdzono, że sole następujących ciężkich metali w dużych stężeniach hamują plazminę: Au⁺⁺⁺ (chlorek złota), Cu⁺⁺ (siarczan miedzi), U⁺⁺⁺⁺⁺ (octan uranylu), Hg⁺⁺ (octan rtęci, chlorek rtęci), Ag⁺ (azotan srebra), Ni⁺⁺ (siarczan niklu), Zn⁺⁺ (octan cynku, siarczan

cynku), Cd^{2+} (siarczan kadmu). Stężenia soli metali, przy których uzyskiwano 50% hamowania plazminy były rzędu 10^{-4} M. Znacznie mniejsze działania hamujące wykazały sole Co^{2+} (siarczan kobaltu) i Fe^{3+} (siarczan amonowo-żelazowy), odpowiednie wartości dla tych metali wynosiły około 10^{-3} M, oraz sole Mn^{2+} (siarczan manganu), Al^{3+} (chlorek glinu), Pb^{2+} (octan ołowiu). Rząd odpowiednich wartości wynosił 10^{-2} M. Należy zaznaczyć, że działanie hamujące soli tych ostatnich metali wiązało się niewątpliwie z wytrąceniem plazminy, ponadto interferowały one wyraźnie z krzepnięciem fibrynogenu, denaturując i wytrącając niekiedy fibrynogen. Natomiast jony metali, hamujące plazminę w stężeniu 10^{-4} M, nie wpływały w tym stężeniu na krzepnięcie, plazminę zaś wytrącały dopiero przy znacznie większych stężeniach (powyżej 10^{-3} M).

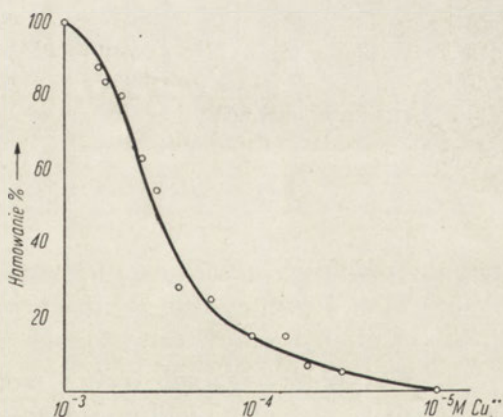
Praktycznie nie stwierdzono hamującego działania soli Ba^{2+} (chlorek baru) i Mg^{2+} (chlorek magnezu); Ca^{2+} (chlorek wapnia) nieznacznie hamuje dopiero w stężeniu 10^{-1} M. Nie znaleziono natomiast jonu metalu, który by aktywował plazminę. Stwierdzono również, że czynność tego enzymu po dializie wobec wody destylowanej w niskiej temperaturze jest w zupełności zachowana.

Stwierdzono, że sole miedzi, cynku, kadmu i rtęci hamują przy analogicznych stężeniach plazminę samoistnie czynną, jak i plazminę aktywowaną streptokinazą. Nie obserwuje się natomiast hamującego wpływu odpowiednich stężeń miedzi na fibrynolityczną czynność trypsyny.

2. Wpływ niemetalowych inhibitorów i aktywatorów na czynność plazminy. Celem stwierdzenia czy hamujące działanie soli metali zależy od zablokowania grup SH lub od wpływu na inne grupy czynne, zbadano wpływ innych inhibitorów i aktywatorów na czynność plazminy.

Stwierdzono, że inhibitory grup SH, jak amid kwasu monojodocytowego (stężenia od $3 \cdot 10^{-2}$ M), woda utleniona (stężenia $3 \cdot 10^{-1}$ M), salirgan, neoarsfenamina (stężenia $3 \cdot 10^{-3}$ M) nie hamują plazminy.

Również dotyczy to inhibitorów grup aminowych, takich jak formalina w stężeniu niższym niż $3 \cdot 10^{-2}$ M. Cjanek potasu (stężenia $3 \cdot 10^{-2}$ M) ani cysteina (stężenia $5 \cdot 10^{-2}$ M — $3 \cdot 10^{-3}$ M) nie powodują zahamowania aktywności plazminy. Natomiast albumina surowicy ludzkiej, wersen (stę-

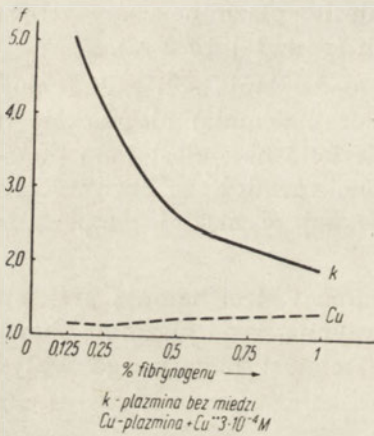


Rys. 2. Hamowanie plazminy przez miedź zależnie od jej stężenia molowego w układzie

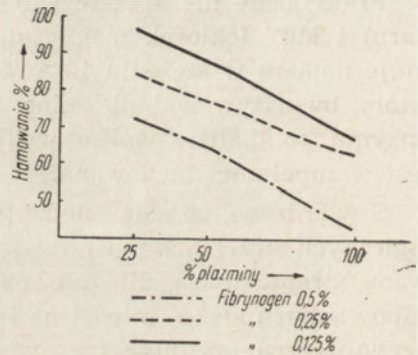
żenia 10^{-2} M — 10^{-3} M) i w mniejszym stopniu dietyloditiokarbaminian sodu aktywują czynność plazminy (wykres 5c).

3. **Wpływ różnych stężeń jonu Cu^{2+} na czynność plazminy.** Jak wynika z wykresu 2 stężenie jonu miedzi, całkowicie hamujące plazminę wynosi 10^{-3} M. Hamujący wpływ jonów miedzi zanika w tym układzie przy stężeniu 10^{-5} M.

4. **Wpływ czasu inkubacji z solami miedzi na czynność plazminy.** Hamujące działanie soli miedzi na plazminę przejawia się natychmiast po zmieszaniu obu substancji. Dalsza inkubacja jonów metali z plazminą nie powoduje większego zahamowania jej czynności w porównaniu z plazmi-



Rys. 3. Wpływ zmiany stężenia substratu na hamowanie plazminy miedzią
 (f — wskaźnik fibrynolityczny $\frac{1000}{t}$ sek)

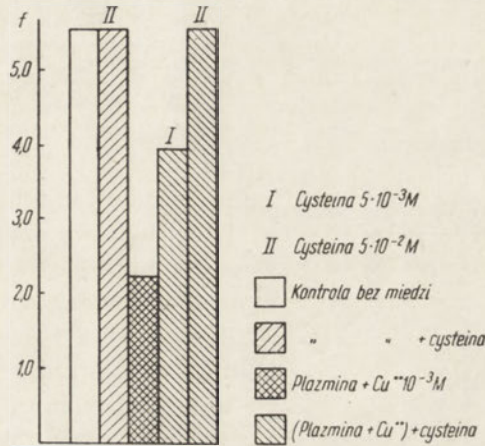


Rys. 4. Hamowanie plazminy w % zależnie od różnych stężeń enzymu i substratu przy stałym stężeniu miedzi = $3,3 \times 10^{-4}$ M (100% plazminy oznacza stężenie wyjściowego roztworu o zawartości 1% białka)

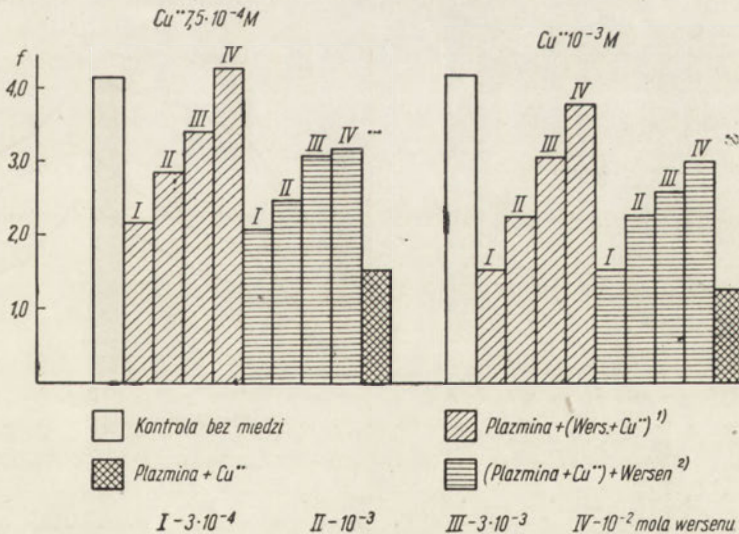
ną nie zawierającą soli metali, która jak wiadomo ulega samorzutnej inaktywacji. Również czas inkubacji soli miedzi z plazminogenem i streptokinazą nie ma wpływu na stopień zahamowania plazminy.

5. **Wpływ stężenia substratu i enzymu na hamowanie plazminy solami miedzi.** Przebadano wpływ soli miedzi na czynność plazminy przy stężeniach fibrynogeny od 0,125% — 1%. Wzrostowi stężenia fibrynogeny, jak wynika z wykresu 3, towarzyszy zmniejszenie stopnia zahamowania plazminy, co przemawiałoby za współzawodnictwem dwu białek o metal. Hamowanie solami miedzi, zależy również od stężenia plazminy. Przy zmniejszaniu stężenia plazminy i stałym stężeniu soli miedzi, stopień zahamowania czynności fibrynolitycznej nieco się zwiększa, co przemawia za stechiometryczną naturą hamowania (wykres 4).

Powyższe dane tłumaczą niewielkie różnice zależne od kolejności mieszania ze sobą substancji reagujących. W wypadku dodania soli miedzi do fibrynogenu, hamowanie jest nieco mniejsze, niż w wypadku dodania soli miedzi do plazminy, aczkolwiek stężenia miedzi w obu układach są jednakowe.

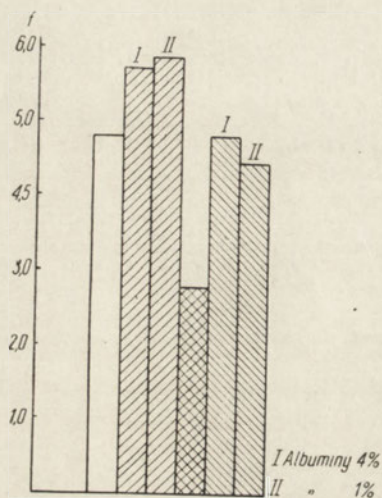


Rys. 5a. Reaktywacja plazminy hamowanej miedzią przez różne stężenia cysteiny (f — wskaźnik fibrynolityczny $\frac{1000}{t}$ sek)



Rys. 5b. Ochrona i reaktywacja plazminy hamowanej miedzią przez wersenen w różnych stężeniach: 1) do plazminy dodano miedź uprzednio zmieszaną z wersenem, 2) wersenen dodano po inkubacji z miedzią. Czas inkubacji z miedzią 3 min.

6. **Odwracalność hamowania i ochrona przed hamowaniem solami miedzi.** Hamowane plazminy solami miedzi jest reakcją odwracalną. Dodatek wersenenu, cysteiny lub dietyloditiokarbaminianu sodu do układu: plazmina + miedź, przywraca wyjściową czynność plazminy, o ile czas inkubacji powyższego układu nie przekroczył kilku minut. Stężenie czynnika, znoszącego hamowanie, musi być przynajmniej dziesięciokrotnie większe od stężenia inhibitora (wykres 5, a, b). Po dłuższym czasie inkubacji układu plazmina + miedź nie udało się odzyskać wyjściowej czynności po reaktywacji wersenem, co można tłumaczyć samorzutną inaktywacją plazminy. Stwierdzono, że plazmina inkubowana bez miedzi w 37°C szybko traci swą czynność, zaś dodatek wersenenu gorzej reaktywuje taką plazminę inkubowaną solami miedzi (5).



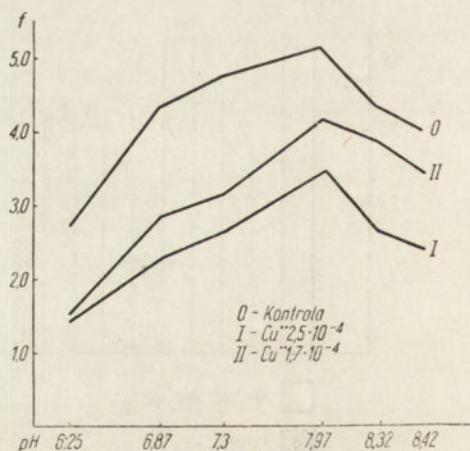
- Plazmina kontr.
- Plazmina + albuminy (bez miedzi)
- Plazm. + Cu $7,5 \cdot 10^{-4} M$
- Plazmina + albuminy + Cu $7,5 \cdot 10^{-4} M$

Rys. 5c. Wpływ dodatku albumin na aktywność plazminy i jej zahamowanie przez miedź

Rys. 6. Hamowanie plazminy przez miedź zależnie od pH (f — wskaźnik fibrynolityczny $\frac{1000}{t}$ sek)

Stwierdzono także, że dodatek albuminy osocza ludzkiego do omawianego układu powoduje zmniejszenie zahamowania plazminy; efekt ten jest ściśle zależny od stężenia dodanych albumin.

Dodatek siarczanu miedzi w stężeniu od $2,5 \cdot 10^{-4} M$ — $10^{-3} M$ do układu: osocze + streptokinaza + trombina nie



powodował zahamowania fibrynolizy, prawdopodobnie na skutek ochronnego działania białek.

7. **Hamowanie plazminy jonami miedzi w zależności od pH** (wykres 6).

Stwierdzono, że stopniowe zmniejszanie pH środowiska, począwszy od pH 7,5 powoduje zwiększanie stopnia zahamowania plazminy miedzią¹⁾. Efekt ten występuje wyraźniej w układach niebuforowanych, a doprowadzonych do odpowiedniego pH dodatkiem rozcieńzonego NaOH lub HCl, niż w układach zawierających bufor weronalowo-octanowy o żądanym pH.

Dyskusja

W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono hamujące działanie wielu metali ciężkich, przy czym wydaje się, że natężenie hamowania przez jony danego metalu stoi w pewnej zależności od miejsca, jakie zajmuje on w szeregu napięciowym metali. Przy próbie tłumaczenia działania metali na enzymy nasuwa się w pierwszym rzędzie ewentualny ich wpływ na grupy SH, jak to udowodniono dla szeregu enzymów. Wydaje się, że w wypadku plazminy można wyłączyć wpływ metali na grupy SH. Cały szereg specyficznych inhibitorów tych grup jak np. organiczne połączenia arsenu i rtęci, amid kwasu monojodooctowego, woda utleniona nie hamują czynności plazminy. Najbardziej prawdopodobnym tłumaczeniem hamowania jonów metali jest przyjęcie niespecyficzności ich działania. Stwierdzono, że jony niektórych metali hamujące plazminę, w wyższych stężeniach wytrącają ten enzym. Wytrącony enzym może być po odwirowaniu i rozpuszczeniu w wersenie prawie całkowicie reaktywowany. Wynika stąd, że proces wytrącania jest odwracalny i nie prowadzi do denaturacji białka. Nasuwa się przypuszczenie, że wytrącenie enzymu i jego hamowanie w roztworze przez sole metalu jest jednym i tym samym procesem, polegającym na agregacji cząsteczek enzymu. Można sobie wyobrazić, że sole metalu łączą się z grupami karboksylowymi i w ten sposób powodują jego agregację.



Takie połączenie się z grupami prawdopodobnie niefunkcjonalnymi enzymu mogłoby być bez efektu na czynność enzymatyczną, dopóki nie jest zajęta duża liczba grup karboksylowych lub nie zachodzi znaczna agregacja. Podobne zjawisko opisano przy acetylowaniu pepsyny. W tym wypadku pepsyna traci aktywność dopiero wówczas, gdy wprowadzono pewną ilość grup acetylowych (3).

¹⁾ Jeszcze bardziej efektowne wyniki uzyskano w doświadczeniach z hamowaniem jonami złota.

Jak widać z wykresu 6, obniżenie pH zmniejsza aktywność plazminy, co można by wiązać z agregacją cząsteczek w miarę zbliżania się do punktu izoelektrycznego. Przy hamowaniu metalem w niższym pH nakładają się oczywiście oba efekty hamowania.

W takim ujęciu działanie metalu na enzym mogłoby być reakcją jonową zachodzącą według prawa działania mas. Szybkość wiązania się soli metali z enzymem oraz zależność hamowania od stężenia obu składników reagujących, potwierdza tę hipotezę.

Należy zaznaczyć, że podobną hipotezę sformułował D o u n c e (2) odnośnie działania uranu na fosforylaze i trombinę.

Fibrynogen, albumina i cysteina posiadają zdolność wiązania jonów metali i dlatego w układach zawierających te substancje istnieje współzawodnictwo o metal między nimi a enzymem. Dlatego też substancje te częściowo chronią enzym od inaktywacji metalami. Ochronny wpływ białka tłumaczy brak hamowania miedzią fibryny w pełnym osoczu oraz pewne różnice w hamowaniu zależne od stopnia oczyszczenia preparatu.

Kolejność dodawania enzymu, metalu i substratu w stężeniach używanych w naszych układach doświadczalnych nie odgrywa istotniejszej roli, gdyż wytwarza się tak szybko równowaga między nimi, że różnice w działaniu nie są istotne. Natomiast białko dodane w znacznym nadmiarze chroni enzym od trującego działania metalu.

W nieumieszczonych w części doświadczalnej badaniach zajmowano się wpływem jonów metali na streptokinazę oraz na proteolityczne działanie plazminy. Niektóre jony metali hamują również czynność streptokinazy, a w wyższych stężeniach wytrącają ją. Badania te będą tematem osobnego doniesienia.

Według S m i t h a (10) trypsyna, chymotrypsyna i pepsyna nie wymagają obecności jonów metalu, warunkujących ich działanie. Natomiast niektóre enzymy tkankowe i roślinne (katepsyny i papainy) są aktywowane cysteiną i cjankiem, a hamowane jonami metali, które blokują grupy SH katepsyn i papain (6).

Działanie peptydaz z kolei jest uwarunkowane przez sole metali (Zn, Co, Fe, Mn, Mg).

Według tej klasyfikacji plazminę można by zaliczyć do tej samej grupy enzymów proteolitycznych, co trypsynę. Prawdopodobnie jednak istnieje szereg różnic w zachowaniu się trypsyny, chymotrypsyny i plazminy wobec jonów różnych metali. Jakby wynikało z badań N e u r a t h a (8) prowadzonych na syntetycznych substratach, Cd²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ nieco wzma-

¹⁾ Odmienne poglądy na to zagadnienie reprezentują B r e s l e r i R o s e n z w e i g (1), wg których kofermentem chymotrypsyny jest Mg, a trypsyny Cr.

gają, a Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} hamują czynność trypsyny i chymotrypsyny. W naszych doświadczeniach jony miedzi (stężenie $10^{-4}M$) nie hamowały a nawet aktywowały czynność fibrynolityczną trypsyny. Sprawa ta wymaga dalszych badań przy uwzględnieniu wpływu jonów metali na czynność plazminy wobec syntetycznych substratów (tj. estrów argininy i lizyny) i przy szerszym uwzględnieniu wpływu soli metali na hydrolizę trypsynową substratów biologicznych.

Sprawa wpływu jonów metali na fibrynolizę w żywym organizmie wymaga oddzielnych badań. Jest faktem godnym zastanowienia, że niektóre preparaty najsilniejszych inhibitorów plazminy tj. miedzi i złota są stosowane w leczeniu choroby gośćcowej. Staje się to tym bardziej interesujące, że streptokinaza i niektóre enzymy proteolityczne okazały się zdolne do wywołania podobnych zmian w mięśniu sercowym, jakie spotykamy w gościcu (4).

Streszczenie

Badano wpływ jonów różnych metali na czynność plazminy, uzyskanej drogą aktywacji streptokinazą oczyszczonych preparatów plazminogenu.

Stwierdzono hamujący wpływ jonów następujących metali: Au^{+++} , Cu^{2+} , U^{++++} , Hg^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , przy czym stężenie, przy których uzyskiwano 50% hamowania plazminy były rzędu $10^{-4}M$. Stwierdzono, że wersen aktywuje plazminę, zaś związki blokujące grupy SH nie hamują jej czynności.

Wykazano, że hamowanie plazminy jonami miedzi jest reakcją odwracalną, zależną od stężenia inhibitora, enzymu i substratu oraz pH.

Omówiono przypuszczalny mechanizm działania jonów metali na plazminę.

LITERATURA

1. Bresler S. E., Rosenzweig N. A., *Biochimia* **16** 84, (1951).
2. Dounce A. L., Tien Ho Lan, „The action of uranium on enzymes and proteins” w *Pharmacology and Toxicology of Uranium Compounds*, ed Voegtlin i Hodge, New York 1949.
3. Herriot R. M., Northrop J. H., *J. Gener. Physiology* **18** 35, (1934)
4. Kellner A., Robertson T., *J. Experimental Medicine* **99** 387, (1954).
5. Kowalski E., Latałło Z., Niewiarowski S. *Plazminogen i plazmina. I. Badania nad aktywacją plazminogenu i inaktywacją plazminy* (w druku).
6. Krebs H. A., *Biochemische Z.* **220** 289, (1930).
7. Michaelis L., *Biochemische Z.* **234** 139, (1931).
8. Neurath H., II Internazionale Congrès de Biochimie, *Symposium sur la biogènese des proteïns*, Paris 1952.

9. Rosenmann M., *Biochemische Z.* **129** 101, (1922).
 10. Smith E. L., *Proteolytic Enzymes in Enzymes* pod red. Sumnera i Myrbäckä. Т. I. Cz. 2. New York, 793, 1951.

ПЛАЗМИНОГЕН И ПЛАЗМИН

II. Влияние ионов металлов на активность плазмина

Резюме

Исследовалось влияние ионов различных металлов на активность плазмина, полученного путем активации стрептокиназом очищенных препаратов плазминогена.

Доказано тормозящее действие ионов следующих металлов: Cu^{2+} , U^{6+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , причем концентрации при которых получалось 50% задержки плазмина, принадлежали к ряду 10^{-4}M .

Доказано, что версен активирует плазмин, тогда как блокирующие соединения группы SH не тормозят ее активности.

Доказано, что задержка плазмина ионами меди является обратной реакцией, зависимой от концентрации ингибитора, энзима и субстрата, а также и от pH.

Обсуждался предполагаемый механизм воздействия ионов металлов на плазмин.

PLASMINOGEN AND PLASMINE

II. Influence of metallic ions on activity of plasmin

Summary

The effect of various metallic ions on plasmin activity was investigated — the plasmin being obtained from purified plasminogen preparations activated by streptokinase. The following ions inhibit plasmin activity: Au^{3+} , Cu^{2+} , U^{6+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} 50 percent inhibition is attained at 10^{-4}M concentration. Versen activates plasmin while the reagents which block SH groups do not show any inhibitory action.

The inhibition of plasmin by cupric ions is a reversible reaction, depending on the concentration of the inhibitor, the enzyme and the substrate; it relies also upon pH.

The possible mechanism of metallic ion action on plasmin is discussed.

WITOLD DRABIKOWSKI

**ZAWARTOŚĆ KREATYNY I FOSFOKREATYNY
W NARZĄDACH ŻĄBY***Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego**Kierownik prof. dr Wł. Niemierko**Warszawa, ul. Pasteura 3*

Od czasu klasycznych prac Fiske i Subbarow (14) i Eggleston'a (8) wiadomo, że fosfokreatyna stale występuje w mięśniach kręgowców. Ponadto stwierdzono jej obecność w układzie nerwowym (18), w elektrycznych organach ryb (3), w plemnikach (8, 17), oraz w jajach żabich (31). W innych narządach sprawa występowania fosfokreatyny nie była pewna.

Dawniejsze metody jej wykrywania polegały głównie na oznaczaniu fosforu. Z różnicy między tzw. fosforem labilnym a fosforem „prawdziwie” nieorganicznym, strącającym się magnezem lub wapniem obliczono ilość fosforu pochodzącego z rozpadu fosfokreatyny. W wypadku niskiego stężenia fosfokreatyny różnice te były bardzo nieznaczne i uzyskana wartość P-fosfokreatyny mogła być obciążona dużym błędem. Dlatego podawane przez niektórych autorów dane dotyczące występowania śladowych ilości fosforu fosfokreatyny w różnych narządach były poddawane w wątpliwość i na ogół przyjmowano, że występująca wszędzie w niewielkim stężeniu kreatyna znajduje się w stanie wolnym.

W ostatnich latach prócz zastosowania chromatografii bibułowej do rozdzielania fosfokreatyny i kreatyny (12) opracowano dwie dokładne, a zarazem czułe metody, pozwalające na wykrycie bardzo nieznacznych ilości fosfokreatyny. Jedną z tych metod (Aleksiejewa (2)) polega na oznaczaniu kreatyniny powstałej z fosfokreatyny w wyniku działania kwasu molibdenowego. Wolna kreatyna nie daje kreatyniny w tych warunkach. Druga metoda opiera się na opracowanej przez Eggletona i wsp. (9) oraz Ennora i Stockena (10) kolorymetrycznej metodzie oznaczania kreatyny w reakcji z dwuacetylem i α -naftolem. Reakcja ta jest specyficzna dla N,N' — asymetrycznych dwupodstawionych pochodnych

guanidyny z wolną drugą grupą aminową (21). Fosfokreatyna reakcji tej więc nie daje, a alkaliczne środowisko w trakcie oznaczania zapewnia jej stabilność. Ennor i Rosenberg (11) przystosowali powyższą metodę również i do oznaczania fosfokreatyny. W jednej próbie oznacza się kreatynę wolną, w równoległej, po łagodnej hydrolizie, kreatynę całkowitą. Z różnicy otrzymuje się zawartość kreatyny związanej z fosforem. Dzięki zastosowaniu powyższych metod udało się Aleksiejewej (2) oraz Ennorowi i Rosenbergowi (11) wykazać obecność fosfokreatyny w niektórych narządach ssaków.

Celem niniejszej pracy było zbadanie występowania fosfokreatyny w narządach żaby. Do badań użyto metody Ennora i Rosenberga (11), która ma pewną przewagę nad metodą Aleksiejewej, gdyż pozwala na równoczesne oznaczenie obok fosfokreatyny również kreatyny całkowitej. Tymczasowe doniesienie z tej pracy zostało opublikowane w pracach IV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (5).

Metodyka

Do badań używano żab *Rana esculenta* przechowywanych w laboratorium. Doświadczenia wykonywano w okresie od 15.II do 15.IV. Żaby były powoli oziębiane do temp. od -10° do -12° metodą Niemiery i wsp. (24), a następnie poszczególne narządy były preparowane bez uprzedniej dekapitacji zwierzęcia. Jedynie krew pobierano z żab będących pod narkozą eterową. Narządy wrzucono do oziębionych mieszaniną mrożącą homogenizatorów typu Potter, Elvehjem'a, uprzednio starowanych. Całość szybko ważono, homogenizowano z oziębionym kwasem trójchlorooctowym i sączono przez oziębiony lejek. Przesącz zubożniano 5N ługiem sodowym. Przy sporządzaniu wyciągów z żołądków i skóry konieczne było zamiast homogenizowania rozcieranie w mózdzierzu z piaskiem i kwasem trójchlorooctowym. W wyciągach ze skóry po zubożnieniu powstawał strąk, który osączało. Kości były rozcierane w mózdzierzu z kwasem trójchlorooctowym. Wytracone w bezbiałkowym przesączu po zubożnieniu fosforany wapnia odsączało.

Używano odczynników i stężeń wg Eggletona i wsp. (9), stosując jako inhibitor grup-SH kwas p-chlorortęciobenzoesowy (10). Jedynie zamiast roztworu ługu sodowego z węglanem sodu używano w późniejszej serii doświadczeń polecany przez Abelina i Raafleuba (1) roztwór ługu bez sody. Dwuacetyl otrzymywano z dwumetyloglioksymu metodą van Niela (23). α -Naftol oczyszczano przez destylację z parą wodną. Kwas p-chlorortęciobenzoesowy syntetyzowano metodą Whitmore i Woodward (30). Standardowy roztwór kreatyny sporządzano z wodzianu kreatyny, otrzymywanego przez przekrystalizowanie kreatyny z wody.

Pomiar kolorymetryczny przeprowadzono na absorpcjometry Spekera przy użyciu filtra zielonego OG 1.

Część doświadczalna i omówienie wyników

Zbadano występowanie kreatyny i fosfokreatyny w następujących narządach żaby w stanie spoczynku: w mięśniach prążkowanych (*m. gastrocnemius*), mięśniach gładkich, (żołądka), sercu mózgu, wątrobie, płucach, nerkach, jajnikach z jajami, jądrach, skórze, kościach długich (goteniowej i udowej) oraz we krwi.

Część uzyskanych wyników dla mięśni łydkowych podana jest przykładowo w tabelicy 1, dla innych narządów w tabelicy 2. Jak widać z tabelicy 1, w mięśniach prążkowanych całkowita zawartość kreatyny jest największa i wynosi średnio około 360 mg⁰/. Stężenie kreatyny w mózgu wynosi około 100 mg⁰/. Z kolei mięśnie gładkie, jądra i wątroba wykazują średnią zawartość około 50 mg⁰/. Nieco niższa jest zawartość kreatyny w kościach. W pozostałych narządach, takich jak serce, płuca, nerki, jajniki z jajami i skóra, stężenie kreatyny wynosi średnio około 25 mg⁰/. Najniższa zawartość kreatyny znajduje się we krwi.

Jak widać z przytoczonych danych fosfokreatyna występuje we wszystkich badanych narządach i organach. Procent kreatyny ufosforylowanej (stosunek kreatyny związanej z fosforem do całkowitej zawartości kreatyny) jest w mięśniach prążkowanych dość stały i waha się na ogół w granicach 50—60⁰/. Procent ten jest w płucach, jądrach i jajach również dość stały i wynosi przeciętnie do 40⁰/. Pozostałe narządy wykazują niższy i bardziej zmienny procent fosfokreatyny.

Porównanie otrzymanych w niniejszej pracy wyników z danymi z literatury nie zawsze jest możliwe. Kreatyna w mięśniach żab była wielokrotnie oznaczana, ale w innych narządach badano kreatynę głównie

Tablica I

Zawartość kreatyny i fosfokreatyny w mięśniach łydkowych żaby (w odniesieniu na świeżą masę)

Kreatyna		% Kreatyny związanej	P-fosfo- kreatyny mg %
całko- wita mg %	związa- na mg %		
405	232	57,3	54,8
346	143	41,6	33,7
369	189	51,2	44,6
344	210	61,0	49,6
390	265	67,7	62,5
387	221	57,1	52,2
279	176	63,1	41,5
350	187	53,4	44,1
355	205	57,7	48,4
394	186	47,2	43,9
395	241	61,1	56,9
339	158	46,7	37,3
375	217	57,9	51,2
372	181	48,6	42,7
288	161	55,7	37,8
386	262	67,6	61,8

T a b l i c a 2
Zawartość kreatyny i fosforokreatyny w narządach żaby (w odniesieniu na świeżą masę)
(dane dotyczące mięśni prądkowanych podane są w tablicy 1)

Narząd	Kreatyna		P-fosfokre- atyny mg %	Narząd	Kreatyna		P-fosfokre- atyny mg %	Kreatyny % związanej	P-fosfokre- atyny mg %
	całkowita mg %	związana mg %			całkowita mg %	związana mg %			
Żołądek	36,2	6,3	1,5	Nerki	28,4	3,0	10,5	0,7	
	40,8	10,3	2,4		31,3	9,6	20,7	2,2	
	50,8	20,1	4,7		38,3	10,1	26,3	2,4	
Serce	58,7	9,3	2,2	Jajniki z jajami	28,1	2,4	8,5	0,6	
	63,2	3,1	0,7		27,0	8,4	31,1	2,0	
	34,3	4,5	1,1		39,5	22,1	55,9	5,2	
Wątroba	17,1	4,0	0,2	Jądra	31,7	12,8	40,4	3,0	
	17,4	2,9	0,9		24,9	9,1	36,5	2,1	
	29,4	6,9	0,7		60,0	7,8	13,0	1,8	
Mózg	42,9	14,3	1,6	Skóra	53,1	25,8	48,5	6,1	
	47,7	9,2	3,4		47,5	20,0	42,5	4,7	
	55,1	7,2	2,2		54,9	19,9	36,2	4,7	
Płuca	33,4	10,6	1,7	Kości	26,7	3,9	14,5	0,9	
	35,4	11,6	2,5		23,8	2,1	8,8	0,5	
	125,5	9,5	2,7		25,2	4,1	16,3	1,0	
Krew	92,9	14,1	2,2	Krew	29,8	7,8	26,2	1,8	
	95,2	4,2	3,3		35,1	3,3	9,5	0,8	
	15,7	5,8	1,0		40,4	7,5	18,3	1,9	
	24,0	7,8	1,4		34,8	11,0	31,7	2,6	
	18,5	5,9	1,4		9,1	1,3	14,2	0,3	
	24,9	12,7	3,0		7,3	0,9	12,3	0,2	
	31,0	9,4	2,2		7,6	2,1	17,6	0,5	
					8,0	0,7	8,8	0,2	

u ssaków. To samo odnosi się i do wyników prac o zawartości fosfokreatyny. Ennor i Rosenberg oraz Aleksiejewa oznaczali stężenie fosfokreatyny tylko w narządach ssaków. Badania innych autorów, dotyczące występowania fosfokreatyny poza mięśniami były również przeprowadzane na ssakach. Dane w literaturze dotyczące jej zawartości podawane były zazwyczaj w stężeniu fosforu. Celem porównania ich z wynikami niniejszej pracy podano w tablicach 1 i 2 ilości fosfokreatyny przeliczone na fosfor.

Znajdowana zawartość kreatyny w mięśniach prążkowanych żaby wykazuje zgodność z literaturą (7), (19), (25). Podawane w literaturze ilości P-fosfokreatyny wynoszą do 67 mg % (4), (6), (13). Jak wynika z tabl. 1 jedynie maksymalne z uzyskanych ilości fosforu zbliżają się do tej wartości, natomiast większość wyników jest nieco niższa. Trzeba jednak zaznaczyć, że wyniki Ennora i Rosenberga (11) wykazują też raczej niższą zawartość P-fosfokreatyny niż dane z literatury z oznaczeń P-labilnego dla mięśni odpowiednich ssaków. Autorzy ci tłumaczą to ewentualnym nieilościowym straceniem P nieorganicznego i ewentualną obecnością w mięśniach innego, prócz fosfokreatyny, związku odszczepiającego P-nieorganiczny, w warunkach powszechnie stosowanych metod.

Znaleziona przez nas ilość całkowitej kreatyny w żołądku jest na ogół niższa od podawanych w literaturze danych dla mięśni gładkich u ssaków (2), (9), (16). Natomiast ilość fosfokreatyny jest nieco wyższa od danych innych autorów, którzy podawali je w ilościach labilnego P (2), (4), (8), (29).

Znalezione przez nas ilości kreatyny w sercu żaby wynoszą maksymalnie 34 mg %. Są one o wiele niższe niż stężenie kreatyny w mięśniu sercowym ssaków (2), (9), (10), (11). Ilości fosfokreatyny również są niższe od cytowanych w literaturze danych dla ssaków (2), (4), (8).

Ilości kreatyny znalezione w wątrobie są stosunkowo wysokie w porównaniu z przeciętną jej zawartością u ssaków, aczkolwiek u tych ostatnich obserwujemy równocześnie znaczne zmiany w zależności od gatunku (2), (10), (11), (16). Sprawa występowania fosfokreatyny w wątrobie była do tej pory sporna. Podczas gdy cały szereg autorów (Rapaport (27), Sacks (28)) nie znajdowało w niej odpowiadającego fosfokreatynie labilnego fosforu, to np. LePage i Umbreit (26) stwierdzali jego obecność. Dopiero Aleksiejewa (2) oraz Ennor i Rosenberg (11) stosując opracowane przez siebie metody wykazali niezbicie obecność fosfokreatyny w wątrobie. Ilości otrzymane przez nas pokrywają się z ilościami podawanymi przez tych autorów.

Stężenie kreatyny w mózgu żab pokrywa się z odpowiednimi danymi dla ssaków (1), (9), (10), (11), (16). Obecność fosfokreatyny w układzie

nerwowym stwierdzono już dawno. Ilości P-fosfokreatyny podawane przez innych autorów dla mózgu żab (Baldwin (4)) i mózgu ssaków (Kerr (18)) są wyższe od znalezionych przez nas. Powszechnie stosowane jest dziś do badań zamrażanie mózgu *in situ*, podczas gdy w niniejszej pracy preparowano mózg z żaby stosunkowo słabo zamrożonej. W wyniku dość długiego czasu preparowania być może nastąpił już częściowy rozpad fosfokreatyny. Z drugiej strony Ennor i Rosenberg stosując również technikę zamrażania *in situ*, ale oznaczając fosfokreatynę nie w postaci fosforu labilnego, uzyskiwali dla mózgu ssaków również liczby niższe, zbliżone do otrzymywanych przez nas. Być może i w tym wypadku na dane poprzednio cytowanych autorów (4), (18), mają wpływ ewentualne wady najczęściej przyjętych metod oznaczania P-labilnego.

Otrzymana zawartość kreatyny w płucach i nerkach żaby jest nieco wyższa od danych dla ssaków (2), (9), (10), (16). Obecności fosfokreatyny w nich nie stwierdzono (8). Niniejsza praca potwierdza obecność w płucach i nerkach fosfokreatyny wykazanej przez Aleksiejewą (2) oraz Ennora i Rosenberga (11).

W jajnikach wypełnionych jajami znaleźliśmy większą zawartość kreatyny całkowitej, jak i fosforu pochodzącego z fosfokreatyny, niż Zieliński (31) w jajach żabich.

Jądra żab zawierają stosunkowo niskie zawartości kreatyny w porównaniu ze ssakami (1), (2), (9), (10), (16), aczkolwiek Ennor i Rosenberg (11) znaleźli bardzo duże różnice w ilości kreatyny zależnie od gatunku ssaków. Mimo niskiej zawartości kreatyny w jądrach żab ilości fosforu odpowiadające znalezionej przez nas fosfokreatynie są o wiele wyższe od podawanych liczb dla ssaków (4), (8), (11).

Znalezione przez nas ilości kreatyny w skórze żab są niższe od danych dla ssaków (16). Danych o zawartości fosfokreatyny w skórze nie znaleziono w dostępnej literaturze, również nie znaleziono danych co do obecności kreatyny i fosfokreatyny w kościach. Monetti (22) badając frakcje fosforowe kości szczurów stwierdził brak w nich fosfokreatyny. Być może kreatyna zawarta jest wyłącznie w szpiku, co wydaje się jednak mało prawdopodobne, gdyż stężenie jej byłoby tam zbyt duże.

Lutwa k-Man (21) oznaczając frakcje fosforowe w szpiku stwierdziła występowanie tam fosforu „oznaczalnego bezpośrednio molibdenianem“, nie zajmowała się jednak zbadaniem, czy chodzi tu o P-nieorganiczny, czy też P pochodzący z fosfokreatyny.

Znalezione przez nas wartości kreatyny we krwi żab są wyższe, niż podawane dla ssaków (16). Sprawa obecności fosfokreatyny we krwi była sporna. Niektórzy autorzy nie znajdowali jej tam w ogóle (8), inni stwierdzali występowanie nieznacznych jej ilości (15), (16).

Fosfokreatynę ujmowaną jako procent kreatyny całkowitej można porównać jedynie z wynikami Ennora i Rosenberga (11) oraz częściowo i Aleksiejewej (2). Procent ten, otrzymywany przez nas jest, przeciętnie biorąc, wyższy, niż w danych powyższych autorów. Prócz tego, szczególnie w mięśniach oraz w jajach, płucach i jądrach uzyskano mniejszy rozrzut procentowej zawartości fosfokreatyny w porównaniu z powyższymi autorami. Jest to być może wynikiem stosowania w niniejszej pracy techniki stopniowego oziębiania całego zwierzęcia, co niewątpliwie wstrzymuje procesy rozpadowe.

W celu sprawdzenia czy fosfokreatyna nie ulega częściowemu rozpadowi już w czasie odbiałczania kwasem trójchlorooctowym (Baldwin (4)) wykonano oznaczenia jej w mięśniach przy zastosowaniu innych metod odbiałczania.

Przeprowadzono oznaczenia fosfokreatyny w wyciągach mięśni łydkowych żaby odbiałczanych siarczanem amonu lub litu oraz w wyciągach nieodbiałczonych, przyrządzanych przy użyciu roztworu soli sodowej kwasu p-chlorortęciobenzoowego lub roztworów buforowych o pH 8—9. Uzyskane wyniki porównywano z danymi analiz mięśni równoległych odbiałczanych kwasem trójchlorooctowym. Wyniki wskazują, że niezależnie od sposobu przyrządzania wyciągów z mięśnia otrzymuje się taki sam procent kreatyny ufosforylowanej. Fakt, że i w alkalicznym środowisku wyciągów otrzymano taką samą procentową zawartość fosfokreatyny co i w środowisku kwaśnym w 0° wskazuje na to, że oziębiony kwas trójchlorooctowy prawdopodobnie nie wywołuje rozpadu fosfokreatyny i otrzymane przez nas wyniki odpowiadają stanowi w mięśniu spoczynkowym.

Dotychczas przyjmowano zazwyczaj, że fosfagen występuje wyłącznie w mięśniach, układzie nerwowym i produktach organów płciowych. Stwierdzenie jego obecności w całym organizmie, nawet w narządach, gdzie natężenie procesów energetycznych nie ulega tak znacznym wahaniom jak w mięśniach, przyczyni się być może do pełniejszego zrozumienia jego znaczenia fizjologicznego.

W trakcie wykonywania niniejszej pracy autor korzystał ze stypendium Komisji Popierania Twórczości Naukowej i Artystycznej przy Prezydium Rady Ministrów.

Streszczenie

Oznaczano kreatynę i fosfokreatynę metodą Ennora i Rosenberga (11) w szeregu narządów żaby *Rana esculenta*. Zawartość kreatyny w mięśniach gładkich, sercu i jądrach jest niższa niż u ssaków, natomiast we krwi wyższa.

Fosfokreatynę wykryto we wszystkich badanych narządach. W mięśniach ilości jej wynoszą średnio 50—60% całkowitej kreatyny. W płucach, jądrach i jajnikach procent ten wynosi przeciętnie 40%. W pozostałych badanych narządach jest on niższy i dość zmienny.

LITERATURA

1. Abelin L., Raaflaub J., *Biochem. Z.* **323**, 382, 1952.
2. Aleksiejewa A. M., *Biochimia* **16**, 97, 1951; **17**, 119, 427, 1952.
3. Baldwin E., *J. Exp. Biol.* **10**, 212, 1933.
4. Baldwin E., *Dynamic Aspect of Biochemistry* Cambridge Univ. Press 1952.
5. Drabikowski W., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 611, 1954.
6. Dubuisson M., *Arch. Intern. Physiol.* **52**, 439, 1942 cyt. wg *Ber. Physiol.* **132**, 119.
7. Duliere W., *Biochem. J.* **23**, 921, 1929.
8. Eggleton P. i Eggleton G. P., *Biochem. J.* **21**, 190, 1927; *J. Physiol.* **68**, 193, 1929.
9. Eggleton P., Eldsen S. R., Gough N., *Biochem. J.* **37**, 526, 1943.
10. Ennor A. H., Stocken L. A., *Biochem. J.* **42**, 557, 1948.
11. Ennor A. H., Rosenberg H., *Biochem. J.* **51**, 606, 1952.
12. Epsztein I. i Fomina M., *Biochimia* **15**, 321, 1950.
13. Fenn W. O., w *Tabulae Biologicae* V. XIX Pars 2, str. 351.
14. Fiske C. H. i Subbarow Y., *Science* **65**, 401, 1927; *J. Biol. Chem.* **81**, 629, 1929.
15. Goebel O., Janda, *Z. Kinderklin.* **63**, 534, 1942, cyt. wg FIATT Review.
16. Guggenheim M., *Die Biogenen Amine*, Basel 1951, str. 353.
17. Iliasow J., *Orenburg Wet. Inst.* **48**, 1933, cyt. wg *Physiol. Abstr.* **20**, 332, 1936.
18. Kerr S. E., *J. Biol. Chem.* **110**, 625, 1935.
19. Lenartz E., Jensen R., *Z. Physiol. Chem.* **271**, 275, 1941.
20. Lutwak-Mann C., *Biochem. J.* **49**, 301, 1951.
21. Mold J. D., Ladino J. M., Schantz E. J., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 6321, 1953.
22. Monetti G., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **16**, 725, 1941, cyt. wg *Ber. Physiol.* **129**, 307.
23. van Niel C. B., *Biochem. Z.* **187**, 472, 1927.
24. Niemierko W., Dydyńska M., Drabikowski W., Kałol I., Załuska H., *Acta Physiol. Pol.* **5**, 609, 1954.
25. Ochoa S., Grande F., Peraita M., *Biochem. Z.* **253**, 112, 1932.
26. Le Page G. A., Umbreit W. W., w W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, Minneapolis 1946, str. 160.
27. Rapaport S., Leva E., Quest G. M., *J. Biol. Chem.* **149**, 57, 1943.
28. Sacks J., *J. Biol. Chem.* **181**, 655, 1949.
29. Walaas O., Walaas E., *Acta Physiol. Scand.* **21**, 1, 1950.
30. Whitmore F. C., Woodward G. E., w *Organic Syntheses* New York V. **1**, str. 159.
31. Zieliński M. A., *J. Exp. Biol.* **14**, 48, 1937.

СОДЕРЖАНИЕ КРЕАТИНА И ФОСФОКРЕАТИНА В ОРГАНАХ ЛЯГУШКИ

Резюме

Креатин и фосфокреатин в органах лягушки *Rana esculenta* определялся по методу Эннора и Розенберга (11).

Процентное содержание всего количества креатина в икроножной мышце составляет в среднем 360 мг⁰/₀, в мозгу около 100 мг⁰/₀. В гладких мышцах, семенниках и печени обнаружено креатин в количестве около 50 мг⁰/₀. Содержание его в костях несколько меньшее. В сердце, легких, почках, яичниках и коже содержание креатина составляет около 25 мг⁰/₀. В крови содержание креатина составляет около 8 мг⁰/₀.

Содержание креатина в гладких мышцах, сердце и семенниках лягушки меньше, чем у млекопитающих, тогда как в крови оно больше.

Содержание фосфокреатина было обнаружено во всех исследуемых органах. В икроножных мышцах количество его составляет в среднем 50 — 60⁰/₀ всего количества креатина. В легких, семенниках и яичниках его количество составляет в среднем 40⁰/₀. В остальных исследуемых органах количество его меньше и довольно изменчиво.

THE CREATINE AND PHOSPHO-CREATINE CONTENT IN THE ORGANS AND TISSUES OF *RANA ESCULENTA*

Summary

The quantitative determination of creatine and phosphocreatine in the different organs and tissues of *Rana esculenta* has been carried out by the method of Ennor and Rosenberg.

The mean value of the total amount of creatine in the leg muscles is 360 mg.⁰/₀, in the brain — 100 mg.⁰/₀, in the smooth muscles, liver and testes — about 50 mg.⁰/₀, in the bones, lungs, kidneys, ovaries and skin — about 25 mg.⁰/₀, in the blood — only 8 mg.⁰/₀.

The concentration of creatine in the smooth muscles, the heart and the testes of frogs is lower than in the corresponding organs of mammals; contrary to this, the level of creatine in frog's blood is higher than in mammalian blood.

Phosphocreatine was found in all the investigated tissues. In the leg muscles it forms 50⁰/₀ to 60⁰/₀ of the total amount of creatine; in the lungs, testes and ovaries — about 40⁰/₀; in the other organs, the relative amount of phosphocreatine is lower and more irregular.

SPIS TREŚCI

J. K. Parnas, Prace wykonane w latach 1907—1939	3
I. Reifer, D. Kleczkowska, M. Solecka, Badania nad wpływem jaryzacji na aktywność niektórych enzymów w pszenicach ozimych	41
W. Tysarowski i S. Kwiek, Oznaczanie własności redukcyjnych układów biologicznych za pomocą kompleksu żelaza z kwasem etylenodwuaminoczeroctowym	55
B. Filipowicz, S. Golewski, K. Pilek, Skład kwasów rybonukleinowych trzustki prawidłowej	69
E. Kowalski, Z. Latałło, S. Niewiarowski, Plazminogen i plazmina I. Badania nad aktywacją plazminogenu i inaktywacją plazminy	87
E. Kowalski, Z. Latałło, S. Niewiarowski, Plazminogen i plazmina II. Wpływ jonów metali na czynność plazminy	109
W. Drabikowski, Zawartość kreatyny i fosfokreatyny w narządach żaby	119

